

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Posgrados**

**Exploración e identificación del microbioma de la rizósfera del  
genus *Inga* en la Amazonía Ecuatoriana**

**Mecanismo de Titulación: Tesis en torno a una hipótesis o problema de  
investigación y su contrastación**

**Johanna Valentina Arévalo Granda**

**Pieter Marinus Johannes van 't Hof, Ph.D.  
Director de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito  
para la obtención del título de Máster en Microbiología

Quito, 21 de mayo de 2021

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO DE POSGRADOS**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Exploración e identificación del microbioma de la rizósfera del  
genus *Inga* en la Amazonía Ecuatoriana**

**Johanna Valentina Arévalo Granda**

Nombre del Director del Trabajo de Titulación: Pieter Marinus Johannes van 't Hof  
Título académico: Ph.D.

Nombre del Director del Trabajo de Titulación: Paúl Andrés Cárdenas Aldaz  
Título académico: Ph.D.

Nombre del Director del Programa: Gabriel Antonio Trueba Piedrahita  
Título académico: Ph.D.  
Director del programa de: Microbiología

Nombre del Decano del Colegio Académico: Carlos A. Valle  
Título académico: Ph.D.  
Decano del Colegio: Ciencias Biológicas y Ambientales

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados: Hugo Burgos  
Título académico: Ph.D.

**Quito, 21 de mayo de 2021**

### © DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombre del estudiante: Johanna Valentina Arévalo Granda

Código de estudiante: 00209641

C.I.: 171584958-2

Lugar y fecha: Quito, 21 de mayo de 2021

## ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

## UNPUBLISHED DOCUMENT

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

## DEDICATORIA

*Dedico la presente investigación a mi compañero de vida Carlos Eduardo, y a mi mamá Berta Mercedes por ser mis pilares, por ser quienes me han apoyado a lo largo de toda esta instrucción y por ser quienes me motivan a alcanzar mis sueños.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis, Pieter van 't Hof Ph.D., Docente-Investigador del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA) de la USFQ, por abrirme las puertas de su equipo de trabajo para realizar la investigación y descubrimiento de las asociaciones microbianas en la Amazonía del Ecuador.

Agradezco también a mi codirector Paúl Cárdenas Ph.D., Docente de Bioinformática del Instituto de Microbiología de la USFQ, por su consejo, apoyo y apertura en la realización de este trabajo.

Agradezco a Belén Prado M.Sc. del Laboratorio de Bioinformática del Instituto de Microbiología, por su dedicada guía y entusiasmo al compartir su conocimiento.

Agradezco a Aileen Hickey Blga., Graduada de la Carrera de Licenciatura en Biología, por su trabajo previo a la realización de esta investigación.

Agradezco a Alejandro Valdivieso, Stalin Sarango, Mariana Gallardo, Andrea Molina, Paola Flores y Andrea Guallasamín, compañeros del equipo de investigación de Pieter van 't Hof por estar siempre dispuesto a escuchar y realizar sus preguntas.

Mi más profundo agradecimiento a todos y cada uno de las personas que conforma el Instituto de Microbiología de la USFQ, por compartir sus experiencias, sus conocimientos y por estar siempre abiertos y dispuestos frente a cada idea, por las clases magistrales y por toda la ayuda que me han brindado a lo largo de este camino.

Finalmente, agradezco a mis compañeros/as Andrea, Paula, Carolina, Stuart, Viviana, Belén, Carolina, Santiago y Rebeca por transitar este camino juntos, por apoyarnos mutuamente y por motivarnos a seguir adelante.

## RESUMEN

Los bosques tropicales de la Amazonía ecuatoriana constituyen un ambiente megadiverso. Tal es así que en la zona geográfica de la Estación de Biodiversidad del Tiputini (TBS) de la USFQ se han caracterizado dos ecosistemas: Bosque Terra Firme y Bosque Várzea, los cuales presentan características climáticas y edáficas diferentes. En estos ecosistemas, uno de los árboles predominantes pertenece al género *Inga*. Se ha identificado que la familia a la que pertenece, las *Fabaceae*, pueden formar asociaciones simbióticas con varios microorganismos. Sin embargo, en el Ecuador no existen reportes de las posibles relaciones simbióticas tanto con hongos micorrícicos como con bacterias fijadoras de nitrógeno. Las asociaciones simbióticas están influenciadas por varios factores bióticos como la comunidad de seres vivos microscópicos del suelo, y el ecosistema en sí; y también por factores abióticos como el pH, la humedad del suelo, la composición del suelo, la temperatura y el régimen de precipitaciones e inundaciones.

Gracias a las nuevas herramientas de secuenciamiento de ácidos nucleicos de siguiente generación, como lo es la plataforma Illumina, es posible caracterizar marcadores genéticos como las regiones ITS y 16S rRNA para identificar los hongos y las bacterias, respectivamente, que se encuentran asociados a la rizósfera de las plántulas de *Inga*, y de esta manera lograr conocer su abundancia, su diversidad y su posible relación tanto con el ecosistema como con la época de muestreo.

Diecinueve muestras de rizósfera asociadas a plántulas de *Inga* fueron recolectadas del ecosistema Terra Firme y del ecosistema Várzea en dos diferentes épocas del año (noviembre 2018 y agosto 2019). Posteriormente, se extrajo el material genético ADN, y se secuenció los marcadores genéticos ITS y 16S rRNA. Finalmente se realizó un análisis bioinformático utilizando la plataforma Qiime2 para conocer la diversidad, taxonomía y abundancia diferencial de los hongos y de las bacterias asociadas.

Este estudio logró identificar por primera vez micorrizas arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a las raíces de *Inga*. Además, la diversidad alfa no fue significativa ni por ecosistema ni por época de muestreo para ninguno de los dos marcadores. La diversidad beta permitió identificar agrupaciones entre los ecosistemas, cuando se analizó bajo los índices de Jaccard, Weighted y Unweighted UniFrac al analizar las secuencias ITS y bajo todos los índices cuando se analizó las secuencias que codifican para el gen 16S rRNA. Para la variable época de muestreo se observaron agrupamientos de las ITS bajo los índices Bray Curtis y Weighted UniFrac mientras que para las secuencias 16S rRNA no fue significativo. Se identificó que las secuencias ITS presentaron mayor cantidad de secuencias representativas y ASVs comparado con las secuencias 16S rRNA. Se identificó que la comunidad micobiana está representada por el 77,52% de los ASVs de las secuencias ITS y de esto el 1,42% pertenecen a hongos del filo Glomeromycota los cuales son característicos por representar a los hongos micorrícicos arbusculares. En la comunidad microbiana los filos predominantes fueron Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria y en menor abundancia se identificó Chloroflexi, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae y otros. Finalmente se identificó que existen taxones abundantemente diferenciales tanto en la comunidad fúngica como en la comunidad bacteriana frente al ecosistema y frente a la época de muestreo lo que puede atribuirse a las diferentes condiciones edáficas y climáticas de ambos ambientes.

**Palabras clave:** micorrizas, *Glomeromycota*, microbioma, *Inga* sp., Amazonía ecuatoriana, Estación Biodiversidad Tiputini, secuenciamiento, diversidad alfa y beta, taxonomía, abundancia.

## ABSTRACT

The Amazon rainforest of Ecuador is a megadiverse habitat. At the Tiputini Biodiversity Station (TBS) of USFQ, two ecosystems have been characterized: Terra Firme Rainforest and Varzea Rainforest, which show different climatic and edaphic characteristics. In these ecosystems, *Inga* is amongst the most abundant trees. It can establish symbiotic associations with various microorganisms. Nevertheless, there is little to no information available about symbiotic associations between *Inga* and either mycorrhizal fungi and/or nitrogen fixing bacteria in the Ecuadorian Amazon. Symbiotic associations are influenced by biotic factors such as the soil microscopic living community, as well as abiotic factors such as pH, humidity, soil composition, temperature, rainfall and floods.

