UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Aplicación de la tecnología de metabarcoding 16S rRNA para el análisis de la rizósfera de mora (*Rubus glaucus*) en cultivos de la provincia de Tungurahua

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación "Aplicación de Tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) en el Análisis de Contaminación Microbiana en Cuerpos Hídricos y en la Evaluación de Patógenos de Alta Prioridad", aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0294-R, por el Consejo de Investigación e Innovación de la Universidad Técnica de Ambato.

Autores: Lenin Apurimak Corrales Iza

Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero

Tutor: Dr. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato – Ecuador

Agosto – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 28 de junio de 2024



Dr. William Ricardo Calero Cáceres

17143448859

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Nosotros, Lenin Apurimak Corrales Iza y Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Lenin Apurimak Corrales Iza
0550245005
AUTOR



Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero
1850176064
AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación, o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Lenin Apurimak Corrales Iza
0550245005
AUTOR



Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero
1850176064
AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
ALEX FABIAN
VALENCIA SILVA

Presidente de Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MARIA DANIELA
GARCES MONCAYO

Mg. María Daniela Gárces Moncayo

1803571585

Firmado electrónicamente por:
HELENA MARITZA DE
LA TORRE OLVERA

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

1309651998

Ambato, 02 de agosto de 2024

DEDICATORIA

A Dios, mi refugio y fortaleza.

A mi familia, por su amor, esfuerzo y dedicación, que han moldeado mi personalidad.

A aquellos investigadores que me inspiraron a amar la biotecnología y a buscar siempre más allá de los límites del conocimiento.

A todas aquellas personas que alguna vez se sintieron limitadas y apartadas, les dedico este trabajo con la esperanza de que encuentren en él un motivo para seguir adelante.

"Nada en la vida debe ser temido, solo comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos." - Marie Curie.

Lenin Apurimak

DEDICATORIA

A Dios, por su infinita gracia y bendiciones. A mis padres, por su amor incondicional y constante apoyo. A mis mentores, por su sabiduría y guía incansable.

"En la ciencia, como en la vida, la curiosidad es la chispa que enciende el motor del progreso." Anónimo

A todos aquellos que creen en el poder transformador del conocimiento, esta tesis es para ustedes.

Con Amor

Lizbeth Andrea

AGRADECIMIENTO

Llegar a esta etapa final me significó un gran reto, atravesé momentos en los que sonreí mucho, en los que celebré mis triunfos y sin duda momentos en los que me daba por rendido, aquellos que aquí se encuentran me acompañaron e impulsaron durante todo este proceso, siempre estarán en mi corazón y en mis oraciones.

A Dios, mi guía y protector en quien hallo refugio y consolación, gracias por siempre darme la oportunidad de empezar de nuevo.

A mis padres, quienes a pesar de nuestras diferencias me permitieron elegir mi destino, acompañándome y defendiéndome, siempre agradecido por sus esfuerzos, a mi hermano Randy, que siempre encuentra admiración en lo que hago, tú confianza es fuente de motivación. El reconocimiento que alcance no solo será mío si no de los cuatro.

A mis confidentes, Cindy y Zule, siempre creyeron en cual alto podía llegar, me brindaron su apoyo y amistad incondicional, nunca tendré las palabras suficientes para agradecer todo lo que hicieron por mí, ansío el día en que los tres seamos colegas. A aquellas personitas especiales que conocí en este viaje Diego, Eve, Jenni, Kevin, Krystel, Meli, Moni, Naye, Wilma y Yahis, de ustedes me llevo consejos, anécdotas, experiencias y bonitos recuerdos, espero haber logrado lo mismo en ustedes.

A mi maestro y tutor PhD. William Calero, gracias por la confianza y paciencia depositada, el presente trabajo es el resultado de su apoyo y conocimiento. El Apurimak siempre estará agradecido.

A mi equipo UTA RAM One Health; a mis guías Ani y Mica, en quienes hallo admiración y gratitud, jamás olvidaré su confianza, apoyo y sobre todo consejos, siempre tendrán un lugar especial en mi corazón; a mis íntimos del lab Bry y Pame, a quienes considero mis grandes amigos, gracias por su compañía, risas y apoyo este último año, ojalá el destino nos vuelva a reunir; a la nueva generación de tesistas, les deseo suerte y éxitos en sus investigaciones.

Finalmente, gracias a mi compañera de guerra Andrea, una persona de carácter fuerte, responsable y de confianza, fundamental en el éxito de la presente investigación, en quien a más de encontrar una compañera encontré una amiga, me brindaste confianza, motivación y sobre todo paciencia.

! Lo logramos ¡

Eternamente agradecido con todos

Lenin Apurimak

AGRADECIMIENTO

Con gran emoción y gratitud,

Agradezco profundamente a DIOS, cuya guía y protección han sido mi luz en cada paso de este viaje.

A mis padres, Dacy y Johny, cuyo amor incondicional y sacrificios constantes han hecho posible que hoy esté aquí. Mamá, papá, ustedes han sido mi refugio y mi mayor fuente de inspiración. Gracias por creer en mí incluso cuando yo mismo dudaba.

A mis hermanos, Mathias y Valeria, gracias por su apoyo inquebrantable y por ser mi motivación diaria. Su amor y compañía han sido esenciales en cada momento de dificultad y celebración.

A mi tutor y maestro, PhD. William Calero. Gracias por la confianza depositada en mí, por su guía y por su invaluable apoyo durante todo este proceso. Su orientación ha sido crucial para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A mis personas especiales, Samuel, Key, Vivi y Naye, gracias por su amor, paciencia y por estar a mi lado en cada paso de este recorrido. Sus palabras de aliento y su presencia han sido mi fuerza en los momentos más desafiantes.

A mi amigo y compañero de guerra, Lenin, con quien logré llevar a cabo este trabajo de investigación. Gracias por tu dedicación, colaboración y por compartir conmigo cada desafío y éxito en este proyecto. Tu compañía ha sido invaluable en esta travesía.

A mis amigos y compañeros de trabajo, Pame y Brian, gracias por su amistad sincera y por compartir conmigo risas, desafíos y éxitos. Su compañía ha enriquecido esta experiencia de formas indescriptibles.

Gracias por los momentos compartidos y las lecciones aprendidas; cada uno de ustedes ha contribuido en mi crecimiento personal y académico.

Este logro no es solo mío, sino de todos nosotros.

¡Con todo mi corazón, gracias!

Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ..... **ii**

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN ..... **iii**

DERECHOS DE AUTOR ..... **iv**

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ..... **v**

DEDICATORIA ..... **vi**

DEDICATORIA ..... **vii**

AGRADECIMIENTO ..... **viii**

AGRADECIMIENTO ..... **ix**

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS ..... **x**

ÍNDICE DE TABLAS ..... **xii**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **xiii**

ÍNDICE DE ANEXOS ..... **xiv**

RESUMEN EJECUTIVO ..... **xv**

ABSTRACT ..... **xvi**

CAPÍTULO l. MARCO TEÓRICO **1**

1.1. Antecedentes Investigativo**s** **1**

1.1.1. Justificación 1

1.1.2. Generalidades de la mora 2

1.1.2.1. Descripción del género *Rubus spp.* 2

1.1.2.2. Presencia del género *Rubus* en Ecuador 2

1.1.2.3. Microbiota y microbioma vegetal 4

1.1.2.4. Factores que afectan el microbioma vegetal 5

1.1.2.5. Rizósfera como hábitat microbiano 6

1.1.2.6. Mecanismo de reclutamiento de comunidades microbianas 8

1.1.2.7. Composición del microbioma de la rizósfera 11

1.1.2.7.1. Alfa diversidad 11

1.1.2.7.2. Beta Diversidad 11

1.1.2.8. Caracterización del microbioma de la rizósfera 11

1.1.2.8.1. Tecnología de próxima generación (NGS) 11

1.1.2.8.2. Técnica de secuenciación Illumina 12
1.1.2.8.3. eDNA metabarcoding 14
1.1.2.8.4. Gen 16S rRNA 14
1.1.2.8.5. Región V3-V4 15
1.1.3. Predicción de los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas 17
1.1.3.1. Perfiles metabólicos 17
1.2. Objetivos 18
1.2.1. Objetivo general 18
1.2.2. Objetivos específicos 18
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA 19
2.1. Materiales 19
2.2. Métodos 21
2.2.1. Descripción de la diversidad y abundancia del microbioma asociado a la rizósfera de *R. glaucus.* 22
2.2.1.1. Recolección y procesamiento de la muestra 22
2.2.1.2. Extracción de ADN ambiental (eDNA) 24
2.2.1.3. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA 24
2.2.1.4. Análisis Bioinformático 25
2.2.1.5. Determinación de Alfa y Beta diversidad 25
2.2.2. Predicción del metabolismo de los taxones encontrados en el microbioma de la rizósfera asociada a *R. glaucus.* 27
2.2.2.1. QIIME2 27
2.2.2.2. EzBioCloud 27
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 29
3.1. Diversidad y abundancia de la microbiota asociada a la rizósfera de *R. glaucus* en cultivos provenientes de la provincia de Tungurahua. 29
3.2. Perfiles metabólicos de los taxones encontrados en el microbioma de la rizósfera asociada a *R. glaucus* en cultivos provenientes de la provincia de Tungurahua 48
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES 54
MATERIALES DE REFERENCIA 55
ANEXOS 76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de la mora de castilla o *R. glaucus* 3
Tabla 2. Reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto de titulación 19
Tabla 3. Material fungible necesarios para el desarrollo del proyecto de titulación 19
Tabla 4. Equipos de laboratorio empleados.....20
Tabla 5. Recursos bioinformáticos empleados 20
Tabla 6. Puntos de muestreo seleccionados.....23
Tabla 7. Características de las muestras de suelo analizadas 29
Tabla 8. Clasificación de especies según su viabilidad de cultivo, patogenicidad y beneficios para la planta *R. glaucus* 45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Provincias con mayor producción de mora.....3
Figura 2. Compartimientos principales que albergan al microbioma vegetal.....5
Figura 3. Factores que afectan el ensamblaje del microbioma vegetal.....6
Figura 4. Distribución y riqueza de microorganismos en diferentes zonas de la raíz.....7
Figura 5. Distribución y riqueza de microorganismos en diferentes zonas de la raíz.....8
Figura 6. Mecanismo de reclutación de comunidades microbianas mediada por exudados.....9
Figura 7. Reclutamiento de rizobacterias mediado por receptores MCP.....10
Figura 8. Proceso de secuenciación Illumina.....13
Figura 9. Estructura del gen 16S rRNA.....15
Figura 10. Ubicación geográfica de los puntos de recolección estudiados.....22
Figura 11. Procesamiento de muestras.....24
Figura 12. Proceso de análisis y comparación de perfiles taxonómicos.....25
Figura 13. Curva de alfa rarefacción.....30
Figura 14. Indicadores de diversidad alfa.....31
Figura 15. Diversidad beta en base al análisis de coordenadas principales.....34
Figura 16. Niveles de abundancia relativa.....36
Figura 17. Distribución de especies microbianas en diferentes muestras rizosféricas de *R. glaucus*..39
Figura 18. Core Microbiome.....40
Figura 19. Especies representativas en muestras rizosféricas de R. glaucus.....42
Figura 20. Abundancia a nivel de contribuciones relativas.....50
Figura 21. Heatmap a nivel de contribuciones relativas.....51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Control de calidad para la preparación de librerías 76
Anexo 2. Parámetros para preparación de librarías para el proceso de secuenciación 76
Anexo 3. Índices de diversidad alfa 77
Anexo 4. Test de significancia PERMANOVA 78
Anexo 5. Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGM) 79
Anexo 6. Niveles de abundancia relativa a nivel de clase 79
Anexo 7. Predicción de los perfiles metabólicos para cada réplica 80
Anexo 8. Comparación por replicas por cada punto a nivel metabólico 121
Anexo 9. Convenio de autorización para la toma de muestras por parte de ASOPROCAMOR 124

RESUMEN EJECUTIVO

Este estudio se enfoca en caracterizar la diversidad y abundancia de la microbiota asociada a la rizósfera de la mora, así como predecir el metabolismo de los taxones encontrados. Utilizando la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) y el análisis de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA, se logró identificar una amplia gama de taxones bacterianos predominados por Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. Los análisis de alfa y beta diversidad revelaron una alta diversidad microbiana en la mayoría de las localidades muestreadas, con variaciones significativas entre los puntos de muestreo, indicando la influencia de factores ambientales locales. Además, se realizaron predicciones funcionales de los perfiles metabólicos mediante herramientas avanzadas de bioinformática como PICRUSt2 y EzBioCloud, destacando la contribución de estas comunidades microbianas en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, carbono y azufre. Los resultados subrayan la importancia de la microbiota rizosférica en la salud del suelo y el crecimiento de *R. glaucus*, y sugieren su potencial para ser utilizada en estrategias de biocontrol y biofertilización. Este estudio no solo proporciona una comprensión más profunda de la ecología microbiana en cultivos de mora, sino que también ofrece el comienzo de futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en la gestión sostenible de cultivos agrícolas en la región de Tungurahua.

Palabras Clave: Metabarcoding 16S rRNA, Rizósferas, Diversidad microbiana, NGS, Bioinformática.

ABSTRACT

This study focuses on characterizing the diversity and abundance of the microbiota associated with the blackberry rhizosphere, as well as predicting the metabolism of the taxa found. Utilizing next-generation sequencing (NGS) technology and analysis of the hypervariable regions V3-V4 of the 16S rRNA gene, a wide range of bacterial taxa predominantly Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria were identified. Alpha and beta diversity analyses revealed high microbial diversity in most of the sampled locations, with significant variations between sampling points, indicating the influence of local environmental factors. Additionally, functional predictions of metabolic profiles were performed using advanced bioinformatics tools such as PICRUSt2 and EzBioCloud, highlighting the contribution of these microbial communities to the biogeochemical cycles of nitrogen, carbon, and sulfur. The results underscore the importance of rhizospheric microbiota in soil health and the growth of *R. glaucus* and suggest its potential for use in biocontrol and biofertilization strategies. This study not only provides a deeper understanding of microbial ecology in blackberry crops but also offers a foundation for future research and practical applications in sustainable agricultural management in the Tungurahua region.

Keywords: *Metabarcoding 16S rRNA, Rhizosphere, Microbial diversity, NGS, Bioinformatics*

CAPÍTULO l. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Justificación

El microbioma vegetal se define como una compleja colección de microorganismos, incluyendo sus genes y metabolitos, en asociación directa con las plantas. Este microbioma desempeña un papel crucial en la salud y productividad de las plantas, siendo esencial su análisis y comprensión para implementar prácticas agrícolas eficientes **(Trivedi *et al.*, 2020)**. Es importante destacar que la rizósfera, la zona del suelo en estrecha proximidad a las raíces de las plantas, es especialmente crítica ya que es aquí donde se dan interacciones intensas y fundamentales entre las raíces y su microbioma, influyendo significativamente en el crecimiento y la salud de las plantas **(Olanrewaju & Babalola, 2022)**. El avance de la biología molecular ha sido fundamental en la identificación de comunidades microbianas asociadas al suelo, ya que técnicas como la secuenciación de próxima generación (NGS) han permitido descubrir la vasta diversidad de microorganismos no cultivables que antes eran inaccesibles, revelando así la complejidad y la riqueza del microbioma del suelo que era previamente desconocida **(Lahlali *et al.*, 2021)**.

La mora (*R. glaucus*), perteneciente a la familia *Rosaceae*, es ampliamente consumida a nivel mundial por su delicioso sabor y su riqueza en fitoquímicos beneficiosos, destacándose las antocianinas, que contribuyen significativamente a sus propiedades antioxidantes **(Ramírez, 2023)**. En Ecuador, el rendimiento de mora alcanza aproximadamente 9.01 T/ha, con Cotopaxi liderando la producción nacional, seguido de Tungurahua representando el 70% del total **(INIAP, 2013; Feicán, 2019)**. A pesar de su importancia, el conocimiento acerca del microbioma de la mora y su potencial impacto en la salud y productividad del cultivo de mora es limitado.

Por lo que, de acuerdo a los antecedentes presentados, la presente investigación tiene como objetivo describir la riqueza y diversidad del microbioma asociado a la rizósfera de cultivos de mora (*R. glaucus*) presentes en la provincia de Tungurahua mediante el análisis del metabarcoding del gen 16S rRNA, con el fin de analizar las comunidades bacterianas presentes en la rizósfera de dicho cultivo; adicionalmente, se plantea la predicción de la composición funcional de aquellos taxones mediante la predicción de sus genomas para identificar si su presencia influyen en los ciclos biogeoquímicos clave y los perfiles metabólicos principales de la rizósfera.

1.1.2. Generalidades de la mora

1.1.2.1. Descripción del género *Rubus spp.*

Las zarzas, o zarzamoras (*Rubus* spp.) constituyen el género más representativo dentro de la familia de las *Rosáceas* **(Schulz *et al.*, 2019)**. Este género cuenta con más de 740 especies distribuidas en 12 subgéneros en todo el mundo **(Martins *et al.*, 2023)**. Las especies de *Rubus* crecen en forma de arbusto con brotes bienales que surgen de un sistema de raíces perennes **(Duan *et al.*, 2023; Sønsteby & Heide., 2023)**.

Estas plantas producen frutas clasificadas como drupecetum, es decir, agregados de drupas carnosas que se unen a un único receptáculo **(Wada *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2019)**. Dichas frutas son altamente valoradas en la industria alimentaria debido a su contenido de flavonoides, antocianinas, vitaminas, ácido elágico, taninos y polifenoles **(Huang *et al.*, 2023; Ladyzhenskaya *et al.*, 2023)**, los cuales les confieren propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas **(Gil *et al.*, 2023)**.
A pesar de la diversidad en el género *Rubus*, solo unas pocas especies están domesticadas para el cultivo, entre las más relevantes se encuentran *Rubus ideaus* L. (frambuesa), *Rubus occidentalis* (zarzamora negra), *Rubus chingii* Hu (zarzamora china), y *Rubus fruticosus* L. (zarzamora o mora común) **(Bhatt *et al.*, 2023)**. En Latinoamérica, destaca la especie *R. glaucus*, conocida comúnmente como mora de castilla, la cual es ampliamente cultivada por su valor económico y propiedades nutricionales **(Garrido *et al.*, 2020)**. La clasificación de los brotes de estas especies puede variar según su desarrollo, dividiéndose en erectas, semierectas y arrastradas **(Padmanabhan *et al.*, 2016)**.

1.1.2.2. Presencia del género *Rubus* en Ecuador

El cultivo de especies del género *Rubus* en Ecuador ha experimentado un notable crecimiento. Hasta el año 2016, el rendimiento de producción de moras alcanzó las 6.80 T/ha, en marcado contraste con las 2.19 T/ha registradas en el año 2000 **(Iza *et al.*, 2020)**, y para el año 2023 se obtuvo un rendimiento de 9.01 T/ha^{-1} por año **(Ministerio de Agricultura y Ganadería., 2023a)**. Entre las principales variedades comerciales cultivadas se encuentran Castilla, Andimora, Colombiana y Brazos **(Samaniego *et al.*, 2020)**. Sin embargo, al analizar la distribución de especies, se evidencia que *R. glaucus* **(Ver Tabla 1)**, conocida como mora de castilla, es la más predominante en el ámbito agrícola **(Garrido *et al.*, 2020)**. La mayor parte de la producción **(Ver Figura 1)** se concentra en la región de la Sierra, abarcando las provincias de Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua **(Alwang *et al.*, 2019)**. De estas provincias, Chimborazo, Bolívar y Cotopaxi destacan por su alto rendimiento en toneladas por hectárea **(Ministerio de Agricultura y Ganadería., 2023b)**.

El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias establecen que los frutos de *R. glaucus* son carnosos, de color morado oscuro a negro cuando están maduros, con un diámetro de 1 a 2 cm, sabor agridulce, y una textura jugosa. Estos frutos son ricos en antioxidantes, vitaminas, y compuestos fenólicos, como las antocianinas, que les confieren propiedades beneficiosas para la salud **(Viteri *et al.*, 2016).** Ecológicamente, *R. glaucus* muestra una gran adaptabilidad a diversas condiciones climáticas y de suelo, prosperando especialmente en zonas montañosas. Es resistente a varias enfermedades y plagas, lo que la hace ideal para el cultivo agrícola. Las condiciones de cultivo óptimas para *R. glaucus* incluyen altitudes entre 2000 y 3100 msnm, temperaturas promedio de 17 °C y una precipitación anual de 800 mm **(Iza *et al.*, 2020)**.

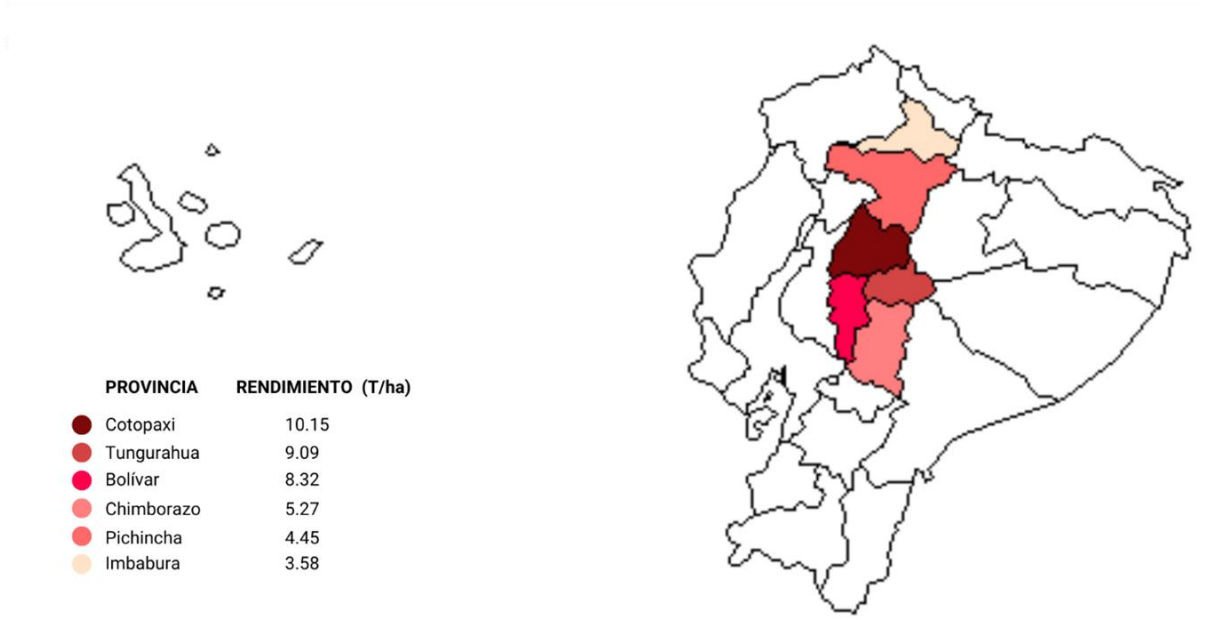


Figura 1. Provincias con mayor producción de mora

Nota: Figura realizada de acuerdo con la información presentada en el Boletín situacional del cultivo de mora del año 2023 en Ecuador (Ministerio de Agricultura y Ganadería., 2023), se destaca el rendimiento de producción en toneladas por hectárea para las seis provincias de mayor producción del género *Rubus*.

Tabla 1

Taxonomía de la mora de castilla o *R. glaucus*

Reino	*Vegetal*
División	*Antofita*
Clase	*Angiospermae*
Subclase	*Dicotyledoneae*
Orden	*Rosae*
Familia	*Rosaceae*

Género	*Rubus*
Especie	*glaucus*

Nota: Información obtenida de Feicán ***et al.*** (2019)

1.1.2.3. Microbiota y microbioma vegetal

Las plantas cohabitan e interactúan con comunidades diversas de microorganismos, que incluyen bacterias, arqueas, hongos y protistas **(Noman *et al.*, 2021)**. Estos microorganismos impactan directamente en el crecimiento, la resiliencia y la producción de las plantas **(Shi *et al*., 2023)**, dando así lugar a una conexión intrínseca entre huésped y su constituyente microbiano, entidad denominada holobionte **(Poupin *et al*., 2023)**, mismo que se encuentra constituido por la microbiota vegetal, que comprende todos los microorganismos asociados al huésped, o visto de una forma más compleja por el microbioma vegetal, el cual engloba al conjunto de microorganismos, genomas, hábitats y condiciones ambientales específicas que rodean a las plantas **(Pantigoso *et al*., 2022)**.

Esta asociación permite que aquellos microorganismos habiten la endósfera y la epísfera de los tejidos vegetales tanto aéreos como subterráneos **(Babalola et al., 2020)**, fitobiomas que permite interacciones de los microorganismos tanto con las plantas hospedantes (*interacción huésped - microbio*) como entre ellos mismos (*interacción microbio-microbio*), lo que lleva a interacciones entre y dentro del reino **(Chepsergon & Moleleki, 2023).** Comúnmente, las plantas no solo interactúan con una diversa gama de microorganismos, sino que también co – evolucionan con ellos, contribuyendo a la formación de un microambiente estable y equilibrado **(Shi *et al*., 2023)**.

Para lo cual las plantas brindan diversos nichos que los microorganismos pueden colonizar, incluyendo la filósfera, la endósfera y la rizósfera **(Ver Figura 2)**. La filósfera es la superficie aérea de las plantas donde habitan diversos microorganismos que influyen en la fisiología de la planta y su resistencia a enfermedades **(Mandal & Jeon, 2019)**. La endósfera, por su parte, incluye los tejidos internos de las plantas que albergan comunidades microbianas que mejoran el crecimiento y la salud de las plantas **(Dastogeer *et al.*, 2020)**. La rizósfera, en cambio es la región del suelo influenciada por las raíces, es un nicho crucial donde se forman relaciones simbióticas que afectan la absorción de nutrientes y la resistencia a patógenos **(Pantigoso *et al*., 2022)**.

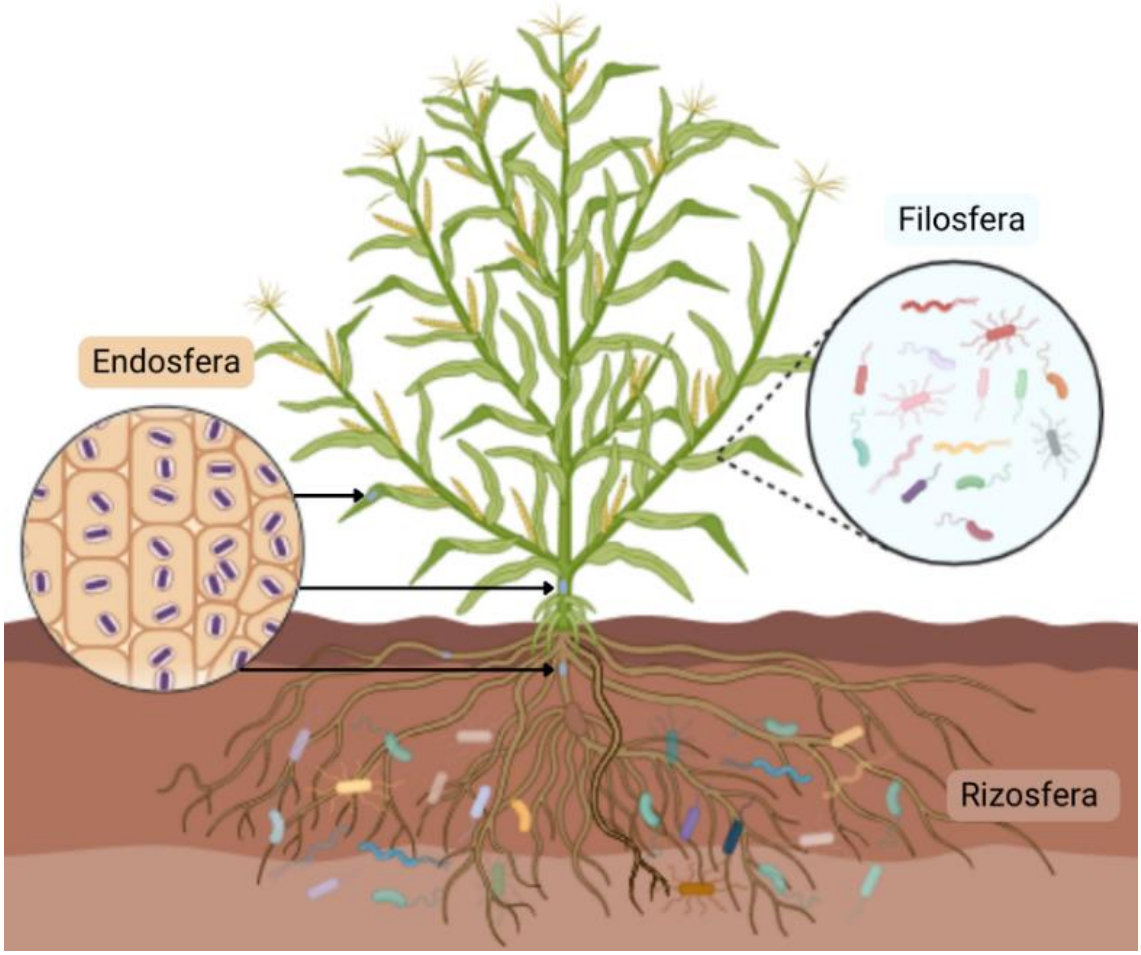


Figura 2. Compartimientos principales que albergan al microbioma vegetal

Nota: Adaptado de Dastogeer ***et al.*** (2020)

1.1.2.4. Factores que afectan el microbioma vegetal

La composición del microbioma vegetal presenta gran variabilidad, así como sensibilidad, es decir, las comunidades microbianas pueden cambiar al verse influenciadas por varios factores, en primer lugar, la identidad de la planta huésped determina la asociación hacia ciertos taxones mediante mecanismos selectivos **(Hartman *et al.*, 2023)**, ya que las plantas buscan obtener beneficios como control de patógenos, promoción del crecimiento, reducción del estrés, entre otros **(Santoyo, 2022)**. Por otra parte, factores bióticos (diversidad microbiana del suelo, genotipo, fenotipo, edad de la planta, cantidad de materia orgánica, tipo y estructura del suelo) **(Compant *et al.*, 2019)**, abióticos (niveles de humedad, pH, salinidad, presencia de metales pesados) y las prácticas agrícolas (rotación de cultivos, uso de fertilizantes, monocultivos) también intervienen en las interacciones *huésped – microbio* de modo que cambian la riqueza, composición y función del microbioma vegetal (**Zhang *et al.*, 2021)**. Finalmente, el ensamblaje del microbioma vegetal se ve desafiado por los cambios de temperatura o calentamiento global del planeta **(Ver Figura 3)**, siendo que, las comunidades microbianas de la filósfera se ven

afectadas en mayor medida, mientras que la endósfera y la rizósfera se ven afectados por la respuesta del huésped hacia dicho estrés **(Trivedi *et al.*, 2022).**

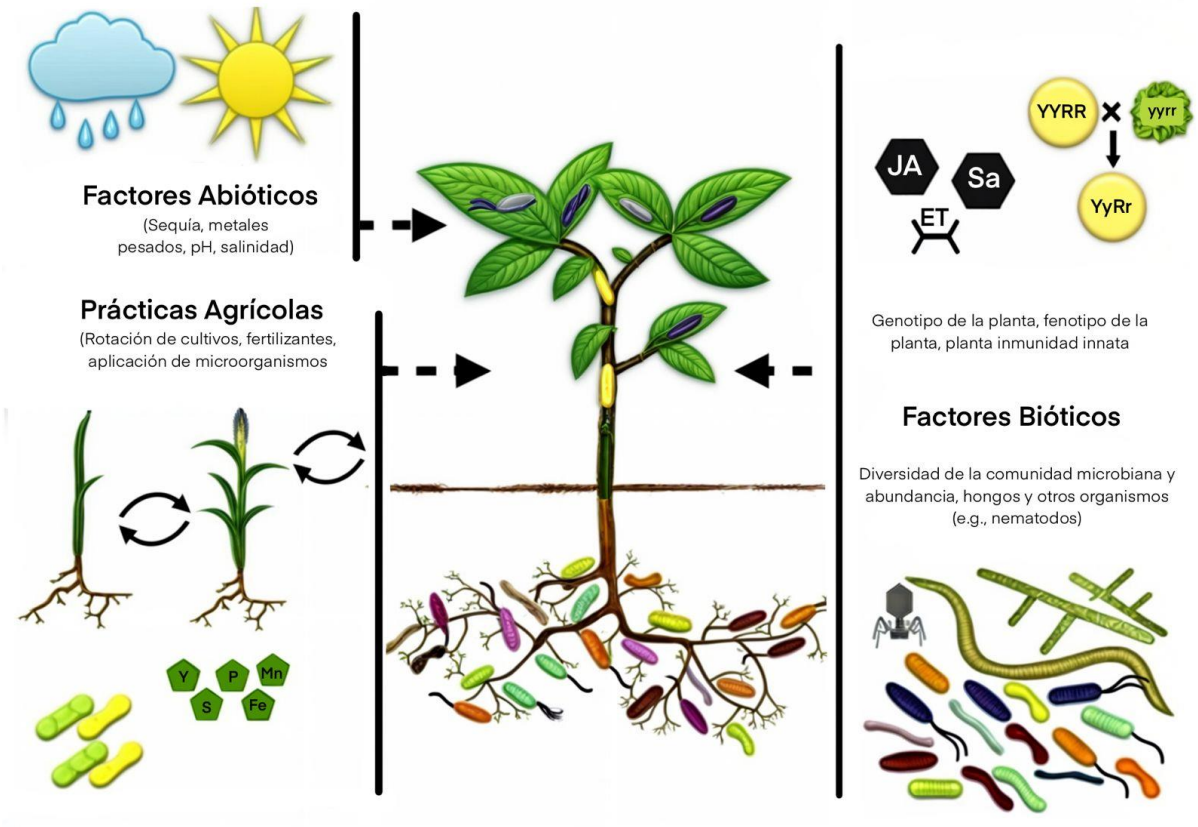


Figura 3. Factores que afectan el ensamblaje del microbioma vegetal

Nota: La imagen muestra cómo factores abióticos (sequía, metales pesados, pH, salinidad), prácticas agrícolas (rotación de cultivos, fertilizantes, microorganismos), factores bióticos (diversidad microbiana, fagos, hongos, nematodos) y las características de la planta (genotipo, fenotipo, inmunidad innata) influyen en el ensamblaje del microbioma vegetal. La planta central representa las interacciones complejas y bidireccionales entre estos factores. Tomado de Zhang ***et al.*** (2021).

1.1.2.5. Rizósfera como hábitat microbiano

La rizósfera, definida como la zona del suelo directamente influenciada por las raíces de las plantas, constituye un epicentro vital de actividad microbiana **(Li *et al*., 2021)**. Este entorno es excepcionalmente rico en microorganismos que desempeñan roles esenciales en la nutrición de las plantas. A través de procesos como la descomposición de materia orgánica, la fijación de nitrógeno y la producción de compuestos antimicrobianos, estos microbios no solo facilitan la absorción de nutrientes, sino que también protegen a las plantas contra patógenos mediante mecanismos de competencia **(Park *et al.*, 2023)**. Este nicho específico alberga una diversidad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, oomicetos, protozoos, virus y arqueas **(Ver Figura 4)**, todos los cuales se especializan en vivir en

estrecha asociación con las raíces de las plantas, lo que subraya la complejidad y la importancia ecológica de la rizósfera en los ecosistemas terrestres **(Ling *et al.*, 2022).**

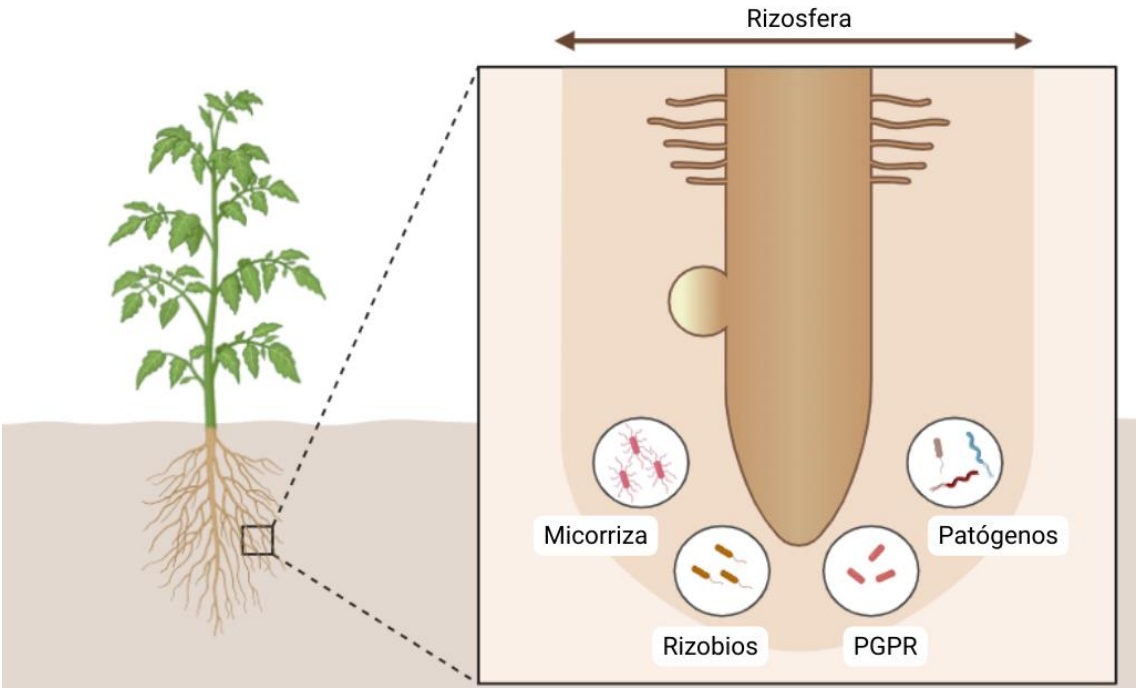


Figura 4. Distribución y riqueza de microorganismos en diferentes zonas de la raíz
Nota: Adaptado de Mgadi ***et al.*** (2024), y Jamil ***et al.*** (2022).

La rizósfera es un nicho microbiológico muy delimitado que abarca una fina capa de suelo de aproximadamente 1 a 10 mm alrededor de las raíces **(Dastogeer *et al*., 2020)**. Esta estrecha zona permite observar cambios en la composición del microbioma radicular, ya que más allá del límite de la rizósfera se encuentra el suelo circundante o bulk soil **(Ver Figura 5)**, el cual presenta diferencias significativas en las comunidades microbianas. Estas diferencias pueden incluir variaciones en los compuestos orgánicos, la cantidad de nutrientes y los perfiles metabólicos, incluso a distancias cortas **(Deng *et al*., 2024)**.

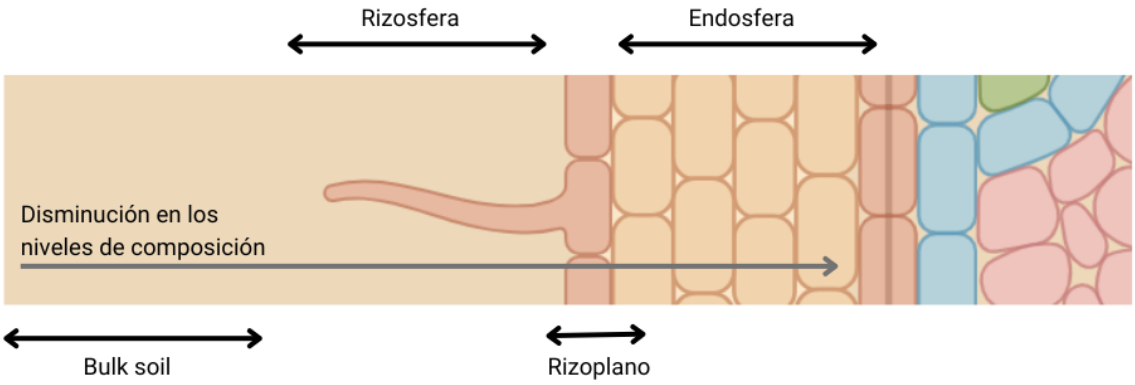


Figura 5. Distribución y riqueza de microorganismos en diferentes zonas de la raíz
Nota: Adaptado de Van der Heijden & Schlaeppi. (2015).

De todos los compartimentos que albergan al microbioma vegetal, la rizósfera corresponde al fitobioma con mayor riqueza y diversidad en especies de microorganismos a comparación de la filósfera y la endósfera radicular **(Wang & Haney., 2020)**, siendo que su composición microbiana puede alcanzar una concentración de hasta 10^{11} células por gramo de raíz y presentar rangos mayores a 30.000 especies procariotas **(Zuo *et al*., 2021)**. De la cantidad total de microrganismos que colonizan aquel ambiente radicular, el 95% corresponden a bacterias **(Chang *et al.*, 2022)**.