Through next generation sequencing technologies, as the Illumina Platform, it is possible to use ITS and 16S rRNA genetic markers to identify fungi and bacteria, respectively, which are associated within the *Inga* rhizosphere, and to get knowledge about abundance, diversity and a possible relationship or differences in the microbial composition between ecosystems and sampling dates.

Nineteen rhizosphere samples of *Inga* seedlings were collected from Terra Firme and Varzea ecosystems during two different sampling expeditions (November 2018 and August 2019). Extracted total DNA was subsequently sequenced using ITS and 16S rRNA markers. Finally, a bioinformatic analysis was performed using the Qiime2 pipeline to identify the alpha and beta diversity, species taxonomy and the differential abundance regarding fungi and bacteria.

This study for the first time molecularly identified arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen fixing bacteria associated with the *Inga* rhizosphere. Furthermore, alpha diversity was not significant different between ecosystem nor sampling date for either of the genetic markers. On the one hand, the beta diversity identified different clusters belonging to different

ecosystems using the Jaccard, Weighted and Unweighted UniFrac methods, for either ITS sequences and 16S rRNA sequences. On the other hand, Bray Curtis and Weighted UniFrac showed that ITS sequences were significantly different for the two sampling expeditions, while 16S rRNA sequences showed no differences. The ITS sequences identified more representative sequences and ASVs than 16S rRNA sequences. The fungal community was represented by 77,52% of the total ASV from which 1,42% corresponded to the phylum *Glomeromycota*, known to harbor arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The microbial community predominantly presented phyla like Proteobacteria, Acidobacteria and Actinobacteria, whereas Chloroflexi, Plantomycetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae and others were present in low abundances. Finally, differentially abundant taxa in both the fungal and bacterial community in relation to the different ecosystems and sampling date were observed, which could be explained by the different edaphic and climatic conditions of both ecosystems.

**Key words:** mycorrhiza, *Glomeromycota*, microbiome, *Inga* sp., Ecuadorian amazon, Tiputini Biodiversity Station, sequencing, alpha and beta diversity, taxonomy, abundance.

## TABLA DE CONTENIDO

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN .....	2
© DERECHOS DE AUTOR.....	3
ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN .....	4
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS .....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
ÍNDICE DE TABLAS .....	13
ÍNDICE DE FIGURAS .....	14
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Antecedentes .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Justificación .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>18</b>
<b>4. Pregunta de Investigación .....</b>	<b>18</b>
<b>5. Marco Teórico .....</b>	<b>18</b>
5.1. Región Amazónica: Ambiente megadiverso en microorganismos .....	18
5.2. Plantas del genus <i>Inga</i> .....	20
5.3. Reino Fungi y micorrizas .....	21
5.4. Micorrizas arbusculares (AMF) .....	22
5.5. Microbioma del suelo.....	23
5.6. Factores que influyen la distribución de las especies microbianas .....	23
5.7. Secuenciación de muestras de suelo.....	24
5.8. Secuenciamiento de ácidos nucleicos de Siguiete Generación (NGS) .....	25
5.9. Marcadores genéticos para la secuenciación de microorganismos .....	26
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>26</b>
6.1. Objetivo General .....	26
6.2. Objetivos Específicos .....	27
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Permisos de investigación .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Financiamiento del Proyecto .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Recolección de muestras .....</b>	<b>28</b>
<b>4. Extracción y cuantificación de ADN.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Preparación de Librerías y Secuenciamiento .....</b>	<b>30</b>
<b>6. Análisis Bioinformático.....</b>	<b>30</b>
6.1. Construcción de la Metadata, Demultiplexing y Denoising .....	31
6.2. Análisis de Alfa y Beta diversidad .....	31
6.3. Análisis Taxonómico.....	32
6.4. Análisis de Abundancia Diferencial.....	33
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>1. Análisis de muestras y denoising.....</b>	<b>35</b>
<b>2. Alfa y Beta Diversidad del microbioma asociado a la rizósfera de <i>Inga</i> sp.....</b>	<b>35</b>
<b>3. Alfa y Beta Diversidad del microbioma asociados a la rizósfera de <i>Inga</i> sp. ....</b>	<b>37</b>

4. Composición fúngica asociada a la rizósfera de <i>Inga</i> sp.....	39
5. Composición bacteriana de la rizósfera de <i>Inga</i> sp.....	40
6. Comparación del microbioma entre los ecosistemas y entre fecha de muestreo ...	41
7. Comparación de la composición bacteriana entre los ecosistemas y entre fecha de muestreo .....	44
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
1. Diversidad microbiana asociada a la rizósfera del genus <i>Inga</i> .....	48
2. Taxonomía microbiana asociada a la rizósfera del genus <i>Inga</i> .....	52
3. Abundancia diferencial microbiana asociada a la rizósfera del genus <i>Inga</i> .....	57
4. Perspectivas Futuras .....	60
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones Edáficas .....	69
<b>Tabla 2.</b> Condiciones Climáticas.....	69
<b>Tabla 3.</b> Condiciones Biológicas.....	69
<b>Tabla 4.</b> Metadata.....	70
<b>Tabla 5.</b> Test estadístico para alfa y beta diversidad en las secuencias correspondientes a ITS. .....	71
<b>Tabla 6.</b> Test estadístico para alfa y beta diversidad en las secuencias correspondientes a 16S rRNA.. ..	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Puntos de muestreo en la Estación de Biodiversidad Tiputini (TBS). (Triángulos: ecosistema Várzea; Círculos: ecosistema Terra Firme. Sitios de muestreo 1 al 19. Rojo: noviembre 2018; Amarillo: agosto 2019).....	29
<b>Figura 2.</b> Análisis de Beta diversidad para las secuencias de ITS de las comunidades de bacterias y Archeae en la rizósfera de plántulas del género <i>Inga</i> , utilizando QIIME2. ....	37
<b>Figura 3.</b> Análisis de Beta diversidad para las secuencias de 16S rRNA de las comunidades de bacterias y Archeae en la rizósfera de plántulas del género <i>Inga</i> , utilizando QIIME2. ....	38
<b>Figura 4.</b> Composición micobiana asociada a la rizósfera de <i>Inga</i> sp. tomando en cuenta: a) todas las ASVs obtenidas de las ITS, b) ASVs pertenecientes al reino Fungi y c) ASVs del filo Glomeromycota.....	40
<b>Figura 5.</b> Composición micobiana asociada a la rizósfera de <i>Inga</i> sp. a) A nivel de reino y b) A nivel de filo. ....	41
<b>Figura 6.</b> Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las ASVs totales de ITS, enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: Noviembre 2018 y Agosto 2019.....	43
<b>Figura 7.</b> Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las ASVs del reino Fungi, enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: noviembre 2018 y agosto 2019.....	44
<b>Figura 8.</b> Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las ASVs del filo Glomeromycota, enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: Noviembre 2018 y Agosto 2019.....	44
<b>Figura 9.</b> Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las secuencias de 16S rRNA enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: Noviembre 2018 y Agosto 2019.....	46

## INTRODUCCIÓN

### 1. Antecedentes

Las micorrizas son formadas por hongos simbióticos que ejercen presión selectiva en las comunidades de plantas, en la planta hospedera y en el micelio del hongo. En el ecosistema estas comunidades microbianas pueden variar en su riqueza y diversidad dependiendo de las condiciones edáficas del ambiente y de otros organismos vivos con los que conviven en la rizósfera. A lo largo del tiempo ha existido el dogma de que las plantas de los bosques tropicales no requerían asociaciones con otros organismos para adquirir nutrientes debido a que este tipo de ecosistema presenta condiciones climáticas óptimas y altos contenidos de nutrientes, por lo que la cantidad de estudios en micorrizas en ecosistemas tropicales fueron menores (Peña-Venegas *et. al.*, 2019; Vasco-Palacios, 2016). Sin embargo, en los últimos años se ha generado evidencia de que los hongos micorrícicos arbusculares (AMF) del filo *Glomeromycota* están presentes incluso en estos ecosistemas y que existen AMF que aún son desconocidas. La Amazonía comprende un ambiente megadiverso tropical con ecosistemas únicos en donde el estudio de las AMF no se encuentra desarrollado. El estudio realizado por Hickey (2020), da el indicio para la investigación de los factores bióticos y abióticos que influyen en las comunidades microbianas asociadas a plántulas de *Inga*. En esta investigación llevada a cabo en los ecosistemas de Terra Firme y Várzea se logró identificar que los bosques Terra Firme presentaron mayor proporción de Nitrógeno total, Molibdeno y Vanadio y que, los suelos del bosque Várzea son más ricos en macronutrientes como fósforo, magnesio, calcio, y en micronutrientes como cobre, manganeso, sodio, cobalto y bario, estos datos fueron estadísticamente significativos (Tabla 1, Anexo A). Los nutrientes como potasio, zinc, hierro, aluminio, plomo, níquel, cromo y cadmio no presentaron diferencia significativa entre ambos ecosistemas. Además, se evaluó el pH del suelo siendo de 4,92 para Terra Firme y 4,65 para