1.1.2.6. Mecanismo de reclutamiento de comunidades microbianas

De forma general, el mecanismo por el cual las plantas reclutan a las comunidades microbianas hacia su microbioma radicular se da en tres etapas, empezando por la exudación, seguido del proceso de quimiotaxis y finaliza con el movimiento bacteriano hacia el sistema radicular **(Bhattacharyya et al., 2023)**.

Las plantas atraen, controlan y permiten la colonización de sus potenciales taxones microbianos que se encuentran en el suelo circundante (Bullk soil) hacia la zona rizosférica mediante la producción y liberación de exudados radiculares **(Ver figura 6) (Lin *et al*., 2022),** mismos que actúan como moléculas repelentes, de señalización químicas, atrayentes, así como estimulantes **(Molefe *et al*., 2023).** Aquellos exudados se producen mediante la fotosíntesis, llegando a liberar hasta el 40 % del total de sus compuestos fotosintéticos hacia la rizósfera **(Acharya *et al*., 2023)**. Ha pesar de que la pérdida de carbono es un costo significativo da lugar al "efecto rizósfera", mismo que consiste en alterar la actividad, composición y función de las comunidades microbianas a beneficio del hospedador **(Papik *et al*., 2020)**, de hecho, el efecto rizósfera es la vía principal por el cual el suelo obtiene su fuente de carbono (Rizodeposición) **(Mondal *et al*., 2023)**.

Los exudados radiculares o quimio atrayentes pueden dividirse en dos tipos, por una parte, aquellos que son de bajo peso molecular y que se encuentran en mayor medida como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes, ácidos grasos, purinas, fitohormonas, flavonoides, benzoxazinoides entre otros metabolitos primarios y secundarios **(Chen & Liu, 2024)**, y por la otra, los de alto peso molecular tal como mucílagos y proteínas **(Galloway *et al*., 2020)**. Las bacterias del suelo a granel cuentan con quimiorreceptores o proteínas de quimiotaxis aceptoras de metilo (MCP) que regulan su motilidad, para lo cual se dirigen a aquellos quimio atrayentes o exudados mediante un gradiente químico cuando estos son benéficos **(Parkinson., 2022),** o a su vez se alejan en presencia de quimio repelentes cuando las sustancias resultan ser tóxicas **(Aroney *et al*., 2021)**, proceso al cual se conoce como quimiotaxis.

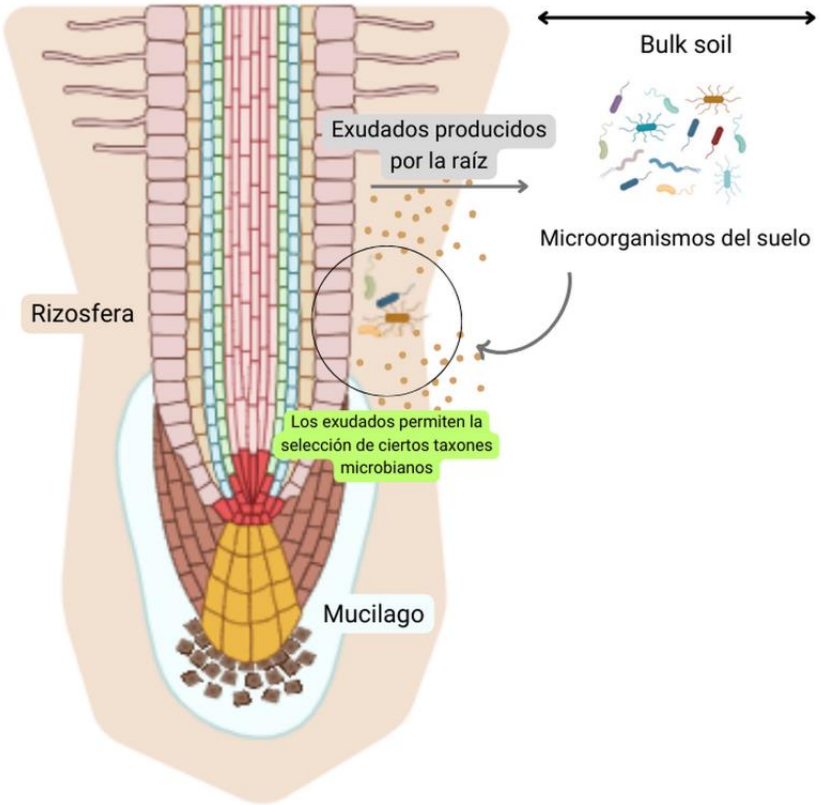


Figura 6. Mecanismo de reclutación de comunidades microbianas mediada por exudados

Nota: Adaptado de Bhattacharyya *et al*. (2023).

Zatakia et al. (2018) explica que, las MCP están conformadas por un dominio periplásmico de unión a ligando (LBD), dos hélices que se encuentran a través de la membrana (TM) al igual que por un dominio de señalización periplásmico (SD). El sistema de reclutamiento mediante MCPs inicia cuando un quimio efector interactúa con el LBD, modulando así la actividad de histidina quinasa CheA, consecuentemente el regulador de respuesta CheY es alterado dando cambio desde CheY a CheY-P (Fosforilizado) el cual desencadena una respuesta sobre el motor flagelar (FliM) **(Feng *et al*., 2021)** Cuando la bacteria se encuentra con exudados radiculares atrayentes CheA se inactiva de modo que CheY-P reduce su

concentración, lo que se traduce en un movimiento antihorario en el FliM **(Ver Figura 7)**, de modo que la motilidad le dirige hacia el origen del atrayente o en otras palabras hacia al sistema radicular del huésped vegetal **(Bhattacharyya *et al*., 2023).**

La velocidad de respuesta hacia FliM está regulada por el ensamblaje entre CheA y la proteína de acoplamiento del receptor CheW, asi también la metilación o desmetilación de los MCPs se controla mediante la metiltransferasa CherR y la metilesterasa CheB **(Salah Ud-Din & Roujeinikova. 2017).** Se teoriza que entre mayor cantidad de genes tengan las rizobacterias en sus genomas para expresar MCPs su persistencia en el suelo al igual que su capacidad de colonizar la rizósfera se incrementará ya que los niveles de quimiotaxis mejora **(Hida *et al*., 2020)**.

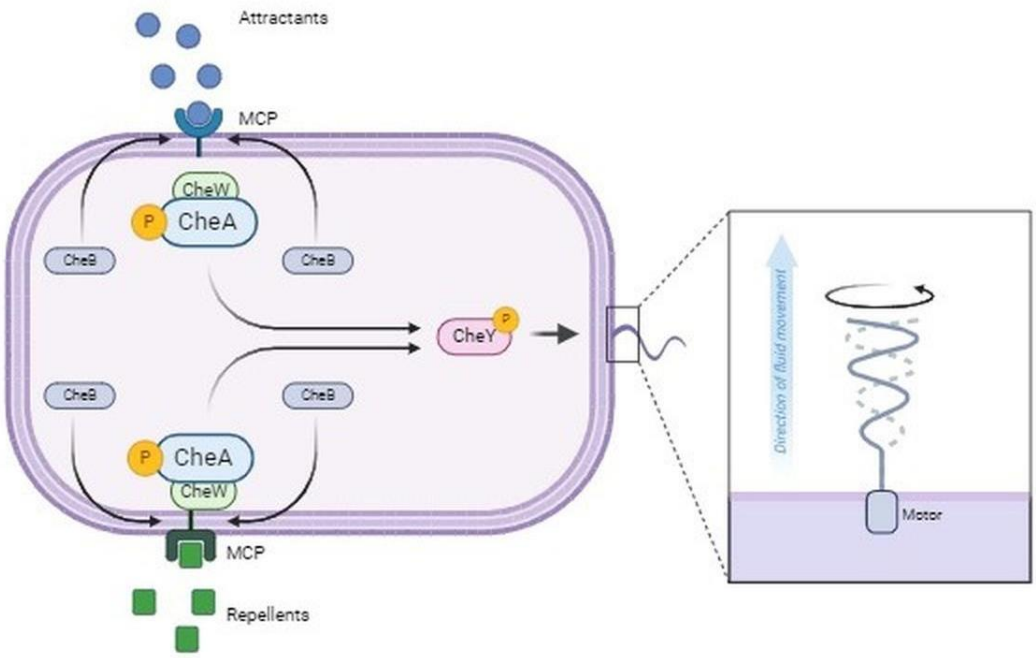


Figura 7. Reclutamiento de rizobacterias mediado por receptores MCP

Nota: La imagen muestra el mecanismo de reclutamiento de rizobacterias mediado por receptores MCP. Los atractantes y repelentes externos interactúan con los receptores MCP en la membrana de la bacteria, activando la proteína CheA a través de CheW. Esta señal se transfiere a CheY, que, al fosforilarse, modula el motor flagelar, alterando la dirección del movimiento de la bacteria hacia o lejos de los estímulos químicos. Adaptado de Zboralski & Filion, (2023) y Roujeinikova, (2017).

1.1.2.7. Composición del microbioma de la rizósfera

1.1.2.7.1. Alfa diversidad

La diversidad alfa permite determinar la riqueza existente en una muestra **(Calle, 2019)**, es decir, el número de especies presentes en la misma. Generalmente, la riqueza observada a partir del análisis de muestras no representa totalmente la riqueza total del entorno en donde estas fueron tomadas, por lo que, el uso de índices posibilita la homogeneidad en los niveles de abundancia **(Liu *et al*., 2021).** Existen varios tipos de índices para la diversidad, alfa, aunque los más comunes corresponden a Chao, Shannon y Simpson **(Zverev *et al.*, 2021)**. El índice de Shannon considera tanto la abundancia como la equidad de las especies, mientras que el índice de Simpson pone más énfasis en la dominancia de especies (**Willis, 2019**). Por su parte, el índice de Chao1 estima la riqueza de especies basándose en el número de especies observadas y el número de especies raras **(Klein *et al.*, 2021**). Para evaluar la significancia de las diferencias en la diversidad alfa entre grupos, se utilizan métodos como el ANOVA o el Kruskal-Wallis **(Willis, 2019)**.

1.1.2.7.2. Beta Diversidad

La diversidad beta determina aquellos cambios en la composición y abundancia de taxones **(Feranchuk *et al.*, 2018),** al igual que, la similitud o distancia entre varias muestras o grupos de microbiomas **(Liu *et al.*, 2021)**. Su análisis permite vincular la diversidad de los taxones con características ambientales o con el estado del hospedador **(Su, 2021)**. Bray – Curtis, UniFrac al igual que UniFrac ponderado permiten determinar la diversidad beta, en el caso del índice de Bray – Curtis, se establece que, cuando la medida es igual a cero (0), las abundancias de taxones entre muestras no difieren, mientras que si es igual a uno (1), las abundancias son distintas **(J. Liu et al, 2022).**

1.1.2.8. Caracterización del microbioma de la rizósfera

1.1.2.8.1. Tecnología de próxima generación (NGS)

La secuenciación de próxima generación (NGS) es una técnica de alto rendimiento de investigación genómica que permite secuenciar masivamente millones de fragmentos de ADN de forma paralela (**Satam *et al.*, 2023)**. A diferencia de otros métodos de secuenciación como Sanger, NGS posibilita obtener una mayor cantidad de secuencias en un menor tiempo y a un menor costo **(Kumar *et al.*, 2019)**. La secuenciación Sanger, por otro lado, es un método más antiguo y tradicional que fue el primer

proceso automatizado de secuenciación de ADN. Desarrollado en 1977 y se basa en la terminación de cadena y permite la lectura de secuencias de ADN relativamente largas pero a un costo y tiempo significativamente mayores en comparación con NGS. La secuenciación Sanger normalmente se emplea para la validación de secuencias obtenidas por NGS y para proyectos que no requieren la secuenciación masiva **(Crossley *et al.*, 2020)**.

De esta manera, se sabe que el desarrollo de tecnologías de secuenciación se ha venido dando durante las últimas cuatro décadas y se puede clasificar en tres generaciones. La ***primera generación*** estuvo representada por la secuenciación de Sanger, que sentó las bases para la secuenciación del ADN. La ***segunda generación***, conocida también como secuenciación de lectura corta, introdujo la capacidad de secuenciación masiva en paralelo, permitiendo la secuenciación simultánea de miles a millones de fragmentos de ADN **(Soliman *et al.*, 2017)**. Entre las plataformas más utilizadas de esta generación se encuentra el método de secuenciación 454 de Roche, que se basa en la pirosecuenciación y detecta la liberación de pirofosfato al añadir nucleótidos. Otras plataformas destacadas incluyen Ion Torrent, que mide la liberación de iones de hidrógeno durante la síntesis del ADN, y la plataforma Illumina, que emplea terminadores de tinte reversibles en su método de secuenciación por síntesis **(Satam *et al.*, 2023)**.

La ***tercera generación***, o secuenciación de lectura larga, incluye tecnologías avanzadas como las de Pacific Biosciences y Oxford Nanopore, que generan lecturas más extensas y permiten una mejor resolución de regiones repetitivas y reordenamientos genómicos complejos, para genomas completos, ofreciendo capacidades de secuenciación de una sola molécula **(Hu *et al.*, 2021)**. Aunque el camino involucre varias plataformas NGS su flujo de trabajo viene determinado por un patrón que involucra cuatro fases: recolección de muestras, preparación de la biblioteca (incluyendo la fragmentación aleatoria del genoma y la ligadura con adaptadores apropiados), amplificación de la biblioteca, reacciones de secuenciación (usando diferentes enfoques) y finaliza con el análisis de datos (**Qin, 2019)**.

1.1.2.8.2. Técnica de secuenciación Illumina

La tecnología Illumina NGS emplea un enfoque esencialmente distinto del método clásico de terminación de cadena de Sanger. Utiliza la secuenciación por síntesis (SBS), que observa la incorporación de nucleótidos marcados mientras se copia la cadena de ADN, permitiendo la secuenciación en paralelo a gran escala **(Illumina, 2024).**

Según **Zhang *et al.* (2021)** el proceso de secuenciación de Illumina implica varios pasos principales **(Ver Figura 8)**. Primero, se prepara una biblioteca de ADN donde el ADN del genoma se fragmenta y se le añaden adaptadores en ambos extremos para formar una biblioteca de ADN monocatenario (ssDNA). Luego, esta biblioteca se añade a una celda de flujo donde los fragmentos de ADN se unen a la superficie de la celda. En la etapa de PCR puente, cada fragmento de ADN se agrupa y se amplifica, formando grupos que contienen muchas copias del ADNss. Durante la secuenciación por síntesis (SBS), se añaden ADN polimerasa, cebadores y cuatro dNTP fluorescentes al sistema de reacción. Cada dNTP tiene un grupo azida en el extremo 3' que bloquea la incorporación de la siguiente base, permitiendo la adición de solo una base a la vez. Después de lavar los dNTP y la enzima sobrante, se escanean las imágenes. Luego, se añade un reactivo químico para cortar el grupo azida y apagar la fluorescencia antes de iniciar el siguiente ciclo. Finalmente, se registra la señal fluorescente para determinar la secuencia del ADN.

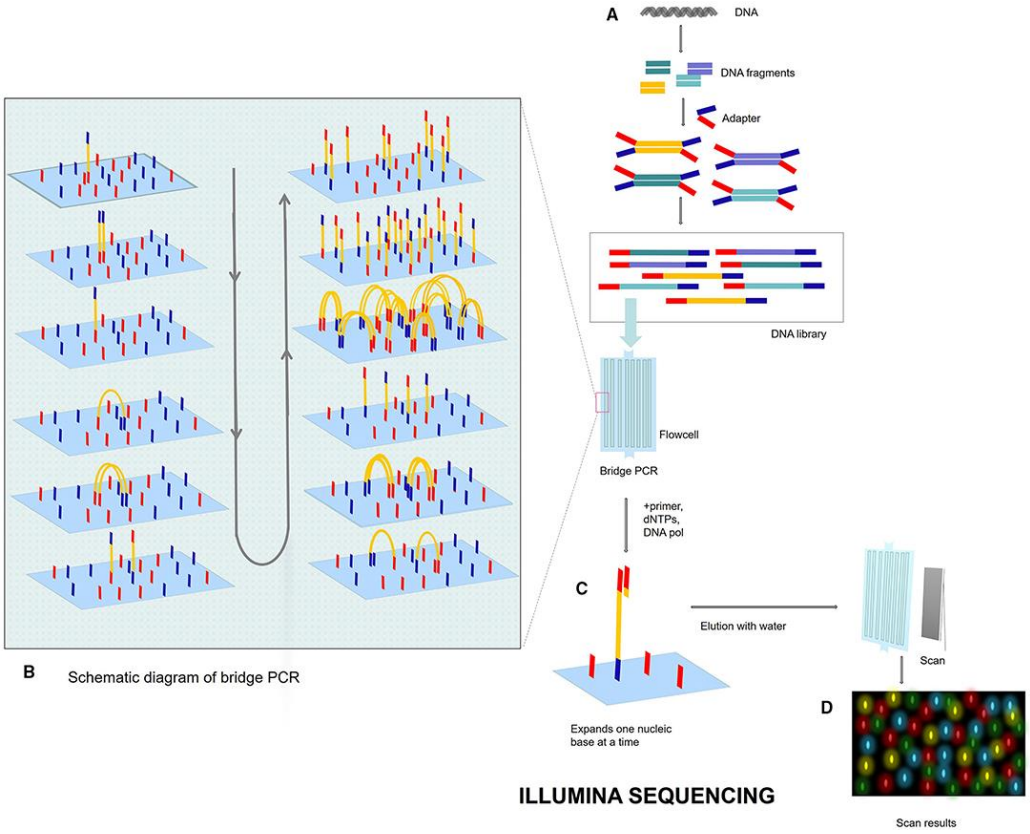


Figura 8. Proceso de secuenciación Illumina

Nota: El proceso de secuenciación Illumina muestra: ***A)*** Fragmentación del ADN y preparación de biblioteca. ***B)*** PCR puente. ***C)*** Sistema de secuenciación por síntesis (SBS). ***D)*** Recepción de señal fluorescente. Tomado de Zhang ***et al.*** (2021).

Actualmente, Illumina produce una serie de plataformas (MiSeq, HiSeq y NextSeq). Específicamente, MiSeq es un secuenciador de mesa personal lanzado en 2011, que permite completar una ejecución en solo cuatro horas para la secuenciación específica de bacterias puede generar lecturas emparejadas de hasta 2 x 300 pares de bases (pb), lo que facilita una mayor cobertura y precisión en la secuenciación **(Gupta & Verma, 2019)**. Las lecturas emparejadas ayudan a resolver secuencias complejas y regiones repetitivas del genoma. En contraste, HiSeq 2500 es adecuado para la secuenciación de alto rendimiento, capaz de generar hasta 1 TB de datos en una única ejecución de 5 a 6 días **(Zhang *et al.*, 2021)**. Mientras que, NextSeq combina la flexibilidad de MiSeq con la capacidad de alto rendimiento de HiSeq, ofreciendo tiempos de ejecución rápidos y la capacidad de generar datos masivos en una sola ejecución realizando secuenciaciones de hasta 120 Gb en una única ejecución permitiendo una mayor flexibilidad en el diseño de experimentos, siendo ideal para aplicaciones como la secuenciación del exoma completo, transcriptómica y estudios de metagenómica **(Cao *et al.*, 2017)**.

1.1.2.8.3. eDNA metabarcoding

Metabarcoding corresponde a un método de evaluación de biodiversidad en comunidades microbianas y su composición taxonómica a partir de muestras medioambientales **(Acharya *et al*., 2023)**; a través del uso de cebadores, amplificación (PCR) y secuenciación de alto rendimiento (HTS) **(Semenov., 2021)**. Su aplicación permite la identificación de microorganismos a partir de eDNA o ADN ambiental sin recurrir a la obtención de cultivos puros **(Hamelin., 2023)**. La amplificación se dirige a genes marcadores taxonómicos conocidos como DNA barcodes, los cuales determinan taxones en base a zonas variables y zonas conservadas, asemejándose a los códigos de barras **(Francioli *et al*., 2021)**. El gen marcador depende del tipo de microorganismo a estudiar, en hongos se utiliza la región espaciadora transcrita interna del ribosoma nuclear (ITS) **(Ohta *et al*., 2023)**, en eucariotas las regiones del gen que transcribe para la subunidad I del citocromo c oxidasa (COI) al igual que el gen 18S **(Casey *et al*., 2021)**, y en bacterias se emplea el gen 16S rRNA **(Bukin *et al.*, 2019)**.

1.1.2.8.4. Gen 16S rRNA

La subunidad pequeña (SSU) de 30S contiene el 16S rRNA, mientras que la subunidad grande (LSU) de 50S contiene el 5S rRNA y el 23S rRNA. Las regiones conservadas del gen 16S rRNA se indican en azul, y las regiones hipervariables (V1 a V9) se indican en verde. Estas regiones hipervariables son cruciales para la identificación y clasificación de bacterias **(Church *et al*., 2020) (Ver Figura 9)**.
16S rRNA es un gen presente en procariotas, es decir tanto en arqueas como en bacterias **(Hassler *et al*., 2022)**. Codifica moléculas de ARN ribosómico, que es un componente clave de la subunidad pequeña del ribosoma en las bacterias **(Byrne *et al*., 2018).** Para lo cual, interviene en la traducción del

ARN mensajero al igual que, en la síntesis de proteínas **(Church *et al.*, 2020)**. Cuenta con nueve regiones conservadas/hipervariables con un tamaño de entre 1,500 y 1,600 pb que en filogenia permiten la asignación de perfiles taxonómicos **(Hsieh *et al.*, 2022)**. Las regiones más conservadas son útiles para identificar taxones de alto rango, mientras que las regiones más variables pueden ayudar a diferenciar géneros o especies **(Bukin *et al.*, 2019)**. Esta característica permite una clasificación taxonómica precisa de las bacterias mediante la secuenciación del gen 16S rRNA **(Lourenco & Welch, 2022)**.

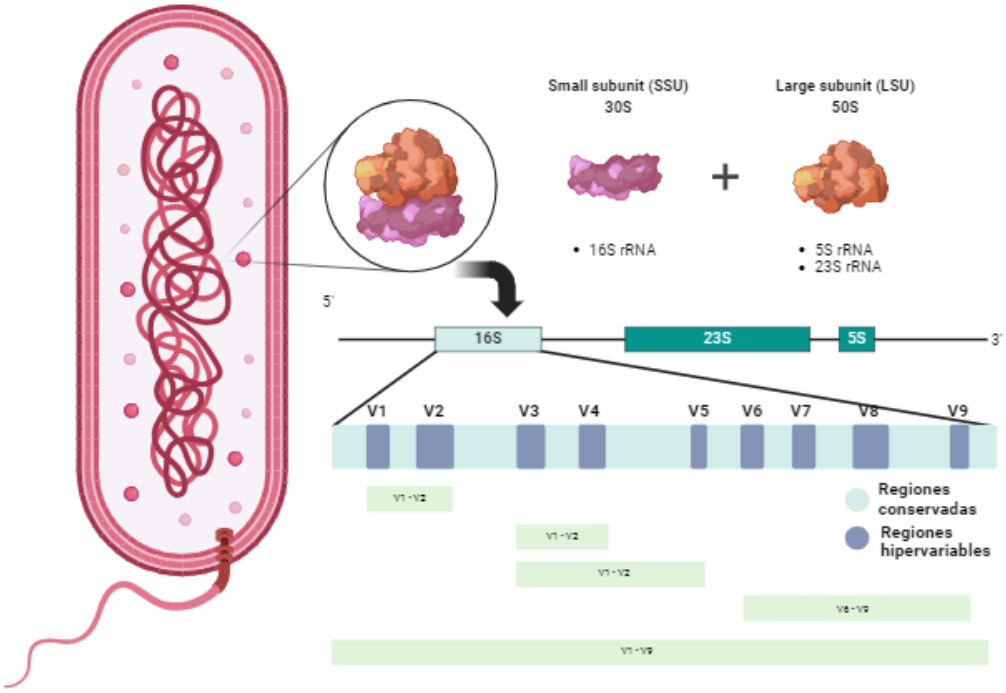


Figura 9. Estructura del gen 16S rRNA

Nota: Estructura del gen 16S rRNA en una bacteria. Adaptado de: (Lourenco & Welch, 2022).

1.1.2.8.5. Región V3-V4

La secuenciación de regiones variables del gen 16S rRNA es fundamental para estudiar la ecología microbiana, ya que permite examinar muchas comunidades microbianas al mismo tiempo, revelando su diversidad y función en distintos hábitats. Aunque las técnicas actuales tienen limitaciones de longitud de lectura, se utiliza una sección más corta del gen como sustituto eficiente, lo que simplifica y mejora el estudio de la composición y dinámica microbiana **(Zhang *et al.*, 2018).**

La elección de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA para el estudio de comunidades microbianas se fundamenta en su capacidad para ofrecer una representación detallada y amplia de la biodiversidad microbiana factor crítico en el análisis de ecosistemas complejos como los suelos **(Jeong *et al.*, 2021)**. **Fadeev *et al.*, (2021)** destacan que, aunque otras regiones como la V4-V5 pueden ofrecer

ventajas en contextos particulares, como la inclusión de *Archaea*, la región V3-V4 es ampliamente reconocida por su eficacia en capturar la diversidad bacteriana con una resolución taxonómica superior.

El método por amplicón, que se centra en la amplificación de regiones específicas del ADN mediante la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), es ampliamente usado por su eficiencia y precisión en la identificación y cuantificación de especies microbianas presentes en una muestra ***(Taylor et al.,* 2020).** Esto, permite un análisis profundo de la estructura y composición de comunidades microbianas, facilitando estudios de diversidad y función en distintos ambientes **(Fadrosh *et al.,* 2019).**

Por otro lado, la secuenciación de shotgun implica secuenciar muchos fragmentos de ADN superpuestos en paralelo y luego usar una computadora para ensamblar los pequeños fragmentos en contigs más grandes y, finalmente, en cromosomas **(Verce *et al.,* 2019)**. Este método ofrece una visión más amplia y detallada del contenido genómico total de una muestra, permitiendo no solo la identificación de bacterias, sino también de otros microorganismos como virus, hongos y protozoos **(Li *et al.,* 2024)**. Además, proporciona información sobre la funcionalidad y el potencial metabólico de las comunidades microbianas analizadas **(Holst *et al.,* 2016).**

1.1.3. Predicción de los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas

1.1.3.1. Perfiles metabólicos

La predicción de perfiles metabólicos en comunidades microbianas representa un enfoque innovador en el campo de la ecología microbiana, donde la integración de herramientas avanzadas de bioinformática y principios de biología de sistemas facilitan la comprensión de las complejas interacciones entre microbios **(Douglas *et al.*, 2020)**. Este proceso implica la identificación y cuantificación de metabolitos endógenos específicos, centrando su atención en clases individuales de compuestos, tales como lípidos polares, isoprenoides, carbohidratos y aminoácidos, o incluso en miembros de una vía metabólica particular **(Qian *et al.*, 2022)**. La relevancia de este enfoque radica en su capacidad para revelar cómo las comunidades microbianas influyen en los procesos ecológicos y biogeoquímicos del suelo, proporcionando información valiosa para el manejo sostenible de ecosistemas y la mitigación de impactos ambientales adversos **(Zhou *et al.*, 2022)**.

Frente a este desafío, se han desarrollado herramientas avanzadas de predicción funcional, como PICRUSt2, que facilita la generación de recuentos de genes esperados a partir de datos de amplicones de 16S rRNA, ampliando las posibilidades de investigación sin requerir secuenciación directa del metagenoma **(Douglas *et al.*, 2020).** PICRUSt2 utiliza técnicas como la colocación filogenética y la predicción de estado oculto de genes y rutas metabólicas por muestra, integrando herramientas de código abierto para predecir funciones genómicas a partir de secuencias del gen 16S rRNA ambientalmente muestreadas **(Wang *et al.*, 2022).** Este avance permite realizar inferencias más precisas sobre el potencial funcional de las comunidades microbianas, superando limitaciones previas mediante la expansión de su base de datos y la compatibilidad con diversas técnicas de secuenciación **(Sun *et al.*, 2020).** Tal mejora es crucial para avanzar en estudios ecológicos y ambientales, permitiendo una exploración más profunda y precisa de las funciones microbianas en diversos hábitats.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Aplicar la tecnología de metabarcoding 16S rRNA para el análisis de la rizósfera de mora (*R. glaucus*) en cultivos de la provincia de Tungurahua.

1.2.2. Objetivos específicos

- Describir la diversidad y abundancia de la microbiota asociada a la rizósfera de *R. glaucus* en cultivos provenientes de la provincia de Tungurahua.
- Predecir el metabolismo de los taxones encontrados en el microbioma de la rizósfera asociada a *R. glaucus* en cultivos provenientes de la provincia de Tungurahua.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

En el presente proyecto de investigación, se emplearon los siguientes equipos, materiales, reactivos y recursos informáticos presentados en las **Tablas 2, 3, 4 y 5**.

Tabla 2.

Reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto de titulación

Reactivos	Cantidad
Phosphate-buffered saline (PBS)	1 L
Etanol al 95%	100 mL
Etanol al 70%	1 L

Tabla 3.

Material fungible necesarios para el desarrollo del proyecto de titulación

Material	Cantidad
Puntas de 0.5 – 10 μL con filtro	1 rack (96 unidades)
Puntas de 100 – 1000 μL con filtro	1 rack (96 unidades)
Microtubos de 1.5 mL	50
Tubos Falcon de 45 mL	50
Espátula	1
Pipetas Graduada de Vidrio de 10 mL	2
Gradilla	1
Filtro de Membrana de Microdisco de 0.45 µm	12
Frascos de Tapa Azul (500 mL)	3
Pinzas	1

Tabla 4.

Equipos de laboratorio empleados

Equipos	Cantidad
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Cabina de flujo laminar bioseguridad 2	1
Centrífuga	1
Vortex	1
Nevera (4ºC)	1
Congelador (-20ºC)	1
Potenciómetro	1
Bomba al Vacío	1
Sistema de Filtración	1
Micropipeta (0.5 – 10 $\boldsymbol{\mu L}$)	1
Micropipeta (100 – 1000 $\boldsymbol{\mu L}$)	1
Mechero Bunsen	11

Tabla 5.

Recursos bioinformáticos empleados

Recursos	Desarrollador
Base de Datos	
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, desarrollada por el grupo del Profesor Minoru Kanehisa en el Instituto de Ciencias Bioinformáticas de Kioto, Japón, comenzando su desarrollo en 1995 **(Kanehisa *et al.*, 2014)**.
PKSSU4.0	Desarrollado por EzBiocloud en el año 2018 **(EzBioCloud, 2018)**.

Recursos	Desarrollador
Herramientas bioinformáticas	
Qiime2	Bajo la dirección del Dr. Rob Knight, como una herramienta avanzada para el análisis de datos de microbioma **(Bolyen *et al.*, *2019)*.**
Jupyter	Creado por **Pérez *et al.* (2021)** y otros colaboradores como Granger.
Picrust2	Equipo liderado por Gavin M. Douglas, Vincent J. Maffei, Jesse Zaneveld, Svetlana N. Yurgel, James R. Brown, Christopher M. Taylor, Curtis Huttenhower y Morgan G. I. Langille **(Douglas *et al.*, 2020)**.
R Studio	Según **RStudio (2024),** fue creado J.J. Allaire quien es el fundador de RStudio, Inc., y Joe Cheng es uno de los desarrolladores principales
EzBiocloud	Desarrollado por el Dr. Jongsik Chun **(EzBioCloud, 2018)**.

2.2. Métodos

La presente investigación propuso describir la diversidad y abundancia del microbioma asociada y predecir el metabolismo de los taxones presentes de la rizósfera de mora (*R. glaucus*) de la provincia de Tungurahua aplicando la tecnología de secuenciación de Illumina *Miseq* para analizar las secuencias de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA. La secuenciación de este material genético fue llevado a cabo gracias al programa *Secuencia Ecuador 2023* ejecutado por la empresa Biosequence S.A.S

2.2.1. Descripción de la diversidad y abundancia del microbioma asociado a la rizósfera de *R. glaucus.*

2.2.1.1. Recolección y procesamiento de la muestra

La obtención y recolección de las muestras se realizó basada en la metodología de **Hao *et al.* (2020)** & **Latif *et al.* (2020)**, con modificaciones.

Para la recolección de muestras se tomó en cuenta a ASOPROCAMOR (*Asociación productora de mora*), quienes centran su producción en las zonas de Tisaleo, Cevallos, y la parroquia de Huachi Grande **(Ver Figura 10)**, mismas que pertenecen a la provincia de Tungurahua. Por lo que, de acuerdo con las zonas de producción se seleccionaran seis puntos de muestreo **(Ver Tabla 6)**.

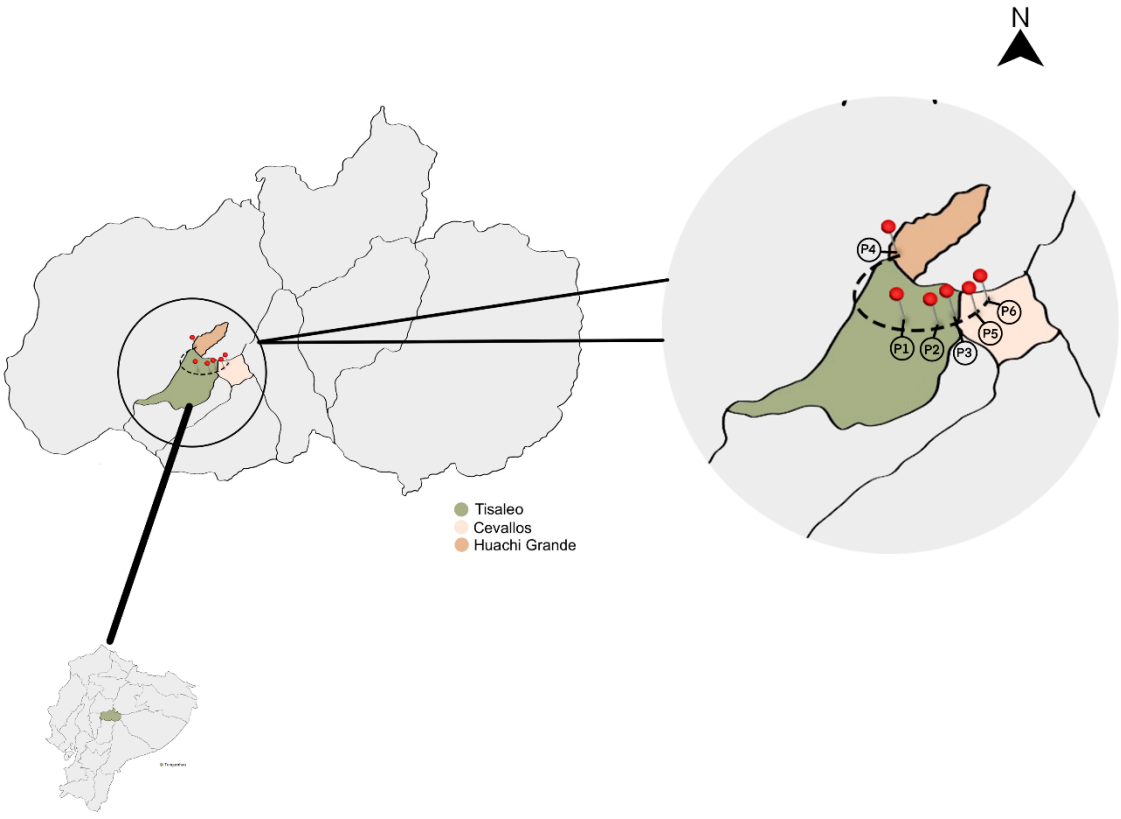


Figura 10. Ubicación geográfica de los puntos de recolección estudiados

Nota: La imagen muestra los puntos de muestreo ubicados en la provincia de Tungurahua, Ecuador, en las localidades de Tisaleo, Alobamba, Santa Lucía, Huachi Grande, Cevallos y Manzana de Oro. Los puntos de muestreo están marcados en rojo dentro del mapa ampliado de Tungurahua, destacando las áreas específicas donde se realizaron las tomas de muestras para el estudio de la rizósfera de *R. glaucus*.

Las diferentes localidades están coloreadas para distinguirlas: Tisaleo (P1), Alobamba (P2), Barrio Santa Lucía (P3), Huachi Grande (P4), Cevallos (P5), Manzana de Oro (P6).

Tabla 6.

Puntos de muestreo seleccionados

Rizósfera Agrícola	Muestra Compuesta	Identificación	Ubicación	Provincia	Coordenadas
Punto 1	Muestra 1	MSL1	Tisaleo	Tungurahua	1°20'09.9"S
	Muestra 2	MEL1			78°38'23.0"W
Punto 2	Muestra 1	MSL2	Alobamba	Tungurahua	1°20'08.9"S
	Muestra 2	MEL2			78°38'22.3"W
Punto 3	Muestra 1	MSL3	Barrio Santa Lucía	Tungurahua	1°18'35.6"S
	Muestra 2	MEL3			78°38'33.7"W
Punto 4	Muestra 1	MSL4	Huachi Grande	Tungurahua	1°19'44.0"S
	Muestra 2	MEL4			78°38'52.4"W
Punto 5	Muestra 1	MSL5	Cevallos	Tungurahua	1°20'20.8"S
	Muestra 2	MEL5			78°38'48.5"W
Punto 6	Muestra 1	MSL6	Manzana de Oro	Tungurahua	1°19'15.1"S
	Muestra 2	MEL6			78°38'16.3"W

Nota: En cada punto mencionado en la tabla 6 se realizó dos tomas de muestras compuestas de la rizósfera asociada a la raíz de mora, es decir, se obtuvo dos réplicas por cada punto. Fuente: Elaboración propia.

La recolección de muestras de la rizósfera se llevó a cabo excavando el suelo hasta una profundidad de 20 cm, se recogió la rizósfera de cada planta, aproximadamente 5 g por muestra, mediante una agitación vigorosa. Posteriormente, las muestras se transportaron al laboratorio en bolsas estériles y almacenadas bajo hielo seco para su posterior análisis. Se agruparon diez muestras de rizósfera de mora de cada punto de recolección para formar una muestra compuesta única. Posteriormente, cada muestra compuesta se mezcló con 45 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en tubos Falcon de 50 mL. Se procedió a filtrar cada muestra mediante filtros de diámetro de poro de 0.45 μm, obteniendo la biomasa microbiana.

El filtro con la muestra de suelo de la rizósfera obtenido en la etapa de procesamiento, se resuspendió en un tubo Falcon con 2 mL de caldo Luria-Bertani (LB) para recuperar los microorganismos adheridos al filtro mediante agitación. Posteriormente, se retiró el filtro del tubo Falcon una vez asegurada la liberación completa de su contenido. La suspensión se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a

1000 rpm durante cinco minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se almacenó a una temperatura de -80°C hasta la etapa de extracción de ADN **(Ver Figura 11).**

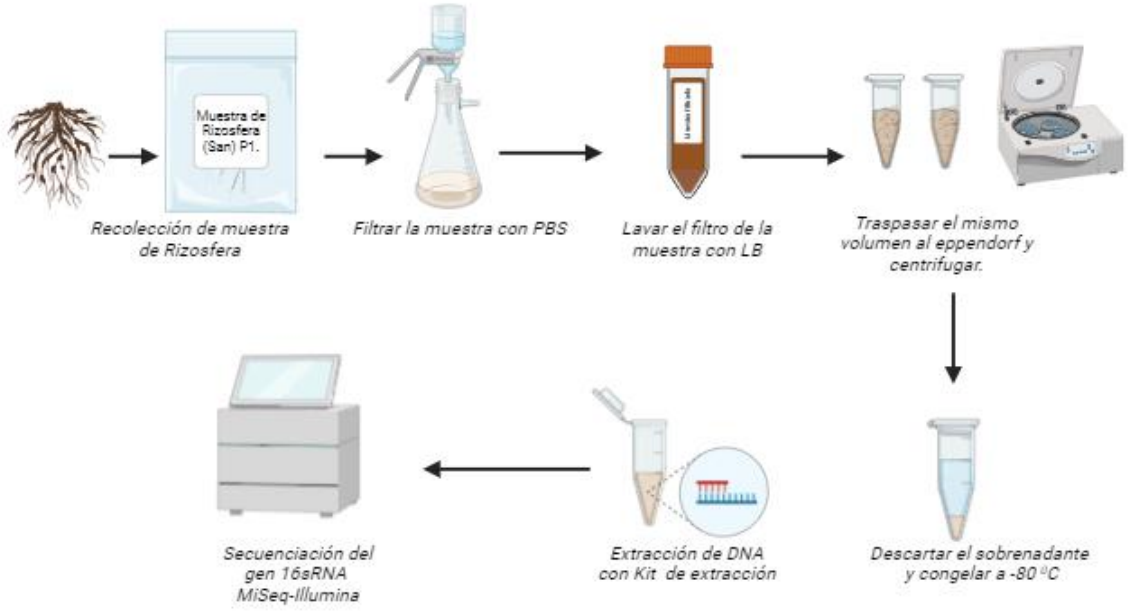


Figura 11. Procesamiento de muestras

Nota: Elaboración propia.

2.2.1.2. Extracción de ADN ambiental (eDNA)

Para la extracción del ADN de las muestras de rizósfera se empleó el protocolo del kit comercial ZymoBIOMICS DNA kit a base de columnas para muestras de suelo **(ZymoBIOMICS, 2022).** Este procedimiento fue realizado por la empresa Biosequence S.A.S.

2.2.1.3. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA

Este procedimiento fue realizado por la empresa Biosequence S.A.S. En el cual, se empleó secuenciación de próxima generación (NGS) con la tecnología *MiSeq system* de acuerdo con el protocolo presentado por Illumina. El target de amplificación se dio en las regiones hipervariables V3 y V4 **(Illumina, 2017).** La profundidad de secuenciación fue de 20,000X, con el fin de obtener lecturas de 2 x 250 pb. Para amplificar las regiones hipervariables V3 y V4 se utilizaron los primers 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y 805R: GACGACTACHVGGGTATCTAATCC **(Bukin *et al.*, 2019)**.

2.2.1.4. Análisis Bioinformático

Los datos que se generan de la secuenciación se conocen como secuencias crudas y fue necesario su procesamiento, esto fue realizado en la plataforma Ez Biocloud. Los datos sin procesar de NGS en formato FASTA se cargaron en el sitio web de EZBioCloud (www.ezbiocloud.net) del cual se obtuvieron los OTUs. Los datos fueron procesados a través de los canales MTP, considerando la base de datos PKSSU4.0 **(base de datos procariótica 16S),** convirtiéndose en unidades de datos llamadas MTPs. Posteriormente, los MTPs se compararon en conjuntos para realizar análisis de índices de diversidad alfa, beta y perfiles metabólicos **(Ver Figura 12).**

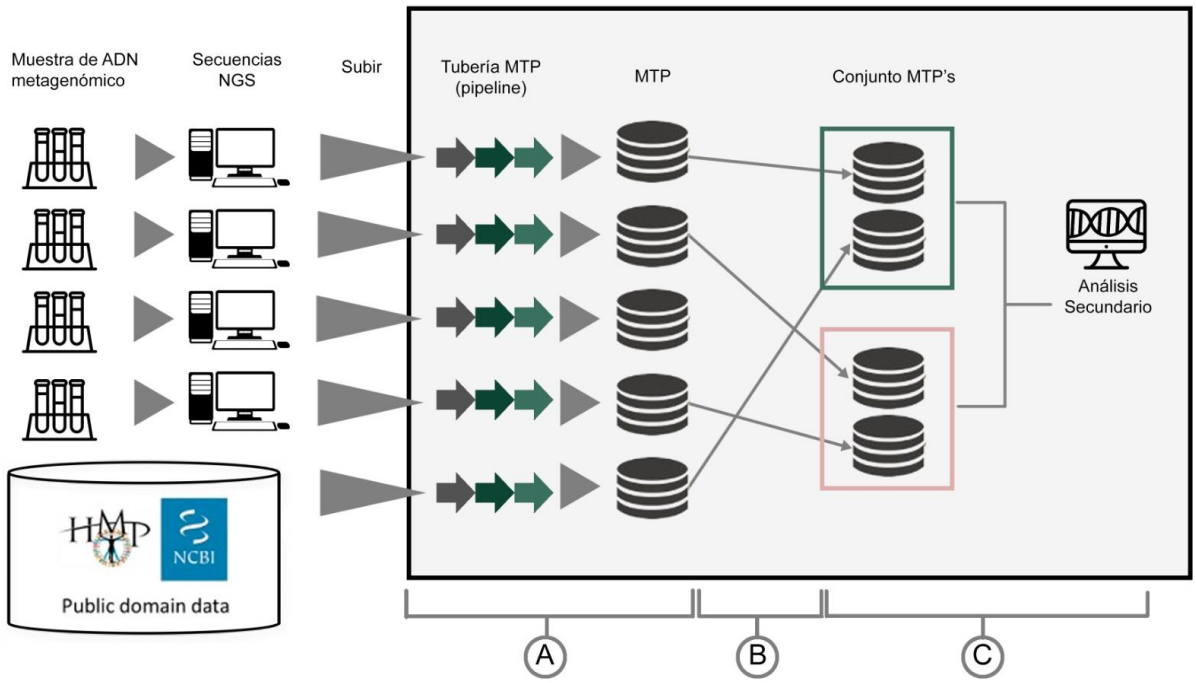


Figura 12. Proceso de análisis y comparación de perfiles taxonómicos

Nota: Adaptado de EZBioCloud (2024).

2.2.1.5. Determinación de Alfa y Beta diversidad

Para el análisis de diversidad alfa, se determinaron los índices de Shannon, Simpson, la riqueza de especies y Chao1. Posteriormente, se generaron matrices de diversidad beta y se calcularon las distancias de beta diversidad utilizando la función *vegdist* de la biblioteca *Vegan*, especificando la métrica de Bray-Curtis. Se realizó un análisis de permutaciones multivariantes (PERMANOVA) utilizando la función *Adonis* para evaluar la influencia de factores específicos en la diversidad beta a un nivel de significancia

del 95%. Para visualizar los resultados, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCoA) y se graficaron los resultados utilizando *ggplot2*. Estos análisis fueron realizados en la plataforma de R Studio.

2.2.2. Predicción del metabolismo de los taxones encontrados en el microbioma de la rizósfera asociada a *R. glaucus*.

2.2.2.1. QIIME2

Para la predicción del perfil metabólico se utilizó QIIME 2. Las secuencias crudas fueron importadas y evaluadas para control de calidad dentro del entorno de trabajo Conda, adaptado a Linux, que permitió una mayor adaptación del pipeline QIIME. **(Thompson *et al*., 2022)** Dentro de este entorno se recurrió al uso de dos algoritmos, el primero, *qiime2.Metadata* que asegura la disponibilidad de los metadatos y el segundo, *demux_actions*, que importa las secuencias demultiplexeadas en formato ***CasavaOneEightSingleLanePerSampleDirFmt.***

El control de calidad primario se basó en evaluar e identificar las pares de bases de baja calidad tanto en las lecturas forward y en las lecturas reverse para evitar una tasa de fusión baja y por tanto perdida de información. **(Abellan *et al*., 2021)** Para lo cual se tomó como archivo de entrada (input) las secuencias demultiplexeadas que se cargaron en la etapa anterior para examinarlas mediante la extensión DOKDO y obtener un gráfico de control de calidad.

Seguido para el ***denoising y eliminación de secuencias quiméricas*** Se estableció el límite de corte para las lecturas forward y reverse de acuerdo con la puntuación obtenida en la etapa de control de calidad, para posteriormente super posicionarlos. A través del paquete DADA2 se redujo el ruido y se eliminaron las secuencias quiméricas, se realizó la agrupación o clustering en ASVs y se cortaron los primers de amplificación.

La clasificación taxonómica de los ASVs se realizó mediante la anotación comparativa con la base de datos Silva para la región V3 y V4. En la etapa de filtración se eliminaron aquellos contigs que se fusionaron pero que no pertenecen al gen 16S rRNA, entre ellos cloroplastos y mitocondrias. Finalmente, para predecir las vías metabólicas, se llevaron a cabo cuatro etapas: *colocación de secuencias, predicción de genomas en estado oculto, predicción del metagenoma* y *predicciones a nivel de vía*, comparando con genomas completos de la base de datos KEGG.

2.2.2.2. EzBioCloud

Para la predicción de perfiles funcionales las secuencias preprocesadas se asignaron taxonómicamente mediante la base de datos de EZBioCloud, comparando las secuencias con las referencias disponibles para determinar los taxones presentes en las muestras. Posteriormente, las secuencias asignadas taxonómicamente fueron normalizadas a un tamaño de genoma 16S rRNA para cada taxón utilizando

las herramientas de PICRUSt, lo cual permitió predecir las abundancias de genes funcionales en las comunidades microbianas basándose en la información de la base de datos de KEGG. Así, se generaron perfiles metabólicos prediciendo la presencia y abundancia de vías metabólicas en las muestras analizadas. Finalmente, los perfiles metabólicos predichos fueron exportados y visualizados utilizando el software STAMP, que facilitó la comparación estadística y la visualización gráfica de los perfiles metabólicos entre diferentes muestras o condiciones experimentales, mediante gráficos de barras, diagramas de dispersión y diagramas de caja. Este enfoque permitió una estimación detallada de las funciones metabólicas potenciales presentes en las comunidades microbianas estudiadas y proporcionó una comprensión clara de las capacidades metabólicas de los microorganismos en diferentes contextos. Adicionalmente, se utilizó RStudio para facilitar el proceso de análisis y visualización de datos. Se emplearon paquetes específicos como 'phyloseq' para el análisis de datos microbiológicos y 'ggplot2' para la visualización gráfica. Para la creación de mapas de rutas metabólicas específicamente, se utilizaron los paquetes 'KEGGREST' para acceder a la base de datos KEGG, 'pathview' para la integración y visualización de datos en el contexto de las vías metabólicas, y 'dplyr' para la manipulación de datos.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diversidad y abundancia de la microbiota asociada a la rizósfera de *R. glaucus* en cultivos provenientes de la provincia de Tungurahua.

El análisis mediante MTPs generado a través de la plataforma EZ Biocloud permitió obtener un total de reads validos a partir de la secuenciación de alto rendimiento, mismos que fueron asignados a un rango de entre 2,400 y 3,706 OTUs para cada una las 12 muestras provenientes de la rizósfera de *R. glaucus* **(Ver Tabla 7)**, al evaluar el *Good´s coverage* o el nivel de cobertura alcanzado se evidenció que, todas las muestras tienen un porcentaje mayor al 90 %, siendo que el valor mínimo fue de 90.99 % y el máximo de 96.71 %, de modo que, todas las muestras tiene gran representación microbiana, debido a que entre mayor es el valor de *good´s coverage*, existe mayor posibilidad que las especies presentes en las muestras se han identificado en al menos una ocasión.

Los resultados de *good´s coverage* se confirman mediante la curva de alfa rarefacción **(Ver Figura 13)**, ya que inicialmente se evidenció un comportamiento exponencial en la cantidad de OTUs asignadas a medida que se incrementa la cantidad de reads, el cual cambió a un comportamiento constante después de los 18,002 reads, en otras palabras, se evidenció la formación de una meseta de saturación. De acuerdo con **Kazou et al. (2022)**, esta tendencia muestra que se ha logrado capturar la mayor parte de diversidad en base a la profundidad de secuenciación empleada. De tal modo que, para el análisis de los índices de diversidad se normalizaron las 12 muestras hasta aquel punto de saturación, ya que, aunque se incremente la cantidad de reads la asignación de OTUs no será de gran significancia **(Mousa *et al.*, 2024)**.

Tabla 7.

Características de las muestras de suelo analizadas

ID	*Codificación de la muestra*	*Fuente*	*Ubicación*	*OTUs*	*Good´s coverage*
231124-WC-001-16S	M1	Suelo rizosférico	Tisaleo	2400	94.50 %
231124-WC-002-16S	M2	Suelo rizosférico	Alobamba	3697	93.85 %
231124-WC-003-16S	M3	Suelo rizosférico	Barrio Santa Lucía	2933	95.21 %
231124-WC-004-16S	M4	Suelo rizosférico	Huachi Grande	3046	96.71 %
231124-WC-005-16S	M5	Suelo rizosférico	Cevallos	2968	92.81 %

ID	*Codificación de la muestra*	*Fuente*	*Ubicación*	*OTUs*	*Good´s coverage*
231124-WC-006-16S	M6	Suelo rizosférico	Barrio Manzana de Oro	3706	93.46 %
231124-WC-007-16S	M7	Suelo rizosférico	Tisaleo	3639	93.24 %
231124-WC-008-16S	M8	Suelo rizosférico	Alobamba	3413	93.21 %
231124-WC-009-16S	M9	Suelo rizosférico	Barrio Santa Lucía	3361	91.15 %
231124-WC-010-16S	M10	Suelo rizosférico	Huachi Grande	3015	90.99 %
231124-WC-011-16S	M11	Suelo rizosférico	Cevallos	3060	92.91 %
231124-WC-012-16S	M12	Suelo rizosférico	Barrio Manzana de Oro	3561	94.21 %

Nota: Elaboración propia

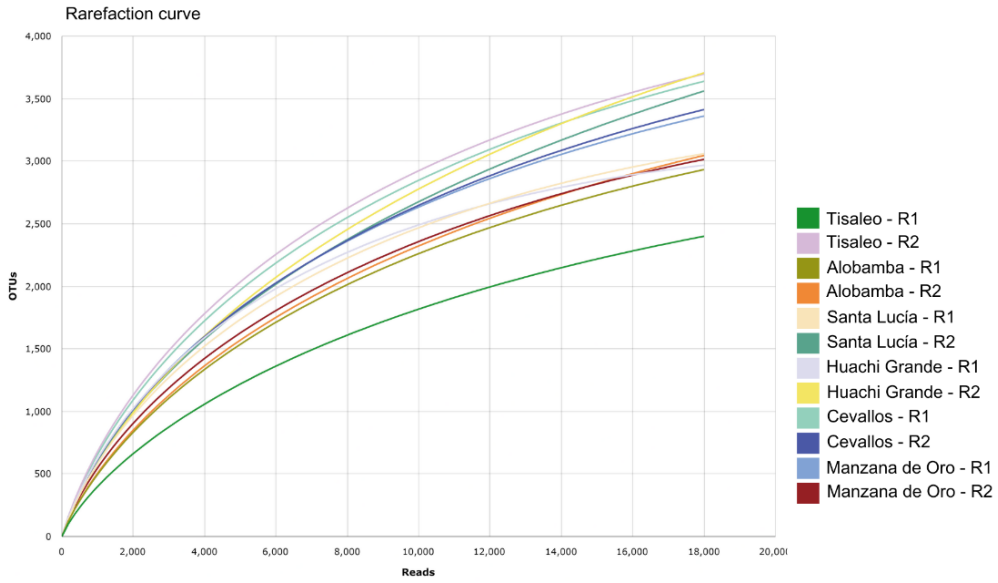


Figura 13. Curva de alfa rarefacción

Nota: La gráfica muestra la relación entre la cantidad de OTUs obtenidos de acuerdo con la cantidad de reads que se generaron en el proceso de secuenciación, la cual se encuentra normalizada a una cantidad de 18002 reads. Fuente: Elaboración propia.

Los índices de Shannon y Simpson permitieron evaluar la diversidad alfa para cada uno de los 6 puntos de muestreo en base a la asignación de OTUs, siendo que, los dos índices mostraron diferencias significativas tanto para la diversidad, riqueza, así como para la uniformidad de las especies asociadas a la rizósfera de cultivos de mora, diferencias que se pueden notar mediante los diagramas de cajas **(Ver**

Figura 13), así como para los valores promedios para cada punto **(Ver Anexo 3)**. La diversidad alfa bacteriana expresada como la diversidad de Shannon y Simpson de los genes 16S rRNA de las muestras se correlacionaron inversamente coincidiendo con los estudios realizados por **Baeshen *et al.* (2023)** en plantas de *Tamarix aphylla* y *Halopeplis perfoliata*.

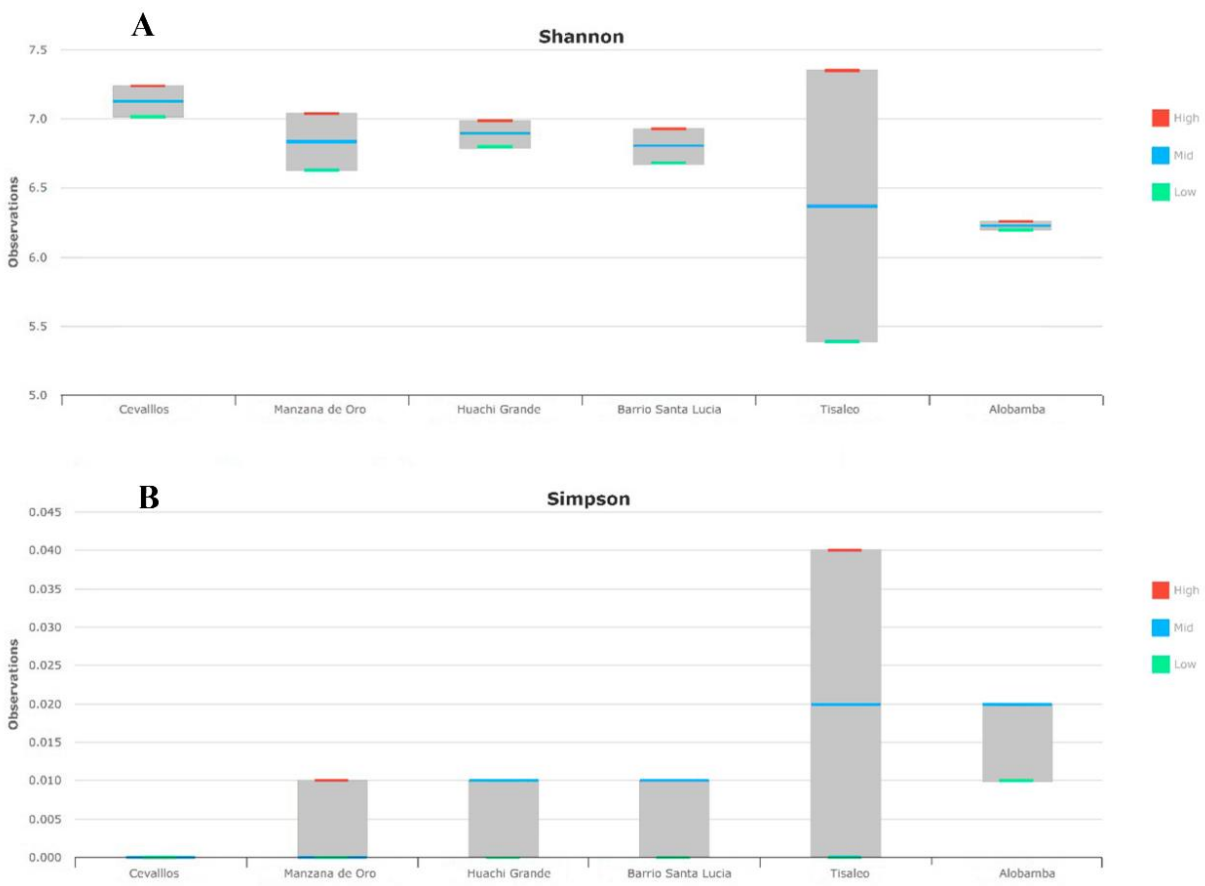


Figura 14. Indicadores de diversidad alfa

Nota: Diversidad alfa de las comunidades microbianas en los cultivos de mora en diferentes ubicaciones. Se analizan los índices de diversidad Shannon y Simpson, y el p-valor se determina mediante la prueba de Wilcoxon rank-sum test con un nivel de significancia del 95%. ***(A)*** Índice de Shannon indica que las muestras pertenecientes a Cevallos, Manzana de Oro, Huachi Grande y Barrio Santa Lucía tienen alta diversidad y equitatividad, mientras que Tisaleo presenta mayor variabilidad y Alobamba tiene menor diversidad. ***(B)*** Índice de Simpson indica que las mismas ubicaciones tienen baja dominancia de OTUS, sin embargo, Tisaleo y Alobamba muestran una mayor dominancia relativa.

El índice de Shannon basa su resultado de acuerdo con la riqueza existente a nivel de taxones, así como en la uniformidad que presenten los microorganismos que pueden ser agrupados dentro de aquellos

taxones **Kers & Saccenti. (2022)**, entre mayor sean los valores para dicho índice, se puede asumir que las comunidades microbianas son mayormente consistentes **(Brisson *et al*., 2019)**, en el contexto de los resultados obtenidos en la presente investigación **(Ver Figura 14)**, se encontró que, Cevallos corresponde al punto con mayor riqueza y uniformidad en los microorganismos identificados pues cada una sus réplicas alcanzaron valores superiores a 7 (7.02 – 7.24 respectivamente), no tan distantes, se encuentran Manzana de Oro (7.04 – 6.63), Huachi Grande (6.99 – 6.80 y Santa Lucía (6.68 – 6.93) presentando diferencias de hasta aproximadamente 0.60 para dicho índice. Un comportamiento similar fue reportado por **Wang et al. (2023)**, donde el índice de diversidad Shannon fue superior en localidades con mayor diversidad de especies en comparación con aquellas con dominancia de unas pocas especies.

Sin embargo, al comparar estos 4 puntos con Tisaleo y Alobamba se puede evidenciar variaciones de mayor significancia, en primer lugar, Alobamba es el punto con la menor media de acuerdo con el índice de Shannon evidenciado en su gráfica de cajas y bigotes **(Ver Figura 14)**, lo que es consistente con cada una de sus réplicas, pues mostraron valores moderadamente separados a los puntos restantes (6.20 – 6.26). Por otra parte, Tisaleo es el único punto con un comportamiento atípico al evidenciado en la presente investigación, ya que a pesar de que sus réplicas corresponden a un mismo punto no presentan un índice de Shannon similar o al menos cercano (5.39 – 7.35), en donde aunque la segunda réplica presenta el mayor valor de las 12 réplicas la primer no lo hace, de hecho, es la réplica con menor riqueza, comportamiento que influye directamente en el diagrama de cajas final, pues se observa que es el punto que más alejados tiene a sus cuartiles inferior y superior de la media.

Walters & Martiny (2020) encontraron que, al analizar suelos correspondientes tanto a ambientes forestales como agrícolas el índice de Shannon variaba significativamente de acuerdo con el factor del pH, de modo que, dicho factor podría ser uno de los posibles diferenciadores para el bajo índice de Shannon obtenido en Alobamba. Al ser una zona de cultivo agrícola constantemente se encuentra bajo prácticas de cuidado, entre ellos la agregación de materia orgánica, fertilizantes entre otro bioinsumos, los cuales se aplican con el fin de mejorar el rendimiento en producción de *R. glaucus*, no obstante, colateralmente se varía el pH del suelo, que ya se ha demostrado que puede cambiar la composición taxonómica en la rizósfera **(Wang *et al*., 2020)**. La medición de este parámetro dentro de la presente investigación sería de gran ayuda para dilucidar correctamente la influencia del pH.

En contraparte, **Willis (2019)** describe que, el índice de diversidad alfa puede verse afectado por sesgos, pues no corresponden a métricas observadas con precisión, de hecho, se debe considerar que pueden darse errores de medición. Entre ellos, se puede mencionar efectos del tipo de muestreo aplicado, sesgo por el procesamiento de muestras al igual que el efecto del procesamiento bioinformático **(Feranchuk *et al*., 2018)**. Por tanto, la forma en cómo se tomaron las muestras de rizósfera, como fue su secuenciación, así como la forma en cómo se las proceso mediante el pipeline Ez Biocloud podría

explicar la variación significativa de aproximadamente 0.96 encontrada en los índices de las réplicas de Tisaleo. Finalmente, se considera como fuente de variación para los distintos índices de Shannon obtenidos en los 6 puntos seleccionados al metabolismo de las plantas, que a pesar de pertenecer a una misma especie, estas pueden tener metabolismos distintos, que se puede evidenciar a la composición del exudoma (*exudados radiculares*), las diferencias en la composición del exudoma pueden cambiar la nivel de respuesta microbiana a desencadenar por parte de las plantas **(Zverev *et al*., 2021)**, teniendo una mayor o menor composición taxonómica que sin duda se evidenciará en los índices de diversidad.

Meena et al. (2017) detallan que, la composición al igual que la concentración de los exudados radicales se encuentran en dependencia del genotipo, así como de la etapa del crecimiento de la planta, incluso, al formar parte de un microbioma vegetal también se ve afectado por las condiciones y variables tanto bióticas como abióticas. Es por tal razón que, existen un gran interés en cribar y caracterizar microbiomas asociados a las plantas, ya que no todas pueden desencadenar reacciones químicas para atraer taxones benéficos a sus fitobiomas en la misma medida **(Chen & Liu, 2024)**.

Por su parte, el índice de diversidad Simpson, que da más peso a las especies dominantes y mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie **(Wei *et al.*, 2021)**, muestra variaciones significativas en las diferentes localidades estudiadas. Cevallos presenta un índice de Simpson cercano a 0.00, lo que refleja una alta diversidad de especies en esta localidad. En contraste, Tisaleo muestra el valor más alto en el índice de Simpson, aproximadamente 0.040, indicando la menor diversidad de todas las localidades. Esto sugiere que en Cevallos no hay dominancia extrema de unas pocas especies, mientras que en Tisaleo, una o pocas especies dominan significativamente.

Mientras que, Manzana de Oro, Huachi Grande y Barrio Santa Lucía presentan índices de Simpson de alrededor de 0.01. Estos valores son superiores a los de Cevallos, pero inferiores a los de Tisaleo, indicando una diversidad media – baja en estas localidades. La comparativa sugiere que, aunque hay una mayor dominancia de unas pocas especies en Manzana de Oro, Huachi Grande y Barrio Santa Lucía en comparación con Cevallos, estas localidades aún mantienen un nivel razonable de diversidad en comparación con Tisaleo. A pesar de las diferencias entre muestras, no se puede asumir que la gran diversidad encontrada en la rizósfera de Cevallos se asocie necesariamente al microbioma radicular de *R. glaucus*, pues como menciona **Gupta et al. (2022)** prácticas agrícolas tales como la aplicación de abono o estiércol pueden aumentar la diversidad bacteriana.

Alobamba, con un índice de Simpson de alrededor de 0.02, presenta una diversidad moderada. En comparación con Tisaleo, Alobamba tiene una comunidad algo más diversa, pero sigue siendo menos diversa que Cevallos. Este valor de Alobamba es también superior al de Manzana de Oro, Huachi Grande y Barrio Santa Lucía, aunque solo ligeramente, indicando una dominancia de unas pocas especies, pero

con una mayor diversidad. Según **Wang et al. (2016)** la textura y humedad del suelo son factores que afectan su variabilidad, lo que conduce a cambios en la diversidad bacteriana, y están significativamente relacionados con el índice de Simpson. Estos factores podrían explicar en parte las diferencias observadas en la diversidad microbiana en la rizósfera entre las localidades estudiadas.

En general, el análisis de los índices de diversidad Shannon y Simpson demuestra variaciones significativas en la diversidad, riqueza y uniformidad en las diferentes localidades estudiadas. Los valores de diversidad observados en las diferentes localidades muestran diferencias sustanciales, respaldadas por la prueba estadística de suma de rangos de Wilcoxon, que indica diferencias significativas en los índices de diversidad entre las localidades con un p-value < 0.05 **(Ver Figura 14)**. Así también, se evidencia la necesidad de correlacionar los índices de diversidad evaluados frente a una meta data más compleja, específicamente una que se encuentre asociada a las propiedades fisicoquímicas del suelo rizosferico, que den una explicación más detallada a las variaciones taxonómicas.

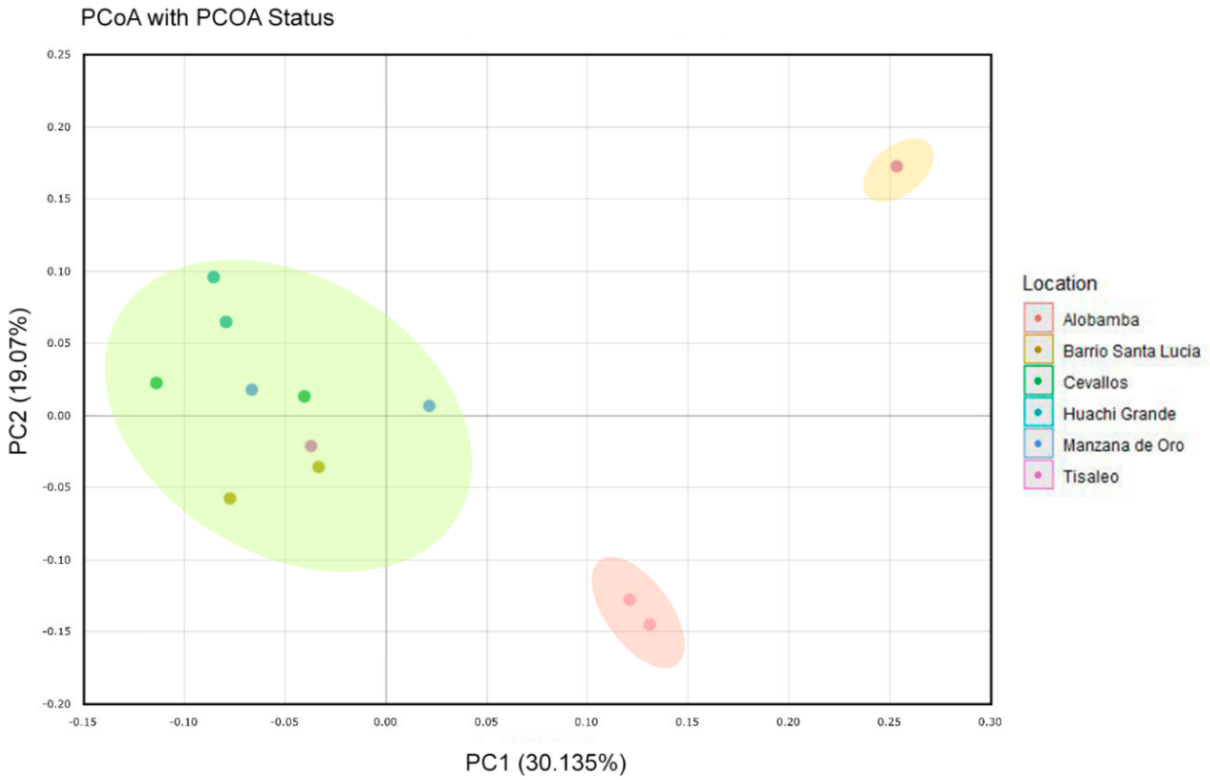


Figura 15. Diversidad beta en base al análisis de coordenadas principales

Nota: Análisis de coordenadas principales (PCoA) para la evaluación de la diversidad beta en la composición microbiana de la rizósfera en los seis puntos de análisis a nivel de especie, se toma como parámetro la disimilitud de Bray – Curtis.

El índice de disimilitud Bray-Curtis, visualizado mediante el diagrama PCoA **(Ver Figura 15)**, permitió determinar la variación en la composición de especies en los 6 puntos de análisis. Este parámetro es altamente sensible a las abundancias relativas al comparar las OTUs de cada punto **(Modin *et al*., 2020)**. Entre la coordenada del eje X y el Eje Y se agruparon el 49.10 % de los cambios en la composición microbiana, al tomar en cuenta que, en la presente investigación se estudia la diversidad microbiana en cultivos de *R. glaucus* en varios puntos, se evidencia que la variabilidad por ubicación puede explicarse mediante el 30.135%, revelando así tres tipos de agrupaciones, la primera agrupación, situada en la zona central izquierda del gráfico, incluye los puntos de Cevallos, Huachi Grande, Santa Lucía y la segunda réplica de Tisaleo, la segunda agrupación, ubicada en la zona inferior derecha, que está compuesta por las dos réplicas pertenecientes a Alobamba y la tercera agrupación, localizada en la zona superior derecha, consiste en la réplica restante de Tisaleo.

Resultados que se comprueban mediante la agrupación UPGMA **(Ver Anexo 5),** el cual consiste en un tipo de método de agrupamiento jerárquico para interpretar la matriz de distancias mediante el uso de ligamiento promedio **(Jiang *et al*., 2021)**. Mediante este observa que la composición microbiana es similar en las réplicas por cada uno de los puntos analizados, sin embargo, esta tendencia no se observó en las réplicas de Tisaleo, sugiriendo que existe alguna fuente de variación en su microbiota

Se ha evidenciado que, el pH es uno de los factores que al igual que en la diversidad alfa logra variar la diversidad beta, debido a que su variación puede afectar procesos metabólicos de las comunidades bacterianas, procesos que están implicado en la viabilidad de crecimiento y reproducción, de modo que la estructura y composición microbiana diferirá si este factor sufre cambios significativos. **(Pu *et al*., 2023)** De modo que, se podría colocar a este factor nuevamente como fuente de variabilidad que, en caso de ser cierto coincidiría con la variación identificada para una de las réplicas del punto de Tisaleo que al igual que en el PCoA también presenta diferencias significativas al compararse con el resto de los puntos.

Por otra parte, Alobamba vuelve a mostrar diferencias a nivel de diversidad beta, no obstante, a diferencia de Tisaleo sus réplicas si se encuentran relacionadas por cercanía, esto se evidenció en la rizósfera asociada a *Scutellaria tsinyunensis*, en donde a pesar de que todas las plantas pertenecían a la misma especie bajo condiciones físico químicas similares se evidenció valores distintos de diversidad beta, en esta situación se notó que, el factor de variabilidad correspondía al área de población de la planta. (**Xu *et al*., 2022)** La presente investigación tomo áreas estandarizadas para todos los cultivos, sin tomar en cuenta la extensión total del mismo, por ende, este puede ser un factor determinante y por tanto de sesgo que pudo averse presentado en Alobamba, sin duda, requeriría realizar un nuevo muestreo adaptado a este hallazgo de la literatura y confirmar su influencia.

Finalmente, **Wang et al. (2022)** describe como la diversidad beta puede variar de acuerdo a la edad de las plantas, ya que, las distintas sus distintas definen su afinidad por ciertos taxones, en su estudio demuestran que las plantas de *Cunninghamia lanceolate* presentan diversidades beta menores a medida que estas envejecían, por tanto, se presume que algunas de las plantas de *R. glaucus* que fueron seleccionadas aleatoriamente podían encontrarse en edades distintas y su requerimiento microbiano también difería, siendo así un posible causante para las variaciones de Alobamba con el resto de puntos, e incluso para la variación atípica presentada para la réplica 1 de Tisaleo. Premisa que se confirmaría mediante una evaluación metagenómica de acuerdo con el estado de crecimiento controlado en plantas de mora.

Aunque, el PCoA muestra diferencias entre los puntos ya mencionados, la prueba de significancia PERMANOVA **(Ver Anexo 4)** da a notar que a un nivel de significancia del 95 %, las permutaciones realizadas entre la comparación de cada uno de los puntos las variaciones a composición no son significativas, ya que en ningún momento el valor de p-value en ningún caso supera al 5%, por tanto, el 30.135 % que demuestra la variabilidad de acuerdo a la locación no es lo suficientemente influyente para que se concluya que tanto las comunidades microbianas de las réplicas y de los puntos difieren en gran medida, aunque sí podrían hacerlo si el nivel de significancia se incrementan.

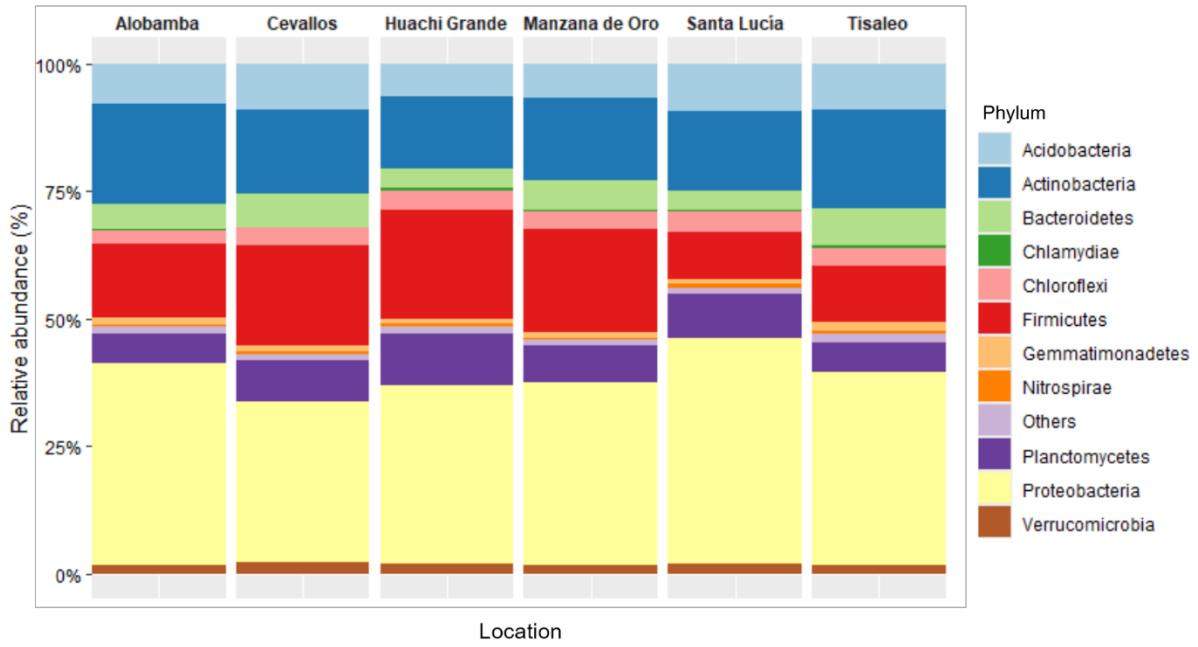


Figura 16. Niveles de abundancia relativa

Nota: Composición taxonómica a nivel de Filo identificadas en la rizósfera de los seis puntos de muestreo, se presentan aquellos taxones que contengan un límite de prevalencia mayor o igual al 1%

(cut off ≥1%), mientras que aquellos taxones que presentaron una abundancia menor al límite de prevalencia se agruparon en la sección Others.

La agrupación y el análisis de las OTUs permitió establecer la composición microbiana en dos niveles taxonómicos representados mediante gráficas de abundancia relativa, a nivel de filo **(Ver Figura 16)** y a nivel de clase **(Ver Anexo 5**), los taxones representativos se determinaron de acuerdo a un límite de prevalencia o límite de abundancia mínima de corte (Cut off) del 1%, de modo que, para el primer nivel taxonómico se estableció la presencia media de 11 filos con mayor abundancia para los 6 puntos de cultivo y sus respectivas réplicas, a partir de los cuales se identificaron 25 clases. Los filos con mayor predominancia constan de *Proteobacteria* (37 %), *Firmicutes* (16 %), *Actinobacteria* (17 %), *Planctomycetes* (8 %), *Acidobacteria* (8 %), *Chloroflexi* (3 %), *Bacteroidetes* (5 %), *Verrucomicrobia (2 %), Gemmatimonadetes* (1 %), *Chlamydiae* (1 %) *y Nitrospirae* (1%). De acuerdo con **Chen et al. (2021)**, estos taxones tienden a estar presentes en altas prevalencias al caracterizar microbiomas del suelo y la rizósfera de las plantas.

A pesar de que los filos identificados se encuentran dentro del límite de prevalencia del 1 %, se evidencia que tres de ellos (*Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*) abarcan más del 60 % de la abundancia relativa total en cada una de las réplicas de cada punto de muestreo. **Mhete et al. (2020)** explican que, los miembros que hacen parte del filo *Proteobacteria* comúnmente muestran mayor prevalencia en ecosistemas agrícolas, suelos salinos, suelos semiáridos y al igual que la zona de estudio de la presente investigación en rizósferas. Su presencia indica gran capacidad fotosintética **(Wei *et al*., 2018)**, así también, sus linajes se inmiscuyen en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, carbono y azufre **(Chen *et al*., 2023),** procesos útiles para la nutrición de *R. glaucus*.

Por otra parte, se ha reportado la dominancia de *Firmicutes* a nivel de filo en distintos tipos de hospedadores, entre ellos *Oryza sativa* **(Zhang *et al*., 2019)** así como *Triticumaestivum L.* **(Fan *et al*., 2017)**, y mediante la presente investigación ya se la puede reportar en la especie *R. glaucus* presente en la provincia de Tungurahua. La literatura además menciona que, su abundancia relativa tiende a mantenerse representativa no solo en la zona rizosférica de las plantas, sino también en la endósfera radicular **(Kumar *et al*., 2012)**, además que, dicha abundancia podría incrementarse cuando el entorno de crecimiento afronte condiciones de sequía **(Xu *et al*., 2018)**.

Encontrar miembros de este filo al estudiar microbiomas asociados a zonas agrícolas es de gran importancia ya que tienen la capacidad de generar esporas latentes con gran resistencia, las cuales se pegan y protegen a las células vegetales bajo condiciones de estrés biótico tal como radiación y aumento de temperatura **(Bandopadhyay & Shade, 2024)**. Los autores **Hashmi et al. (2020)** detallan que

Firmicutes actúa a modo de promotor del crecimiento vegetal (PCV), los cuales se encuentran bajo investigación para implementarlos dentro de procesos biológicos de agricultura sostenible.