Várzea; varias condiciones climáticas fueron también reportadas como la temperatura ambiental que para el mes de noviembre 2018 fue de 25,58°C mientras que para agosto 2019 fue de 23,89°C. El registro de precipitaciones mostró que enero, febrero y marzo corresponden a meses relativamente secos, y de abril a diciembre son meses lluviosos. La humedad relativa para el mes de noviembre 2018 fue de 72,10% y para agosto 2019 74,34% (Tabla 2, Anexo A). A pesar de los grandes avances realizados, queda por describir a nivel molecular cuales son las comunidades de hongos micorrícicos y de bacterias que colonizan la rizósfera de *Inga* y si presentan diferencias al comparar sus comunidades entre los ecosistemas Terra Firme y Várzea y entre la época de muestreo.

## 2. Justificación

Los hongos micorrizales, los cuales se encuentran dentro de la primera capa de suelo, muchas veces pasan desapercibidos por los observadores. Sin embargo, su contribución al desarrollo de plantas representa un papel indispensable en la complejidad de la biodiversidad y ecología (Ritter, Dunthorn, Anslan, Xavier, *et al.*, 2020). A pesar de que se conoce que Ecuador es un país megadiverso, se tiene poco conocimiento de cuáles son los hongos micorrizales que colonizan a las plantas de *Inga* sp., tampoco se conoce los impactos ecológicos en la distribución y en estructura de la comunidad microbiana que circunda en su rizósfera. Se conoce que los microorganismos cumplen un rol fundamental en los suelos, los hongos micorrizales, por ejemplo, forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas incrementando la resistencia a patógenos y la tolerancia a sequías, además permiten la transferencia de nutrientes a la planta de aproximadamente el 90% de fósforo y 80% de nitrógeno requerido por la planta, por su parte la planta brinda al hongo fotosintatos, azúcares necesarios para su desarrollo. Por otro lado, las bacterias cumplen funciones importantes en procesos biogeoquímicos como es la

fijación del nitrógeno y la degradación de compuestos complejos. Por ello se plantea este estudio con el fin de dar a conocer la riqueza, diversidad, abundancia, composición de los hongos micorrizales y de las interacciones microbianas en la rizósfera de plantas del genus *Inga* en la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT) de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), ubicada en la provincia de Napo en la Reserva de Biósfera Yasuní.

En este estudio se trabajará con plántulas de *Inga* sp. debido a que son abundantes en ecosistemas neotropicales y porque las *Fabaceae* son conocidas por formar asociaciones tanto con bacterias fijadoras de nitrógeno como con hongos micorrizales. Además, se pretende realizar este estudio en dos tipos de ecosistemas en la EBT: Bosque Terra Firme y Bosque parcialmente inundable Várzea, debido a que el hábitat es un factor que influencia y explica la composición de las comunidades microbianas (Hickey, 2020; Ritter, Dunthorn, Anslan, Xavier, *et al.*, 2020). También debido a que según Hoorn *et. al.*, (2010) esta región oeste de la Amazonía de América del Sur, en el pie de los Andes, es mucho más diversa que la región este donde el río Amazonas desemboca en el Océano Atlántico. Por lo que se puede decir que tanto el hábitat como la heterogeneidad en la Amazonía y sus características físico-químicas juega un papel indispensable en la biodiversidad.

La secuenciación de lecturas cortas y las herramientas bioinformáticas permiten determinar la diversidad y las comparaciones entre las comunidades de microorganismos en los diferentes hábitats. En este sentido, la secuenciación de las regiones ITS y 16S rRNA darán un indicio para la identificación de las principales especies y/o géneros de hongos micorrizales y bacterias, respectivamente, además se podrá identificar posibles nuevas especies con lo que se podrán alimentar las bases de datos.

### 3. Hipótesis

En la Amazonía ecuatoriana existen microorganismos que forman asociaciones simbióticas microbianas y micorrizales en la rizósfera de plántulas de *Inga*, siendo tan diversos como los macroorganismos.

El ecosistema en donde se desarrollan las plántulas de *Inga* sp. y la época del año ejerce un efecto en la biodiversidad de micorrizas asociadas a las raíces de las plantas y en el microbioma de su rizósfera.

Los ecosistemas Várzea el cual es más rico en nutrientes comparado al ecosistema Terra Firme, manifiesta menor cantidad de asociaciones simbióticas tanto con bacterias como con micorrizas.

Dogma: Basado en estudios anteriores es importante tener en cuenta que los ecosistemas más pobres nutricionalmente se establecen la mayor cantidad de asociaciones microbianas.

### 4. Pregunta de Investigación

¿El micobioma y el microbioma bacteriano asociado a las raíces de *Inga* sp. varía en función del ecosistema y de la época de muestreo en la Estación de Biodiversidad de Tiputini de la USFQ ubicada en la Reserva Biósfera Yasuní?

### 5. Marco Teórico

#### 5.1.Región Amazónica: Ambiente megadiverso en microorganismos

Se ha logrado determinar que las propiedades fisicoquímicas del suelo, así como también la planta hospedera y las estaciones son determinantes en la composición y estructura de las comunidades micorrizales (de Oliveira Freitas *et al.*, 2014).

Los ecosistemas tropicales y principalmente la Amazonía brindan el nicho ecológico más amplio para el desarrollo de interacciones microbianas. Por ello es posible encontrar una amplia riqueza de especies y biodiversidad. Este ecosistema es mantenido gracias a los procesos bióticos y abióticos mediados por los hongos y bacterias, así como por sus propias características demográficas, es decir, por la topografía del suelo, el régimen de inundación y la disponibilidad de nutrientes los cuales son controlados por la temperatura, por las lluvias y por los rápidos ciclos biológicos en la descomposición de nutrientes. La región amazónica ecuatoriana es considerada un ambiente megadiverso debido a que presenta una heterogeneidad de hábitats en base a cada fitofisionomía, con sus propias características de suelo, régimen de inundación y disponibilidad de nutrientes lo que hace que cada nicho tenga distinta microbiota, además la Amazonía ecuatoriana presenta una gran biodiversidad principalmente por encontrarse al lado oeste de la Amazonía (Ritter, Dunthorn, Anslan, de Lima, *et al.*, 2020).

En la Amazonía, se han identificado 4 tipos de hábitats: Bosque no Inundable conocido como Terra Firme, Bosque estacionalmente inundable por ríos de aguas blancas (Várzea), Bosque estacionalmente inundable por ríos de aguas negras (Igapó) y Áreas naturales con suelo de arena blanca (Campinas); los cuales se diferencian por la riqueza de microorganismos y por sus condiciones naturales (Ritter *et al.*, 2019). En el Bosque Terra Firme se puede encontrar una riqueza de plantas de las familias *Mimosaceae*, *Fabaceae*, *Lecythidaceae*, y *Arecaceae*; este hábitat fue considerado en otros estudios como el que presenta la mayor cantidad de micorrizas arbusculares (Moura & Cabral, 2019), se encuentra ubicado en las partes altas por lo que sus suelos son drenados y no inundables, presenta vegetación dividida por estratos y mayor cantidad de árboles altos y viejos, mayor acumulación de hojarasca y humus pero menos compacto y menos degradado y en donde las plantas de Inga presentan un mayor brote. En cambio el bosque Várzea se caracteriza por ser ocasionalmente inundable, su suelo es rico en sedimentos y presenta una capa de materia orgánica más profunda y menos contenido de arcilla

por lo que puede captar mayor humedad, sin embargo sus suelos son menos fértiles, y su hojarasca es más oscura, más saturada de agua, más compacta por lo que las plantas de *Inga* tienen una mayor longitud radicular (Hickey, 2020).