Al igual que los dos filos anteriores, *Actinobacteria* es un taxón bacteriano con gran predominancia a nivel de rizósfera en varios tipos de plantas ya que sus miembros tienen la capacidad de utilizar los nutrientes producidos por las plantas con el fin de promover el crecimiento vegetal. **(Narsing et al., 2022)** Su presencia es de gran importancia en la rizósfera debido a su capacidad de producir enzimas, vitaminas al igual que metabolitos con propiedades antibacteriales, antifúngicas y antivirales a favor del huésped. **(Elshafie & Camele, 2022)** Las *Actinobacterias* también influyen dentro del ciclo de nutrientes y en áreas de cultivo, su predominancia se relaciona con una buena calidad del suelo al igual que con el rendimiento de producción de cultivos **(Siddharthan *et al*., 2022).**

Jiang *et al*. (2017) llevaron a cabo un estudio similar a la presente investigación en la locación de Lishui, Nanjing, China, en donde mediante el cultivo de plantas de mora (*Rubus* spp.) en una misma zona bajo las mismas condiciones se obtuvo que los principales perfiles taxonómicos a nivel de filo fueron *Acidobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Gemmatimonadetes*. Evidenciando la ausencia de filos como *Firmicutes* o taxones con menor abundancia como *Verrucomicrobia, Planctomycetes, Chlamydiae y Nitrospirae* encontrados en la especie *R. glaucus*, lo que puede verse influenciado por la variación de la zona geográfica o incluso la especie de la planta puede determinar tendencia hacia ciertos taxones

En este estudio, se utilizó el upset plot **(Ver Figura 17)** para analizar las intersecciones de especies de comunidades bacterianas en las diferentes muestras de rizósfera de mora *R. glaucus*. Este enfoque permite visualizar las similitudes y diferencias entre las diversas comunidades microbianas presentes en las muestras, presentando una visión detallada de su diversidad y estructura. Se presenta una intersección significativa en todas las muestras con 28 elementos compartidos, lo que sugiere que las muestras comparten condiciones ambientales o tratamientos similares, resultando en perfiles microbianos comparables. Un comportamiento similar reporta **Oliveira et al. (2024)** en su estudio de caracterización de los agrosistemas del archipiélago de Madeira donde sea evidenciado que comunidades microbianas de nichos ecológicos similares mantienen una tendencia considerable de superposición en sus composiciones microbianas.

Las intersecciones menores, que abarcan entre 1 y 3 elementos compartidos, indican una alta diversidad y especificidad en las comunidades microbianas. Esta variabilidad puede ser atribuida a diferencias en factores ambientales tales como tipo de suelo, condiciones de salud de la planta, y niveles de humedad, que afectan significativamente a la composición microbiana **(Mousa *et al*., 2024)**. Se ha demostrado en estudios previos que incluso ligeras variaciones en las condiciones ambientales pueden resultar en

composiciones microbianas distintas debido a la especificidad de nicho y las interacciones entre especies microbianas **(Tang *et al.*, 2020)**. Por ejemplo, las variaciones en la humedad del suelo, la disponibilidad de nutrientes y los niveles de pH pueden influir significativamente en la diversidad y composición microbiana **(Cui *et al.*, 2023).**

Por otro lado, la alta diversidad observada en las numerosas intersecciones pequeñas en el sugiere una amplia gama de nichos microbianos. Esta diversidad es crucial para comprender los roles ecológicos de los microorganismos en la salud y el desarrollo de las plantas. Estudios recientes de comunidades microbianas, han destacado la importancia de la diversidad microbiana en el funcionamiento del ecosistema y el ciclado de nutrientes **(Langille *et al*., 2013)**.

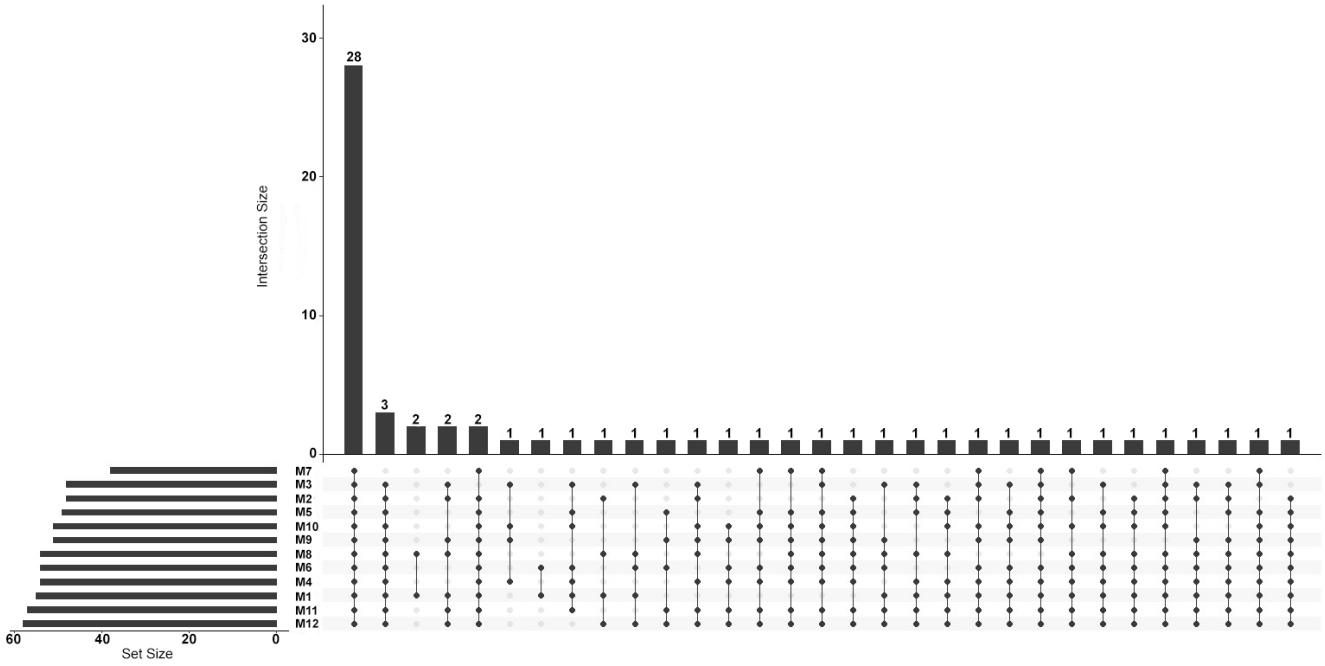


Figura 17. Distribución de especies microbianas en diferentes muestras rizosféricas de *R. glaucus*

Nota: El UpSet plot resume la presencia de especies entre las 12 muestras (*M1 a M12*) para identificar similitudes y diferencias en la composición de especies. El gráfico de barras horizontal en la parte inferior izquierda muestra el número total de especies presentes en cada muestra. Los círculos en la matriz de cada panel representan las partes únicas y comunes en las secciones de los diagramas de Venn (*especies únicas y compartidas*). Los círculos conectados indican una cierta intersección de especies entre las muestras. El gráfico de barras en la parte superior de cada panel resume el número de especies para cada combinación única o superpuesta de muestras.

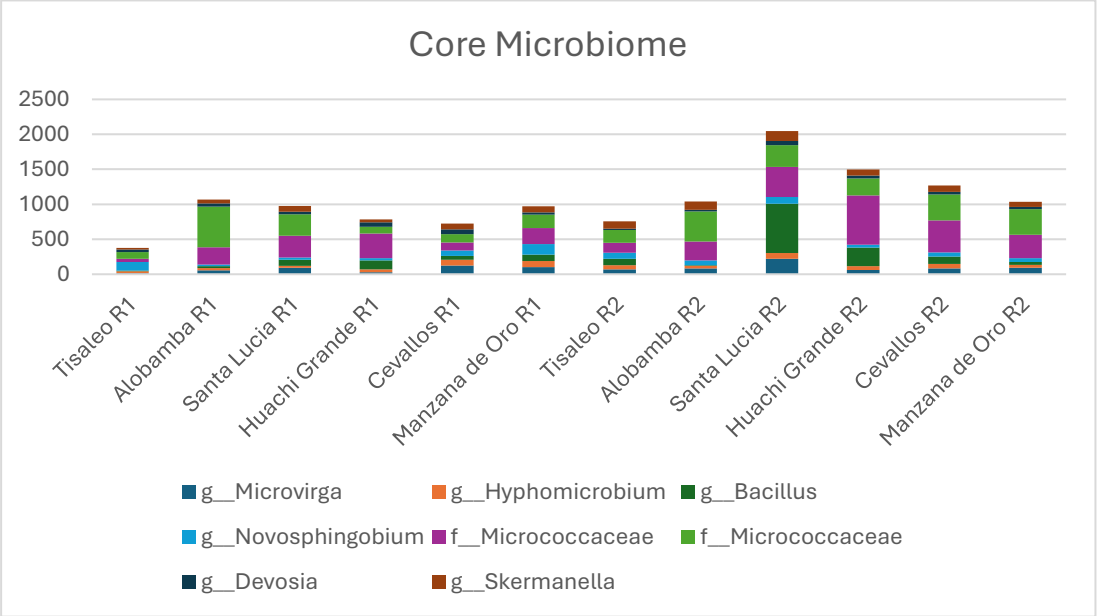


Figura 18. Core Microbiome

Nota: Abundancia de los ASVs que conforman el core microbiome para la rizósfera de *R. glaucus* en las 12 réplicas.

El Core Microbiome (microbioma central) **(Ver Figura 18)**, definido como conjuntos de microorganismos que forman núcleos de interacciones que pueden usarse para optimizar las funciones microbianas a nivel de plantas individuales y ecosistemas **(Toju *et al*., 2018),** se refiere al conjunto de plantas y microorganismos que se encuentran consistentemente en una muestra o en conjunto de muestras **(Dong *et al*., 2022)**, en este caso, en diferentes localidades de muestras rizosféricas de mora *R. glaucus*, lo que es importante porque estos microorganismos pueden jugar roles críticos en la salud y funcionamiento de las plantas, como la promoción del crecimiento, la protección contra patógenos y la mejora de la absorción de nutrientes. En las plantas, el microbioma central se forma debido a la selección natural y adaptación de ciertos microorganismos que prosperan en el entorno específico de la rizósfera de la planta **(Kumar *et al*., 2023)**.

A nivel de ASVs se identificó, seis géneros y dos familias presentes en todas las localidades muestreadas. Los géneros identificados son *Microvirga, Hyphomicrobium, Bacillus, Novosphingobium, Devosia* y *Skermanella.* Las familia identificada es *Micrococcaceae*. La presencia consistente de estos microorganismos en todas las localidades sugiere que forman parte del core microbiome de la rizósfera

de *R. glaucus* de cultivos provenientes a seis puntos pertenecientes a la provincia de Tungurahua. Estos microorganismos desempeñan funciones cruciales, como es el caso del género *Microvirga* en su capacidad para fijar nitrógeno lo que ayuda a mejorar la disponibilidad de este nutriente esencial para las plantas. La fijación de nitrógeno es crucial en suelos pobres en este elemento, siendo promotor del crecimiento vegetal **(Jiménez *et al*., 2019)**.

Por su parte, *Hyphomicrobium*, contribuye a la degradación de compuestos orgánicos y participa en procesos como la desnitrificación, que es crucial para la regulación del nitrógeno en el suelo, destacando su capacidad para utilizar compuestos de metanol y su papel en la modulación de la comunidad microbiana del suelo **(Yousaf *et al.,* 2024)**. Además, *Bacillus* es conocido por su capacidad para promover el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas involucradas en los procesos de germinación de semillas, iniciación de flores, expansión de hojas, elongación de tallos, o desarrollo de flores y frutos **(Tsotetsi *et al.,* 2022)**, y por su capacidad de mejora en la absorción de nutrientes y la resistencia a estreses ambientales, jugando un papel esencial en la salud y productividad de las plantas **(Hashem *et al.,* 2019).**

El género *Novosphingobium* incluye cepas bacterianas capaces de degradar una amplia gama de compuestos aromáticos xenobióticos, y es, por lo tanto, se considera un género importante en diversas aplicaciones de biorremediación **(Krishan *et al.*,2017)**. Además, *Devosia* es conocido por su papel en la fijación de nitrógeno y su capacidad para promover el crecimiento de las plantas, la micorrización y la acumulación de N mejorando así la fertilidad del suelo y la productividad de las plantas **(Zhang *et al.,* 2024**). *Skermanella*, por su parte, incluye bacterias que tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos y participar en la mineralización de nutrientes, lo que mejora la disponibilidad de estos para las plantas, favoreciendo así su crecimiento **(Ajilogba *et al.,* 2022)**.

La familia *Micrococcaceae* es conocida por su capacidad para descomponer materia orgánica y participar en el biocontrol de patógenos del suelo, promoviendo la salud de las plantas. Estas bacterias desempeñan un papel crucial en la mineralización de nutrientes y la degradación de compuestos orgánicos complejos, mejorando la fertilidad del suelo y la salud general de la planta **(Dubey *et al.,* 2022)**. De esta manera, cada uno de estos microorganismos y familias identificadas en el core microbiome de *R. glaucus* juega un papel vital en la promoción del crecimiento vegetal, la protección contra patógenos y la mejora de la absorción de nutrientes, subrayando la importancia de estos microorganismos en la salud y productividad de las plantas.

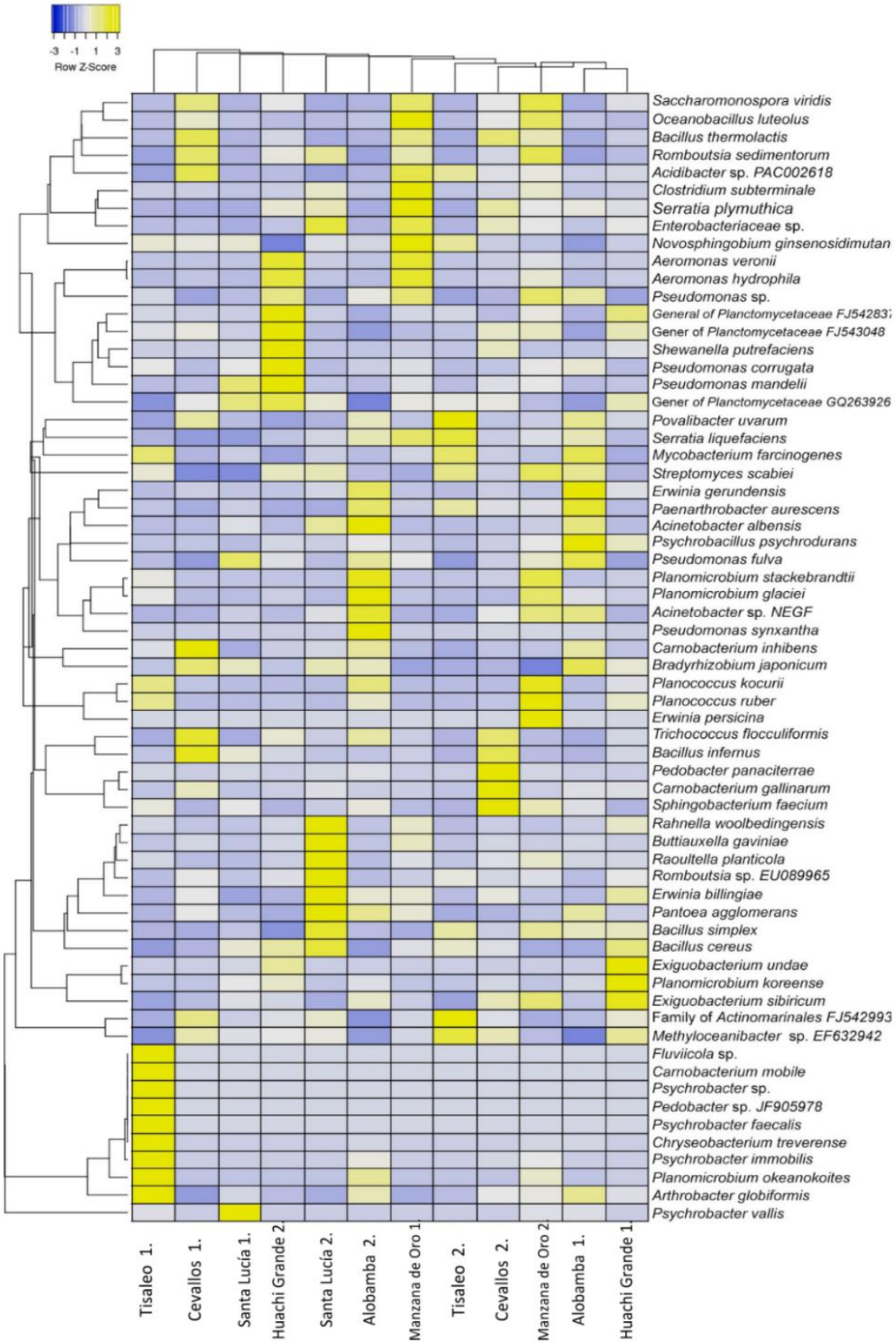


Figura 19. Especies representativas en muestras rizosféricas *de R. glaucus.*

Nota: Abundancia de especies microbianas en diversas muestras de rizósfera de mora. Los valores de abundancia representan el promedio de las réplicas para cada muestra, mostrando las diferencias en la

composición microbiana entre distintas localidades de muestreo. El heatmap utiliza un gradiente de color, donde el azul indica baja abundancia y el amarillo alta abundancia, para visualizar las variaciones relativas de cada especie microbiana. Los colores en el heatmap indican la abundancia relativa de cada especie, con un gradiente que va de azul (baja abundancia) a amarillo (alta abundancia).

Además, se ha encontrado que las comunidades microbianas son influenciadas significativamente por el sitio de muestreo **(Adedayo *et al.,* 2022).** Este hallazgo se refuerza en la identificación de especies bacterianas **(Ver Figura 19),** que muestra patrones de abundancia similares. Por ejemplo, especies como *S. viridis*, *O.lutimaris* y *B. thermocloacae* mostraron alta abundancia en múltiples muestras, lo que indica que estas especies pueden ser dominantes en la rizósfera de la mora bajo ciertas condiciones ambientales.

Asimismo, especies como *Pseudomonas sp.* y *P. glaciei* presentaron patrones de abundancia específicos a ciertas muestras, sugiriendo una preferencia por condiciones ambientales particulares o interacciones específicas con la planta huésped. De la misma manera, se reveló variaciones significativas en la composición microbiana entre diferentes localidades en las que se destacan, *Cevallos 1, Santa Lucía 1 y Manzana de Oro 1,* destacando cómo factores ambientales locales, como el tipo de suelo y las condiciones climáticas, pueden influir en la estructura de las comunidades microbianas.

Para entender los niveles en abundancia de las especies identificadas se realizó una agrupación en 4 categorías: cultivables, no cultivables, patógenos y benéficos **(Ver Tabla 9)**. Las especies cultivables en condiciones de laboratorio son aquellas que presentan requerimientos nutricionales y ambientales que pueden ser replicados fácilmente en un entorno controlado. Entre las especies cultivables más importantes destacan *Pseudomonas* sp., *B. simplex*, *S. scabiei*, y *P. aurescens*. La viabilidad de estas especies para crecer en laboratorio ha permitido su utilización en una variedad de estudios, pues como lo respalda **Vincze et al. (2024)** estas especies han demostrado su papel crucial en la promoción del crecimiento de las plantas y la protección contra patógenos del suelo.

Es así, que los microorganismos como principal biota del suelo, desempeñan un papel fundamental en la restauración del ecosistema terrestre **(Koskey *et al.,* 2021)**. La introducción de microorganismos beneficiosos promueve la adaptabilidad al estrés adverso al mejorar la fertilidad del suelo, inhibir los patógenos e inducir resistencia sistémica **(Vincze *et al.,* 2024).** Entre estos microorganismos beneficiosos, especies como *Pseudomonas* y *Bacillus,* tienen un gran potencial en la promoción del crecimiento de las plantas y la remediación del suelo **(Wang *et al.,* 2022)**. Por su parte, *S. scabiei* (cepas no patógenas) es conocida por su capacidad para sintetizar una amplia gama de compuestos orgánicos bioactivos que provocan efectos directos o indirectos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas y sus propiedades antimicrobianas **(Khan *et al.,* 2023)**.

Además, *P. agglomerans* ha mostrado eficacia en la inhibición de patógenos de plantas como resultado de la producción de antibióticos, mecanismos de competencia o de inducción de resistencia de las plantas **(Dutkiewicz *et al.*, 2016)**. En conjunto, el uso de estos microorganismos no solo optimiza el rendimiento de los cultivos, sino que también contribuye a la salud del ecosistema agrícola, reduciendo la necesidad de fertilizantes y pesticidas químicos y promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles **(Nadarajah & Abdul, 2023).**

Gran parte de las especies de las comunidades bacterianas identificadas mediante la amplificación del gen 16S rRNA no son viables para el cultivo en condiciones de laboratorio, debido a que los medios no logran simular las condiciones ideales o mínimas para su crecimiento, así también el cultivo en placa puede causar tal nivel de estrés que impide su proliferación **(Fleischmann et al., 2021).** En la rizósfera de *R. glaucus*, las especies no cultivables corresponden a *S. viridis, O. luteolus, B. thermolactis, R. sedimentorum, C. subterminale, N. ginsenosidimutans, Pseudomonas sp., S. liquefaciens, M. farcinogenes, E. gerundensis, Acinetobacter sp. NEGF, P. stackebrandtii, B. simplex, E. undae* y *Psychrobacter sp* **(Ver table 8).** Estas especies están implicadas en la degradación de compuestos orgánicos y xenobióticos, en la fijación y transformación de nitrógeno, implicados en la fitopatógena (**Parra *et al.*, 2023; Mehmood *et al.*, 2023**), de hecho, *B. simplex* y *Psychrobacter* sp. se dan lugar cuando las condiciones del entorno son extremas o frías **(Rodrígues *et al.*, 2009)**, mientras que, *B. japonicum* y *P. corrugata* son índice de la existencia de relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos. (**Egamberdieva *et al.*, 2018**)

Para la última clasificación "especies patógenas" se dividió en dos subclases patógenas para plantas y para humanos. Para el caso de los fitopatógenos, se tiene que la réplica 1 de Huachi Grande muestra gran abundancia para *S. liquefaciens*, el cual es un patógeno oportunista que puede causar pudrición en los tejidos vegetales **(Khalifa, 2022)**. Cevallos 1 y Santa Lucía 1 demuestran evidencia en *E. gerundensis*, mismo que según la literatura menciona que puede ser usado como microorganismo de biocontrol frente a infecciones fúngicas (**Gnonlonfoun *et al.*, 2024**). En el caso de especies patógenas hacia humanos, se evidencia que Santa Lucía tiene gran abundancia de *M. farcinogenes*, mismo que causa infecciones en la piel **(Cheng & Lee, 2022).** Huachi Grande presenta *S. liquefaciens*, el cual causa infecciones nosocomiales **(Ikumapayi *et al.*, 2016)**. Finalmente, para Manzana de Oro 1 se identificó A. veronii, causante de infecciones gastrointestinales **(Xia *et al.*, 2021).**

Tabla 8.

Clasificación de especies según su viabilidad de cultivo, patogenicidad y beneficios para la planta *R. glaucus*

Especie	Cultivable (laboratorio)	No cultivable (laboratorio)	Patógeno	Benéfico
Saccharomonospora viridis	■			
Oceanobacillus luteolus	■			
Bacillus thermotolerans	■			
Romboutsia sedimentorum		■		
Acidibacter sp. PAC002618		■		
Clostridium subterminale	■			
Serratia plymuthica	■		■	
Enterobacteriaceae sp.	■		■	
Novosphingobium ginsenosidimutans		■		
Aeromonas veronii	■		■	
Aeromonas hydrophila	■		■	
Pseudomonas sp.	■		■	■
Gener of *Planctomycetaceae* FJ542983		■		
Gener of *Planctomycetaceae* GQ263926		■		
Povalibacter uvarum		■		
Serratia liquefaciens	■		■	
Mycobacterium farcinogenes	■		■	
Streptomyces scabiei	■		■	
Paenarthrobacter aurescens	■			■
Acinetobacter albensis	■		■	
Psychrobacillus psychrodurans		■		
Planomicrobium stackebrandtii		■		

Especie	Cultivable (laboratorio)	No cultivable (laboratorio)	Patógeno	Benéfico
Planomicrobium glaciei		■		
Acinetobacter sp. *NGEF*		■		
Carnobacterium iners		■		
Trichococcus flocculiformis		■		
Bacillus infernus	■			
Pedobacter panaciterrae		■		
Carnobacterium gallinarum		■		
Sphingobacterium faecium		■		
Rahnella woolbedingensis		■		
Buttiauxella gaviniae		■		
Rouxiella chamberiensis		■		
Romboutsia sp. EOU89965		■		
Erwinia billingiae	■		■	
Pantoea agglomerans	■			■
Bacillus simplex	■			■
Exiguobacterium undae	■			
Planomicrobium koreense		■		
Exiguobacterium sibiricum		■		
Family of *Actinomarinoles* FJ542993		■		
Methylocella silvestris		■		
Fluviicola sp.		■		
Carnobacterium mobile		■		
Psychrobacter sp. JP50978		■		
Psychrobacter faecalis		■		
Chryseobacterium treverense		■		

Especie	Cultivable (laboratorio)	No cultivable (laboratorio)	Patógeno	Benéfico
Psychrobacter immobilis				
Planomicrobium okeanokoites				
Arthrobacter globiformis				
Psychrobacter vallis				

Nota: Esta tabla clasifica las especies identificadas en el heatmap según su capacidad de ser cultivadas en condiciones de laboratorio, su patogenicidad para plantas y humanos, y sus beneficios para las plantas. Las especies marcadas como "cultivables" son aquellas que pueden ser fácilmente cultivadas en laboratorio, mientras que las "no cultivables" presentan dificultades para ser cultivadas en dichas condiciones. Las especies patógenas son aquellas que pueden causar enfermedades en plantas o humanos. Las especies benéficas son aquellas que promueven el crecimiento y la salud de las plantas mediante diversos mecanismos biológicos.

3.2. Perfiles metabólicos de los taxones encontrados en el microbioma de la rizósfera asociada a *R. glaucus* en cultivos provenientes de la provincia de Tungurahua

La rizósfera de las plantas es un entorno dinámico donde las interacciones entre las raíces y la microbiota del suelo desempeñan un papel crucial en la salud y la productividad de las plantas **(Chauhan *et al.*, 2023)**. Para determinar las funciones metabólicas que tienen las bacterias presentes en la rizósfera de las plantas de mora, se identificaron las rutas metabólicas presentes en las poblaciones bacterianas que forma parte de la microbiota de la rizósfera de las plantas analizadas, para esto se realizó un análisis de predicción de comunidades utilizando la herramienta bioinformática PICRUSt, que mediante la predicción de genes y genomas comparados con la base de datos de Kyoto (KEGG), logró predecir un total de 425 perfiles metabólicos asociadas al microbioma rizosférico para *R. glaucus* **(Ver Anexo 6)**.

Mediante el entorno de EZ Biocloud se analizó aquellos perfiles para determinar diferencias significativas entre los diferentes puntos de muestreo utilizando la prueba Krustal – Wallis, a lo que se obtuvo que los 6 puntos y sus 2 réplicas superan el p-value de 0.05, de modo que, se establece que no existe diferencias significativas a nivel de perfiles metabólicos. Se procedió a comparar las dos réplicas para cada punto con el fin de establecer si existe diferencias a nivel metabólico, para lo cual se empleó la prueba de significancia de G-test (w/Yates')+Fisher's, a dos lados con un valor P<0.0.5, el cual es adecuado para comparar dos réplicas de un mismo punto **(Chung *et al.*, 2019),** se evidenció que no existen gran cantidad de rutas metabólicas con variabilidad y que las mismas acercaban su p-value a cero de modo que la variabilidad era mínima. Por ende, se presentan las principales clasificaciones de las rutas metabólicas, en donde, se evidenciaron 8 agrupaciones principales de acuerdo con la función metabólica que estas cumplen **(Ver Figura 20)**.

Las 425 rutas metabólicas están divididas en el Metabolismo de Aminoácidos, metabolismo de carbohidratos, biosíntesis de pared celular, metabolismo energético, metabolismo de cofactores y vitaminas, metabolismo de nucleótidos, biodegradación de metabolitos y xenobióticos entre otras, las cuales se agruparon como Miscellaneous Metabolism pathways, las cuales representan rutas que no se encuentran en gran abundancia y generalmente, son rutas intermedias que dan como resultado las 7 rutas antes mencionadas.

El metabolismo de los carbohidratos representados por el color azul tiene relación directa con una diversidad funcional consistente, ya que investigaciones como la de **Huang et al. (2024)** identificaron que, el metabolismo de carbohidratos muestra que los microorganismos presentes en la rizósfera tienen la capacidad de utilizar el carbono secretado a través de las raíces en forma de exudados como sustrato. Por otra parte, **Jiang et al. (2021)** describe que, las plantas logran moldear el ensamblaje de su

microbioma radicular a través de este perfil metabólico, estructurando su composición taxonómica a conveniencia de la planta.

Una tendencia similar sucede en el caso del metabolismo de aminoácidos (Color celeste), ya que este es la prueba de la interacción existente entre las plantas y su microbioma radicular, las plantas utilizan la secreción de aminoácidos para atraer microorganismos mutualistas, de hecho, estas comunidades microbianas tienen la capacidad de manipular el metabolismo de la planta con la finalidad de aumentar la producción de aminoácidos. **(Moormann *et al*., 2022)** Así también, el metabolismo de aminoácidos le permite diferenciar a la planta entre microorganismos comensalitas y patógenos, ya que pueden identificar variaciones especificas en la forma en como los microorganismos metabolizan los aminoácidos exudados, permitiéndole identificar especies patógenos. **(Liu *et al*., 2021)** Las rutas implicadas en la biosíntesis de pared celular (Color verde claro) están relacionas a aquellas rutas precursoras para la formación de peptidoglucano, así como de otros componentes celulares que protegen a ciertos grupos de bacterias del estrés ambiental, su presencia puede indicar procesos de alargamiento y división celular **(Radkov *et al*., 2018)**. Mismos que se dan lugar en gran medida en la rizósfera.

El metabolismo energético (representado por el color verde oscuro) engloba aquellas vías que le permiten a las comunidades bacterianas obtener energía a partir de varios sustratos, tales como glucolisis, metabolismo de polisacáridos, aminoácidos, nucleótidos, cofactores y vitaminas **(Li *et al*., 2021)**, mismos que son exudados a partir de las raíces. Finalmente, las rutas implicadas en el metabolismo de xenobióticos (Color anaranjado oscuro) guardan relación con la presencia de sustancias extrañas generalmente contaminantes, al tomar en cuenta los entornos agrícolas estos compuestos pueden englobar a pesticidas y detergentes **(Salem *et al*., 2017)**, los cuales al ser agregados en áreas de cultivos pueden influir directamente sobre la composición y riqueza microbiana, frente a este tipo de estrés se da lugar la rizoremediación **(Cesco *et al*., 2021)**, en donde la microbiota convierte los compuesto xenobióticos en compuesto orgánicos no tóxicos **(Jaiswal & Verma, 2016)**.

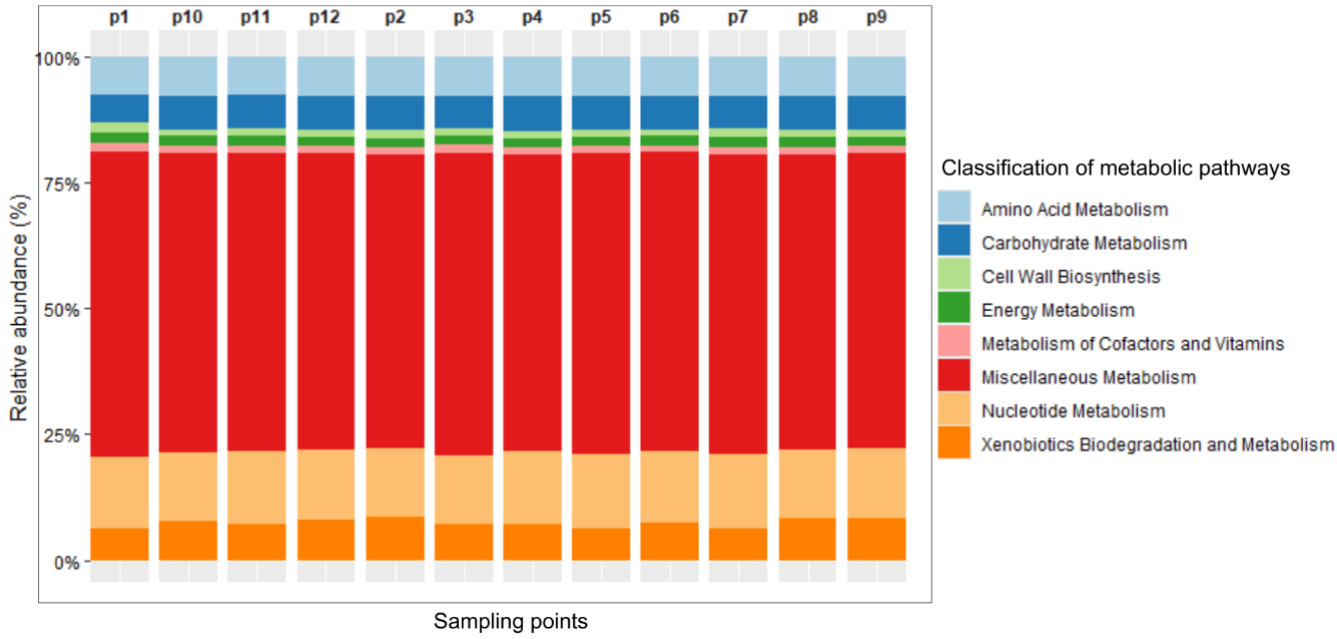


Figura 20. Abundancia a nivel de contribuciones relativas

Nota: En este gráfico se muestra la abundancia relativa de diversas categorías funcionales en muestras de p1 a p12, representadas por colores: Metabolismo de Aminoácidos (celeste), Metabolismo de Carbohidratos (azul), Biosíntesis de Pared Celular (verde claro), Metabolismo Energético (verde oscuro), Metabolismo de Cofactores y Vitaminas (rosa), Metabolismo de Miscellaneous (rojo), Metabolismo de nucleótidos (tomate claro) y Biodegradación y metabolismo de xenobióticos (tomate oscuro). Este gráfico ilustra cómo varían las funciones metabólicas microbianas en las distintas muestras, proporcionando una visión comparativa de sus contribuciones funcionales.

El metabolismo de los carbohidratos, representado por los segmentos de color naranja se consideran como la clasificación con mayor abundancia para cada uno de los puntos, lo que indica una alta prevalencia de vías involucradas en la descomposición y utilización de carbohidratos, que es esencial para la producción y almacenamiento de energía en las comunidades microbianas **(Berg *et al*., 2020)**. El metabolismo de los aminoácidos (representado por segmentos azules) muestra una variación significativa entre las muestras, se videncia que esta clasificación es más prominente en las muestras p1, p3, p5 y p7 en comparación con otras. Esta variación podría deberse a diferencias en la composición microbiana o factores ambientales que influyen en la demanda de síntesis y degradación de aminoácidos **(Fierer *et al*., 2017)**.

La presencia de los segmentos marrones (*metabolismo energético*) muestra una abundancia constante en cada uno de los puntos, su r abundancia sugiere que las vías de producción de energía son universalmente importantes para la supervivencia y actividad de las comunidades microbianas en la rizósfera. A estas les siguen las rutas implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios y la

biodegradación de xenobióticos, los cuales muestran mayor variabilidad entre las muestras, lo que indica que la producción de metabolitos secundarios y la capacidad de degradar xenobióticos podrían ser funciones más especializadas, lo que potencialmente refleja las presiones selectivas o roles ecológicos únicos en cada ambiente **(Tringe *et al*., 2021)**. El metabolismo de los nucleótidos es relativamente menos abundante, aunque está presente en todas las muestras. Esta categoría funcional es crucial para la síntesis de ADN y ARN, ya que refleja los procesos celulares básicos necesarios para el crecimiento y la replicación microbiana **(Schönknecht *et al*., 2023)**.

Adicional, se presenta un heatmap que evidencia el filtrado de las 15 rutas metabólicas más abundantes en contribuciones relativas por cada replica de cada punto, dando un total de 34 rutas metabólicas **(Ver Figura 21)**.

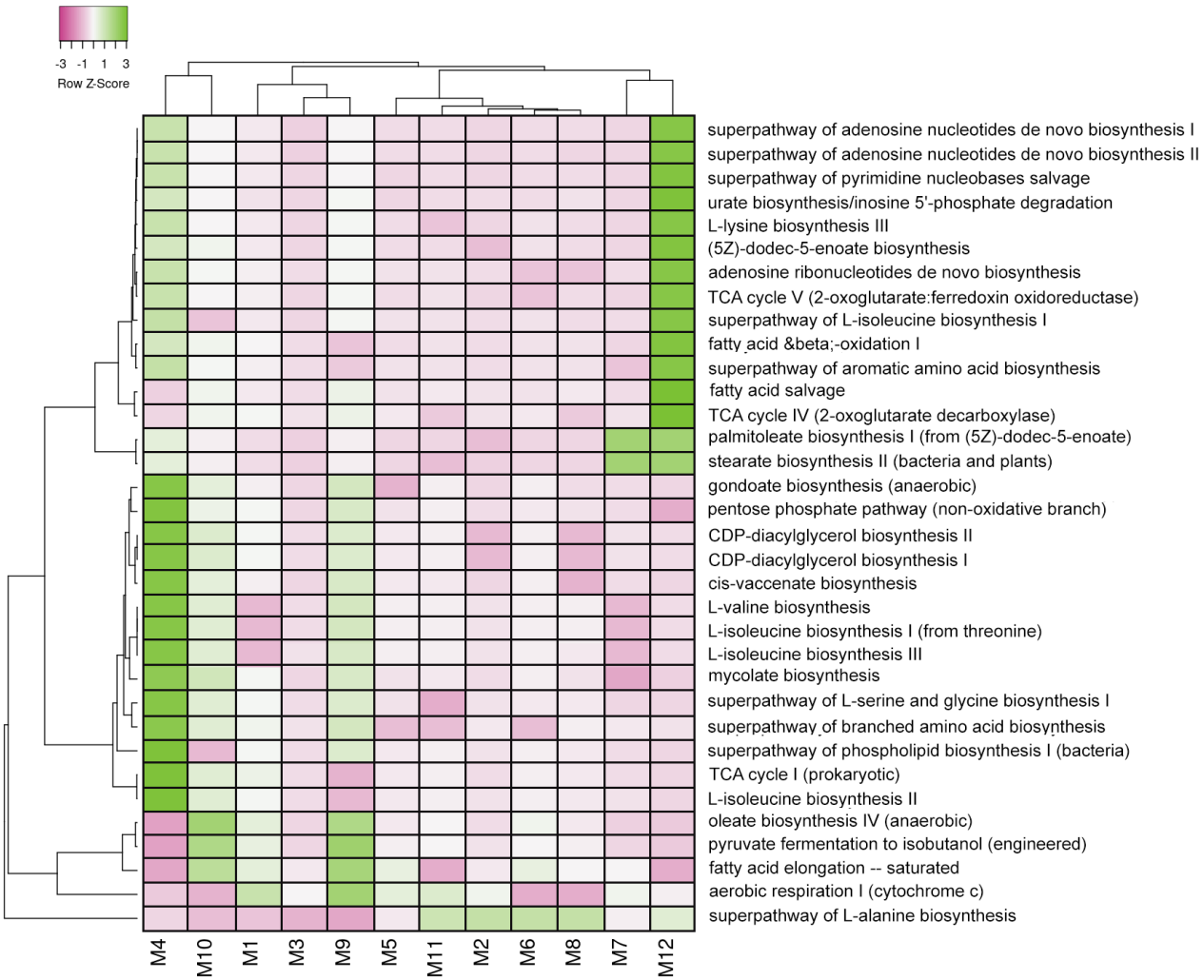


Figura 21. Heatmap a nivel de contribuciones relativas

Nota: El heatmap muestra las vías metabólicas predominantes en el microbioma de la rizósfera asociada a *R. glaucus* en cultivos de la provincia de Tungurahua. Las columnas (M1-M12) representan distintas muestras ambientales, mientras que las filas corresponden a diversas vías metabólicas. Los colores varían de verde a rosa, indicando la abundancia relativa de cada vía: el verde indica alta abundancia y el rosa baja abundancia. Las vías como la biosíntesis de nucleótidos y el ciclo del TCA son particularmente abundantes en ciertas muestras, sugiriendo una actividad metabólica intensa en estos procesos. Este análisis facilita la comparación de la diversidad funcional entre diferentes muestras y puede ayudar a entender cómo las comunidades microbianas contribuyen a la salud y productividad del ecosistema de la rizósfera.

Las muestras se agruparon en dos clústeres principales: el primero incluye las muestras M4, M10, M1, M3, M9 y M11, y el segundo agrupa las muestras M2, M5, M6, M8, M7 y M12. La alta diversidad y funcionalidad observada en las comunidades microbianas de la rizósfera de *R. glaucus* destaca la complejidad y adaptabilidad del microbioma del suelo. Entre las vías metabólicas más abundantes y destacadas se encuentra la biosíntesis de nucleótidos de adenosina, que es crucial para la síntesis de ATP, la principal molécula de energía en las células **(Witte & Herde, 2020).** La alta presencia de esta vía en las muestras M4, M10, M1, M3, M9 y M11 sugiere una comunidad microbiana activa en la provisión de energía y soporte del crecimiento de celular. Pues, el ATP es vital para múltiples procesos celulares, incluyendo el transporte de nutrientes y la síntesis de macromoléculas esenciales **(Trivedi *et al.*, 2020)**.

Por otro lado, la degradación de inosina 5'-fosfato y la biosíntesis de urato, procesos clave en el metabolismo de las purinas, también se destacan en estas muestras **(Carrascosa *et al.*, 2023)**. Estos compuestos son importantes para la regulación de la energía celular y la señalización, y su alta actividad indica una eficiente gestión de compuestos nitrogenados, lo cual beneficia a la planta al proporcionar metabolitos esenciales y facilitar el reciclaje de nutrientes **(Mendes *et al.*, 2013; Fei *et al.*, 2022).**
Otra vía importante es la β-oxidación de ácidos grasos, fundamental para la degradación de lípidos y la producción de energía. Esta vía es crucial para la adaptación de las bacterias a condiciones de estrés y la provisión de energía durante periodos de baja disponibilidad de carbohidratos. La alta expresión de esta vía sugiere una comunidad microbiana adaptada a la utilización eficiente de recursos energéticos **(Goepfert & Poirier, 2007)**.

Además, la biosíntesis de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina es notable en estas comunidades **(Agulló *et al.*, 2017**). Estos aminoácidos son precursores de varios metabolitos secundarios que desempeñan roles cruciales en la defensa de la planta y la comunicación planta-microbio. Estas rutas están involucradas en la degradación de compuestos aromáticos, lo cual es

crucial para la detoxificación y el reciclaje de materia orgánica en los suelos **(Agulló *et al.*, 2017; Ladino *et al.*, 2016).**

La vía de las pentosas fosfato (rama no oxidativa) es otra ruta clave identificada, necesaria para la generación de NADPH y ribosa-5-fosfato, esenciales para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleícos. Según **Ponomareva et al. (2024)** la producción de NADPH es vital para las reacciones de reducción en la biosíntesis de lípidos y otros metabolitos importantes. La alta actividad de esta vía en ciertas muestras indica un entorno microbiano que favorece la síntesis de estos compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta **(Xu *et al.*, 2024).**

La alta diversidad funcional observada en las comunidades microbianas de la rizósfera de mora destaca la complejidad y adaptabilidad del microbioma del suelo. La variación en la expresión de vías metabólicas sugiere que las comunidades bacterianas están adaptadas a condiciones específicas del suelo y desempeñan roles complementarios en la nutrición y defensa de la planta. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que muestran cómo las condiciones del suelo y la gestión agrícola afectan la composición y funciones del microbioma rizosférico **(Hartman *et al.*, 2018).** De esta manera, la promoción de una microbiota rizosférica diversa y funcional puede mejorar la salud y productividad de los cultivos **(Jacoby *et al.*, 2017)**. Prácticas como la aplicación de enmiendas orgánicas, la rotación de cultivos y el uso de inoculantes microbianos específicos podrían ser estrategias efectivas para fomentar comunidades microbianas beneficiosas en la rizósfera **(Liu *et al.*, 2020)**.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES

- La aplicación de la tecnología de metabarcoding 16S rRNA en la rizósfera de cultivos de *R. glaucus* permitió caracterizar la composición de la microbiota asociada a estos cultivos dentro de seis puntos de la provincia de Tungurahua, dando como resultado una alta diversidad microbiana con variaciones tanto significativas como no significativas entre las diferentes localidades, lo que subraya la especificidad del huésped vegetal, las practica antropogénicas y la influencia de factores ambientales locales en la composición microbiana. La correcta generación de este conocimiento puede ser empleado para mejorar las estrategias de manejo agrícola, optimizando la productividad de los cultivos y contribuyendo a la sostenibilidad ambiental. Además, los perfiles funcionales predichos sugieren que el microbioma vegetal de zona rizosférica tienen funciones cruciales en la promoción del crecimiento vegetal y la protección contra patógenos.

- La descripción de la diversidad y abundancia de la microbiota asociada a la rizósfera de R. *glaucus* reveló una amplia gama de taxones bacterianos afines, destacando la predominancia de *Proteobacteria, Firmicutes* y *Actinobacteria* como filos principales. Las comunidades microbianas mostraron variaciones significativas entre los diferentes puntos de muestreo, evidenciadas mediante las métricas de diversidad alfa y beta, los índices de Shannon y Simpson mostraron que Alobamba presentó los niveles más bajos de riqueza, mientras que, Tisaleo presentó una separación significativa entres sus réplicas, por otra parte, el índice de Bray – Curtis mostro que Cevallos, Huachi Grande, Santa Lucía, Manzana de Oro y la segunda réplica de Tisaleo tenían similitud en sus composiciones, al igual que las dos réplicas de Alobamba, no obstante, se presentó variabilidad en composición para la primera réplica de Tisaleo, lo que sugiere una considerable influencia de las condiciones ambientales locales como las condiciones fisicoquímicas de suelo y el clima, incluso de la forma que se realizó el muestreo.

- La predicción del metabolismo de los taxones presentes en la rizósfera de *R. glaucus* identificó rutas metabólicas cruciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la degradación de compuestos aromáticos y la síntesis de metabolitos esenciales. Los perfiles metabólicos predichos indicaron una alta actividad en vías relacionadas con la biosíntesis de lípidos, nucleótidos y otros compuestos importantes, sugiriendo que las comunidades bacterianas están adaptadas a condiciones específicas del suelo y desempeñan roles complementarios en la nutrición y defensa de la planta. Estos resultados destacan el potencial de utilizar prácticas agrícolas como la aplicación de enmiendas orgánicas y el uso de inoculantes microbianos para fomentar comunidades microbianas beneficiosas en la rizósfera

MATERIALES DE REFERENCIA

Alwang, J., Barrera, V., Andrango, G., Dominguez, J., Martinez, A., Escudero, L., & Montufar, C. (2019). Value-chains in the Andes: Upgrading for Ecuador's blackberry producers. *Journal of Agricultural Economics*, 70(3), 705–730. https://doi.org/10.1111/1477-9552.12329

Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: Issues in 16S rRNA gene sequencing. *mSphere*, 6(1). https://doi.org/10.1128/msphere.01202-20

Acharya, S. M., Yee, M. O., Diamond, S., Andeer, P. F., Baig, N. F., Aladesanmi, O. T., ... & Chakraborty, R. (2023). Fine scale sampling reveals early differentiation of rhizosphere microbiome from bulk soil in young Brachypodium plant roots. *ISME communications*, 3(1), 54. https://doi.org/10.1038/s43705-023-00265-1

Adedayo, A. A., Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2022). The Effects of Plant Health Status on the Community Structure and Metabolic Pathways of Rhizosphere Microbial Communities Associated with Solanum lycopersicum. *Horticulturae*, *8*(5). https://doi.org/10.3390/horticulturae8050404

Agulló, L., Romero-Silva, M. J., Domenech, M., & Seeger, M. (2017). P-Cymene promotes its catabolism through the p-Cymene and the p-cumate pathways, activates a stress response and reduces the biofilm formation in Burkholderia xenovorans LB400. *PLoS ONE*, *12*(1), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169544

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*(February), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825377

Aroney, S. T. N., Poole, P. S., & Sánchez, C. (2021). Rhizobial chemotaxis and motility systems at work in the soil. *Frontiers in Plant Science*, 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.725338

Babalola, O. O., Fadiji, A. E., Enagbonma, B. J., Alori, E. T., Ayilara, M. S., & Ayangbenro, A. S. (2020). The Nexus Between Plant and Plant Microbiome: Revelation of the Networking Strategies. *Frontiers in Microbiology*, *11*(September), 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.548037

Baeshen, N. N., Baz, L., Shami, A. Y., Ashy, R. A., Jalal, R. S., Abulfaraj, A. A., Refai, M., Majeed, M. A., Abuzahrah, S. S., Abdelkader, H., Baeshen, N. A., & Baeshen, M. N. (2023). Composition, Abundance, and Diversity of the Soil Microbiome Associated with the Halophytic Plants Tamarix aphylla and Halopeplis perfoliata on Jeddah Seacoast, Saudi Arabia. *Plants*,

12(11), 1–20. https://doi.org/10.3390/plants12112176

Bandopadhyay, S., & Shade, A. (2024). Soil bacteria and archaea. *In Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (pp. 41-74). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822941-5.00003-X

Bhattacharyya, A., Mavrodi, O., Bhowmik, N., Weller, D., Thomashow, L., & Mavrodi, D. (2023). Bacterial biofilms as an essential component of rhizosphere plant-microbe interactions. *Methods in microbiology*, 53, 3. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10898258/

Bhatt, S. C., Naik, B., Kumar, V., Gupta, A. K., Kumar, S., Preet, M. S., Sharma, N., & Rustagi, S. (2023). Untapped potential of non-conventional rubus species: bioactivity, nutrition, and livelihood opportunities. *Plant Methods*, 19(1). https://doi.org/10.1186/s13007-023-01094-y

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, *37*(8), 852-857.

Brisson, V. L., Schmidt, J. E., Northen, T. R., Vogel, J. P., & Gaudin, A. C. M. (2019). Impacts of maize domestication and breeding on rhizosphere microbial community recruitment from a nutrient depleted agricultural soil. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52148-y

Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. Scientific data, 6, 190007. https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7

Byrne, S. J., Butler, C. A., Reynolds, E. C., & Dashper, S. G. (2018). Taxonomy of oral bacteria. In *Methods in Microbiology* (Vol. 45, pp. 171-201). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.mim.2018.07.001

Calle, M. L. (2019). Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics & informatics*, *17*(1). https://doi.org/10.5808%2FGI.2019.17.1.e6

Cao, F., Gao, L., Wei, L., Chen, Z., Wang, Y., Ran, X., Meng, X., & Tao, J. (2017). Performance comparison of NextSeq and Ion Proton platforms for molecular diagnosis of clinical oncology. *Tumori*, *103*(3), 223–230. https://doi.org/10.5301/tj.5000600

Carrascosa, A., Pascual, J. A., López-García, A., Romo-Vaquero, M., Ros, M., Petropoulos, S. A., & Alguacil, M. del M. (2023). Different Functional and Taxonomic Composition of the Microbiome in the Rhizosphere of Two Purslane Genotypes. *Agronomy*, *13*(7). https://doi.org/10.3390/agronomy13071795

Casey, J. M., Ransome, E., Collins, A. G., Mahardini, A., Kurniasih, E. M., Sembiring, A., ... & Meyer,

C. P. (2021). DNA metabarcoding marker choice skews perception of marine eukaryotic biodiversity. *Environmental DNA*, 3(6), 1229-1246. https://doi.org/10.1002/edn3.245

Cesco, S., Lucini, L., Miras-Moreno, B., Borruso, L., Mimmo, T., Pii, Y., Puglisi, E., Spini, G., Taskin, E., Tiziani, R., Zangrillo, M. S., & Trevisan, M. (2021). The hidden effects of agrochemicals on plant metabolism and root-associated microorganisms. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, *311*(111012), 111012. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111012

Chang, X., Wei, D., Zeng, Y., Zhao, X., Hu, Y., Wu, X., Song, C., Gong, G., Chen, H., Yang, C., Zhang, M., Liu, T., Chen, W., & Yang, W. (2022). Maize-soybean relay strip intercropping reshapes the rhizosphere bacterial community and recruits beneficial bacteria to suppress Fusarium root rot of soybean. *Frontiers in Microbiology*, 13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1009689

Chauhan, P., Sharma, N., Tapwal, A., Kumar, A., Verma, G. S., Meena, M., Seth, C. S., & Swapnil, P. (2023). Soil Microbiome: Diversity, Benefits and Interactions with Plants. *Sustainability (Switzerland)*, *15*(19). https://doi.org/10.3390/su151914643

Chen, L., & Liu, Y. (2024). The function of root exudates in the root colonization by beneficial soil rhizobacteria. *Biology*, 13(2), 95. https://doi.org/10.3390/biology13020095

Chen, J., Li, N., Chang, J., Ren, K., Zhou, J., & Yang, G. (2021). Taxonomic structure of rhizosphere bacterial communities and its association with the accumulation of alkaloidal metabolites in Sophora flavescens. *Frontiers in Microbiology*, 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.781316

Chen, Y., Lyu, Y., Zhang, J., Li, Q., Lyu, L., Zhou, Y., Kong, J., Zeng, X., Zhang, S., & Li, J. (2023). Riddles of Lost City: Chemotrophic prokaryotes drives carbon, sulfur, and nitrogen cycling at an extinct cold seep, South China sea. *Microbiology Spectrum*, 11(1). https://doi.org/10.1128/spectrum.03338-22

Cheng, A.-Y., & Lee, C.-H. (2022). Skin infection by Mycobacterium farcinogenes–senegalense group in an immunocompetent patient: a case report. BMC Infectious Diseases, 22(1). https://doi.org/10.1186/s12879-022-07409-z

Chepsergon, J., & Moleleki, L. N. (2023). Rhizosphere bacterial interactions and impact on plant health. *Current Opinion in Microbiology*, *73*, 102297. https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102297

Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*, *33*(4), 10-1128. https://doi.org/10.1128/cmr.00053-19

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology,

functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, *19*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004

Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *32*(6), 767–775. https://doi.org/10.1177/1040638720905833

Cui, S., Xiao, Y., Zhou, Y., Wu, P., Cui, L., & Zheng, G. (2023). Variations in diversity, composition, and species interactions of soil microbial community in response to increased N deposition and precipitation intensity in a temperate grassland. *Ecological Processes*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/s13717-023-00445-w

Dastogeer, K. M. G., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A., & Chakraborty, A. (2020). Plant microbiome–an account of the factors that shape community composition and diversity. *Current Plant Biology*, *23*(April), 100161.

Deng, Y., Kong, W., Zhang, X., Zhu, Y., Xie, T., Chen, M., Zhu, L., Sun, J., Zhang, Z., Chen, C., Zhu, C., Yin, H., Huang, S., & Gu, Y. (2024). Rhizosphere microbial community enrichment processes in healthy and diseased plants: implications of soil properties on biomarkers. *Frontiers in microbiology*, 15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1333076

Dong, C., Shao, Q., Ren, Y., Ge, W., Yao, T., Hu, H., Huang, J., Liang, Z., & Han, Y. (2022). Assembly, Core Microbiota, and Function of the Rhizosphere Soil and Bark Microbiota in Eucommia ulmoides. *Frontiers in Microbiology*, *13*(May), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.855317

Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Bi*

Duan, Y., Yang, H., Yang, H., Wei, Z., Che, J., Wu, W., Lyu, L., & Li, W. (2023). Physiological and morphological responses of blackberry seedlings to different nitrogen forms. *Plants*, *12*(7), 1480. https://doi.org/10.3390/plants12071480

Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., & Milanowski, J. (2016). Pantoea agglomerans: A mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *23*(2), 206–222. https://doi.org/10.5604/12321966.1203879

Dubey, A., Kumar, A., Khan, M. L., & Payasi, D. K. (2022). Plant Growth-promoting and Bio-control Activity of Micrococcus luteus Strain AKAD 3-5 Isolated from the Soybean (Glycine max (L.) Merr.) Rhizosphere. *The Open Microbiology Journal*, *15*(1), 188–197.

https://doi.org/10.2174/1874285802115010188

Egamberdieva, D., Jabborova, D., Wirth, S. J., Alam, P., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2018). Interactive Effects of Nutrients and Bradyrhizobium japonicum on the Growth and Root Architecture of Soybean (Glycine max L.). *Frontiers in microbiology*, 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01000

Elshafie, H. S., & Camele, I. (2022). Rhizospheric Actinomycetes revealed antifungal and plant-growth-promoting activities under controlled environment. *Plants*, 11(14), 1872. https://doi.org/10.3390/plants11141872

EzBioCloud. (2018). About EzBioCloud. Retrieved from https://www.ezbiocloud.net/

Fan, K., Cardona, C., Li, Y., Shi, Y., Xiang, X., Shen, C., Wang, H., Gilbert, J. A., & Chu, H. (2017). Rhizosphere-associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields. *Soil Biology & Biochemistry*, 113, 275–284. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.020

Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L., & Boetius, A. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, *12*(February), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526

Fadrosh, D. W., Bing Ma, P. G., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M., & Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, *2*(6), 1–7. http://www.microbiomejournal.com/content/2/1/6

Fei, Z., Wang, J., Zhang, K., Wu, H., Ke, F., Duan, Y., Wang, Y., Zou, J., Zhu, K., Zhang, Z., Lu, F., & Zou, H. (2022). Regulation of photosynthetic material production by inter-root microbial extinction and metabolic pathways in sorghum under different nitrogen application patterns. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-022-10969-4

Feicán, C., Huaraca, H., Martínez, A., & Viteri, P. (2019). Guía para facilitar el aprendizaje en el manejo integrado de mora. In *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*. https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5476

Feng, H., Fu, R., Hou, X., Lv, Y., Zhang, N., Liu, Y., Xu, Z., Miao, Y., Krell, T., Shen, Q., & Zhang, R. (2021). Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: The first step towards root–microbe rhizosphere interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6655. https://doi.org/10.3390/ijms22136655

Feranchuk, S., Belkova, N., Potapova, U., Kuzmin, D., & Belikov, S. (2018). Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits. *Research in microbiology*, *169*(4-5), 254-261. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.004

Fleischmann, S., Robben, C., Alter, T., Rossmanith, P., & Mester, P. (2021). How to evaluate non-growing cells—current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(2), 115. https://doi.org/10.3390/antibiotics10020115

Foster, T. M., Bassil, N. V., Dossett, M., Leigh Worthington, M., & Graham, J. (2019). Genetic and genomic resources for Rubus breeding: a roadmap for the future. *Horticulture Research*, 6(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41438-019-0199-2

Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S., & Kolb, S. (2021). DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota—pitfalls and solutions. *Microorganisms*, 9(2), 361. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361

Garrido, P., Morillo, E., & Vásquez-Castillo, W. (2020). Genetic diversity of the Andean blackberry (Rubus glaucus Benth.) in Ecuador assessed by AFLP markers. *Plant Genetic Resources*, 18(4), 243-250. doi:10.1017/S1479262120000283

Galloway, A. F., Knox, P., & Krause, K. (2020). Sticky mucilages and exudates of plants: putative microenvironmental design elements with biotechnological value. *The New Phytologist*, 225(4), 1461–1469. https://doi.org/10.1111/nph.16144

Gil, L., Mut, N., Ruiz, J. A., Falcón, A., Maijó, M., Baños, A., De la Torre, J. M., Guillamón, E., Verardo, V., & Gómez, A. M. (2023). Phytochemicals determination, and antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer activities of blackberry fruits. *Foods*, 12(7), 1505. https://doi.org/10.3390/foods12071505

Gnonlonfoun, E., Fotin, G., Schwebel, S., Colin, C., Salles, M., Parant, V., Alonso, P., Moreau, F., Borges, F., Revol-Junelles, A.-M., Schmitt, M., Framboisier, X., Fick, M., & Rondags, E. (2024). Impact of Erwinia gerundensis as a biocontrol agent on the sanitary and technological quality of barley malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. American Society of Brewing Chemists, 82(2), 120–133. https://doi.org/10.1080/03610470.2023.2216630

Goepfert, S., & Poirier, Y. (2007). β-Oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Current opinion in plant biology*, *10*(3), 245-251.

Gupta, A., Singh, U. B., Sahu, P. K., Paul, S., Kumar, A., Malviya, D., Singh, S., Kuppusamy, P., Singh, P., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., Manna, M. C., Crusberg, T. C., Kumar, A., & Saxena, A. K. (2022). Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review.

International Journal of Environmental Research and Public Health, *19*(5). https://doi.org/10.3390/ijerph19053141

Gupta, N., & Verma, V. K. (2019). *Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality*. 313–341. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6_15

Hao, L., Qingdong, S., Imin, B., & Kasim, N. (2020). Methodology for optimizing quadrat size in sparse vegetation surveys: A desert case study from the Tarim Basin. *PLoS ONE*, *15*(8 August 2020), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235469

Hamelin, R. C. (2023). Genomic biosurveillance to protect the world's forest resources. In *Genomics and the Global Bioeconomy* (pp. 139-151). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91601-1.00011-0

Hartman, K., van der Heijden, M. G. A., Wittwer, R. A., Banerjee, S., Walser, J. C., & Schlaeppi, K. (2018). Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome*, *6*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0389-9

Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd_Allah, E. (2019). Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(6), 1291–1297. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004

Hassler, H. B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R. W., Russell, B. T., & Richards, V. P. (2022). Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. *Microbiome*, *10*(1), 104. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01295-y

Hashmi, I., Bindschedler, S., & Junier, P. (2020). *Firmicutes*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, 363–396. doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00018-6

Hida, A., Oku, S., Miura, M., Matsuda, H., Tajima, T., & Kato, J. (2020). Characterization of methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs) for amino acids in plant-growth-promoting rhizobacterium Pseudomonas protegens CHA0 and enhancement of amino acid chemotaxis by MCP genes overexpression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(9), 1948–1957. https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1780112

Holst, A., Spilsberg, B., Arulandhu, A. J., Kok, E., Shi, J., & Zel, J. (2016). Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(17), 4595–4614. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9549-1

Hsieh, Y. P., Hung, Y. M., Tsai, M. H., Lai, L. C., & Chuang, E. Y. (2022). 16S-ITGDB: An Integrated

Database for Improving Species Classification of Prokaryotic 16S Ribosomal RNA Sequences. *Frontiers in Bioinformatics*, *2*, 905489. https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.905489

Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, *82*(11), 801–811. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012

Illumina. (2017). Illumina 16S Metagenomics Sequencing Workflow. Illumina, 12, 1-3.

Illumina. (2024). *Sequencing platforms*. Retrieved June 25, 2024, from https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2013). Ficha Técnica de la Variedad de Mora sin Espinas *(Rubus glaucus Benth). INIAP ANDIMORA-2013. https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4066/1/iniapscCD104p105.pdf*

Ikumapayi, U. N., Kanteh, A., Manneh, J., Lamin, M., & Mackenzie, G. A. (2016). An outbreak of Serratia liquefaciens at a rural health center in the Gambia. *Journal of Infection in Developing Countries*, *10*(8), 791–798. https://doi.org/10.3855/jidc.7184

Iza, M., Viteri, P., Hinojosa, M., Martínez, A., Sotomayor Correa, A., & Viera, W. (2020). Diferenciación morfológica, fenológica y pomológica de cultivares comerciales de mora (Rubus glaucus Benth). *Redalyc.Org*, *11*(2), 47–57. https://doi.org/10.29019/enfoque.v11n2.529

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, *8*(September), 1–19. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617

Jaiswal, D. K., & Verma, J. P. (2016). The Significance of Plant-Associated Microbial Rhizosphere for the Degradation of Xenobiotic Compounds. *Plant Responses to Xenobiotics,* 307–316. doi:10.1007/978-981-10-2860-1_13

Jamil, F., Mukhtar, H., Fouillaud, M., & Dufossé, L. (2022). Rhizosphere Signaling: Insights into Plant–Rhizomicrobiome Interactions for Sustainable Agronomy. *Microorganisms*, *10*(5), 1–26. https://doi.org/10.3390/microorganisms10050899

Jeong, J., Yun, K., Mun, S., Chung, W. H., Choi, S. Y., Nam, Y. do, Lim, M. Y., Hong, C. P., Park, C. H., Ahn, Y., & Han, K. (2021). The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read

Jiang, H., Xu, X., Fang, Y., Ogunyemi, S. O., Ahmed, T., Li, X., Yang, Y., Yan, C., Chen, J., & Li, B. (2023). Metabarcoding reveals response of rice rhizosphere bacterial community to rice

bacterial leaf blight. *Microbiological Research*, *270*(February), 127344. https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127344

Jiang, Y., Li, S., Li, R., Zhang, J., Liu, Y., Lv, L., Zhu, H., Wu, W., & Li, W. (2017). Plant cultivars imprint the rhizosphere bacterial community composition and association networks. *Soil Biology & Biochemistry*, 109, 145–155. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.02.010

Jiang, L., Luo, C., Zhang, D., Song, M., Mei, W., Sun, Y., & Zhang, G. (2021). Shifts in a phenanthrene-degrading microbial community are driven by carbohydrate metabolism selection in a Ryegrass rhizosphere. *Environmental Science & Technology*, *55*(2), 962–973. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04951

Jiao, S., Xu, Y., Zhang, J., & Hao, X. (2019). Core Microbiota in Agricultural Soils and Their Potential. *American Society for Microbiology*, *4*(2), e00313-18.

Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Igual, J. M., Rivas, R., Mateos, P. F., & García-Fraile, P. (2019). Genome insights into the novel species microvirga brassicacearum, a rapeseed endophyte with biotechnological potential. *Microorganisms*, *7*(9), 1–19. https://doi.org/10.3390/microorganisms7090354

Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research*, *42*(D1), D199-D205.

Kazou, M., Grafakou, A., Tsakalidou, E., & Georgalaki, M. (2021). Zooming into the Microbiota of home-made and industrial Kefir produced in Greece using classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses. *Frontiers in microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.621069

Kers, J. G., & Saccenti, E. (2022). The power of microbiome studies: Some considerations on which alpha and beta metrics to use and how to report results. *Frontiers in microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.796025

Khalifa, A. (2022). First Isolation and Characterization of Serratia liquefaciens Associated with Rot Disease of Malus domestica (Apple) Fruit and Its Inhibition by Origanum vulgare (Oregano) Oil. Horticulturae, 8(8), 752. https://doi.org/10.3390/horticulturae8080752

Khan, S., Srivastava, S., Karnwal, A., & Malik, T. (2023). Streptomyces as a promising biological control agents for plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *14*(November). https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285543

Kleine Bardenhorst, S., Berger, T., Klawonn, F., Vital, M., Karch, A., & Rübsamen, N. (2021). Data Analysis Strategies for Microbiome Studies in Human Populations—a Systematic Review of Current Practice. *MSystems*, *6*(1). https://doi.org/10.1128/msystems.01154-20

Koskey, G., Mburu, S. W., Awino, R., Njeru, E. M., & Maingi, J. M. (2021). Potential Use of Beneficial Microorganisms for Soil Amelioration, Phytopathogen Biocontrol, and Sustainable Crop Production in Smallholder Agroecosystems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*(April), 1–20. https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606308

Krishnan, R., Menon, R. R., Busse, H. J., Tanaka, N., Krishnamurthi, S., & Rameshkumar, N. (2017). Novosphingobium pokkalii sp nov, a novel rhizosphere-associated bacterium with plant beneficial properties isolated from saline-tolerant pokkali rice. *Research in microbiology*, *168*(2), 113-121.

Kumar, G., Kanaujia, N., & Bafana, A. (2012). Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of Ajuga bracteosa in Kangra valley. *Microbiological Research*, 167(4), 220–225. doi:10.1016/j.micres.2011.09.001

Kumar, A., & Dubey, A. (2020). Rhizosphere microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. *Journal of Advanced Research*, *24*, 337–352. https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.04.014

Kumar, M., Ansari, W. A., Zeyad, M. T., Singh, A., Chakdar, H., Kumar, A., Farooqi, M. S., Sharma, A., Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2023). Core microbiota of wheat rhizosphere under Upper Indo-Gangetic plains and their response to soil physicochemical properties. *Frontiers in Plant Science*, *14*(May), 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1186162

Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., da Silva, R., Salt, C., & Parsons, J. R. (2016). Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *237*(November), 105–121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5

Ladyzhenskaya, O., Aniskina, T., Kryuchkova, V., & Simakhin, M. (2023). Comparison of Fruit Parameters and Elemental Composition of Commercial Varieties of Blackberries. Agronomy, 13(10), 2628. https://doi.org/10.3390/agronomy13102628

Lahlali, R., Ibrahim, D. S. S., Belabess, Z., Roni, M. Z. K., Radouane, N., Vicente, C. S. L., Menendez, E., Mokrini, F., Barka, E. A., de Melo e Mota, M. G., & Peng, G. (2021). High-throughput molecular technologies for unraveling the mystery of soil microbial community: challenges and future prospects. *Heliyon*, *7*(10). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08142

Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013).

Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, *31*(9), 814–821. https://doi.org/10.1038/nbt.2676

Latif, S., Bibi, S., Kouser, R., Fatimah, H., Farooq, S., Naseer, S., & Kousar, R. (2020). Characterization of bacterial community structure in the rhizosphere of Triticum aestivum L. *Genomics*, *112*(6), 4760–4768. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.07.031

Li, C., Song, J., Chen, Q., Ge, D., Li, Q., & Yang, Y. (2024). Whole-genome shotgun sequencing unravels the influence of environmental microbial co-infections on the treatment efficacy for severe pediatric infectious diseases. *Frontiers in Microbiology*, *15*(January), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1308871

Li, H., Song, F., Wu, X., Deng, C., Xu, Q., Peng, S., & Pan, Z. (2021). Microbiome and metagenome analysis reveals huanglongbing affects the abundance of citrus rhizosphere bacteria associated with resistance and energy metabolism. *Horticulturae*, *7*(6), 151. https://doi.org/10.3390/horticulturae7060151

Li, J., Wang, C., Liang, W., & Liu, S. (2021). Rhizosphere Microbiome: The Emerging Barrier in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Microbiology*, *12*(October). https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.772420

Liu, H., Brettell, L. E., Qiu, Z., & Singh, B. K. (2020). Microbiome-Mediated Stress Resistance in Plants. *Trends in Plant Science*, *25*(8), 733–743. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.014

Liu, Y., Han, J., Wilson, A. J., O'Sullivan, L., & Haney, C. H. (2021). Amino acid availability determines plant immune homeostasis in the rhizosphere microbiome. *BioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2021.12.20.473424

Lin, Y., Mei, L., Wei, Q., Li, B., Zhang, P., Sun, S., & Cui, G. (2022). Leymus chinensis resists degraded soil stress by modulating root exudate components to attract beneficial microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.951838

Ling, N., Wang, T., & Kuzyakov, Y. (2022). Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature Communications*, *13*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9

Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. Protein & cell, 12(5), 315-330. https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8

Liu, J., Zhang, X., Chen, T., Wu, T., Lin, T., Jiang, L., Lang, S., Liu, L., Natarajan, L., Tu, J. X., Kosciolek, T., Morton, J., Nguyen, T. T., Schnabl, B., Knight, R., Feng, C., Zhong, Y., & Tu, X.

M. (2022). A semiparametric model for between-subject attributes: Applications to beta-diversity of microbiome data. *Biometrics*, 78(3), 950–962. https://doi.org/10.1111/biom.13487

Lourenco, J. M., & Welch, C. B. (2022). Using microbiome information to understand and improve animal performance. *Italian Journal of Animal Science*, *21*(1), 899–913. https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2077147

Mandal, S. De, & Jeon, J. (2019). Microbiome in Plant Health and Disease. *Microbiome in Plant Health and Disease*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0

Martins, M. S., Gonçalves, A. C., Alves, G., & Silva, L. R. (2023). Blackberries and mulberries: Berries with significant health-promoting properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12024. https://doi.org/10.3390/ijms241512024

Meena, V. S., Meena, S. K., Verma, J. P., Kumar, A., Aeron, A., Mishra, P. K., Bisht, J. K., Pattanayak, A., Naveed, M., & Dotaniya, M. L. (2017). Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. *Ecological Engineering*, 107, 8–32. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058

Mehmood, N., Saeed, M., Zafarullah, S., Hyder, S., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Jamil, N., Iqbal, R., Ali, B., Ercisli, S., & Kupe, M. (2023). Multifaceted Impacts of Plant-Beneficial Pseudomonas spp. in Managing Various Plant Diseases and Crop Yield Improvement. *ACS Omega*, *8*(25), 22296–22315. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00870

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 634–663. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028

Mgadi, K., Ndaba, B., Roopnarain, A., Rama, H., & Adeleke, R. (2024). Nanoparticle applications in agriculture: overview and response of plant-associated microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *15*(March), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1354440

Mhete, M., Eze, P. N., Rahube, T. O., & Akinyemi, F. O. (2020). Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. *Scientific African*, 7, e00246. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00246

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). (2023). *Boletín Situacional del Cultivo de Mora.* http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/situacionales-agricolas/situacional-mora

Modin, O., Liébana, R., Saheb-Alam, S., Wilén, B.-M., Suarez, C., Hermansson, M., & Persson, F.

(2020). Hill-based dissimilarity indices and null models for analysis of microbial community assembly. *Microbiome*, 8(1). https://doi.org/10.1186/s40168-020-00909-7

Molefe, R. R., Amoo, A. E., & Babalola, O. O. (2023). Communication between plant roots and the soil microbiome; involvement in plant growth and development. *Symbiosis (Philadelphia, Pa.)*, 90(3), 231–239. https://doi.org/10.1007/s13199-023-00941-9

Mondal, S., Pramanik, K., Pal, P., Mitra, S., Ghosh, S. K., Mondal, T., Saren, T., & Maiti, T. K. (2023). Multifaceted roles of root exudates in light of plant-microbe interaction. In *Unravelling plant-microbe synergy* (pp. 49-76). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99896-3.00003-5

Moormann, J., Heinemann, B., & Hildebrandt, T. M. (2022). News about amino acid metabolism in plant–microbe interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, *47*(10), 839–850. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.07.001

Mousa, W. K., Abu-Izneid, T., & Salah-Tantawy, A. (2024). High-throughput sequencing reveals the structure and metabolic resilience of desert microbiome confronting climate change. *Frontiers in Plant Science*, *15*(March), 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1294173

Narsing, M. P., Lohmaneeratana, K., Bunyoo, C., & Thamchaipenet, A. (2022). Actinobacteria–plant interactions in alleviating abiotic stress. *Plants*, 11(21), 2976. https://doi.org/10.3390/plants11212976

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). *NCBI services and databases*. Bethesda, MD: National Library of Medicine (US). from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Nadarajah, K., & Abdul Rahman, N. S. N. (2023). The Microbial Connection to Sustainable Agriculture. *Plants*, *12*(12). https://doi.org/10.3390/plants12122307

Noman, M., Ahmed, T., Ijaz, U., Shahid, M., Azizullah, Li, D., Manzoor, I., & Song, F. (2021). Plant–microbiome crosstalk: Dawning from composition and assembly of microbial community to improvement of disease resilience in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6852. https://doi.org/10.3390/ijms22136852

Ohta, A., Nishi, K., Hirota, K., & Matsuo, Y. (2023). Using nanopore sequencing to identify fungi from clinical samples with high phylogenetic resolution. *Scientific Reports*, 13(1), 9785. https://doi.org/10.1038/s41598-023-37016-0

Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2022). The rhizosphere microbial complex in plant health: A review of interaction dynamics. Journal of Integrative Agriculture, 21(8), 2168–2182. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63817-0

Oliveira, M. C. O., Ragonezi, C., Valente, S., de Freitas, J. G. R., & Pinheiro de Carvalho, M. A. A. (2024). Microorganism community structure: A characterisation of agrosystems from Madeira Archipelago. *Environmental Microbiology Reports*, *16*(1), 1–18. https://doi.org/10.1111/1758-2229.13227

Padmanabhan, P., Correa-Betanzo, J., & Paliyath, G. (2016). Berries and Related Fruits. *Encyclopedia of Food and Health*, 364–371. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00060-x

Pantigoso, H. A., Newberger, D., & Vivanco, J. M. (2022). The rhizosphere microbiome: Plant–microbial interactions for resource acquisition. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(5), 2864–2876. https://doi.org/10.1111/jam.15686

Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., & Uhlik, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology Advances*, 44(107614), 107614. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107614

Park, I., Seo, Y. S., & Mannaa, M. (2023). Recruitment of the rhizo-microbiome army: assembly determinants and engineering of the rhizosphere microbiome as a key to unlocking plant potential. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1163832

Parkinson, J. S. (2022). Bacterial chemotaxis. *Reference Module in Life Sciences.* Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822563-9.00051-2

Parra, J., Beaton, A., Seipke, R. F., Wilkinson, B., Hutchings, M. I., & Duncan, K. R. (2023). Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus Streptomyces. Current Opinion in Microbiology, 76(102385), 102385. https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102385

Pérez, F. (2021). Jupyter: Thinking and storytelling with code and data. *Computing in Science & Engineering*, *23*(2), 7-14.

Ponomareva, D., Ivanov, A., & Bregestovski, P. (2024). Analysis of the Effects of Pentose Phosphate Pathway Inhibition on the Generation of Reactive Oxygen Species and Epileptiform Activity in Hippocampal Slices. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(3). https://doi.org/10.3390/ijms25031934

Poupin, M. J., Ledger, T., Roselló, R., & González, B. (2023). The Arabidopsis holobiont: a resource of insights to understand the amazing world of plant–microbe interactions. *Environmental Microbiome*, 18(1). https://doi.org/10.1186/s40793-023-00466-0

Pu, H., Yuan, Y., Qin, L., & Liu, X. (2023). PH drives differences in bacterial community β-diversity in hydrologically connected lake sediments. *Microorganisms*, *11*(3), 676. https://doi.org/10.3390/microorganisms11030676

Radkov, A. D., Hsu, Y.-P., Booher, G., & VanNieuwenhze, M. S. (2018). Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *87*(1), 991–1014. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921

Rodrigues, D. F., da C Jesus, E., Ayala-del-Río, H. L., Pellizari, V. H., Gilichinsky, D., Sepulveda-Torres, L., & Tiedje, J. M. (2009). Biogeography of two cold-adapted genera: Psychrobacter and Exiguobacterium. The ISME Journal, 3(6), 658–665. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.25

RStudio, PBC. (2024.). *Learn R: Beginner*. Retrieved June 01, 2024, from https://education.rstudio.com/learn/beginner/

Salah Ud-Din, A. I. M., & Roujeinikova, A. (2017). Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*, 3293-3303. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2514-0

Salem, H. M., Abdel-Salam, A., Abdel-Salam, M. A., & Seleiman, M. F. (2017). Soil xenobiotics and their Phyto-chemical remediation. *Soil Biology* (pp. 267–280). Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-47744-2_18

Qian, F.-Z., Huang, X., Su, X., & Bao, Y. (2022). Responses of microbial communities and metabolic profiles to the rhizosphere of Tamarix ramosissima in soils contaminated by multiple heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, *438*. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129469

Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, *16*(1), 4–10. https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055

Ramirez, D. X., Pinos, A., Vega, P., Salas, I., Jones, C. D., & Torres, M. de L. (2023). Untangling the Effects of Plant Genotype and Soil Conditions on the Assembly of Bacterial and Fungal Communities in the Rhizosphere of the Wild Andean Blueberry (Vaccinium floribundum Kunth). *Microorganisms*, *11*(2). https://doi.org/10.3390/microorganisms11020399

Salah Ud-Din, A. I. M., & Roujeinikova, A. (2017). Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(18), 3293–3303. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2514-0

Samaniego, I., Brito, B., Viera, W., Cabrera, A., Llerena, W., Kannangara, T., Vilcacundo, R., Angós, I., & Carrillo, W. (2020). Influence of the maturity stage on the phytochemical composition and the antioxidant activity of four andean blackberry cultivars (Rubus glaucus benth) from Ecuador. *Plants*, *9*(8), 1–15. https://doi.org/10.3390/plants9081027

Santoyo, G. (2022). How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions.

Journal of Advanced Research, *40*, 45–58. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.11.020

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). *Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements*. 1–25.