La región Amazónica comprende 8 millones km<sup>2</sup> en América del Sur, albergando al 50% de la selva tropical global donde se alojan una amplia diversidad de organismos que ayudan en la regulación del ciclo climático, hidrológico y en los ciclos del carbono y del nitrógeno. A pesar de que se han descrito una inmensa variedad de organismos que viven en esta región, queda por describir los microorganismos, entre estos, bacterias, hongos y también insectos. En este sentido, en las regiones Amazónicas de Colombia, Brasil, Venezuela y Perú se han descrito una variedad de microorganismos, pero en el Ecuador este conocimiento aun es limitado (Cañarte *et al.*, 2020).

## **5.2.Plantas del genus *Inga***

*Inga* es un género de árboles pertenecientes a las Leguminosas, pertenece al Reino Plantae, Division Magnoliophyta, Clase Magnolipsida, Orden Fabales, Familia *Fabaceae* Subfamilia *Mimosoideae* y un miembro común es por ejemplo la Guaba. Consta aproximadamente de 357 especies que crecen en lo selva tropical de América, es un importante elemento en la producción maderera y alimenticia que crece desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm, su tranco es corto, su copa globosa y frondosa, sus hojas son paripinnadas con hasta 12 folios, pero de tamaño variable. Además de su importancia en la agricultura, presenta importancia a nivel ecológico debido a que tiene la capacidad de transformar el nitrógeno atmosférico a nitrógeno asimilables (Soto *et al.*, 2012). Este género se diversificó hace aproximadamente 9,8 millones de años en el lado oeste de la amazonia al pie de los Andes. Este tipo de árbol crece en lugares abiertos llegando a una altura de 5 m, es característico de la selva

neotropical Amazónica pues está presente en 1 por cada 10 árboles siendo la especie más rica de la Amazonía. Su mayor floración y fructificación se da por los meses de noviembre a mayo (Richardson *et al.*, 2001; Vargas, 2020).

### **5.3.Reino Fungi y micorrizas**

El reino Fungi está compuesto por aproximadamente 1,5 a 5 millones de especies de hongos, los cuales puede estar presentes en forma unicelular o filamentosa sea de vida libre, parasíticos, comensales o mutualistas. Sin embargo, estos valores son estimaciones pues a pesar de los esfuerzos por caracterizar a los hongos existen muchos que aún no se han identificado. Cabe recalcar que estos microorganismos juegan un rol importante en los ciclos biogeoquímicos, contribuyen a mantener la estructura del suelo, son fuente de producción de metabolitos secundarios, permiten controlar el estrés abiótico a partir de las asociaciones en forma de líquenes o micorrizas y también pueden llegar a ser patógenos (Vasco-Palacios *et al.*, 2018).

A nivel taxonómico, el reino *Fungi* se encuentra clasificado en 5 filos, Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota. Dentro del filo de los Glomeromycota se encuentran los hongos formadores de micorrizas los cuales pueden establecer asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas. Existen cuatro tipos de micorrizas basadas en su estructura y función, las ectomicorrizas, las micorrizas arbusculares, micorrizas de orquídeas y micorrizas ericoide. Se ha identificado que las micorrizas arbusculares más antiguas datan de hace 400 millones de años y se ha propuesto que estas interacciones fueron primordiales para que las plantas se vuelvan terrestres (Vasco-Palacios *et al.*, 2018).

#### 5.4.Micorrizas arbusculares (AMF)

Las micorrizas arbusculares son hongos filamentosos septados y simbiontes obligados del filo Glomeromycota, es decir, están presentes en el suelo formando asociaciones con las raíces de una amplia variedad de plantas. Las AMF tiene la capacidad de penetrar las raíces de las plantas y se sitúan entre las células de la planta hospedera, es decir, son endomicorrizas que conforman estructuras intracelular fúngicas complejas a manera de árboles. Las micorrizas cumplen roles importantes: formando parte de la estructura del suelo a través de su red de hifas, participando en ciclos biogeoquímicos como en el ciclo del carbono en donde secuestra el carbono en el suelo, ayudando a las plantas en la absorción de agua y nutrientes y protegiéndolas del estrés biótico o abiótico, aumentando la aptitud de la planta; mientras que la planta le proveerá a la micorriza de protección y de fuentes de energía; y en la estabilidad y productividad del ecosistema (Cañarte *et al.*, 2020). Se encuentran ampliamente distribuidas ya que han sido identificadas en ecosistemas tropicales, polares, desiertos, cultivos y bosques, dicha colonización inició hace más de 450 millones de años en donde mencionadas asociaciones simbióticas permitieron que las plantas alcance ecosistemas terrestres (Taylor *et al.*, 2015). El conocimiento de su riqueza y diversidad permitirá su monitoreo, así como también el estudio preciso de su taxonomía, distribución y filogenia lo que puede ser posible a través de la caracterización molecular en base a referencias filogenéticas (Garcés-ruiz *et al.*, 2017). Por lo que desde el 2001, la taxonomía fue modificada y se estableció un grupo monofilético en el filo Glomeromycota basado en estudios moleculares, el cual reemplazó la antigua clasificación establecida en función de observaciones morfológicas (Moura & Cabral, 2019). Dentro de este filo se describen a 3 clases (Archaeosporomycetes, Glomeromycetes y Paraglomeromycetes), 5 órdenes (Archaeosporales, Diversisporales, Gigasporales, Glomerales y Paraglomerales), 14 familias, 29 géneros y aproximadamente 250 especies conocidas (Oehl *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2015).

### **5.5. Microbioma del suelo**

El microbioma del suelo hace referencia al conjunto de microorganismos que se encuentran en este ecosistema y que forman parte de procesos vitales relacionados a su ambiente como en el crecimiento de las plantas, en el ciclo del carbono y de otros nutrientes. Estos procesos se han visto afectados por la actividad humana, el cambio climático, y las precipitaciones. Es importante recalcar que el estudio a nivel genético de las comunidades microbianas permite caracterizar los microorganismos que componen el ecosistema del suelo y además ayudan a entender los procesos vitales en los que participan los microorganismos (Jansson & Hofmockel, 2018). Los hongos y las bacterias son los microorganismos dominantes en términos de diversidad, biomasa e influencia en los procesos esenciales llevados a cabo por el suelo (Bahram *et al.*, 2018).

A pesar de que se conoce que la biomasa de los microorganismos en el suelo es de apenas 1-2%, fuera de las raíces y de los animales vertebrados, la presencia de estos microorganismos juega un rol importante en la biodiversidad y en los procesos ecológicos. Las bacterias en la rizósfera, además forman estructuras protectoras conocidas como biofilms en las raíces de la planta hospedera y secretan antibióticos y toxinas que protegen a las plantas de patógenos. Las plantas por su parte les brindan a los microorganismos secreciones de metabolitos secundarios, aminoácidos, azúcares, enzimas, restos celulares que puede atraer o inhibir el crecimiento de los microorganismos (Fonseca *et al.*, 2018)

### **5.6. Factores que influyen la distribución de las especies microbianas**

Dentro del ecosistema existe factores bióticos y abióticos que influyen en las interacciones de las plantas con los microorganismos. Entre los factores abióticos se encuentran

las precipitaciones, el tipo de suelo, el CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> la temperatura, la radiación, el pH, los nutrientes y otros factores geográficos. Mientras que dentro de los factores bióticos se encuentran la diversidad de microorganismos, plantas, animales y la actividad humana. Así se ha visto que la biota presente en la superficie del suelo (plantas, animales) ejercen su efecto en la biota debajo del suelo. En el microecosistema que circundan la rizósfera habitan comunidades microbianas que interactúan de forma benéfica, perjudicial o neutral con las plantas. Las interacciones benéficas entre plantas y microbios son un factor importante en el desarrollo y fisiología de las plantas ya que promueven su crecimiento, desarrollo, salud y supervivencia; además las plantas por su parte excretan hormonas o metabolitos secundarios que estimulan el crecimiento microbiano o la eliminación de patógenos. Por su parte los microorganismos reciben protección para aplacar las condiciones de estrés a la vez que ayudan a la plantas a fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar el fosfato, remover contaminantes y controlar los fitopatógenos (Santoyo *et al.*, 2017).