Semenov, M. V. (2021). Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: achievements, challenges, and prospects. *Biology Bulletin Reviews*, *11*, 40-53. https://doi.org/10.1134/S2079086421010084

Schulz, M., & Chim, J. F. (2019). Nutritional and bioactive value of Rubus berries. *Food Bioscience*, *31*(July), 100438. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100438

Shi, X., Zhao, Y., Xu, M., Ma, L., Adams, J. M., & Shi, Y. (2023). Insight into Plant-Microbe Interactions in rhizosphere for Sustainable Agriculture in the New Crops Era. *New Crops*. https://doi.org/10.1016/j.ncrops.2023.11.002

Siddharthan, N., Sangeetha, M., Asokan, N., Balagurunathan, R., & Hemalatha, N. (2022). Actinobacterial enzymes—An approach for engineering the rhizosphere microorganisms as plant growth promotors. *In Rhizosphere engineering* (pp. 273-292). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89973-4.00025-9

Soliman, T., Yang, S. Y., Yamazaki, T., & Jenke-Kodama, H. (2017). Profiling soil microbial communities with next-generation sequencing: The influence of DNA kit selection and technician technical expertise. *PeerJ*, *2017*(12), 1–16. https://doi.org/10.7717/peerj.4178

Sønsteby, A., & Heide, O. M. (2023). Temperature and daylength effects on growth and floral initiation in biennial-fruiting blackberry. *Horticulturae*, *9*(12), 1285. https://doi.org/10.3390/horticulturae9121285

Su, X. (2021). Elucidating the Beta-Diversity of the Microbiome: from Global Alignment to Local Alignment. *MSystems*, *6*(4). https://doi.org/10.1128/msystems.00363-21

Sun, S., Jones, R. B., & Fodor, A. A. (2020). Inference-based accuracy of metagenome prediction tools varies across sample types and functional categories. *Microbiome*, *8*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00815-y

Tang, X., Xie, G., Shao, K., Hu, Y., Cai, J., Bai, C., Gong, Y., & Gao, G. (2020). Erratum: Contrast diversity patterns and processes of microbial community assembly in a river-lake continuum across a catchment scale in northwestern China (Environmental Microbiome (2020) 15: 10 DOI: 10.1186/s40793-020-00356-9). *Environmental Microbiomes*, *15*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s40793-020-00360-z

Taylor, M. K., Williams, E. P., Wongsurawat, T., Jenjaroenpun, P., Nookaew, I., & Jonsson, C. B. (2020). Amplicon-Based, Next-Generation Sequencing Approaches to Characterize Single Nucleotide Polymorphisms of Orthohantavirus Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(October), 1–18. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.565591

Thompson, L. R., Anderson, S. R., Den Uyl, P. A., Patin, N. V., Lim, S. J., Sanderson, G., & Goodwin, K. D. (2022). Tourmaline: A containerized workflow for rapid and iterable amplicon sequence analysis using QIIME 2 and Snakemake. *GigaScience*, 11, giac066. https://doi.org/10.1093/gigascience/giac066

Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M., Nakaoka, S., Onoda, Y., Yoshida, K., Schlaeppi, K., Bai, Y., Sugiura, R., Ichihashi, Y., Minamisawa, K., & Kiers, E. T. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*, *4*(5), 247–257. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nature Reviews Microbiology, 18(11), 607–621. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1

Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., & Tugizimana, F. (2022). Bacillus for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? *Plants*, *11*(19). https://doi.org/10.3390/plants11192482

Van Der Heijden, M. G. A., & Schlaeppi, K. (2015). Root surface as a frontier for plant microbiome research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(8), 2299–2300. https://doi.org/10.1073/pnas.1500709112

Verce, M., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2019). Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel Oenococcus species. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR), 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479

Vincze, É. B., Becze, A., Laslo, É., & Mara, G. (2024). Beneficial Soil Microbiomes and Their Potential Role in Plant Growth and Soil Fertility. *Agriculture (Switzerland)*, *14*(1), 1–23. https://doi.org/10.3390/agriculture14010152

Viteri D., P., Vásquez C., W., Viera, W., Sotomayor, A., & Mejía, P. (2016). Ecología para el desarrollo y crecimiento de la mora. En D. Galarza, S. Garcés, J. Velásquez, V. Sánchez, & J. Zambrano (Eds.), *El cultivo de la mora en el Ecuador* (cap. 1, pp. 19-24). Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura.

Walters, K. E., & Martiny, J. B. H. (2020). Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PloS One*, *15*(9), e0233872. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233872

Wang, Z., Liu, L., Chen, Q., Wen, X., & Liao, Y. (2016). Conservation tillage increases soil bacterial diversity in the dryland of northern China. *Agronomy for Sustainable Development*, *36*(2), 1–9. https://doi.org/10.1007/s13593-016-0366-x

Wang, F., Wang, F., Zhang, H., Qin, F., Xiang, W., Wu, C., Yan, C., Zhu, Z., Chen, J., & Ge, T. (2023). Deciphering differences in microbial community composition and multifunctionality between healthy and Alternaria solani-infected potato rhizosphere soils. *Plant and Soil*, *484*(1–2), 347–362. https://doi.org/10.1007/s11104-022-05797-4

Wang, X., He, T., Gen, S., Zhang, X., Wang, X., Jiang, D., Li, C., Li, C., Wang, J., Zhang, W., & Li, C. (2020). Soil properties and agricultural practices shape microbial communities in flooded and rainfed croplands. *Applied Soil Ecology: A Section of Agriculture, Ecosystems & Environment*, *147*(103449), 103449. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103449

Wang, Y., Jiao, P., Guo, W., Du, D., Hu, Y., Tan, X., & Liu, X. (2022). Changes in bulk and rhizosphere soil microbial diversity and composition along an age gradient of Chinese fir (Cunninghamia lanceolate) plantations in subtropical China. *Frontiers in microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.777862

Wang, N. R., & Haney, C. H. (2020). Harnessing the genetic potential of the plant microbiome. *The Biochemist*, 42(4), 20–25. https://doi.org/10.1042/bio20200042

Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021). Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, *9*(9), 1–18. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988

Wang, G., Ren, Y., Bai, X., Su, Y., & Han, J. (2022). Contributions of Beneficial Microorganisms in Soil Remediation and Quality Improvement of Medicinal Plants. *Plants*, *11*(23). https://doi.org/10.3390/plants11233200

Wang, S., Wang, Y., Liu, H., Li, X., Zhao, J., Dong, Z., Li, J., Kaka, N. A., Nazar, M., & Shao, T. (2022). Using PICRUSt2 to explore the functional potential of bacterial community in alfalfa silage harvested at different growth stages. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *9*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s40538-022-00372-6

Wada, S., Kennedy, J. A., & Reed, B. M. (2011). Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of Rubus seed. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 762–768. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.034

Wei, H., Peng, C., Yang, B., Song, H., Li, Q., Jiang, L., Wei, G., Wang, K., Wang, H., Liu, S., Liu, X., Chen, D., Li, Y., & Wang, M. (2018). Contrasting soil bacterial community, diversity, and

function in two forests in China. *Frontiers in Microbiology*, 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01693

Wei, F., Feng, H., Zhang, D., Feng, Z., Zhao, L., Zhang, Y., Deakin, G., Peng, J., Zhu, H., & Xu, X. (2021). Composition of Rhizosphere Microbial Communities Associated With Healthy and Verticillium Wilt Diseased Cotton Plants. *Frontiers in Microbiology*, *12*(April), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.618169

Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in Microbiology*, *10*(OCT). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407

Xia, Q., Rufty, T., & Shi, W. (2021). Predominant Microbial Colonizers in the Root Endosphere and Rhizosphere of Turfgrass Systems: Pseudomonas veronii, Janthinobacterium lividum, and Pseudogymnoascus spp. *Frontiers in Microbiology*, *12*(March), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643904

Xu, L., Naylor, D., Dong, Z., Simmons, T., Pierroz, G., Hixson, K. K., Kim, Y.-M., Zink, E. M., Engbrecht, K. M., Wang, Y., Gao, C., DeGraaf, S., Madera, M. A., Sievert, J. A., Hollingsworth, J., Birdseye, D., Scheller, H. V., Hutmacher, R., Dahlberg, J., … Coleman-Derr, D. (2018). Drought delays development of the sorghum root microbiome and enriches for monoderm bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(18). https://doi.org/10.1073/pnas.1717308115

Xu, H., Yu, F., Zuo, Y., Dai, Y., Deng, H., & Xie, J. (2022). Selected rhizosphere bacteria are associated with endangered species - Scutellaria tsinyunensis via comparative microbiome analysis. *Microbiological Research*, *258*(126917), 126917. https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126917

Xu, Y., Schmiege, S. C., & Sharkey, T. D. (2024). The oxidative pentose phosphate pathway in photosynthesis: a tale of two shunts. *New Phytologist*, 2453–2463. https://doi.org/10.1111/nph.19730

Yousaf, T., Saleem, F., Andleeb, S., Ali, M., & Farhan Ul Haque, M. (2024). Methylotrophic bacteria from rice paddy soils: mineral-nitrogen-utilizing isolates richness in bulk soil and rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(6), 1–16. https://doi.org/10.1007/s11274-024-04000-3

Zatakia, H. M., Arapov, T. D., Meier, V. M., & Scharf, B. E. (2018). Cellular Stoichiometry of Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins in Sinorhizobium meliloti. *Journal of Bacteriology*, 200(6). https://doi.org/10.1128/jb.00614-17

Zboralski, A., & Filion, M. (2020). Genetic factors involved in rhizosphere colonization by

phytobeneficial Pseudomonas spp. *Computational and Structural Biotechnology* Journal, 18, 3539–3554. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.025

Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., Zhang, H., Xiong, Z., Xue, Y., Tu, J., & Lu, Z. (2018). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of the Total Environment*, *618*, 1254–1267. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228

Zhang, J., Liu, Y.-X., Zhang, N., Hu, B., Jin, T., Xu, H., Qin, Y., Yan, P., Zhang, X., Guo, X., Hui, J., Cao, S., Wang, X., Wang, C., Wang, H., Qu, B., Fan, G., Yuan, L., Garrido-Oter, R., … Bai, Y. (2019). NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nature Biotechnology*, 37(6), 676–684. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0104-4

Zhang, Z., Tariq, A., Zeng, F., Graciano, C., Sun, F., Chai, X., & Ahmed, Z. (2021). Nitrogen and water addition regulate fungal community and microbial co-occurrence network complexity in the rhizosphere of Alhagi sparsifolia seedlings. *Applied Soil Ecology*, *164*(May 2020), 103940. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103940

Zhang, L., Chen, F. X., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y. J., Hao, H. X., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *12*(December), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364

Zhou, Z., Tran, P. Q., Breister, A. M., Liu, Y., Kieft, K., Cowley, E. S., Karaoz, U., & Anantharaman, K. (2022). METABOLIC: high-throughput profiling of microbial genomes for functional traits, metabolism, biogeochemistry, and community-scale functional networks. *Microbiome*, *10*(1), 1–22. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01213-8

Zuo, J., Zu, M., Liu, L., Song, X., & Yuan, Y. (2021). Composition and diversity of bacterial communities in the rhizosphere of the Chinese medicinal herb Dendrobium. BMC Plant Biology, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12870-021-02893-y

Zverev, A. O., Kichko, A. A., Pinaev, A. G., Provorov, N. A., & Andronov, E. E. (2021). Diversity indices of plant communities and their rhizosphere microbiomes: An attempt to find the connection. Microorganisms, 9(11), 2339. https://doi.org/10.3390/microorganisms9112339

Zhang, C., van der Heijden, M. G. A., Dodds, B. K., Nguyen, T. B., Spooren, J., Valzano-Held, A., Cosme, M., & Berendsen, R. L. (2024). Correction to: A tripartite bacterial-fungal-plant symbiosis in the mycorrhiza-shaped microbiome drives plant growth and mycorrhization (Microbiome, (2024), 12, 1, (13), 10.1186/s40168-023-01726-4). *Microbiome*, *12*(1).

https://doi.org/10.1186/s40168-024-01776-2

ZymoBIOMICS. (2022). *ZymoBIOMICS Microbial Community Standard*

ANEXOS

Anexo 1.

Control de calidad para la preparación de librerías

#	BioSequence ID	Nombre de Muestra	Fuente	Integridad	Concentración (ng/µL)	Cumple
1	231124-WC-001-16S	MSL_001	Suelo	OK	32,00	Si
2	231124-WC-002-16S	MSL_002	Suelo	OK	35,00	Si
3	231124-WC-003-16S	MSL_003	Suelo	OK	66,00	Si
4	231124-WC-004-16S	MSL_004	Suelo	OK	40,00	Si
5	231124-WC-005-16S	MSL_005	Suelo	OK	40,00	Si
6	231124-WC-006-16S	MSL_006	Suelo	OK	30,00	Si
7	231124-WC-007-16S	MEL_001	Suelo	OK	60,00	Si
8	231124-WC-008-16S	MEL_002	Suelo	OK	58,00	Si
9	231124-WC-009-16S	MEL_003	Suelo	OK	30,00	Si
10	231124-WC-010-16S	MEL_004	Suelo	OK	47,00	Si
11	231124-WC-011-16S	MEL_005	Suelo	OK	30,00	Si
12	231124-WC-012-16S	MEL_006	Suelo	OK	39,00	Si

Nota: La concentración de ADN para cada una de las muestras es mayor a 20 ng/u, de modo que su integridad es adecuada para el posterior análisis bioinformática.

Anexo 2.

Parámetros para preparación de librarías para el proceso de secuenciación

#	BioSequence ID	Índices		Banda (bp)	Concentración (ng/ul)	Cumple
1	231124-WC-001-16S	C-N701	C-S513	~630	304,00	OK
2	231124-WC-002-16S	C-N701	C-S515	~630	276,50	OK
3	231124-WC-003-16S	C-N701	C-S516	~630	295,00	OK
4	231124-WC-004-16S	C-N701	C-S517	~630	316,00	OK
5	231124-WC-005-16S	C-N701	C-S518	~630	345,50	OK
6	231124-WC-006-16S	C-N701	C-S520	~630	286,00	OK
7	231124-WC-007-16S	C-N701	C-S521	~630	352,50	OK
8	231124-WC-008-16S	C-N701	C-S522	~630	217,00	OK

9	231124-WC-009-16S	C-N702	C-S513	~630	114,00	OK
10	231124-WC-010-16S	C-N702	C-S515	~630	199,00	OK
11	231124-WC-011-16S	C-N702	C-S516	~630	248,50	OK
12	231124-WC-012-16S	C-N702	C-S517	~630	171,00	OK

Nota: Cada muestra cuenta con aproximadamente 630 pb y con concentraciones mayores a 10 ng/ul, de modo que la preparación de librerías a partir de la muestras rizosféricas es adecuada.

Anexo 3.

Índices de diversidad alfa

Sample name	Shannon	Simpson	Phylogenetic Diversity
Cevallos – M1	7.24	0.00	4698
Manzana de Oro – M1	7.04	0.00	4414
Tisaleo – M2	7.35	0.00	4705
Alobamba – M2	6.26	0.01	3999
Santa Lucía – M2	6.93	0.00	4358
Huachi Grande – M2	6.80	0.01	4706
Cevallos – M2	7.02	0.00	4336
Manzana de Oro – M2	6.63	0.01	4015
Huachi Grande – M1	6.99	0.00	4117
Santa Lucía – M1	6.68	0.01	4129
Alobamba – M1	6.20	0.02	3836
Tisaleo – M1	5.39	0.04	3428

Anexo 4.

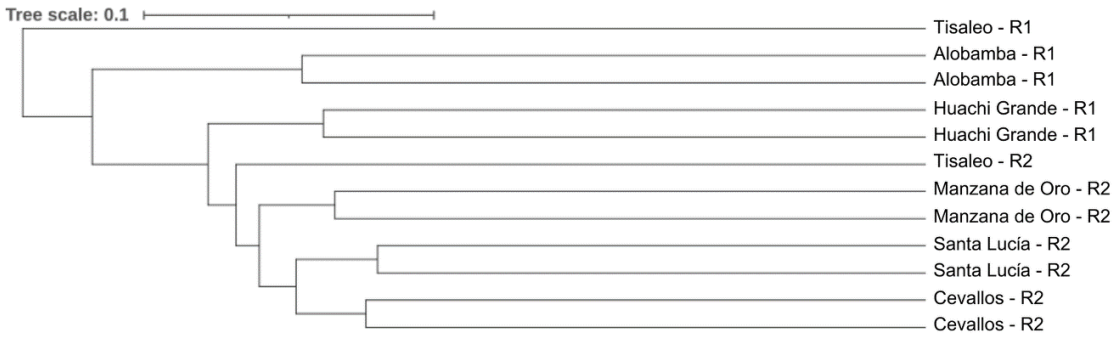
Test de significancia PERMANOVA

		pseudo-F	p-value	q-value
Moras Manzana de Oro	Mora Tisaleo	1.150	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Alobamba	1.564	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Barrio Santa Lucia	1.564	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Huachi Grande	1.224	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Cevalllos	1.293	N.S (0.333)	N.S (0.333)
Mora Tisaleo	Moras Alobamba	1.195	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Barrio Santa Lucia	1.142	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Huachi Grande	1.135	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Cevallos	1.185	N.S (0.333)	N.S (0.333)
Moras Alobamba	Moras Barrio Santa Lucia	1.691	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Huachi Grande	1.895	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Cevallos	1.818	N.S (0.333)	N.S (0.333)
Moras Barrio Santa Lucia	Moras Huachi Grande	1.422	N.S (0.333)	N.S (0.333)
	Moras Cevalllos	1.493	N.S (0.333)	N.S (0.333)
Moras Huachi Grande	Moras Cevalllos	1.298	N.S (0.333)	N.S (0.333)

Nota: Síntesis de los resultados obtenido mediante el Análisis multivariado permutado de la varianza (PERMANOVA) a un nivel de significación del 95%, los resultados se obtuvieron al configurar seis sets de acuerdo con los puntos de análisis conformado por dos MTPs de acuerdo con sus réplicas.

Anexo 5.

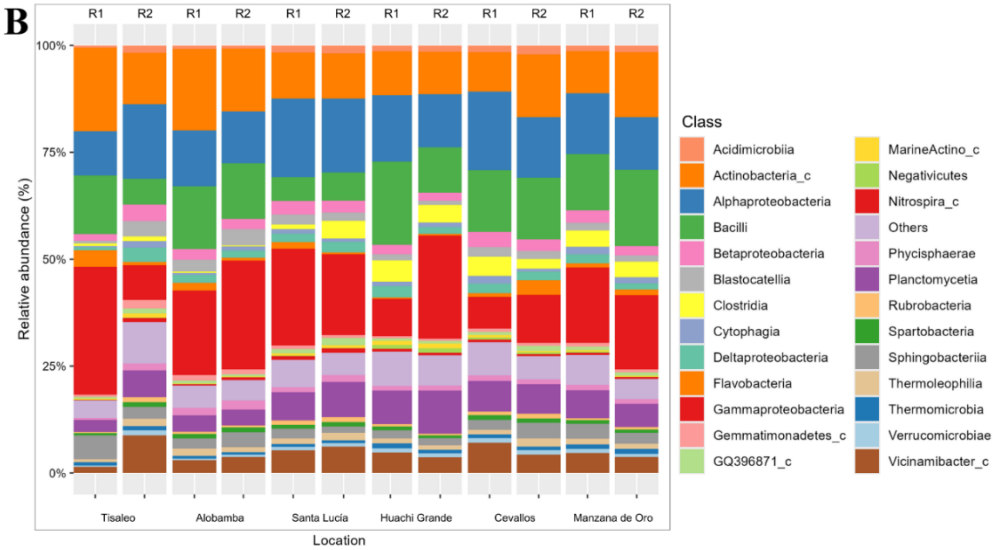
Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGM)



Nota: Árbol de agrupamiento o clustering tree construido de acuerdo con las distancias de disimilitud de Bray – Curtis, el cual muestra la similitud en composición entre réplicas y entre puntos.

Anexo 6.

Niveles de abundancia relativa a nivel de clase



Nota: Composición taxonómica a nivel de clase identificadas en la rizósfera de los seis puntos de muestreo, se presentan aquellos taxones que contengan un límite de prevalencia mayor o igual al 1% (cut off ≥1%), mientras que aquellos taxones que presentaron una abundancia menor al límite de prevalencia se agruparon en la sección Others.

Anexo 7.

Predicción completa de los perfiles metabólicas para cada réplica.

Pathway	Description	Tisaleo 1	Alobamba 1	Santa Lucía 1	Huachi Grande 1	Cevallos 1	Manzana de Oro 1	Tisaleo 2	Alobamba 2	Santa Lucía 2	Huachi Grande 2	Cevallos 2	Manzana de Oro 2
1CMET2-PWY	N10-formyl-tetrahydrofolate biosynthesis	16453,02	9936,948	9046,723	4537,067	10431,08	11967,11	8513,924	11067,87	20630,27	20345,96	11992,37	8176,012
3-HYDROXYPHENYLACETATE-DEGRADATION-PWY	4-hydroxyphenylacetate degradation	1939,175	2136,964	1254,093	484,9234	726,6148	1967,874	457,5053	2089,364	4122,668	4367,365	1693,865	1420,718
AEROBACTINSYN-PWY	aerobactin biosynthesis	114,7385	161,3835	8,072023	64,5644	27,60204	425,2126	39,18699	0,0	1388,429	93,89269	189,4602	172,6175
ALL-CHORISMATE-PWY	superpathway of chorismate metabolism	3292,087	2774,866	2144,891	1683,939	3156,451	5791,599	2907,455	2710,227	10325,31	7429,298	4732,009	3424,825
ANAEROFRUCAT-PWY	homolactic fermentation	12053,82	9082,27	7347,377	4599,223	9660,537	11021,89	8557,12	10015,9	20431,96	16737,45	11412,8	7615,074
ANAGLYCOLYSIS-PWY	glycolysis III (from glucose)	13903	10306,51	8614,168	5197,839	12213,86	13443,36	10228,54	11552,35	24415,4	21072,32	13481,88	8872,821
ARG+POLYAMINE-SYN	superpathway of arginine and polyamine biosynthesis	3292,316	4532,041	3567,279	2465,832	6105,302	6766,08	4782,462	4928,101	12374,65	10239,11	6478,442	4155,446
ARGDEG-PWY	superpathway of L-arginine, putrescine, and 4-aminobutanoate degradation	409,1325	1038,617	32,94744	275,6883	290,9421	1687,859	137,9713	267,6356	4885,073	880,1535	856,5164	765,4345
ARGORNPROST-PWY	arginine, ornithine and proline interconversion	2020,118	3089,838	2043,741	823,4455	1837,616	3814,756	1096,097	3596,302	7310,6	6569,204	2285,115	2257,227

ARGSYN-PWY	L-arginine biosynthesis I (via L-ornithine)	15565,15	9476,43	8514,542	4361,706	10279,96	11454,8	8619,649	11115,42	21191,13	19589,75	11087,73	7743,959
ARGSYNBSUB-PWY	L-arginine biosynthesis II (acetyl cycle)	16749,64	10433,09	9521,687	4698,086	10994,67	12239,17	9332,803	11970,62	22605,69	21272,64	11845,29	8382,258
ARO-PWY	chorismate biosynthesis I	16940,08	11045,77	9862,296	5296,784	12259,85	13419,02	10144,53	12735,96	24316,86	22856,34	13300,32	9124,253
ASPASN-PWY	superpathway of L-aspartate and L-asparagine biosynthesis	7060,539	5443,77	3293,597	1721,041	2357,073	5160,647	2349,402	5904,616	8296,289	8688,622	5765,953	3696,162
AST-PWY	L-arginine degradation II (AST pathway)	1033,322	2368,653	1326,794	417,2773	732,8376	2497,334	523,1598	2762,723	3622,86	6861,987	1583,814	1404,625
BIOTIN-BIOSYNTHESIS-PWY	biotin biosynthesis I	7078,215	6612,161	5750,044	2918,763	6780,175	8856,178	5827,141	7833,524	14645,19	17181,69	7444,692	5372,574
BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY	superpathway of branched amino acid biosynthesis	21192,34	13544,38	12597,7	6568,206	16581,24	17215,81	13810,23	15905,43	32658,42	28709,68	17451,82	11491,42
CALVIN-PWY	Calvin-Benson-Bassham cycle	17538,97	10841,31	9676,27	5519,389	12407,09	13712,03	10308,41	11993,69	25212,99	21647,2	13890,49	9199,439
CATECHOL-ORTHO-CLEAVAGE-PWY	catechol degradation to β-ketoadipate	1066,57	1680,41	1098	384,3601	814,6354	1339,432	547,78	2488,409	2003,118	3905,001	1146,974	1130,438
CENTBENZCOA-PWY	benzoyl-CoA degradation II (anaerobic)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	4,16	0,0	0,0	0,0
CENTFERM-PWY	pyruvate fermentation to butanoate	446,7481	224,1927	386,169	644,5569	1516,496	1862,559	757,0473	239,7313	3547,983	2222,836	1020,935	1217,941

CHLOROPHYLL-SYN	chlorophyllide a biosynthesis I (aerobic, light-dependent)	139,515	28,22175	0,0	3,465782	113,5427	171,4652	87,57121	69,22768	9,290231	133,9737	156,85	0,0
COA-PWY	coenzyme A biosynthesis I	16088,39	9502,865	8882,041	4791,651	11600,3	12203,08	9583,408	10888,87	21918,55	20939,66	12372,3	8130,283
COBALSYN-PWY	adenosylcobalamin salvage from cobinamide I	2841,807	3949,32	3597,485	1892,707	5469,342	5217,937	3868,585	5166,278	10286,47	10293,98	5217,34	3532,145
CODH-PWY	reductive acetyl coenzyme A pathway	160,1951	403,5465	375,9313	208,6967	704,141	599,6642	564,7088	484,9567	1657,612	753,5975	580,8741	334,3317
COLANSYN-PWY	colanic acid building blocks biosynthesis	7478,637	6932,52	5625,469	3324,633	8825,747	8808,539	7165,591	8450,86	17801,9	13007,41	8761,977	5981,238
COMPLETE-ARO-PWY	superpathway of aromatic amino acid biosynthesis	18203,84	11704,47	10514,93	5587,239	12979,25	14188,52	10758,51	13473,19	25646,15	24307,81	14088,87	9650,731
CRNFORCAT-PWY	creatinine degradation I	4892,72	3253,204	2053,199	1155,619	889,4698	1848,604	1574,215	3670,448	3135,958	3362,667	2897,736	2298,044
DAPLYSINESYN-PWY	L-lysine biosynthesis I	16670,9	10068,32	9140,906	4511,687	10759,39	12030,19	8990,884	11557,57	21769,02	21358,73	11870,37	8248,663
DENITRIFICATION-PWY	nitrate reduction I (denitrification)	1117,548	1248,98	833,485	371,8706	828,2901	1083,41	793,5462	1002,655	1188,537	3912,795	766,2708	786,7565
DENOVOPURINE2-PWY	superpathway of purine nucleotides de novo biosynthesis II	5130,15	5945,096	4698,531	3570,534	6831,117	9579,219	3994,038	4573,565	16939,06	17826,49	7812,648	5759,341
DHGLUCONATE-PYR-CAT-PWY	glucose degradation (oxidative)	979,9847	2481,836	1474,613	141,5667	249,471	1273,665	176,5525	3095,889	1149,887	3792,227	872,667	1181,853
DTDPRHAMSYN-PWY	dTDP-L-rhamnose biosynthesis I	8498,137	9184,147	7171,365	4233,893	10905,31	11730,48	9133,529	10700,72	20654,34	20527,62	11806,78	7266,52

ECASYN-PWY	enterobacterial common antigen biosynthesis	142,1954	297,9099	4,639079	183,8054	162,3867	894,6819	85,80394	41,26179	3190,739	395,5179	377,7712	266,3372
ENTBACSYN-PWY	enterobactin biosynthesis	955,147	1255,858	867,8348	878,5263	1220,578	3581,093	1225,345	1076,854	7702,607	2611,093	1721,884	1818,298
FAO-PWY	fatty acid β-oxidation I	21601,37	11744,75	11416,78	4513,256	11740,38	14361,35	10420,06	14139,46	26529,64	26259,92	14335,01	9546,009
FASYN-ELONG-PWY	fatty acid elongation -- saturated	19824,05	12204	12607,71	6892,612	18739,35	18399,26	14417,7	14146,03	35078,27	29827,09	17679,48	11474,98
FASYN-INITIAL-PWY	superpathway of fatty acid biosynthesis initiation (E. coli)	16547,67	11107,37	9653,938	4088,048	10488,66	12963,78	8502,406	11953,33	21338,12	24676,2	12429,32	8740,656
FERMENTATION-PWY	mixed acid fermentation	11916,65	6348,086	6208,908	2816,709	5776,001	8447,047	4609,031	7572,583	16524,67	15355,6	7435,001	5267,692
FOLSYN-PWY	superpathway of tetrahydrofolate biosynthesis and salvage	16693,2	9417,528	8660,847	4393,94	10129,42	11596,58	8451,044	10797,01	20120,2	19938,18	11696,01	7845,801
FUC-RHAMCAT-PWY	superpathway of fucose and rhamnose degradation	47,62862	197,7033	84,67747	94,61889	341,5663	368,2089	136,6747	48,05635	1348,915	544,0956	307,7399	177,5767
FUCCAT-PWY	fucose degradation	128,3347	132,1878	97,3872	157,1127	438,0427	417,3878	108,9382	123,5154	1050,07	510,1663	374,5357	198,1034
GALACT-GLUCUROCAT-PWY	superpathway of hexuronide and hexuronate degradation	2692,391	2113,428	1463,072	1120,606	2504,245	3112,47	1970,869	2395,764	6975,628	3052,911	3346,356	2181,615
GALACTARDEG-PWY	D-galactarate degradation I	382,3381	728,4301	521,014	283,8109	602,3494	1228,445	480,0086	724,6656	3560,405	2004,155	996,6885	725,9157
GALACTUROCAT-PWY	D-galacturonate degradation I	4225,216	3632,956	2779,586	1847,775	4360,542	5168,938	3278,648	4284,226	9846,114	6538,001	5469,695	3370,893

GALLATE-DEGRADATION-I-PWY	gallate degradation II	588,6965	301,8297	274,5799	218,1431	428,299	601,3432	278,6114	429,4959	881,6037	632,5034	453,4678	534,6753
GALLATE-DEGRADATION-II-PWY	gallate degradation I	588,6965	301,8297	227,2709	218,1431	428,299	584,7119	278,6114	412,7604	756,2145	632,5034	450,974	534,6753
GLCMANNANAUT-PWY	superpathway of N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine and N-acetylneuraminate degradation	1023,197	853,9008	818,411	692,0879	1648,891	1709,849	905,4408	739,3817	4901,137	1980,629	1507,14	1205,113
GLUCARDEG-PWY	D-glucarate degradation I	408,8683	766,5649	554,9334	533,558	1028,897	1375,06	756,5258	745,3258	4405,604	2180,513	1268,042	808,6765
GLUCARGALACTSUPER-PWY	superpathway of D-glucarate and D-galactarate degradation	382,3381	728,4301	521,014	283,8109	602,3494	1228,445	480,0086	724,6656	3560,405	2004,155	996,6885	725,9157
GLUCONEO-PWY	gluconeogenesis I	17367,86	9958,185	9053,751	4557,784	10614,48	11896,24	8784,272	11153,22	21582,04	19375,06	11931,4	8147,467
GLUCOSE1PMETAB-PWY	glucose and glucose-1-phosphate degradation	1656,489	3329,133	1970,979	592,1404	1208,579	3839,181	1050,825	3975,56	5943,611	9136,853	2432,551	2093,584
GLUCUROCAT-PWY	superpathway of β-D-glucuronide and D-glucuronate degradation	2882,751	3781,521	2391,827	1627,862	2827,653	3752,972	2386,435	3469,556	8909,907	4239,058	3967,668	2813,544
GLUTORN-PWY	L-ornithine biosynthesis	16584,69	10282,8	9318,394	4428,797	10580	11541,45	9303,927	11888,68	20521,62	20274,64	11738,5	8036,347
GLYCOCAT-PWY	glycogen degradation I (bacterial)	4660,636	6786,175	4700,716	3097,048	7261,222	8273,613	6140,409	7675,2	15240,12	15825,37	7892,124	5188,139

GLYCOGENSYNTH-PWY	glycogen biosynthesis I (from ADP-D-Glucose)	7117,661	7624,846	5787,985	3953,092	9104,735	10375,65	7513,503	8097,205	18177,59	17218,24	10297,75	6736,026
GLYCOL-GLYOXDEG-PWY	superpathway of glycol metabolism and degradation	11,90504	72,25708	24,64118	27,06672	132,9721	130,6191	52,09904	11,93093	707,2293	191,5888	99,1008	55,49289
GLYCOLYSIS	glycolysis I (from glucose 6-phosphate)	15703,08	10593,97	8922,975	5065,328	11255,49	12663,42	9487,644	11777,89	23086,34	20798,34	12973,48	8831,493
GLYCOLYSIS-E-D	superpathway of glycolysis and Entner-Doudoroff	11583,42	9317,87	7379,973	4426,502	9518,127	11054,43	8409,222	10370,85	19754,21	18066,53	11283,61	7659,865
GLYCOLYSIS-TCA-GLYOX-BYPASS	superpathway of glycolysis, pyruvate dehydrogenase, TCA, and glyoxylate bypass	15526,89	9949,55	8444,298	4221,837	9081,589	11105,97	7927,29	11172,35	19313,6	18587,64	11489,63	7956,408
GLYOXYLATE-BYPASS	glyoxylate cycle	14584,41	7599,772	7553,155	3327,968	6744,828	8533,904	5964,836	8414,031	15176,31	15625,57	9438,735	6425,215
GOLPDLCAT-PWY	superpathway of glycerol degradation to 1,3-propanediol	26,55085	112,0218	39,44334	65,57083	127,8749	363,9203	77,57848	4,444655	1999,94	233,3565	120,9063	80,27151
HCAMHPDEG-PWY	3-phenylpropanoate and 3-(3-hydroxyphenyl)propanoate degradation to 2-oxopent-4-enoate	43,7656	99,84527	43,89758	31,20502	55,17413	175,2368	40,70784	66,79688	786,1771	223,8635	55,52223	73,94291

HEME-BIOSYNTHESIS-II	heme biosynthesis I (aerobic)	13359,57	6569,552	6664,885	2750,999	7438,581	8422,256	6227,117	7734,714	13853,93	13925,8	7430,892	5488,007
HEMESYN2-PWY	heme biosynthesis II (anaerobic)	18027,41	9505,441	8816,445	4387,207	10865,74	11808,89	9385,663	11017,68	20737,93	20617,29	12175,7	8088,097
HEXITOLDEGSUPER-PWY	superpathway of hexitol degradation (bacteria)	1195,34	1105,179	1328,381	1007,737	2224,219	2672,515	1537,655	1408,076	8130,524	3195,585	2644,473	1848,59
HISDEG-PWY	L-histidine degradation I	7799,922	7810,29	5169,433	2529,391	6218,632	8052,591	5412,217	8922,168	13725,85	13692,31	8384,85	5712,768
HISTSYN-PWY	L-histidine biosynthesis	16792,74	9363,186	8832,403	4557,567	10853,49	11345,3	9275,83	11097,47	20903,66	19071,86	11986,03	7762,462
HOMOSER-METSYN-PWY	L-methionine biosynthesis I	12617,77	8526,448	5606,534	3026,525	6330,445	8651,252	5780,245	9229,577	14784,49	15273,05	8995,555	6476,536
HSERMETANA-PWY	L-methionine biosynthesis III	16229,36	8345,457	7857,919	3745,959	8803,812	9288,864	7645,252	10087,43	16694,57	16935,02	9986,296	6747,69
ILEUSYN-PWY	L-isoleucine biosynthesis I (from threonine)	23460,14	15884,64	14491,04	7469,486	19193,09	19857,17	15583,13	18766,54	38295,87	32670,13	20100,33	13413,84
KDO-NAGLIPASYN-PWY	superpathway of (Kdo)2-lipid A biosynthesis	751,4415	1043,814	724,0986	1116,474	1725,932	5323,789	1004,233	147,1766	8640,386	9278,263	3075,562	2026,23
KETOGLUCONMET-PWY	ketogluconate metabolism	1710,642	2842,176	1538,642	465,6746	1051,513	1660,093	770,5224	2436,559	3647,672	2159,889	1840,308	1626,426
LACTOSECAT-PWY	lactose and galactose degradation I	98,32718	11,74083	0,0	13,29915	0,0	0,0	0,0	0,0	68,33865	0,0	0,0	34,88492
LEU-DEG2-PWY	L-leucine degradation I	13271,81	6278,488	6620,595	2057,797	5677,496	6983,506	4778,185	7484,695	11004,57	14362,44	7139,496	5122,732
LIPASYN-PWY	phospholipases	104,7598	116,4137	65,76517	32,79139	104,6506	98,27969	83,30495	94,45333	431,1755	235,996	186,7184	146,3746

MET-SAM-PWY	superpathway of S-adenosyl-L-methionine biosynthesis	14966,76	9294,351	7132,117	3727,07	8167,762	10591,1	7203,64	10239,9	18313,44	19026,23	10811,05	7458,768
METH-ACETATE-PWY	methanogenesis from acetate	37,47544	69,03476	126,7167	383,1457	1008,95	706,8588	195,1468	9,970334	1980,171	1355,35	499,3251	755,68
METHANOGENESIS-PWY	methanogenesis from H2 and CO2	0,0	0,0	0,0	28,4647	20,44261	0,0	0,0	########	0,0	75,071566	15,50651	0,0
METHGLYUT-PWY	superpathway of methylglyoxal degradation	331,0238	904,7092	554,5827	0,0	82,8908	389,4869	65,039335	765,1055	315,3408	369,5535	165,9944	411,8544
METHYLGALLATE-DEGRADATION-PWY	methylgallate degradation	722,2805	373,5047	338,2929	268,6875	526,6724	740,1942	343,5297	530,0444	1086,417	784,7487	559,9351	653,8179
NAD-BIOSYNTHESIS-II	NAD salvage pathway II	13174,88	1244,765	4854,687	470,895	1271,44	1992,315	928,3592	1010,728	4788,769	1442,632	1137,039	1413,758
NADSYN-PWY	NAD biosynthesis II (from tryptophan)	2062,318	1138,018	1180,128	600,6658	1970,323	2116,476	1702,429	1441,991	2748,271	2388,283	1651,182	1375,797
NAGLIPASYN-PWY	lipid IVA biosynthesis	12039,41	6211,365	6491,025	3012,522	8085,788	8496,938	6586,47	7607,114	14597	14332,04	7991,066	5112,079
NONMEVIPP-PWY	methylerythritol phosphate pathway I	14742,86	8363,745	8108,532	4232,097	10046,2	10693,47	8283,66	10010,53	19821,31	18202,25	10285,42	7204,375
NONOXIPENT-PWY	pentose phosphate pathway (non-oxidative branch)	19524,32	12646,1	10949,71	6213,552	14391,06	15561,99	12043,89	14411,44	30169,94	23840,98	16532,71	10605,91

OANTIGEN-PWY	O-antigen building blocks biosynthesis (E. coli)	10649,15	8849,561	7754,075	4237,101	10437,67	10980,11	8884,29	10136,92	20224,36	19562,09	10994,66	7228,097
ORNARGDEG-PWY	superpathway of L-arginine and L-ornithine degradation	409,1325	1038,617	32,94744	275,6883	290,9421	1687,859	137,9713	267,6356	4885,073	880,1535	856,5164	765,4345
ORNDEG-PWY	superpathway of ornithine degradation	1816,482	3004,222	1912,544	704,1453	1048,372	2546,639	870,2326	2362,701	5967,29	7405,429	1710,214	1546,31
P101-PWY	ectoine biosynthesis	255,5592	194,5964	460,6066	148,566	496,416	585,8599	337,8675	359,1318	1138,959	706,1783	562,3184	519,7662
P105-PWY	TCA cycle IV (2-oxoglutarate decarboxylase)	19814,18	10667	10367,26	4918,467	11693,4	13185,16	10040,29	12338,78	23615,23	21556,76	13640,68	9081,972
P108-PWY	pyruvate fermentation to propanoate I	8971,547	7019,2	6460,785	3798,815	11152,36	10378,63	9367,854	8331,406	19389,36	13838,54	10739,3	6664,009
P122-PWY	heterolactic fermentation	3188,532	3188,767	2350,586	1124,588	2657,754	2779,802	2652,564	2855,537	5712,054	9560,115	3669,634	2298,798
P124-PWY	Bifidobacterium shunt	3951,591	3720,09	2835,394	1257,512	2971,299	3090,695	2920,271	2964,482	6310,803	10715,47	3971,568	2489,573
P125-PWY	superpathway of (R,R)-butanediol biosynthesis	1854,848	2358,4	1589,161	853,1424	1067,913	1845,26	780,4841	1828,876	2927,77	4592,11	1812,651	1595,796
P161-PWY	acetylene degradation	5401,464	2021,011	1499,887	1702,766	2896,759	5721,483	1918,868	2803,224	9564,107	14499,59	4908,75	2579,675
P162-PWY	L-glutamate degradation V (via hydroxyglutarate)	72,44861	0,0	0,0	56,93503	188,9654	599,7681	15,90317	0,0	647,9171	159,8021	165,3112	161,5359

P163-PWY	L-lysine fermentation to acetate and butanoate	167,5361	376,0742	239,6578	177,6416	853,0689	954,7257	394,1425	362,9337	1549,515	794,1292	598,3107	514,4892
P164-PWY	purine nucleobases degradation I (anaerobic)	1829,413	3145,373	2695,977	2171,139	5794,229	7087,988	4495,724	3935,893	12423,33	8555,949	3965,284	4460,769
P184-PWY	protocatechuate degradation I (meta-cleavage pathway)	662,096	336,0696	273,7387	220,4595	498,1851	703,2923	320,5214	481,0777	918,1776	689,6281	524,0962	573,8797
P221-PWY	octane oxidation	11253,32	3916,848	5005,324	130,9931	466,9264	1661,881	493,6611	4438,253	1548,494	5511,228	1092,675	1952,741
P23-PWY	reductive TCA cycle I	4891,916	5742,095	4939,821	4153,606	9720,034	10965,9	7602,873	6600,867	18959,5	17072,22	8482,185	5701,844
P241-PWY	coenzyme B biosynthesis	2,324609	12,91928	17,17671	21,98422	4,820203	22,54466	17,29382	7,995971	19,16808	37,03422	2,34308	14,48233
P261-PWY	coenzyme M biosynthesis I	58,23684	72,70239	70,26899	68,95577	157,5167	160,5962	66,70345	132,1534	170,5192	174,6838	133,8604	92,06622
P281-PWY	3-phenylpropanoate degradation	925,899	1570,51	1040,321	705,3041	904,6152	1278,755	780,1859	1477,78	2956,949	1937,512	1617,608	1052,552
P341-PWY	glycolysis V (Pyrococcus)	0,0	5,623153	0,0	16,61858	3,349459	0,0	0,0	7,497052	0,0	21,01236	3,349495	4,998299
P381-PWY	adenosylcobalamin biosynthesis II (late cobalt incorporation)	445,6736	486,004	497,0787	812,7375	2333,818	2249,45	690,4877	48,23172	4854,935	2383,406	2091,255	1492,479
P4-PWY	superpathway of L-lysine, L-threonine and L-methionine biosynthesis I	15110,56	9709,821	8086,404	4196,61	9683,443	11371,41	8288,868	10977,35	20118,98	19878,36	11375,54	7891,758