### **5.7. Secuenciación de muestras de suelo**

A pesar de que antiguamente el suelo era considerado importante para el ciclo del carbono y como fuente de CO<sub>2</sub> y otros compuestos, actualmente se sabe que su rol en el ecosistema tiene una mayor importancia pues sirve de albergue para muchas especies y microorganismos. Tras la exploración del ADN del suelo, se empieza a realizar la secuenciación de ácidos nucleicos llegando a describir la composición microbiana hasta nivel de género y especie. El estudio del microbioma del suelo puede permitir la comprensión del funcionamiento de este ecosistema, sus interacciones y el conocimiento de forma integral de los microorganismos que en el habitan (Baldrian, 2019).

### 5.8. Secuenciamiento de ácidos nucleicos de Siguiete Generación (NGS)

La secuenciación permite determinar la composición y diversidad de las comunidades microbianas en diferentes hábitats. A través de esta metodología es posible descifrar el código genético que define a las especies y organismos. La secuenciación del genoma ha pasado por varias fases desde su inicio en 1977 con la secuenciación Sanger basada en el método de terminación de cadena. A continuación, la secuenciación de primera generación basada en el uso de materiales radioactivos y en la utilización de instrumentos automáticos y paquetes de software asociados a los analizadores genéticos capilares. Finalmente, la secuenciación de siguiente generación (NGS) se desarrolló a partir de varias y modernas tecnologías de secuenciamiento las cuales permiten realizar procesamientos masivos, y obtener un alto rendimiento a un costo reducido. Dentro de las NGS se encuentran las tecnologías 454, SOLiD y *Genome Analyzer* las cuales han ido evolucionando en términos de longitud de lectura, precisión, aplicaciones y otros requisitos y han cambiado su nombre a Sistema Roche 454, AB SOLiD e Illumina respectivamente, sin embargo no son las únicas, las plataformas Ion Torrent y *Pacific Bioscience* también forman parte de las NGS (Garrido-cardenas *et al.*, 2017).

El sistema Illumina está basado en secuenciación por síntesis, en donde el fragmento de ADN se adquiere a una plataforma a través de adaptadores fijos, a continuación, las hebras son desnaturalizadas a hebras simples y tras la ligación de los primers, la enzima polimerasa se encarga de ir colocando uno a uno los nucleótidos que se encuentran unidos a un fluoróforo específico por cada base nitrogenada, el cual emite su señal al ser detectado, señal que es capturada por un dispositivo de carga acoplada produciendo hasta 3T de datos para HiSeq, cuya tasa de error es del 2% y cuyo precio es de \$0,02/millón de bases. Este sistema permite la secuenciación de varias muestras a la vez gracias al acoplamiento de los Barcodes a cada muestra lo que permite que durante el análisis se identifique exactamente que secuencias pertenecen a cada muestra. El sistema MiSeq de Illumina, por su parte, es conveniente para

genomas pequeños como por ejemplo muestras bacterianas y amplicones produciendo hasta 1,5Gb de datos en 8 horas, debido a que produce varias copias del mismo fragmento corto de lectura su secuencia permite un mejor ensamblaje de contigs (Liu *et al.*, 2012).

### **5.9. Marcadores genéticos para la secuenciación de microorganismos**

Para el estudio de la dinámica de las comunidades microbianas en el suelo puede realizarse un estudio basado en marcadores genéticos, entre estos, regiones ITS para el estudio de comunidades de hongos y regiones 16S rRNA para comunidades bacterianas. Las regiones ITS son conocidas como las regiones inter espaciadoras de transcritos ribosómicos, esta región se ha establecido como el marcador universal para la identificación de grupos fúngicos pues ofrece la mejor resolución taxonómica comparada con marcadores de 18S rRNA y 28S rRNA, en especial las regiones ITS1 e ITS2. Su longitud varía entre 500 a 600pb dependiendo del linaje (Nilsson *et al.*, 2015).

Por otro lado, las regiones 16S rRNA codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal, en secuenciación se dirigen a un fragmento que presenta nueve regiones hipervariables (V1-V9), siendo la región V4 o las regiones V1-V3, V3-V5 las que presentan una mejor cobertura y resolución taxonómica que se encuentran ligadas a las bases de datos. Debido al tamaño de secuenciación de estos fragmentos la resolución taxonómica es mejor a nivel de familia, género o en un nivel superior (Earl *et al.*, 2018).

## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivo General**

Explorar las interacciones microbianas en la rizósfera de plántulas de *Inga* sp. en la Estación de Biodiversidad Tiputini en la Amazonía Ecuatoriana.

## **6.2. Objetivos Específicos**

Caracterizar el microbioma y el microbioma asociado a la rizósfera y suelo de plántulas de *Inga* sp. a través del secuenciamiento por NGS de marcadores genéticos ITS y 16S rRNA y análisis de datos utilizando el paquete bioinformático Qiime2.

Explorar la abundancia y la diversidad del microbioma asociadas a las raíces de plántulas de *Inga* sp. a través del secuenciamiento por NGS de marcadores genéticos ITS y 16S rRNA.

Identificar una posible relación entre las micorrizas y el microbioma frente a los hábitats naturales en los que se desarrollan las plantas de *Inga* sp. y frente a la época de recolección de muestras.

## METODOLOGÍA

### 1. Permisos de investigación

Para el desarrollo de la presente investigación se solicitó la revisión y aprobación de los protocolos llevados a cabo, mismos que fueron otorgados por el Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA) y por el Instituto de Microbiología de la USFQ. Además, el Ministerio del Ambiente aprobó la presente investigación en su contrato marco MAE-DNB-CM-2018-0085.

### 2. Financiamiento del Proyecto

El Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA) de la USFQ financió este proyecto junto con los Fondos Tiputini 2017 y 2018.

### 3. Recolección de muestras

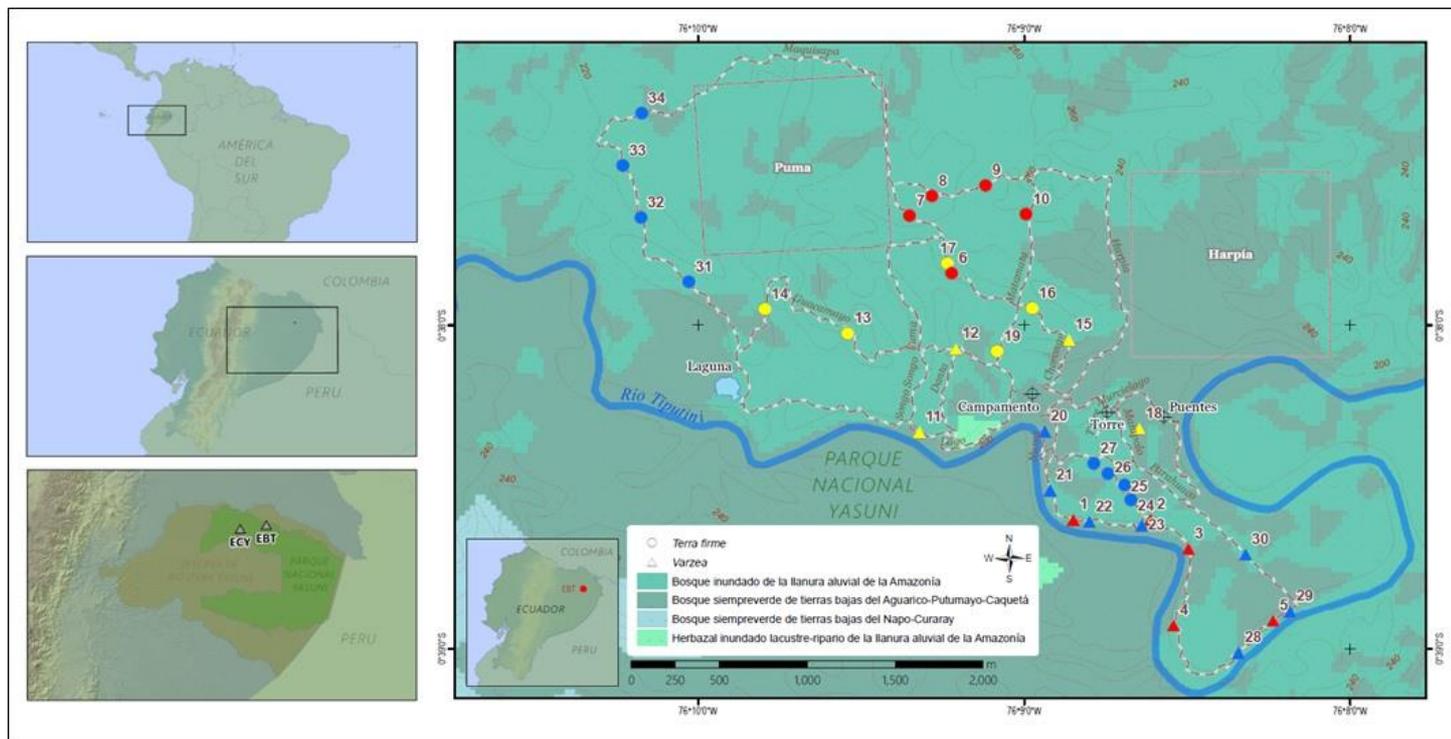
Se tomaron 19 muestras de rizósfera asociadas a plántulas de *Inga* sp. que crecían en dos ecosistemas, Bosque Terra Firme y Bosque Inundable Várzea en la Estación de Biodiversidad Tiputini (TBS) de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) ubicada en la Reserva de Biósfera Yasuní. Las muestras fueron recolectadas en dos salidas de campo, la primera realizada del 23 al 25 de noviembre de 2018 (Figura 1, puntos y triángulos de color rojo) y la segunda llevada a cabo el 12 al 16 de agosto de 2019 (Figura 1, puntos y triángulos de color amarillo). Dentro de los criterios de inclusión y exclusión se determinaron los siguientes:

Criterios de Inclusión:

- Plantas de *Inga* sp. con micorrizas.
- Muestras de rizósfera: suelo que circunda a la raíz.
- Plantas de *Inga* sp. que crecía en el Bosque Várzea y/o Bosque Terra Firme.

Criterios de Exclusión:

- Plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae* diferentes a *Inga* sp.
- Muestras de suelo de la Endosfera o capas diferentes a la rizósfera.
- Plantas de *Inga* sp. que crecen en bosques de Igapó o ecosistema Campinas.



**Figura 1.** Puntos de muestreo en la Estación de Biodiversidad Tiputini (TBS). (Triángulos: ecosistema Várzea; Círculos: ecosistema Terra Firme. Sitios de muestreo 1 al 19. Rojo: noviembre 2018; Amarillo: agosto 2019)

Inicialmente se realizó la identificación de plántulas de *Inga* entre mínimo 25 cm y de máximo 50 cm de altura, y que presentaron raquis alado, a continuación, se excavó alrededor de la planta con el fin de extraer todo el sistema radicular, se sacudió el exceso de suelo y se conservó únicamente el suelo adherido a las raíces. Posteriormente se raspó con una espátula el suelo adherido en las raíces y se recogieron muestras de aproximadamente 1,5 gramos de suelo en tubos Eppendorf de 2mL junto con la solución de preservación de suelos LifeGuard

(Qiagen, 2017). Las muestras de rizósfera fueron transportadas al campus de Cumbayá de la USFQ y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  con el fin de evitar la degradación del material genético.

#### **4. Extracción y cuantificación de ADN**

A partir de la muestra de rizósfera ( $< 2\text{g}$  de suelo) se extrajo el ADN total. En primer lugar, se realizó lisis mecánica utilizando perlas magnéticas, a continuación, se realizó la extracción y purificación del ADN utilizando el kit *DNeasy PowerSoil* y siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, 2017). Se utilizó el espectrofotómetro Nanovue para cuantificar el ADN obtenido. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y enviadas a la empresa Baseclear en Leiden – Holanda para su respectivo secuenciamiento.

#### **5. Preparación de Librerías y Secuenciamiento**

El secuenciamiento se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiSeq. La preparación de librerías fue realizada utilizando primers que amplificaban la región del ADN que codifica para ITS1 y ITS2; también se amplificó la región 515F-806R que codifica para la región V4 del 16S rRNA. Ambas regiones fueron amplificadas y secuenciadas en ambos sentidos en el laboratorio Baseclear. Se utilizó PhiX como control de secuenciamiento (BaseClear, 2020).

Se obtuvieron las lecturas de las secuencias en formato FASTQ, así como también la evaluación de la calidad de las secuencias procesadas por Baseclear.

#### **6. Análisis Bioinformático**

Los datos de las secuencias crudas fueron analizados utilizando el paquete bioinformático QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) versión 2020.6 (Caporaso, *et. al.*,

2011). QIIM2 es una plataforma públicamente abierta y accesible que permite realizar análisis bioinformático de microbiomas, que le permite al investigador obtener gráficos y estadísticas explicativas de la composición del microbioma a partir de secuencias crudas de nucleótidos tras aplicar varios comandos en la terminal.

### **6.1. Construcción de la Metadata, Demultiplexing y Denoising**

La metadata incluía información como el ID de las muestras, el ecosistema en donde se recolectó cada muestra (Terra Firme o Várzea), el año de muestreo (2018 o 2019) y el mes de muestreo (noviembre 2018 o agosto 2019) (Anexo B). Se utilizó Keemei *add-on* para validar la metadata (Ram, *et. al.*, 2016). A continuación, se importó en la terminal el archivo demultiplexeado, y se llevó a cabo el proceso de denoising utilizando el paquete DADA2 (Callahan, *et. al.*, 2016) tanto en las secuencias obtenidas a partir del secuenciamiento en sentido forward como en sentido reverse. Se utilizó el comando `qiime dada2 denoise-paired` con un `trim left` de 10 y un `trunc-len` de 290. El denoising permitió llevar a cabo un control de calidad de las secuencias demultiplexeadas en donde las secuencias de amplicones fueron corregidas y las secuencias control PhiX y las secuencias quiméricas fueron removidas. Como resultado se obtuvieron 3 archivos: la feature table o tabla de ASVs, la tabla de secuencias representativas y una tabla de estadísticas (Caporaso, *et. al.*, 2011).

### **6.2. Análisis de Alfa y Beta diversidad**

Los análisis de diversidad necesitan un árbol filogenético enraizado para realizar las métricas de diversidad de Faith, Weighted y Unweighted UNIFRAC, este árbol fue generado utilizando el pipeline `qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree`. La diversidad alfa mide la riqueza y la homogeneidad de los taxones en cada muestra, mientras

que la diversidad beta mide las diferencias del microbioma entre las muestras, para ambos análisis se aplicó el comando `qiime diversity core-metrics-phylogenetic` con una profundidad de muestreo de 5500 en la rarefacción de las secuencias pertenecientes a ITS, mientras que para las secuencias de 16S rRNA se utilizó una profundidad de muestreo de 18000 (Caporaso, *et. al.*, 2011). Las variables analizadas fueron el ecosistema (Terra Firme y Várzea) y la fecha de muestreo (noviembre 2018 y agosto 2019).