P42-PWY	incomplete reductive TCA cycle	8683,594	8796,092	7639,331	4225,73	8779,962	10507,38	6883,137	10284,09	17566,48	18861,7	9861,226	7555,674
P441-PWY	superpathway of N-acetylneuraminate degradation	1884,006	1786,354	1522,568	1463,017	3180,302	3826,96	1776,621	1482,116	9326,048	4966,618	3243,237	2441,636
P461-PWY	hexitol fermentation to lactate, formate, ethanol and acetate	1026,831	1792,828	1123,204	1308,785	1237,715	3549,08	1233,236	1063,483	5968,34	4348,055	2802,834	2319,923
P562-PWY	myo-inositol degradation I	1887,689	3486,719	2126,51	1134,937	1630,814	2632,821	1493,747	3394,914	5615,739	5162,689	2934,906	2156,579
P621-PWY	nylon-6 oligomer degradation	88,94849	92,03221	66,23028	0,0	91,90857	85,10125	59,92441	357,4193	697,5875	129,5315	60,57674	66,04619
PANTO-PWY	phosphopantothenate biosynthesis I	16024,55	9062,741	8579,885	4456,499	10616,84	11320,24	8906,989	10286,53	20445,52	18894,89	11823,83	7649,848
PANTOSYN-PWY	pantothenate and coenzyme A biosynthesis I	15461,58	8510,917	7843,192	4174,585	9526,395	10563,73	8038,174	9895,424	19830,62	18638,05	10698,7	7109,958
PENTOSE-P-PWY	pentose phosphate pathway	12820,38	10787,91	8306,595	4813,017	11344,54	12299,83	9885,876	12432,68	22924,57	19357,19	12651,02	8626,691
PEPTIDOGLYCANSYN-PWY	peptidoglycan biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)	16071,27	9201,268	8581,438	4576,443	10993,85	11701,52	9294,025	10557,91	20842,01	18714,94	11857,21	7862,86
PHOSLIPSYN-PWY	superpathway of phospholipid biosynthesis I (bacteria)	17769,78	12511,28	10983,09	5710,111	13677,68	14763,97	11750,23	14351,85	26295,96	24600,71	14568,18	10162,16

POLYAMINSYN3-PWY	superpathway of polyamine biosynthesis II	1894,786	2901,729	2232,378	1713,705	4316,663	4752,953	3282,765	3138,777	8400,762	7061,768	4485,62	2806,921
POLYAMSYN-PWY	superpathway of polyamine biosynthesis I	1895,248	2978,875	2273,954	1728,306	4345,347	4812,112	3312,058	3176,224	8762,419	6934,456	4585,832	2846,33
POLYISOPRENSYN-PWY	polyisoprenoid biosynthesis (E. coli)	16022,62	8943,423	8463,753	4277,696	10899,89	11474,22	9029,74	10532,46	20333,68	18935,34	11360,1	7626,252
PPGPPMET-PWY	ppGpp biosynthesis	12512,61	3801,064	5599,809	1609,175	3697,412	5386,094	3296,384	3861,158	10318,6	7050,542	3425,918	3202,438
PROTOCATECHUATE-ORTHO-CLEAVAGE-PWY	protocatechuate degradation II (ortho-cleavage pathway)	6969,189	7241,243	4571,831	1928,19	4259,603	5020,518	3727,226	8321,286	10688,57	9380,048	5513,847	4377,766
PRPP-PWY	superpathway of histidine, purine, and pyrimidine biosynthesis	5155,989	5759,347	4719,176	3309,301	6658,95	9112,82	4228,63	5105,674	16546,47	16333,98	7357,565	5376,24
PWY-1269	CMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate biosynthesis I	11738,92	6054,457	6336,601	2896,166	7842,835	8393,515	6401,275	7327,544	14710,36	13860,3	7682,408	5038,232
PWY-1361	benzoyl-CoA degradation I (aerobic)	0,0	128,7225	135,9254	0,0	132,61	46,00281	46,44283	69,23101	274,7671	195,7004	116,5382	71,28474
PWY-1422	vitamin E biosynthesis (tocopherols)	0,0	0,0	0,0	1,998136	11,68626	0,0	7,970997	5,993134	8,880811	2,998343	0,0	0,0
PWY-1501	mandelate degradation I	26,19464	0,0	32,79605	0,0	96,39191	60,24728	0,0	161,6155	390,4507	115,2097	51,85379	60,206
PWY-1541	superpathway of taurine degradation	44,80621	46,43754	48,50085	23,06383	15,44861	104,813	0,0	102,4733	97,42954	147,025	3,980633	94,51573

PWY-1622	formaldehyde assimilation I (serine pathway)	1635,52	1261,649	1646,466	1296,077	3328,298	2465,276	2593,469	1647,498	5613,735	5097,461	2994,11	1421,367
PWY-181	photorespiration	9434,212	5363,177	4951,46	2788,064	6216,925	6695,42	5264,988	7142,378	10863,18	14624,81	6961,773	4699,509
PWY-1861	formaldehyde assimilation II (RuMP Cycle)	1246,358	653,2024	906,8736	641,6337	1547,4	2160,506	1425,383	893,3196	2594,33	1546,69	1707,378	1120,696
PWY-1882	superpathway of C1 compounds oxidation to CO2	504,1294	380,9089	584,3038	441,29	816,4873	689,4025	669,0588	489,3761	1816,702	990,4598	796,8538	461,7747
PWY-2221	Entner-Doudoroff pathway III (semi-phosphorylative)	0,0	10,11578	0,0	0,0	35,88973	40,37746	0,0	13,48536	17,98725	7,872133	0,0	22,44492
PWY-2941	L-lysine biosynthesis II	677,6524	366,4245	663,6696	733,358	1937,182	2341,199	1017,953	482,5726	3491,487	2070,39	1689,306	1508,733
PWY-2942	L-lysine biosynthesis III	18385,02	11163,32	10178	5561,359	13461,89	14842,23	11116,7	12881,77	26167,55	24727,54	14656,11	9755,6
PWY-3001	superpathway of L-isoleucine biosynthesis I	18446,94	11608,13	10325,97	5690,014	13937,18	15037,1	11582,22	13277,45	27158,23	25676,68	15016,58	9910,171
PWY-3081	L-lysine biosynthesis V	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,41455	0,0	0,0
PWY-3661	glycine betaine degradation I	2409,617	1473,739	2032,927	563,3224	1655,292	1617,277	2175,348	1634,764	5027,924	1508,372	1792,325	1109,147
PWY-3781	aerobic respiration I (cytochrome c)	46384,52	28060,95	25327,19	13030,33	32824,42	34250,04	28537,53	33440,89	61224,79	55147,21	36447,04	23469,55
PWY-3801	sucrose degradation II (sucrose synthase)	74,62439	291,8744	1135,89	924,4385	2014,84	853,2737	2520,816	638,6933	3088,992	2080,83	1463,566	865,9141

PWY-3941	β-alanine biosynthesis II	73,63131	23,88313	19,03524	0,0	103,4121	82,12858	58,83287	0,0	96,20434	107,1434	70,97414	28,88397
PWY-4361	S-methyl-5-thio-α-D-ribose 1-phosphate degradation	182,2686	151,3951	223,147	205,7412	512,8508	715,3375	396,0707	262,4311	735,6772	505,6292	556,1124	369,1827
PWY-4722	creatinine degradation II	113,2398	56,75331	26,93933	41,69004	86,54025	83,56229	0,0	74,69765	86,78013	41,9173	0,0	68,59192
PWY-4984	urea cycle	4755,076	3545,713	3375,071	1701,342	5858,396	5729,718	4836,285	4661,257	10971,9	6243,452	5602,728	3958,881
PWY-5005	biotin biosynthesis II	33,55332	85,68294	85,0951	240,9584	443,5123	392,0445	57,85222	0,0	1007,84	831,5852	316,489	408,3613
PWY-5022	4-aminobutanoate degradation V	9482,644	7109,537	5145,153	2142,552	4614,988	6409,085	4078,73	7864,929	10413,81	13853,63	6280,494	5114,616
PWY-5028	L-histidine degradation II	1849,648	3828,646	2368,371	840,7587	2043,489	3186,11	1672,111	4407,897	4770,075	6947,448	2099,543	2234,652
PWY-5088	L-glutamate degradation VIII (to propanoate)	23,64907	12,86231	8,726141	54,33599	3,004857	4,488483	11,39981	8,283572	8,979832	34,78558	5,943971	14,40394
PWY-5097	L-lysine biosynthesis VI	17941,76	10911,79	9897,945	5332,704	12913,42	14101,19	10656,68	12468,25	24833	24122,65	14021,53	9359,317
PWY-5100	pyruvate fermentation to acetate and lactate II	1856,883	2824,593	2324,421	1891,788	3993,526	5117,781	2969,758	2567,676	8459,505	8011,112	3335,474	2458,733
PWY-5101	L-isoleucine biosynthesis II	24617,18	16395,45	15020,91	7720,474	19624,64	20343,9	16111	19361,77	39036,61	33800,8	20490,14	13762,24
PWY-5103	L-isoleucine biosynthesis III	19914,3	12460,04	11620,21	5908,378	14712,06	15391,97	12382,8	14585,79	28860,18	26336,38	15549,37	10405,03
PWY-5104	L-isoleucine biosynthesis IV	9308,443	7158,525	5467,77	3074,492	6719,064	8116,348	5028,264	7928,967	13649,92	12398,26	7996,087	4891,389

PWY-5121	superpathway of geranylgeranyl diphosphate biosynthesis II (via MEP)	14131,01	8567,275	7554,517	4069,534	9652,315	10344,52	8026,472	10263,01	18440,95	17491,21	10433,1	7271,318
PWY-5154	L-arginine biosynthesis III (via N-acetyl-L-citrulline)	15871,59	9232,373	8632,299	3870,401	10106,51	11116,1	8373,841	11051,57	19912,89	19362,08	10570,99	7427,557
PWY-5177	glutaryl-CoA degradation	37,97634	0,0	0,0	29,92428	99,69277	354,4916	7,99761	0,0	352,1721	81,89427	86,78884	85,69718
PWY-5178	toluene degradation IV (aerobic) (via catechol)	903,0519	894,9102	647,9701	182,5686	426,61	817,557	366,71	1162,473	1103,726	1859,367	705,4966	749,8944
PWY-5179	toluene degradation V (aerobic) (via toluene-cis-diol)	20,91721	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,99281	32,78167	0,0	0,0
PWY-5180	toluene degradation I (aerobic) (via o-cresol)	3633,177	1537,6	1083,782	808,3173	1360,686	2167,785	1204,081	2093,546	4061,958	5340,801	2030,805	1645,924
PWY-5181	toluene degradation III (aerobic) (via p-cresol)	2637,651	4251,098	2435,715	621,6275	1038,844	2660,972	795,4991	4840,26	4947,488	5175,991	2178,892	2333,433
PWY-5182	toluene degradation II (aerobic) (via 4-methylcatechol)	3633,177	1537,6	1083,782	808,3173	1360,686	2167,785	1204,081	2093,546	4061,958	5340,801	2030,805	1645,924
PWY-5183	superpathway of aerobic toluene degradation	17,82651	265,9634	222,4924	245,779	176,3618	270,9736	263,9077	450,6949	855,5439	865,5073	122,958	241,7325

PWY-5188	tetrapyrrole biosynthesis I (from glutamate)	16618,14	10166,5	9206,688	4789,089	11674,67	12464,05	9865,741	11908,7	22082,21	20606,99	12656,28	8456,292
PWY-5189	tetrapyrrole biosynthesis II (from glycine)	16063,92	9957,657	8930,512	4601,956	11260,64	12057,34	9484,081	11408,85	20932,75	20145,35	12126,98	8160,83
PWY-5198	factor 420 biosynthesis	0,0	0,0	0,0	50,66664	14,62054	0,0	15,90799	11,93502	10,66019	25,79767	4,015103	0,0
PWY-5265	peptidoglycan biosynthesis II (staphylococci)	679,7202	58,42319	0,0	94,20605	0,0	0,0	0,0	91,84459	0,0	19,83483	70,96247	149,3428
PWY-5266	p-cymene degradation	2938,806	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2353,426	0,0	0,0
PWY-5273	p-cumate degradation	2938,806	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2353,426	0,0	0,0
PWY-5304	superpathway of sulfur oxidation (Acidianus ambivalens)	418,0	547,5	442,83	333,09	687,25	1081,53	504,68	555,07	1336,17	813,58	1685,85	597,01
PWY-5345	superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)	15398,6	9230,063	8436,227	4299,236	10387,9	11584,19	8562,672	10837,14	20305,76	20802,15	11483,17	7671,137
PWY-5347	superpathway of L-methionine biosynthesis (transsulfuration)	14162,73	9739,861	7246,924	4105,202	9032,717	11414,42	7865,854	10667,04	19576,37	19850,31	11661,96	7951,184
PWY-5384	sucrose degradation IV (sucrose phosphorylase)	1622,027	3156,893	1864,147	578,7342	1168,931	3582,421	1018,15	3766,396	5679,183	8654,585	2345,406	1991,948
PWY-5392	reductive TCA cycle II	152,6132	80,04386	290,8969	106,9934	197,417	152,7504	362,1551	93,95018	787,8874	304,6748	441,0656	79,9985

PWY-5415	catechol degradation I (meta-cleavage pathway)	3339,045	1185,004	776,963	566,6928	966,9416	1637,57	883,3634	1855,04	2854,046	2642,671	1490,697	1107,245
PWY-5417	catechol degradation III (ortho-cleavage pathway)	1219,554	1986,893	1241,632	362,5225	660,0089	1478,485	467,2262	2743,584	2322,035	3726,914	1238,345	1269,643
PWY-5419	catechol degradation to 2-oxopent-4-enoate II	1378,668	628,5217	752,7515	523,7423	1458,239	1558,881	1200,909	1038,784	2504,434	1899,411	940,3422	1185,109
PWY-5420	catechol degradation II (meta-cleavage pathway)	1796,77	768,7663	741,9994	529,3275	1062,787	1576,281	946,4594	1239,554	2615,408	2240,397	1098,33	1118,77
PWY-5430	meta cleavage pathway of aromatic compounds	893,8475	502,6318	552,4478	265,9846	502,6479	834,4163	447,4564	847,1467	1318,287	1162,25	658,3129	716,234
PWY-5431	aromatic compounds degradation via β-ketoadipate	1219,554	1986,893	1241,632	362,5225	660,0089	1478,485	467,2262	2743,584	2322,035	3726,914	1238,345	1269,643
PWY-5484	glycolysis II (from fructose 6-phosphate)	14756,28	10464,85	8582,99	4811,094	10187,59	11651,84	8641,93	11603,24	21260,86	19729,42	12246,36	8536,4
PWY-5499	vitamin B6 degradation	35,5	3,225369	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,329114	0,0	1,75	0,0	0,0
PWY-5505	L-glutamate and L-glutamine biosynthesis	6110,004	5221,186	4300,625	2871,129	6637,976	7778,46	5035,47	6647,076	13873,7	10619,4	7010,24	4758,042

PWY-5507	adenosylcobalamin biosynthesis I (early cobalt insertion)	205,0064	264,6379	324,6783	535,1665	1598,852	1696,112	433,1437	25,66748	3839,715	1753,714	1068,215	1030,362
PWY-5509	adenosylcobalamin biosynthesis from cobyrinate a,c-diamide I	2275,607	3394,659	2828,127	1633,86	4224,151	4532,786	2830,218	4588,037	7551,033	9404,04	4291,828	3044,674
PWY-5529	superpathway of bacteriochlorophyll a biosynthesis	224,2582	44,99549	0,0	6,39361	197,6217	280,3097	148,9335	113,6278	17,18069	237,7271	256,8991	0,0
PWY-5531	chlorophyllide a biosynthesis II (anaerobic)	324,0856	99,2164	188,5687	160,7129	531,0646	451,7187	288,6277	149,1609	717,0657	932,9466	354,7519	182,5465
PWY-5532	adenosine nucleotides degradation IV	0,0	0,0	0,0	9,88102	2,00844	0,0	0,0	0,0	0,0	9,953009	2,008344	0,0
PWY-5647	2-nitrobenzoate degradation I	700,4766	251,6701	347,0683	184,3945	699,6152	660,9522	593,2688	412,668	965,0704	844,4923	384,9753	481,2903
PWY-5651	L-tryptophan degradation to 2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde	1369,684	764,0774	789,539	400,8374	1341,995	1445,723	1159,749	973,2484	1835,785	1592,475	1110,434	943,2097
PWY-5654	2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde degradation to 2-oxopentenoate	660,764	241,6569	330,6628	182,9288	688,9065	644,6181	584,2097	418,655	979,606	832,0971	366,3859	462,8533
PWY-5655	L-tryptophan degradation IX	1118,6777	451,8716	528,8096	294,8231	930,9378	1025,088	800,8819	713,025	1513,746	1321,15	668,0515	715,0986
PWY-5656	mannosylglycerate biosynthesis I	0,0	0,0	0,0	5,90793	3,978228	30,36004	61,29303	27,52871	9,979292	19,58783	10,80617	9,818665
PWY-5659	GDP-mannose biosynthesis	14148,49	11683,08	9346,244	5074,777	12454,89	12957,58	10709,48	13817,6	24202,7	21037,54	13217,87	8893,515

PWY-5667	CDP-diacylglycerol biosynthesis I	19270,66	13910,64	12166,21	6306,789	15213,84	16540,02	12707,33	16161,81	29661,79	28709,02	16047,62	11204,04
PWY-5676	acetyl-CoA fermentation to butanoate II	951,5377	1419,958	1407,22	956,4542	2520,918	1942,548	2011,427	1844,073	5331,948	3452,71	1934,323	1224,716
PWY-5677	succinate fermentation to butanoate	54,50272	63,20533	62,93041	94,93432	119,5703	115,6208	33,4247	0,0	375,5945	136,8996	118,1301	106,4086
PWY-5686	UMP biosynthesis	18891,62	10825,76	10198,11	5398,547	13181,87	13811,05	10998,73	12622,01	24963,22	22139,57	13839,22	9242,972
PWY-5695	urate biosynthesis/inosine 5'-phosphate degradation	16383,66	12822,1	10361,39	4500,846	11707,04	13401,17	10100,79	14818,43	25034,03	23037,92	13364,2	9825,821
PWY-5705	allantoin degradation to glyoxylate III	2680,181	2861,307	1631,087	766,9805	1325,92	1885,656	1297,035	2867,912	3663,612	2757,509	1923,672	1853,686
PWY-5741	ethylmalonyl-CoA pathway	705,3104	792,881	947,4064	756,9908	2029,538	1487,053	1577,848	984,1334	3548,02	2635,654	1681,511	1004,552
PWY-5743	3-hydroxypropanoate cycle	102,2458	0,0	5,162412	0,0	87,32087	116,0646	54,78391	56,41949	63,20111	87,70613	105,071	7,699646
PWY-5744	glyoxylate assimilation	101,2892	0,0	5,164756	0,0	99,98483	131,5952	62,96604	54,92693	63,92714	89,61253	108,2032	7,783641
PWY-5747	2-methylcitrate cycle II	8670,117	3830,325	3966,996	1087,542	1680,571	3014,455	1796,255	4052,325	4920	7598,611	3477,42	2472,919
PWY-5837	1,4-dihydroxy-2-naphthoate biosynthesis I	3522,502	1883,627	1092,613	892,0212	1865,077	3342,552	1634,371	2001,038	5440,285	4856,539	3414,122	2091,822
PWY-5838	superpathway of menaquinol-8 biosynthesis I	5724,652	3418,799	2188,494	1681,108	3468,382	5352,223	3017,058	3638,989	8841,818	7842,238	5487,283	3455,441
PWY-5840	superpathway of menaquinol-7 biosynthesis	5457,636	3309,429	2120,632	1652,841	3363,977	5148,839	2919,853	3512,048	8519,479	7490,455	5332,297	3364,115

PWY-5845	superpathway of menaquinol-9 biosynthesis	2991,184	2214,597	1797,242	1440,841	2769,949	4796,051	2531,789	2235,839	8077,215	6810,102	4582,257	2883,446
PWY-5850	superpathway of menaquinol-6 biosynthesis I	2991,184	2214,597	1797,242	1440,841	2769,949	4796,051	2531,789	2235,839	8077,215	6810,102	4582,257	2883,446
PWY-5855	ubiquinol-7 biosynthesis (prokaryotic)	11190,56	6469,341	6440,889	2878,466	7676,131	8433,304	6265,052	7439,731	15392,29	14995,16	7276,538	5199,47
PWY-5856	ubiquinol-9 biosynthesis (prokaryotic)	11190,56	6469,341	6440,889	2878,466	7676,131	8433,304	6265,052	7439,731	15392,29	14995,16	7276,538	5199,47
PWY-5857	ubiquinol-10 biosynthesis (prokaryotic)	11190,56	6469,341	6440,889	2878,466	7676,131	8433,304	6265,052	7439,731	15392,29	14995,16	7276,538	5199,47
PWY-5860	superpathway of demethylmenaquinol-6 biosynthesis I	2125,182	1597,313	1285,032	1075,421	2012,777	3699,51	1854,047	1598,221	6164,936	5160,298	3498,551	2181,33
PWY-5861	superpathway of demethylmenaquinol-8 biosynthesis	4327,151	2580,793	1589,873	1280,281	2578,794	4205,106	2251,912	2724,729	6842,356	6068,028	4313,275	2685,84
PWY-5862	superpathway of demethylmenaquinol-9 biosynthesis	2125,182	1597,313	1285,032	1075,421	2012,777	3699,51	1854,047	1598,221	6164,936	5160,298	3498,551	2181,33
PWY-5863	superpathway of phylloquinol biosynthesis	3835,305	2080,542	1212,67	979,9162	2056,272	3604,003	1799,856	2219,51	5867,782	5272,907	3701,559	2282,207
PWY-5896	superpathway of menaquinol-10 biosynthesis	2991,184	2214,597	1797,242	1440,841	2769,949	4796,051	2531,789	2235,839	8077,215	6810,102	4582,257	2883,446
PWY-5897	superpathway of menaquinol-11 biosynthesis	5459,869	3242,462	2044,769	1590,472	3268,085	5134,027	2846,531	3443,391	8459,226	7501,625	5275,177	3312,134

PWY-5898	superpathway of menaquinol-12 biosynthesis	5459,869	3242,462	2044,769	1590,472	3268,085	5134,027	2846,531	3443,391	8459,226	7501,625	5275,177	3312,134
PWY-5899	superpathway of menaquinol-13 biosynthesis	5459,869	3242,462	2044,769	1590,472	3268,085	5134,027	2846,531	3443,391	8459,226	7501,625	5275,177	3312,134
PWY-5910	superpathway of geranylgeranyldiphosphate biosynthesis I (via mevalonate)	218,1081	84,57896	79,28062	206,3784	192,6956	316,0033	174,3558	38,55297	254,0713	295,6744	221,472	237,3012
PWY-5913	TCA cycle VI (obligate autotrophs)	14834,59	9023,555	8030,017	3801,362	8794,499	10084,18	7380,605	10028,45	16899,14	16175,58	10466,94	7044,199
PWY-5918	superpathay of heme biosynthesis from glutamate	15106,92	8215,663	7818,267	3603,255	9233,484	10260,87	7793,367	9615,278	17337,79	16976,85	9738,709	6838,716
PWY-5920	superpathway of heme biosynthesis from glycine	8561,436	5893,53	4722,619	2764,103	6472,788	6805,002	5711,363	6828,877	12368,33	11206,31	7258,136	4999,689
PWY-5941	glycogen degradation II (eukaryotic)	980,2052	582,3148	583,4773	274,5932	782,1165	446,5115	619,125	304,2278	1599,397	885,3804	1002,805	486,2303
PWY-5971	palmitate biosynthesis II (bacteria and plants)	5776,221	2803,44	1719,034	3593,331	5012,626	11569,85	5477,015	1439,197	16034,17	8956,063	6678,578	3975,706
PWY-5973	cis-vaccenate biosynthesis	21792,94	14425,28	14082,39	7811,393	20530,36	21523,98	15817,35	16992,2	39563,46	34094,81	20550,53	13537,17
PWY-5989	stearate biosynthesis II (bacteria and plants)	18485,06	11855,22	11162,3	4683,429	12436,11	14980,04	9879,637	13121,97	25215,65	28369,8	14032,5	9843,783

PWY-6071	superpathway of phenylethylamine degradation	2808,436	3076,413	1519,021	691,8195	978,2583	1993,372	843,003	3393,902	4694,694	3271,769	2379,245	1921,653
PWY-6107	chlorosalicylate degradation	1741,049	1165,77	655,6707	240,1338	305,7668	397,9188	656,0085	1688,718	1345,112	743,0063	1049,06	751,5079
PWY-6121	5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis I	18035,61	10920,23	9982,035	5313,841	12884,1	13722,66	10815,38	12497,3	24293,36	22354,17	13705,11	9158,065
PWY-6122	5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis II	18157,05	10744,67	9902,654	5324,061	12923,11	13492,74	10828,54	12304,24	23967,21	21442,94	13588,31	9076,039
PWY-6123	inosine-5'-phosphate biosynthesis I	15971,87	9225,645	8606,334	4590,913	11081,69	11815,87	9242,298	10589,66	20813,62	19275,68	11865,5	7875,185
PWY-6125	superpathway of guanosine nucleotides de novo biosynthesis II	17997,58	10623,51	9743,581	5090,31	12240,44	13128,66	10490,73	12148,3	23686,4	21182,23	13434,89	8916,361
PWY-6126	superpathway of adenosine nucleotides de novo biosynthesis II	19032,94	11382,39	10425,69	5487,79	13242,53	14187,12	11188,19	12980,81	25381,08	23216,27	14456,3	9539,748
PWY-6141	archaetidylserine and archaetidylethanolamine biosynthesis	0,0	0,0	0,0	10,08822	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PWY-6145	superpathway of sialic acids and CMP-sialic acids biosynthesis	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,824047	0,0	0,0

PWY-6147	6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis I	17302,2	9175,61	8743,421	4163,112	9909,332	10994,27	8280,324	10515,32	18805,14	18920,92	11355,2	7641,153
PWY-6148	tetrahydromethanopterin biosynthesis	0,0	0,0	0,0	26,81376	3,209468	0,0	0,0	0,0	0,0	15,90896	3,207564	0,0
PWY-6151	S-adenosyl-L-methionine cycle I	6511,711	3958,446	3060,719	1982,249	4363,656	6306,993	3392,785	4461,95	11001,76	9131,087	5745,331	3849,188
PWY-6163	chorismate biosynthesis from 3-dehydroquinate	17046,79	10613,2	9559,709	5098,797	11898,77	12832,23	9892,463	12339,06	23405,66	21287,65	12970,74	8817,197
PWY-6165	chorismate biosynthesis II (archaea)	0,0	0,0	0,0	19,43559	2,623262	0,0	0,0	0,0	0,0	10,65267	3,717025	0,0
PWY-6167	flavin biosynthesis II (archaea)	0,0	0,0	0,0	26,1506	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PWY-6174	mevalonate pathway II (archaea)	6,554847	22,06113	40,03199	20,75776	39,00981	27,44432	9,707693	20,42192	74,12045	67,0118	20,12324	47,12738
PWY-6182	superpathway of salicylate degradation	1254,732	2029,236	1308,162	403,5087	739,6628	1553,747	523,8669	2735,527	2543,251	3673,1	1334,257	1320,299
PWY-6185	4-methylcatechol degradation (ortho cleavage)	1188,703	1927,735	1133,633	320,8128	542,6195	1334,764	414,142	2648,713	1844,826	3603,681	1040,064	1197,341
PWY-621	sucrose degradation III (sucrose invertase)	3113,614	5429,545	2870,039	2085,369	2104,729	5011,525	2062,531	3811,676	9393,275	9124,542	4597,138	3557,586

PWY-6210	2-aminophenol degradation	431,2001	186,9419	271,1336	135,5942	369,0559	420,9795	377,1694	253,4293	750,4006	484,5433	250,6417	367,8913
PWY-622	starch biosynthesis	479,4568	263,1471	338,5408	149,931	330,0695	521,4375	468,8993	186,4673	874,1229	1125,708	555,9528	558,2728
PWY-6263	superpathway of menaquinol-8 biosynthesis II	4382,442	3150,014	2571,451	1825,893	4915,714	4738,549	4145,625	4348,201	8316,56	6723,838	4801,13	2782,078
PWY-6269	adenosylcobalamin salvage from cobinamide II	2281,194	3408,031	2834,348	1636,26	4231,073	4550,003	2835,344	4612,464	7554,717	9425,169	4305,678	3056,367
PWY-6277	superpathway of 5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis	18157,05	10744,67	9902,654	5324,061	12923,11	13492,74	10828,54	12304,24	23967,21	21442,94	13588,31	9076,039
PWY-6282	palmitoleate biosynthesis I (from (5Z)-dodec-5-enoate)	17659,75	11448,61	10925,48	4653,446	12462,11	14935,42	9772,948	12655,33	25158,35	27942,23	13819,51	9668,292
PWY-6317	galactose degradation I (Leloir pathway)	7419,163	5832,656	4038,551	2844,912	6143,141	7434,064	5614,761	6557,615	14024,08	11640,87	7871,689	5028,468
PWY-6338	superpathway of vanillin and vanillate degradation	575,1341	247,1179	229,6799	197,6017	423,1144	640,7833	290,6996	400,8968	829,2367	614,6886	414,192	502,0017
PWY-6339	syringate degradation	1056,461	571,9154	433,6121	373,3823	795,9701	1102,869	0,0	786,5837	1441,466	1162,915	859,802	925,2664
PWY-6349	CDP-archaeol biosynthesis	0,0	0,0	0,0	15,16749	2,625684	0,0	0,0	0,0	0,0	12,19157	2,619771	0,0
PWY-6350	archaetidylinositol biosynthesis	0,0	0,0	0,0	13,02864	1,657853	0,0	0,0	0,0	0,0	7,956769	1,655964	0,0

PWY-6353	purine nucleotides degradation II (aerobic)	10689,68	8861,493	6436,053	3623,348	7739,971	10242,96	6727,804	9779,299	18508,48	17664,2	10700,83	7369,615
PWY-6383	mono-trans, poly-cis decaprenyl phosphate biosynthesis	4352,692	2650,232	1387,924	962,6529	972,5226	1389,668	1268,085	2797,079	2568,23	2672,337	2594,323	1873,359
PWY-6385	peptidoglycan biosynthesis III (mycobacteria)	15903,04	9021,611	8433,722	4485,701	10550,9	11428,75	8850,12	10341,67	20357,99	18577,44	11713,92	7669,001
PWY-6386	UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis II (lysine-containing)	15968,37	9046,902	8421,418	4470,718	10489,44	11386,08	8841,054	10330,46	20200,5	18156,17	11642,38	7667,72
PWY-6387	UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)	16127,02	9222,264	8595,178	4611,566	11071,47	11779,23	9345,239	10591,64	20973,04	18614,39	11903,5	7907,096
PWY-6396	superpathway of 2,3-butanediol biosynthesis	1050,533	988,5389	801,9457	482,2875	823,6016	1300,174	679,3381	881,4942	3117,9	1400,011	1226,037	905,6823
PWY-6397	mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex biosynthesis	8,097772	25,59899	59,58543	9,756959	14,69294	43,50843	39,44532	28,0329	102,1688	56,48987	19,87028	7,443151

PWY-6404	superpathway of mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex biosynthesis	29,64758	0,0	0,0	35,5441	0,0	124,6503	134,5517	0,0	0,0	195,7044	0,0	0,0
PWY-6467	Kdo transfer to lipid IVA III (Chlamydia)	11727,71	6204,73	6443,69	2968,65	8119,84	8376,3	6673,96	7772,39	14883,84	14158,12	7822,15	5076,9
PWY-6470	peptidoglycan biosynthesis V (β-lactam resistance)	861,2699	83,18945	45,11781	356,5391	125,6774	187,2112	134,6442	478,8475	504,7425	383,2322	221,6078	287,1834
PWY-6471	peptidoglycan biosynthesis IV (Enterococcus faecium)	9585,374	1863,353	167,2013	873,0008	1604,481	1352,961	1727,023	4467,061	4241,079	2798,412	2422,181	2018,509
PWY-6478	GDP-D-glycero-α-D-manno-heptose biosynthesis	815,5188	1704,576	1279,502	654,9218	2458,644	2277,652	2581,633	2519,462	4162,653	2357,061	1768,534	1178,717
PWY-6505	L-tryptophan degradation XII (Geobacillus)	854,6025	397,3262	476,5386	253,7743	683,741	802,2307	651,3815	549,2365	1389,698	965,3934	524,8168	633,4713
PWY-6507	4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranuronate degradation	3359,226	2239,04	1679,098	1225,128	2880,927	3411,088	2277,727	2605,857	6895,041	3001,243	3713,277	2289,958
PWY-6519	8-amino-7-oxononanoate biosynthesis I	6312,693	6999,159	5753,434	2914,759	6843,662	9086,96	6064,867	8126,498	15158,21	18248,65	7441,409	5409,139
PWY-6545	pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis III	2151,454	2557,718	2547,4	1802,282	4673,81	4566,868	3208,033	2707,558	9487,678	7086,11	3778,288	2913,446

PWY-6562	norspermidine biosynthesis	1726,458	1193,753	1603,111	340,8033	561,3642	1242,494	525,59	1644,312	2437,883	1146,309	1201,239	951,9745
PWY-6572	chondroitin sulfate degradation I (bacterial)	34,25389	52,749	37,11132	2,968967	74,09923	62,9725	28,98079	61,74278	64,30899	46,32411	81,03838	27,44147
PWY-6588	pyruvate fermentation to acetone	362,5151	537,4782	486,6167	363,3544	1563,812	1403,902	1045,712	910,8419	4068,659	1432,821	987,3716	873,048
PWY-6590	superpathway of Clostridium acetobutylicum acidogenic fermentation	566,427	284,3203	486,1609	767,424	1792,548	2213,91	920,3305	303,9224	4179,97	2708,688	1244,053	1435,723
PWY-6608	guanosine nucleotides degradation III	11386,64	8555,086	6540,956	3898,282	9925,94	11507,92	8186,649	9620,508	21574,21	18822,62	11725,18	7643,978
PWY-6609	adenine and adenosine salvage III	9622,588	6644,07	5203,845	3860,885	8623,144	9801,248	6990,767	7159,575	18337,59	15708,51	10192,09	6283,81
PWY-6612	superpathway of tetrahydrofolate biosynthesis	16530,56	8972,02	8268,549	4156,83	9380,797	10901,52	7823,6	10276,15	18719,33	18829,44	11131,05	7470,815
PWY-6628	superpathway of L-phenylalanine biosynthesis	15519,88	9594,563	8680,735	3389,972	7995,396	10940,14	6115,209	11086,21	18872,11	20294,24	9625,582	7447,259
PWY-6629	superpathway of L-tryptophan biosynthesis	0,0	246,8515	0,0	22,23354	270,4618	761,9761	0,0	0,0	4326,782	459,4153	247,7783	165,2072
PWY-6630	superpathway of L-tyrosine biosynthesis	14156,55	9086,221	8133,546	3338,939	7911,028	10697,58	6060,541	10498,35	18533,94	19414,46	9460,796	7198,718
PWY-6641	superpathway of sulfolactate degradation	94,56639	93,91461	75,9672	37,56013	222,8233	270,2344	74,57184	115,461	189,9046	308,3241	314,4678	249,2799

PWY-6654	phosphopantothenate biosynthesis III	0,0	0,0	0,0	16,61829	1,339885	0,0	0,0	0,0	0,0	6,658669	1,339894	0,0
PWY-6690	cinnamate and 3-hydroxycinnamate degradation to 2-oxopent-4-enoate	43,7656	99,84527	43,89758	31,20502	55,17413	175,2368	40,70784	66,79688	786,1771	223,8635	55,52223	73,94291
PWY-6700	queuosine biosynthesis	13115,39	7338,196	7544,111	3728,94	10031,95	10453,14	7971,866	8729,17	18159,16	16818,69	9637,676	6463,442
PWY-6703	preQ0 biosynthesis	12160,65	7144,313	7249,885	3479,637	8904,678	9415,216	7445,364	8891,155	16620,04	16441,79	8325,037	5999,858
PWY-6708	ubiquinol-8 biosynthesis (prokaryotic)	11190,56	6469,341	6440,889	2878,466	7676,131	8433,304	6265,052	7439,731	15392,29	14995,16	7276,538	5199,47
PWY-6728	methylaspartate cycle	793,159	399,1488	543,3174	454,1684	1398,208	2330,123	320,2429	327,7201	5112,02	1915,938	1378,322	778,4369
PWY-6731	starch degradation III	19,88842	69,27363	0,0	31,7359	60,33775	12,47986	75,08323	7,49287	232,248	34,92994	27,3552	18,66985
PWY-6737	starch degradation V	4509,492	6458,262	4462,43	2887,291	6784,557	7804,43	5758,967	7439,391	14044,7	15606	7504,363	4867,509
PWY-6749	CMP-legionaminate biosynthesis I	652,7553	199,7419	238,6193	319,8189	882,6396	903,123	599,4515	239,9021	813,5333	858,5312	349,4587	462,7519
PWY-6876	isopropanol biosynthesis	362,5151	537,4782	486,6167	210,0147	680,3876	642,0296	629,1161	910,8419	2485,217	692,7595	726,2395	433,63
PWY-6891	thiazole biosynthesis II (Bacillus)	294,7038	401,6006	353,0277	546,0328	973,1306	3029,158	544,5991	237,2118	5565,617	5486,656	1421,652	1050,898
PWY-6892	thiazole biosynthesis I (E. coli)	2894,663	2119,213	1510,694	1835,136	3995,978	6175,65	1971,358	2604,272	9795,147	9144,729	5700,83	3202,561
PWY-6895	superpathway of thiamin diphosphate biosynthesis II	1369,405	1716,025	1516,713	1825,205	3573,71	7342,658	2195,253	1091,905	13322,27	12724,17	4811,129	3389,96

PWY-6897	thiamin salvage II	15352,36	9164,465	8383,574	4257,606	10327,15	11077,34	8847,999	10785,31	19904,2	18127,75	11601,36	7414,269
PWY-6901	superpathway of glucose and xylose degradation	6928,065	7156,076	5796,029	3340,583	7032,112	8482,816	5689,536	7572,823	16191,43	14106,04	8595,804	5992,497
PWY-6906	chitin derivatives degradation	0,0	27,18226	0,0	0,0	7,474185	0,0	12,39814	9,918532	0,0	42,12855	0,0	0,0
PWY-6919	neopentalenoketolactone and pentalenate biosynthesis	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,039216	0,0	0,0	0,0	8,0	0,0	13,33333
PWY-6944	androstenedione degradation	116,617	97,12937	44,34821	0,0	129,6215	0,0	89,92601	166,1873	375,489	198,6847	89,16269	106,9007
PWY-6948	sitosterol degradation to androstenedione	9,897406	0,0	0,0	11,57133	0,0	15,79794	30,79111	0,0	0,0	46,24498	0,0	0,0
PWY-6957	mandelate degradation to acetyl-CoA	25,71339	0,0	101,6702	0,0	168,3475	165,512	0,0	367,1234	727,6403	369,3313	109,9459	157,7375
PWY-6969	TCA cycle V (2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase)	19922,37	11110,29	10542,87	5510,119	13794,77	14621,93	11656,48	12708,06	26519,75	23323,29	14789,23	9680,93
PWY-6992	1,5-anhydrofructose degradation	633,1459	255,1377	432,2672	214,821	436,07	324,937	438,2042	257,1524	1228,481	459,9621	562,2318	235,4293
PWY-7002	4-hydroxyacetophenone degradation	0,0	0,0	0,0	4,910952	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PWY-7003	glycerol degradation to butanol	611,368	646,2642	467,7118	770,9574	2021,109	2781,088	640,6864	461,9376	7155,881	3334,835	2064,129	1615,65
PWY-7007	methyl ketone biosynthesis	5293,88	3435,097	1816,634	1230,495	1188,496	1680,015	1501,086	3567,02	3180,917	3364,614	3185,686	2282,246