El análisis de las secuencias ITS se realizó en 3 niveles: 1) de manera general en donde se incluyeron todos los ASVs, 2) Filtrando y analizando los ASVs que pertenecían únicamente al reino *Fungi* y 3) Filtrando y analizando los ASVs pertenecientes al filo *Glomeromycota*. Para realizar estos análisis fue necesario filtrar la feature table utilizando el plugin `q2-taxa` y el comando `qiime taxa filter-table` y generando dos nuevas feature table 1) solo con ASVs del reino *Fungi* y 2) solo con ASVs de *Glomeromycota*. La profundidad de muestreo para *Fungi* fue de 10000 mientras que para el filo *Glomeromycota* fue de 96.

La diversidad alfa fue calculada utilizando los índices de Shannon, Faith y Evenness; en cada métrica se realizó la prueba estadística de *Kruskal-Wallis* tomando como significativo un  $p < 0,05$  (Kruskal, *et. el.*, 1952).

La diversidad beta fue calculada realizando matrices de distancia de Bray Curtis, Jaccard, Unweighted UNIFRAC y Weigted UNIFRAC. Para cada métrica se realizó un teste estadístico de PERMANOVA considerando significativo valores  $p < 0,05$  (Anderson, 2001).

### **6.3. Análisis Taxonómico**

La asignación taxonómica de los ASVs se realizó aplicando el plugin `q2-feature-classifier`, tomando UNITE como base de datos para las secuencias ITS y la base de datos de GreenGenes para las secuencias de 16S rRNA. La composición taxonómica pudo ser

visualizada al graficar los taxa bar plots para todos los ASVs de ITS, para los ASVs de *Fungi*, para los ASVs de *Glomeromycota* y para los ASVs obtenidos del análisis de 16S rRNA. Para estos análisis se utilizó el comando `qiime taxa barplot` directamente para los ASVs totales, pero para el reino *Fungi* y el filo *Glomeromycota* previamente se realizó una filtración de la feature table utilizando el comando `qiime taxa filter-table` e incluyendo respectivamente el `k_Fungi` y el `p_Glomeromycota`. Finalmente, se calculó la abundancia relativa de cada taxón en diferentes niveles taxonómicos (Caporaso, *et. al.*, 2011).

#### **6.4. Análisis de Abundancia Diferencial**

Los análisis de abundancia diferencial permiten identificar los ASVs que son abundantemente diferentes a través de los grupos en los que se compara. Estos análisis se los puede realizar a través del Análisis de composición de microbiomas (ANCOM) y/o a través de Gneiss (Caporaso, *et. al.*, 2011).

En el análisis de ANCOM se utilizó el plugin `q2-composition` para comparar las features entre los diferentes grupos a través de cada nivel taxonómico. Para esto, la feature table fue colapsada utilizando el comando `qiime taxa collapse` y especificando el nivel taxonómico. A continuación, el comando `qiime composition add-pseudocount` fue aplicado con el fin de ajustar las frecuencias de las features para que sean diferentes de cero. Por último, cada variable dicotómica (ecosistema y fecha de muestreo) fue analizada utilizando el comando `qiime composition ancom` con el fin de generar un archivo visualizable que muestra el ANCOM Volcano plot, los valores W, los clr y los percentiles (Mandal, *et. al.*, 2015).

Por otro lado, en el análisis de Gneiss se utilizó el plugin `q2-gneiss` para realizar el análisis de abundancia diferencia basados en agrupamientos de correlación. Se aplicó el

comando `qiime gneiss correlation-clustering` para crear un árbol dependiendo de la frecuencia con la que co-ocurren los ASVs en cada grupo. Finalmente, se crearon los gráficos de biplots utilizando el comando `qiime gneiss balance-taxonomy` en donde se especificó cada nivel taxonómico a analizar. Estos gráficos mostraron una comparación de las proporciones de 10 ASVs más abundantes en cada categoría de las variables dicotómicas analizadas (Morton *et al.*, 2017).

## RESULTADOS

### 1. Análisis de muestras y denoising

Se recolectaron 19 muestras, en dos diferentes ecosistemas; 10 pertenecientes al ecosistema de Terra Firme y 9 al ecosistema de Várzea. Además, se recolectaron muestras en dos diferentes épocas del año, 10 muestras fueron recolectadas en noviembre de 2018 y 9 muestras en agosto de 2019.

Los resultados del secuenciamiento mostraron un total de 1 207 868 secuencias crudas (paired end) pertenecientes al marcador genético ITS. Tras realizar el denoising, se identificaron 5 776 secuencias representativas bajo una calificación de calidad de 30. Bajo estos parámetros, 5 muestras tuvieron que ser excluidas debido al bajo número de recuento de features (las muestras eliminadas fueron la A1, A3, A6, A10 y A15) quedando 8 muestras de Terra Firme y 6 de Várzea.

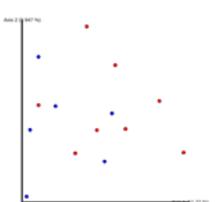
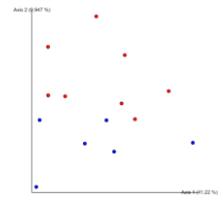
En cuanto a los resultados de las secuencias crudas correspondientes al marcador genético 16S rRNA se observó que, a pesar de haber secuenciado por ambos sentidos, las secuencias obtenidas en sentido reverso no fueron de buena calidad por lo que el incluirlas reflejaba en una pérdida de ASVs, por lo que se trabajó únicamente con las secuencias en sentido forward en donde se identificó 605 112 secuencias crudas (single ended). Después de realizar el denoising bajo el pipeline de DADA2 se obtuvieron 4 277 secuencias representativas. Al igual que en las secuencias correspondientes a ITS, las mismas 5 muestras tuvieron que ser descartadas por bajo número de features.

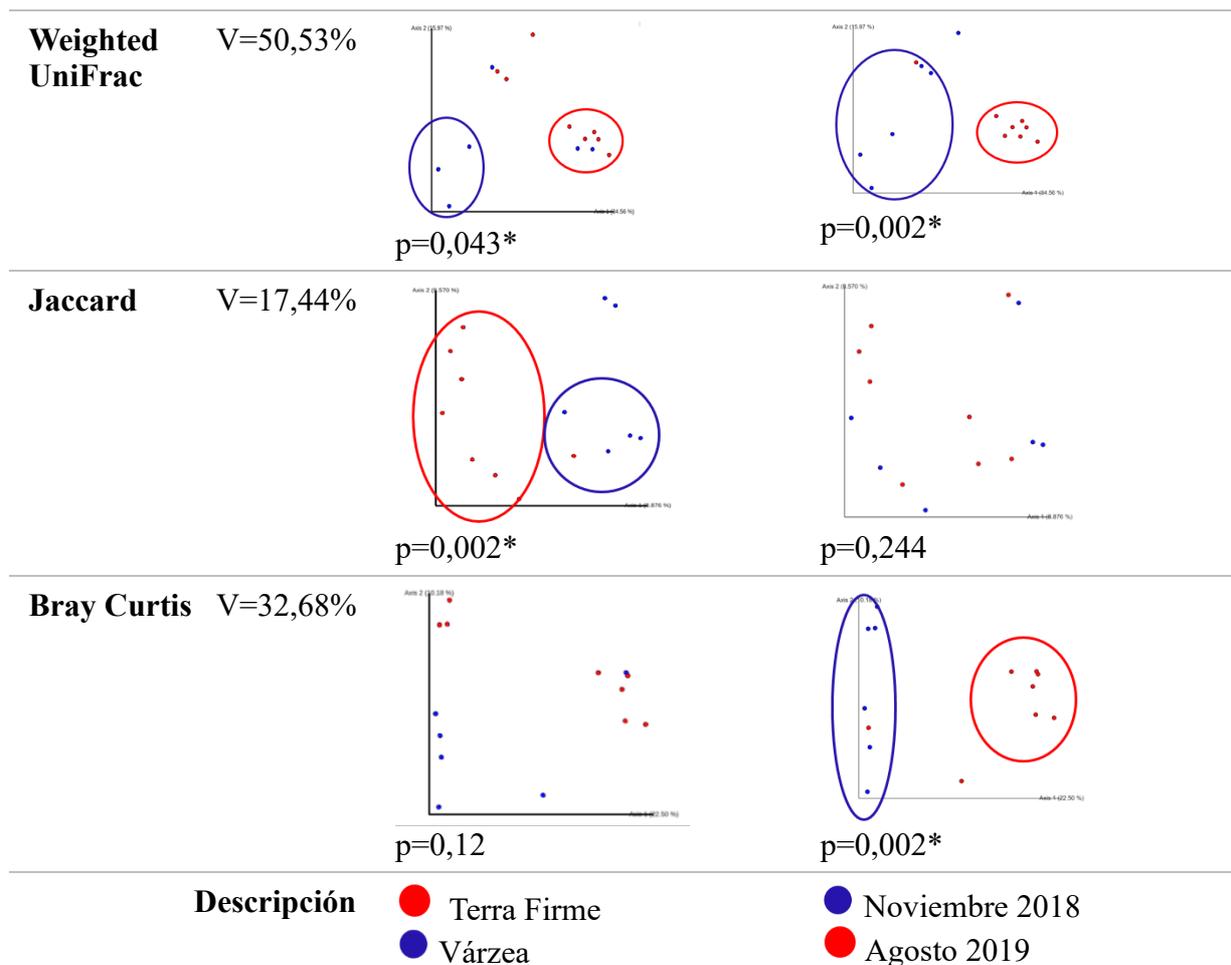
### 2. Alfa y Beta Diversidad del microbioma asociado a la rizósfera de *Inga* sp.