PWY-7013	L-1,2-propanediol degradation	53,95105	125,6302	0,0	2,759634	197,1608	398,993	27,979	0,0	2582,354	330,9183	125,6891	83,80613
PWY-7024	superpathway of the 3-hydroxypropanoate cycle	137,3892	0,0	7,458408	0,0	120,0792	157,994	76,01168	77,63802	90,04794	123,1121	142,5768	11,13387
PWY-7046	4-coumarate degradation (anaerobic)	21,49063	0,0	9,667885	27,48822	35,02946	16,91754	46,74059	0,0	70,52568	33,88412	85,40906	15,14977
PWY-7084	nitrifier denitrification	41,14407	89,00173	50,51081	1,994764	76,24581	21,78885	229,4826	75,14348	158,4348	65,65981	68,39495	13,87916
PWY-7090	UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-α-D-mannuronate biosynthesis	321,4011	176,6961	240,1362	303,7805	769,9898	556,354	505,5899	216,7666	999,3219	877,5268	532,8398	279,0718
PWY-7094	fatty acid salvage	15110,25	12133,36	11161,08	4552,427	12048,17	14346,49	10686,86	14908,89	27322,68	26239,8	14555,81	9969,509
PWY-7097	vanillin and vanillate degradation I	575,1341	247,1179	229,6799	197,6017	423,1144	640,7833	290,6996	400,8968	829,2367	614,6886	414,192	502,0017
PWY-7098	vanillin and vanillate degradation II	627,9298	275,5693	255,3157	213,5193	461,8426	701,7317	315,4499	446,1201	916,9719	685,8636	454,5315	549,6931
PWY-7111	pyruvate fermentation to isobutanol (engineered)	25001,85	18079,38	16203,84	8249,252	20162,28	21461,79	16253,29	20601,58	41954,03	38621,09	21226,75	14711,57
PWY-7159	chlorophyllide a biosynthesis III (aerobic, light independent)	324,0856	99,2164	188,5687	160,7129	531,0646	451,7187	288,6277	149,1609	717,0657	932,9466	354,7519	182,5465

PWY-7184	pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis I	17545,31	9780,875	9081,129	4604,885	10704,85	11820,63	9104,812	11140,51	20598,7	19376,6	11633,69	8019,55
PWY-7187	pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II	4451,03	5006,721	3979,636	2889,676	5470,588	7637,565	3313,919	3876,158	13418,44	14509,29	6247,827	4687,609
PWY-7196	superpathway of pyrimidine ribonucleosides salvage	11257,39	5665,248	4281,813	3203,572	7834,444	9251,927	6287,462	6642,922	15931,4	13509,13	9194,562	5712,703
PWY-7197	pyrimidine deoxyribonucleotide phosphorylation	15940,22	9329,81	8569,489	4486,393	10631,37	11286,58	9220,322	10648,34	20307,29	18641,36	11531,45	7691,778
PWY-7198	pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis IV	0,0	34,91406	10,49147	16,86186	23,30958	20,97405	73,089554	0,0	111,5776	65,748441	23,31303	0,0
PWY-7199	pyrimidine deoxyribonucleosides salvage	7929,277	5952,455	4321,505	2916,747	6842,659	8157,645	5676,792	6506,065	13561,97	11119,6	8066,731	5250,417
PWY-7200	superpathway of pyrimidine deoxyribonucleoside salvage	11213,55	7378,528	5878,504	3525,786	8323,644	9509,825	7093,667	8227,129	16254,75	14057,31	9594,343	6335,155
PWY-7208	superpathway of pyrimidine nucleobases salvage	20123,47	12201,4	10903,59	5527,34	13198,36	14798,84	11117,14	13913,97	25494	24062,77	14817,5	9985,904
PWY-7209	superpathway of pyrimidine ribonucleosides degradation	0,0	0,0	0,0	17,40575	14,9712	0,0	0,0	0,0	59,77628	44,858561	0,0	0,0

PWY-7210	pyrimidine deoxyribonucleotides biosynthesis from CTP	0,0	49,81654	14,98183	24,05921	33,27674	29,94506	104,1684	0,0	159,1365	93,82157	33,28267	0,0
PWY-7211	superpathway of pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis	18135,43	10169,55	9405,889	4711,525	11160,66	12264,58	9477,792	11694,18	21542,82	19916,99	12316,93	8321,281
PWY-7219	adenosine ribonucleotides de novo biosynthesis	19061,6	12021,53	10782,61	5753,925	13692,99	14658,87	11374,44	13493,76	26170,75	24606,04	15261,07	9977,057
PWY-722	nicotinate degradation I	138,9805	156,8677	121,0385	48,98884	105,2163	331,265	98,64501	207,336	764,0906	64,87956	107,5082	73,81299
PWY-7220	adenosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II	19206,69	10946,17	10201,71	5205,627	12797,2	13802,32	11012,9	12677,36	24611,2	22269,79	13965,86	9214,792
PWY-7221	guanosine ribonucleotides de novo biosynthesis	17215,88	10432,88	9469,127	5119,163	12046,21	12834,81	10174,01	11813,81	23379,2	20643,1	13175,1	8807,544
PWY-7222	guanosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II	19206,69	10946,17	10201,71	5205,627	12797,2	13802,32	11012,9	12677,36	24611,2	22269,79	13965,86	9214,792
PWY-7228	superpathway of guanosine nucleotides de novo biosynthesis I	18424,62	10960,79	10007,11	5261,357	12577,93	13517,82	10741,81	12515,21	24453,17	21774,49	13822,19	9209,102

PWY-7229	superpathway of adenosine nucleotides de novo biosynthesis I	19704,86	11917,18	10858,34	5764,866	13832,83	14848,56	11606,12	13560,49	26591,66	24331,01	15103,04	9996,207
PWY-7234	inosine-5'-phosphate biosynthesis III	15829,47	8996,226	8352,776	4247,609	10230,02	11032,56	8446,411	10348,23	19392,51	17985,76	11232,59	7501,092
PWY-7237	myo-, chiro- and scillo-inositol degradation	2846,45	5661,04	3326,68	1732,66	2158,0	3698,1	1967,45	4861,74	7229,65	8381,2	4334,11	3227,23
PWY-7242	D-fructuronate degradation	4934,209	4955,223	3316,042	2337,672	4718,911	5902,292	3750,415	5057,98	12455,33	6933,475	5923,316	4100,152
PWY-7254	TCA cycle VII (acetate-producers)	12416,08	9656,773	6439,181	2600,402	5019,554	8287,264	4407,955	11237,21	12726,65	15366,4	9289,674	6624,124
PWY-7255	ergothioneine biosynthesis I (bacteria)	261,1225	314,1545	542,7003	272,0714	673,1772	682,9068	636,9094	480,4506	1696,284	1270,868	835,4633	513,6531
PWY-7274	D-cycloserine biosynthesis	0,0	0,0	3,428415	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PWY-7286	7-(3-amino-3-carboxypropyl)-wyosine biosynthesis	0,0	0,0	0,0	11,09992	########	0,0	0,0	0,0	0,0	4,439738	########	0,0
PWY-7295	L-arabinose degradation IV	110,2666	162,6812	166,2129	0,0	81,30484	64,96474	170,2597	199,2831	218,5491	204,8684	292,4852	108,2086
PWY-7315	dTDP-N-acetylthomosamine biosynthesis	664,8552	1309,554	784,4605	402,4607	1066,885	2085,448	692,0766	1099,779	4593,556	1455,167	840,8049	1112,23
PWY-7323	superpathway of GDP-mannose-derived O-antigen building blocks biosynthesis	8868,275	8176,539	6301,788	3746,062	9827,461	9709,385	8235,809	9541,036	18865,95	15725,64	9994,063	6621,138

PWY-7328	superpathway of UDP-glucose-derived O-antigen building blocks biosynthesis	5500,776	5882,729	4214,018	2295,317	5065,946	5921,541	4044,372	5744,24	10728,15	12451,32	6737,46	4650,142
PWY-7332	superpathway of UDP-N-acetylglucosamine-derived O-antigen building blocks biosynthesis	1386,978	603,4018	1013,966	1091,528	2607,768	1932,852	1879,048	724,6285	4086,467	3517,14	2216,748	1000,535
PWY-7347	sucrose biosynthesis III	350,9807	452,8264	592,6298	456,8827	966,433	1042,33	776,0996	618,1571	2457,968	2496,749	1056,73	633,3098
PWY-7371	1,4-dihydroxy-6-naphthoate biosynthesis II	1975,632	1490,229	1168,288	912,8168	2724,139	2459,749	2308,944	2297,14	4261,048	3340,145	2432,156	1325,69
PWY-7373	superpathway of demethylmenaquinol-6 biosynthesis II	107,4322	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,95341	51,1319	0,0	0,0	0,0	80,18921
PWY-7374	1,4-dihydroxy-6-naphthoate biosynthesis I	1727,985	765,7652	539,6197	480,0005	1254,869	1479,902	1049,869	1424,571	1604,853	1262,323	1551,307	781,6584
PWY-7376	cob(II)yrinate a,c-diamide biosynthesis II (late cobalt incorporation)	2049,507	3075,405	2552,834	1211,962	3210,832	3436,268	2148,05	4045,425	6130,823	6940,438	3118,854	2573,43
PWY-7377	cob(II)yrinate a,c-diamide biosynthesis I (early cobalt insertion)	199,7291	296,8557	420,3902	502,5695	1507,507	1777,726	504,562	61,69882	3843,45	2220,029	1012,809	1046,167

PWY-7385	1,3-propanediol biosynthesis (engineered)	39,54462	115,3307	0,0	0,0	83,56666	100,3243	0,0	0,0	110,3708	52,3406	65,38373	65,07118
PWY-7391	isoprene biosynthesis II (engineered)	7,807992	30,61363	16,12601	29,53236	95,72557	33,29852	11,43097	19,05527	90,35768	138,2835	94,14022	88,12608
PWY-7392	taxadiene biosynthesis (engineered)	11592,15	6347,198	5004,685	2726,765	6726,019	8055,846	5477,831	7553,928	13743,9	10518,06	8196,903	5549,945
PWY-7398	coumarins biosynthesis (engineered)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,488276	35,81191	0,0	33,01926	11,42527	18,28268	0,0
PWY-7400	L-arginine biosynthesis IV (archaebacteria)	15489,08	9442,046	8479,957	4345,42	10251,14	11407,47	8600,979	11073,72	21098,56	19506,55	11061,81	7711,898
PWY-7431	aromatic biogenic amine degradation (bacteria)	3333,651	4515,863	3472,126	1189,64	3268,387	4310,682	3139,54	4911,871	7308,394	7473,382	3420,996	2908,895
PWY-7446	sulfoglycolysis	586,8118	1660,815	814,4902	535,6136	354,328	636,8903	483,9178	1167,913	1126,357	1103,055	1171,368	913,7172
PWY-7456	mannan degradation	736,1075	472,7166	270,7039	202,7022	714,3248	467,5616	474,3098	204,5287	1093,882	850,0288	902,8071	279,1239
PWY-7527	L-methionine salvage cycle III	288,1441	244,7044	352,5993	320,4584	802,4419	1091,522	621,4247	417,6062	1168,299	806,1035	862,6074	569,064
PWY-7528	L-methionine salvage cycle I (bacteria and plants)	0,0	0,0	0,0	0,0	31,95531	16,31815	41,66758	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PWY-7539	6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis III (Chlamydia)	18627,65	9650,821	9264,046	4342,061	10231,51	11441,58	8526,772	10883,95	19459,89	19537	11856,43	8004,533

PWY-7560	methylerythritol phosphate pathway II	14742,86	8363,745	8108,532	4232,097	10046,2	10693,47	8283,66	10010,53	19821,31	18202,25	10285,42	7204,375
PWY-7616	methanol oxidation to carbon dioxide	2782,505	3563,754	1743,291	856,2692	897,2555	1524,004	1036,036	3548,462	2299,878	3267,019	2500,125	2182,751
PWY-7644	heparin degradation	90,42781	37,03628	16,83925	42,49653	30,71088	21,34112	76,29211	97,74322	73,39864	72,94237	278,2286	102,0003
PWY-7663	gondoate biosynthesis (anaerobic)	21738,32	13665,58	13815,12	7689,089	20664,93	21339,41	15754,11	16272,22	39495,98	33052,07	20346,46	13239,36
PWY-7664	oleate biosynthesis IV (anaerobic)	17990,65	11708,73	11225,36	4930,421	13183,94	15577,31	10280,12	13062,45	26460,44	28834,05	14428,43	10023,11
PWY-841	superpathway of purine nucleotides de novo biosynthesis I	18037,91	10739,1	9855,175	5209,054	12554,83	13412,94	10587,98	12274,81	24000,76	21860,6	13612,91	9028,191
PWY-922	mevalonate pathway I	153,3613	59,36499	55,67407	146,6819	135,6857	223,1999	122,8278	27,01482	178,6062	208,0083	155,9381	167,631
PWY0-1061	superpathway of L-alanine biosynthesis	19214,51	8764,184	8857,206	3006,061	3755,882	8829,469	4097,48	8962,221	15205,99	16196,15	8087,278	6421,849
PWY0-1241	ADP-L-glycero-β-D-manno-heptose biosynthesis	2202,041	3879,753	2665,269	1434,546	3840,926	5106,241	3455,024	4936,194	8265,435	9091,888	3486,822	2627,777
PWY0-1261	anhydromuropeptides recycling	11036,46	7822,627	6644,237	4030,747	10401,09	11921,38	8228,711	9774,243	21656,78	15929,79	11265,96	7385,868
PWY0-1277	3-phenylpropanoate and 3-(3-hydroxyphenyl)propanoate degradation	167,7604	313,5569	148,6965	106,2894	186,9164	527,6032	141,5536	238,5596	1701,218	729,19	198,705	244,4726

PWY0-1296	purine ribonucleosides degradation	3088,063	3283,21	2707,629	2036,991	4838,47	6206,453	3673,84	3841,425	11837,15	9383,287	5621,092	3562,905
PWY0-1297	superpathway of purine deoxyribonucleosides degradation	4853,552	3034,725	2491,92	1864,453	4458,177	5790,577	3371,607	3602,964	10929,88	10996,17	5132,141	3281,632
PWY0-1298	superpathway of pyrimidine deoxyribonucleosides degradation	3819,047	2371,404	1978,292	1598,677	4226,321	5262,94	2990,357	2860,334	9622,154	9530,692	4291,921	2713,059
PWY0-1319	CDP-diacylglycerol biosynthesis II	19270,66	13910,64	12166,21	6306,789	15213,84	16540,02	12707,33	16161,81	29661,79	28709,02	16047,62	11204,04
PWY0-1338	polymyxin resistance	265,1194	806,8374	353,4786	107,7396	136,8807	1041,109	73,81823	1516,374	2458,545	509,1924	438,3121	488,6987
PWY0-1415	superpathway of heme biosynthesis from uroporphyrinogen-III	7611,768	5350,397	4212,486	2514,364	5782,405	6137,671	5191,703	6196,629	11269,7	11089,9	6580,221	4575,95
PWY0-1479	tRNA processing	3095,675	3563,497	2130,536	1653,052	3366,072	6566,818	3443,584	3105,351	12380,95	9677,707	4615,413	3274,538
PWY0-1533	methylphosphonate degradation I	2325,094	2165,901	1993,595	1092,526	3502,582	3187,423	2392,988	2610,545	9412,181	2883,103	2756,508	1730,494
PWY0-1586	peptidoglycan maturation (meso-diaminopimelate containing)	16256,47	8999,312	8306,964	3187,671	7034,366	8887,782	6858,008	9926,737	15202,27	16541,12	8766,735	6500,233

PWY0-162	superpathway of pyrimidine ribonucleotides de novo biosynthesis	18980,09	10958,24	10261,18	5318,505	13032,36	13797,55	11023,56	12676,22	24742,7	22294,33	13902,61	9228,46
PWY0-166	superpathway of pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis (E. coli)	16381,67	9196,937	8465,685	4295,486	9884,799	10895,88	8500,006	10404,18	19061,88	18003,17	10763,49	7450,67
PWY0-321	phenylacetate degradation I (aerobic)	3005,057	3971,888	2264,393	706,6925	1190,114	3147,468	907,0625	4390,786	5748,468	4385,324	2644,573	2436,641
PWY0-41	allantoin degradation IV (anaerobic)	110,4651	235,5621	255,0188	77,91745	244,2516	148,8347	211,4012	142,5848	939,6377	188,141	266,6043	92,35974
PWY0-42	2-methylcitrate cycle I	6615,805	3731,936	3421,166	1105,164	1671,977	2824,124	1751,904	4042,263	4840,069	7121,59	3334,037	2395,994
PWY0-781	aspartate superpathway	14388,93	8883,346	7955,492	4096,274	9421,826	10884,41	8073,687	10181,63	19619,89	19011,06	10899,58	7513,16
PWY0-845	superpathway of pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis and salvage	9240,657	5494,65	4323,43	1893,621	2995,397	6033,699	1693,401	6298,128	11074,24	10215,38	4873,272	4064,942
PWY0-862	(5Z)-dodec-5-enoate biosynthesis	16992,83	11107,69	10603,45	4565,716	12204,36	14585,51	9513,111	12311,96	24584,01	27608,48	13454,29	9397,287
PWY1G-0	mycothiol biosynthesis	3140,125	2211,221	1190,87	731,2722	941,0976	1147,294	1202,589	2289,334	2455,111	2259,269	2176,057	1602,015
PWY490-3	nitrate reduction VI (assimilatory)	389,924	520,5138	467,5728	409,6339	1228,432	1364,514	997,7432	959,7704	2451,518	1403,816	731,8256	699,2613
PWY4FS-7	phosphatidylglycerol biosynthesis I (plastidic)	17156,24	11635,2	10338,51	5394,115	12915,64	13919,7	11093,27	13322,06	24583,35	22550,06	13753,2	9536,721

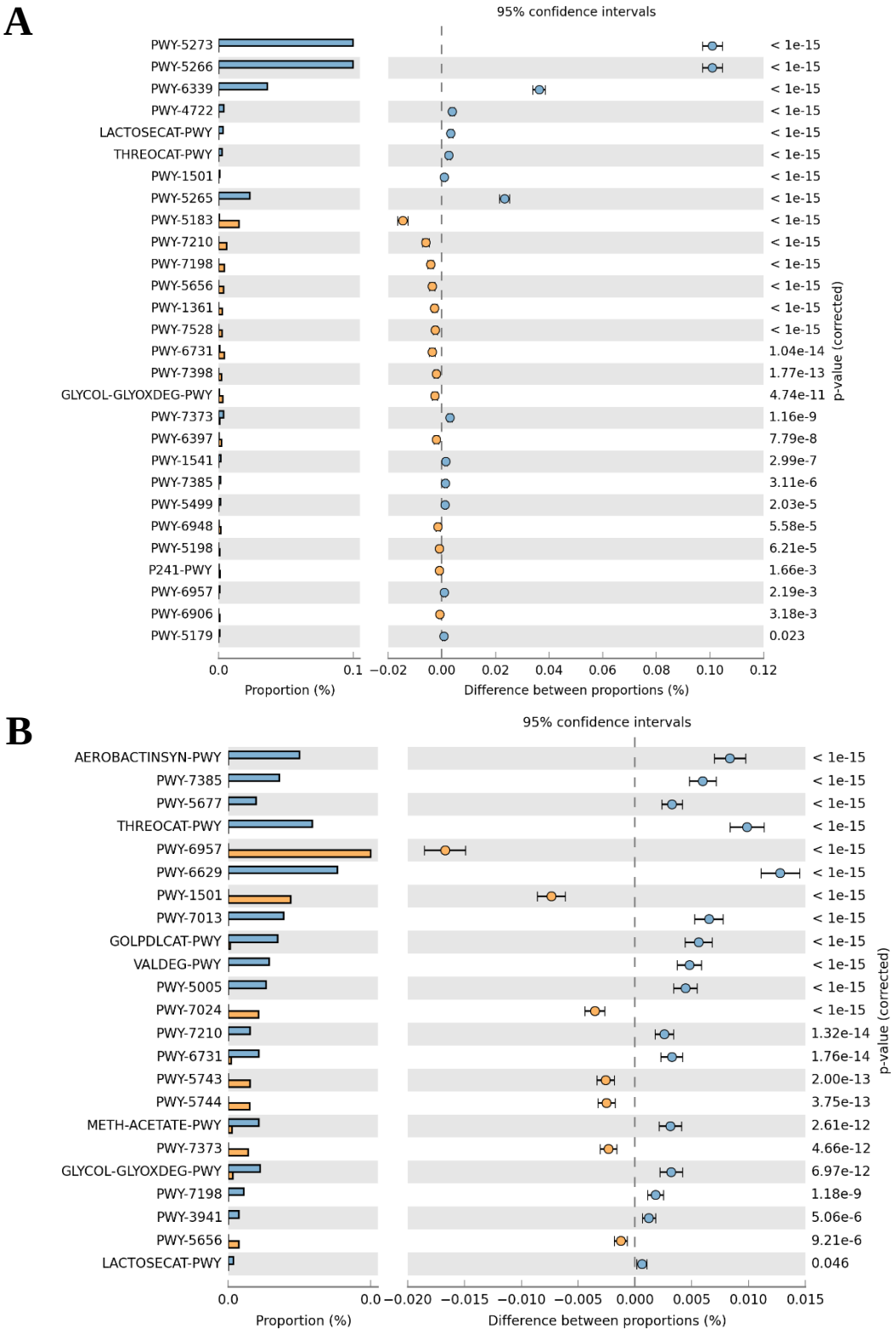
PWY4FS-8	phosphatidylglycerol biosynthesis II (non-plastidic)	17156,24	11635,2	10338,51	5394,115	12915,64	13919,7	11093,27	13322,06	24583,35	22550,06	13753,2	9536,721
PWY5F9-12	biphenyl degradation	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PWYG-321	mycolate biosynthesis	18887,63	12444,28	11799,34	5178,843	13775,29	16278,97	10773,84	13853,08	27648,92	30349,83	15146,05	10562,28
PYRIDNUCSAL-PWY	NAD salvage pathway I	11748,77	6600,635	6010,921	2816,506	6959	7974,227	5842,339	7326,936	13812,92	12479,07	7343,845	5302,705
PYRIDNUCSYN-PWY	NAD biosynthesis I (from aspartate)	13713,49	8033,178	7148,108	3794,343	9344,097	9794,097	8005,459	9169,992	17477,22	15900,08	10044,56	6592,597
PYRIDOXSYN-PWY	pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis I	11833,95	5496,391	6053,439	1650,02	2284,3	6319,783	1044,037	6155,699	10271,19	12953,93	4464,996	4029,453
REDCITCYC	TCA cycle VIII (helicobacter)	13430,58	10708,38	9191,538	5371,477	11492,71	13641,23	9737,681	12439,12	23867,72	23498,07	13916,2	9595,51
RHAMCAT-PWY	L-rhamnose degradation I	1549,375	2487,951	1595,151	1224,265	2089,308	2267,052	1578,796	2134,885	4594,599	3606,424	2862,769	1928,909
RIBOSYN2-PWY	flavin biosynthesis I (bacteria and plants)	16249,19	9702,229	8950,644	4724,062	11376,89	12250,07	9497,847	11208,51	21567,94	20651,73	12280,39	8183,956
RUMP-PWY	formaldehyde oxidation I	932,763	494,2808	685,4112	481,8863	1168,285	1632,565	1082,172	677,346	1948,931	1168,143	1284,125	849,1953
SALVADEHYPOX-PWY	adenosine nucleotides degradation II	11813,15	10076,19	7021,51	3790,382	10048,84	11605,62	8377,165	10675,51	21961,19	19295,81	11729,93	7912,561
SER-GLYSYN-PWY	superpathway of L-serine and glycine biosynthesis I	18141,59	12516,04	11057,82	5527,995	12692,61	14151,52	10786,85	14408,65	26396,54	25633,36	14036,6	10003,88
SO4ASSIM-PWY	sulfate reduction I (assimilatory)	15286,43	8918,146	8379,857	3845,098	9698,066	11149,39	7711,666	10637,26	19744,83	21733,04	10815,49	7310,885

SUCSYN-PWY	sucrose biosynthesis I (from photosynthesis)	1023,999	1312,793	1560,89	977,3459	2065,828	2698,906	1698,832	1750,789	5849,49	6147,123	2563,606	1638,998
SULFATE-CYS-PWY	superpathway of sulfate assimilation and cysteine biosynthesis	17029,57	10181,53	9426,077	4509,792	11028,55	12438,15	8893,624	12103,28	22294,49	22093,11	12308,93	8328,567
TCA	TCA cycle I (prokaryotic)	21202,51	11892,96	11405,3	5638,773	14055,37	15192,91	12027,04	13814,18	27193,89	24585,16	15501,79	10188,44
TCA-GLYOX-BYPASS	superpathway of glyoxylate bypass and TCA	17558,41	9396,942	8755,145	3619,165	7811,985	9889,655	6817,108	10726,64	16973,68	17524,77	10310,37	7271,688
TEICHOICACID-PWY	teichoic acid (poly-glycerol) biosynthesis	3002,163	742,2848	208,0187	153,6433	319,7958	405,3526	528,4149	1420,972	870,534	640,3607	923,8398	675,8093
THISYN-PWY	superpathway of thiamin diphosphate biosynthesis I	8285,714	5583,172	4440,847	3441,285	8041,863	9751,267	5270,41	6688,985	16793,85	15622,79	9779,697	5983,533
THREOCAT-PWY	superpathway of L-threonine metabolism	75,18067	190,4794	0,0	179,9058	313,4873	1046,667	0,0	0,0	3020,933	644,8222	697,5925	573,4001
THRESYN-PWY	superpathway of L-threonine biosynthesis	16811,04	10712,85	9166,58	5361,364	12894,89	14338,87	10645,62	11937,19	24958,55	24337,89	14121,85	9248,554
TRNA-CHARGING-PWY	tRNA charging	16269,49	8892,001	8599,915	4339,118	10567,15	11776,49	8743,95	10212,29	20398,25	19137,53	11396,92	7642,422
TRPSYN-PWY	L-tryptophan biosynthesis	18459,14	10593,06	9724,267	4998,541	12079,67	12761,77	10353,81	12152,44	22519,48	22258,53	13480,09	8686,81
TYRFUMCAT-PWY	L-tyrosine degradation I	5804,458	5205,626	3972,692	1140,216	3087,438	5073,135	2247,958	6122,28	7752,323	10696,33	4108,401	3532,692

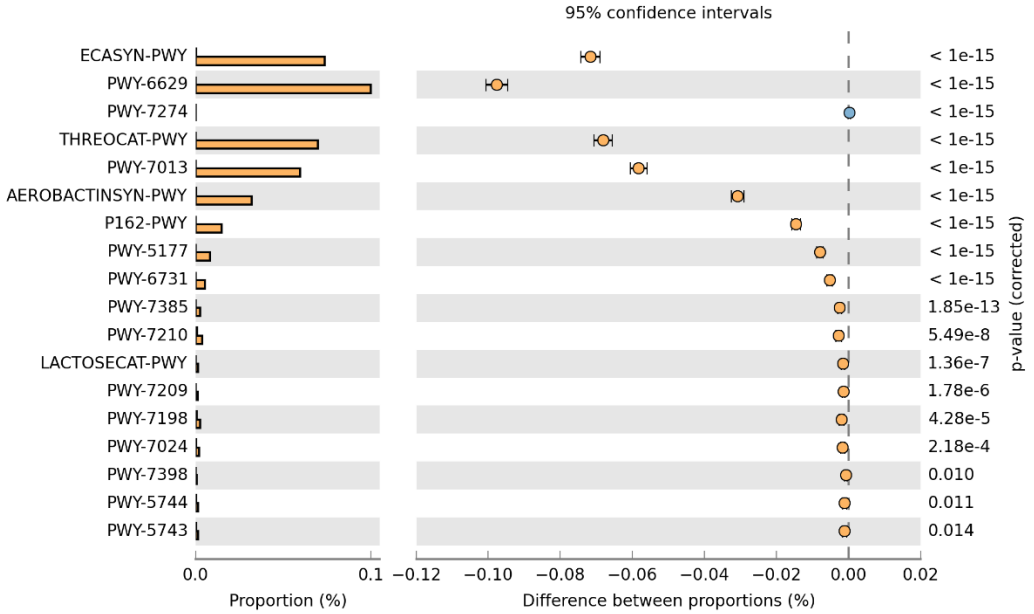
UBISYN-PWY	superpathway of ubiquinol-8 biosynthesis (prokaryotic)	10190,13	6304,379	6386,264	2800,488	7513,084	8215,015	6138,492	7241,308	14995,16	14548,4	7079,801	5070,783
UDPNAGSYN-PWY	UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis I	14773,21	9304,158	8764,765	4485,148	10952,36	11441,38	9301,497	10545,71	21684,31	19438,32	10993,72	7678,177
VALDEG-PWY	L-valine degradation I	121,5409	92,61286	95,51673	0,0	175,3128	122,3218	104,2947	0,0	465,3474	197,0587	116,4167	101,3775
VALSYN-PWY	L-valine biosynthesis	23460,14	15884,64	14491,04	7469,486	19193,09	19857,17	15583,13	18766,54	38295,87	32670,13	20100,33	13413,84

Anexo 8.

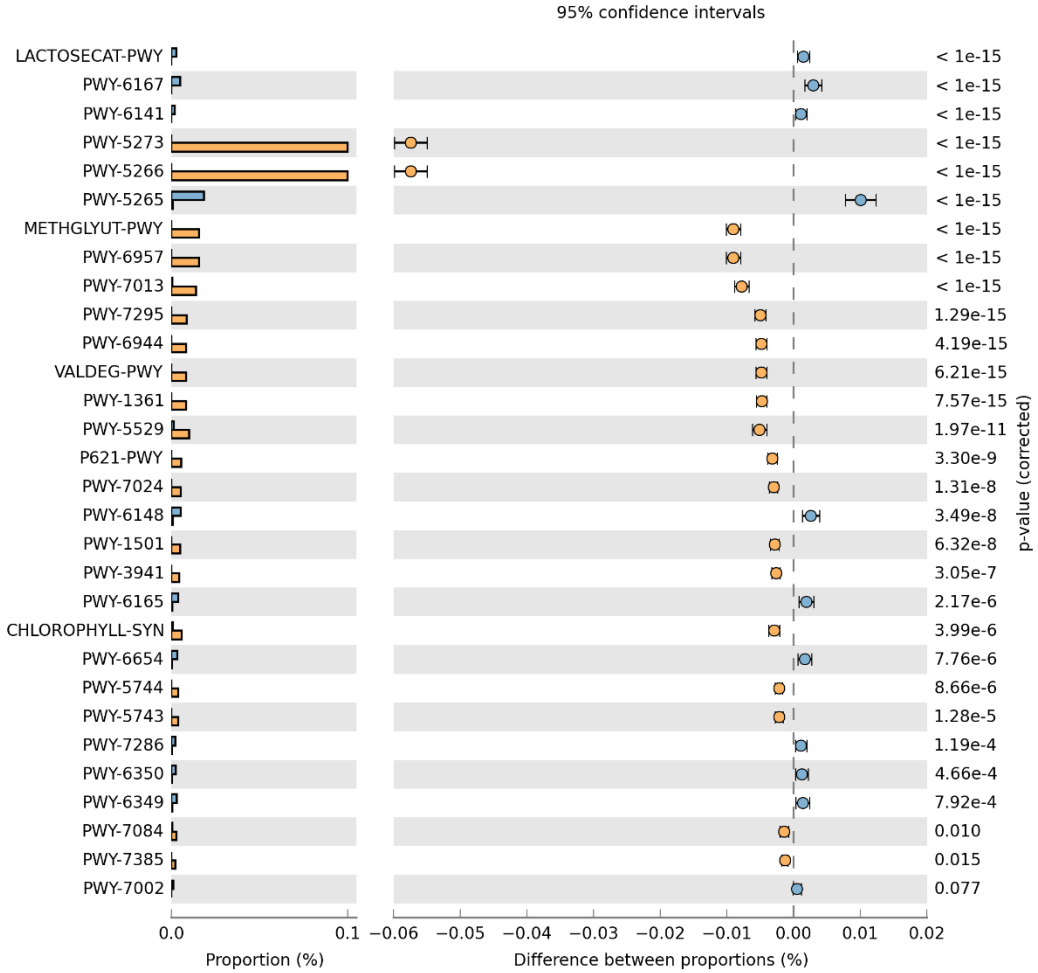
Comparación por replicas por cada punto a nivel metabólico

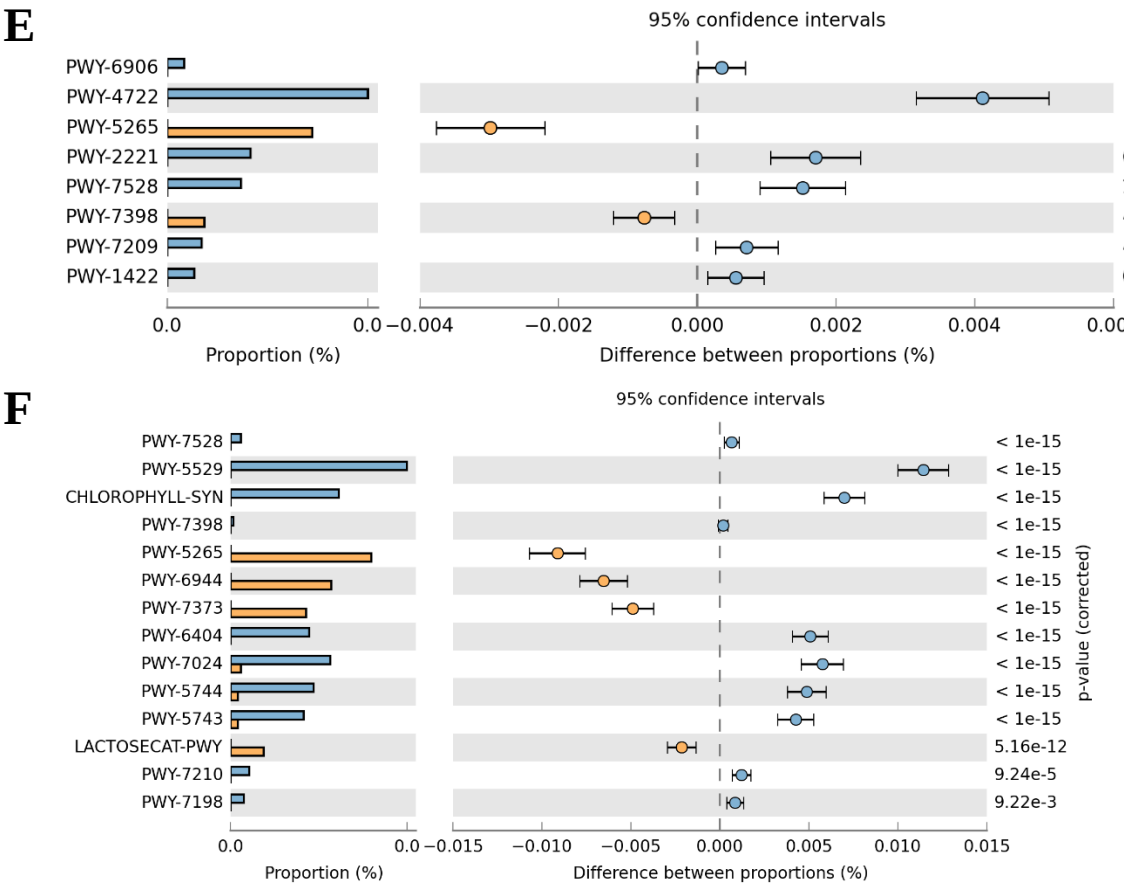


C


95% confidence intervals
ECASYN-PWY
PWY-6629
PWY-7274
THREOCAT-PWY
PWY-7013
AEROBACTINSYN-PWY
P162-PWY
PWY-5177
PWY-6731
PWY-7385
PWY-7210
LACTOSECAT-PWY
PWY-7209
PWY-7198
PWY-7024
PWY-7398
PWY-5744
PWY-5743
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
1.85e-13
5.49e-8
1.36e-7
1.78e-6
4.28e-5
2.18e-4
0.010
0.011
0.014
p-value (corrected)
0.0
0.1
Proportion (%)
−0.12
−0.10
−0.08
−0.06
−0.04
−0.02
0.00
0.02
Difference between proportions (%)

D


95% confidence intervals
LACTOSECAT-PWY
PWY-6167
PWY-6141
PWY-5273
PWY-5266
PWY-5265
METHGLYUT-PWY
PWY-6957
PWY-7013
PWY-7295
PWY-6944
VALDEG-PWY
PWY-1361
PWY-5529
P621-PWY
PWY-7024
PWY-6148
PWY-1501
PWY-3941
PWY-6165
CHLOROPHYLL-SYN
PWY-6654
PWY-5744
PWY-5743
PWY-7286
PWY-6350
PWY-6349
PWY-7084
PWY-7385
PWY-7002
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
< 1e-15
1.29e-15
4.19e-15
6.21e-15
7.57e-15
1.97e-11
3.30e-9
1.31e-8
3.49e-8
6.32e-8
3.05e-7
2.17e-6
3.99e-6
7.76e-6
8.66e-6
1.28e-5
1.19e-4
4.66e-4
7.92e-4
0.010
0.015
0.077
p-value (corrected)
0.0
0.1
Proportion (%)
−0.06
−0.05
−0.04
−0.03
−0.02
−0.01
0.00
0.01
0.02
Difference between proportions (%)



Nota: Se muestran las diferencias por cada punto para las rutas metabólicas. A) Tisaleo B) Alobamba C) Santa Lucía D) Huachi Grande E) Cevallos y F) Manzana de Oro.

Anexo 9.

Convenio de autorización para la toma de muestras por parte de ASOPROCAMOR

Ambato, 2 de octubre de 2023

AUTORIZACIÓN

A quien corresponda,

Yo, Luisa Susana Naranjo Cordovilla, con CI: 1801306984, representante legal de ASOPROCAMOR Cadena Provincial de la Mora Tungurahua, autoriza al Sr. Lenin Apurimak Corrales Iza con CI: 0550245005, estudiante de la carrera de Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato y a la Srta. Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero, con CI: 1850176064, estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Yo, William Ricardo Calero Cáceres, con CI: 1714348859, docente de Universidad Técnica de Ambato de la carrera de Biotecnología, me comprometo con el Sr. Lenin Apurimak Corrales Iza con CI: 0550245005 y la Srta. Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero con CI: 1850176064 estudiantes de la carrera de Biotecnología,

Yo, Lenin Apurimak Corrales Iza, con CI: 0550245005, estudiante de la carrera de Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato, me comprometo a:

Yo, Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero, con CI: 1850176064, estudiante de la carrera de Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato, me comprometo a:

Empresa: tomar muestras para la obtención del ADN microbiano o fúngico y realizar el análisis filogenético de los microorganismos presentes en las muestras, como parte del proyecto "SECUENCIA ECUADOR 2022", a realizarse en conjunto con la empresa BioSequence S.A.S y a la institución académica mencionada.

Institución académica: A guiar en la obtención del ADN microbiano o fúngico y realizar el análisis filogenético de los microorganismos presentes en las muestras de la empresa colaboradora, como parte del proyecto "SECUENCIA ECUADOR 2022", a realizarse en conjunto con BioSequence S.A.S.

Estudiantes: Solicito de la manera más comedida realizar un proyecto de investigación de análisis filogenético de los microorganismos bacterianos o fúngicos presentes en muestras biológicas procedentes de su empresa. Este análisis no tiene costo alguno, y tiene como objeto identificar grupos de microorganismos que pueden estar afectando a procesos de elaboración de productos, o a su vez realizar un control de calidad de los diferentes ambientes de producción.

Dicho proyecto se desarrollará juntamente con la Universidad Técnica de Ambato como proyecto de investigación para mi titulación. Las muestras serán procesadas por la tecnología de secuenciación de siguiente generación de Illumina en la empresa BioSequence Ecuador como parte de "SECUENCIA ECUADOR 2022". Siendo así, solicito dar parte para utilizar esta información exclusivamente en el proyecto de investigación y titulación con la universidad en mención.

Información Legal: Toda la información genética y análisis obtenidos del presente estudio serán desarrollados en base a una investigación científica con tecnología NGS de Illumina, por lo que nos responsabilizamos juntamente con la empresa BioSequence de su contenido, veracidad y alcance científico. Así mismo toda la información recolectada pertenecerá exclusivamente a la empresa a la que usted representa y cualquier mal uso de esta será penada acorde a las leyes de comercio e intelecto vigentes en el Ecuador.
En adición al párrafo precedente, el interesado puede hacer uso de la presente como crea conveniente.

Atentamente,

Sra. Luisa Susana Naranjo Cordovilla
Presidenta
ASOPROCAMOR
CI: 1801306984

William Ricardo Calero Cáceres, PhD
Universidad Técnica de Ambato
CI: 1714348859

Lenin Apurimak Corrales Iza
Universidad Técnica de Ambato
CI: 055024500

Lizbeth Andrea Vallejo Guerrero
Universidad Técnica de Ambato
CI:1850176064