Tras realizar los análisis de diversidad alfa para las secuencias pertenecientes al marcador genético ITS, se logró observar que de manera general no hubo diferencia significativa cuando

se analizó la variable ecosistema y la variable fecha de muestreo ( $p > 0,05$ ). Una vez filtrados los ASVs pertenecientes solo al reino *Fungi*, se pudo identificar que los índices de Evenness y Shannon fueron estadísticamente significativos para fecha de muestreo ( $p = 0,01$  y  $p = 0,04$ , respectivamente), sin embargo, al analizar el ecosistema se pudo observar que ningún índice fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ). Finalmente, al tomar en cuenta solo los ASVs pertenecientes al filo *Glomeromycota* se pudo observar que no hubo diferencia significativa para ninguna de las variables analizadas ( $p > 0,05$ ) (Anexo C).

Los análisis de beta diversidad para las secuencias de ITS mostraron que al incluir todos los ASVs se observaron agrupamientos bajo los índices de Jaccard, Weighted UNIFRAC y Unweighted UNIFRAC ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,04$  y  $p = 0,04$ , respectivamente) al analizar la variable ecosistema, pero al analizar la variable fecha de muestreo Bray Curtis y Weighted UNIFRAC formaron agrupaciones ( $p = 0,002$ ). Tomando en cuenta solo los ASVs pertenecientes al reino *Fungi*, se logró observar agrupaciones bajo los índices de Jaccard y Unweighted UNIFRAC ( $p = 0,003$  y  $p = 0,03$ , respectivamente) para la variable ecosistema, mientras que para la variable fecha de muestreo los índices Bray Curtis y Weighted UNIFRAC fueron significativos ( $p = 0,003$ ). Finalmente, tomando en cuenta solo los ASVs del filo *Glomeromycota*, se pudo observar que ningún índice fue estadísticamente significativo ni para la variable ecosistema ni para la variable fecha de muestreo ( $p > 0,05$ ) (Figura 2) (Anexo C).

Índice	Varianza	Ecosistema	Fecha de muestreo
Unweighted UniFrac	V=21,16%	 p=0,03*	 p=0,11



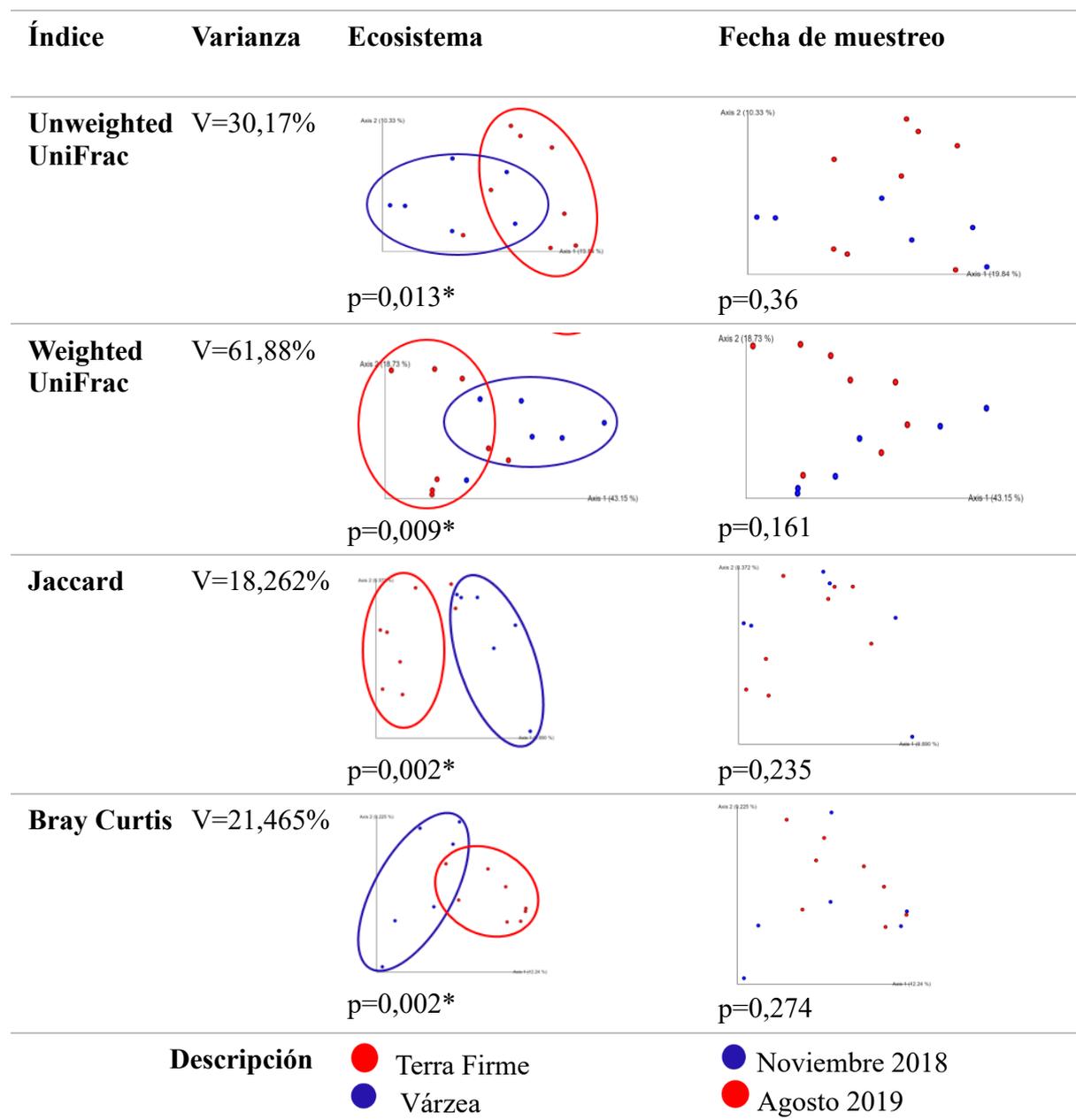
**Figura 2.** Análisis de Beta diversidad para las secuencias de ITS de las comunidades de bacterias y Archeae en la rizósfera de plántulas del género *Inga*, utilizando QIIME2.

### 3. Alfa y Beta Diversidad del microbioma asociados a la rizósfera de *Inga* sp.

Los análisis de alfa diversidad de las secuencias correspondientes al 16S rRNA revelaron que solo el índice de Evenness fue significativo ( $p=0,03$ ) cuando se analizó a variable ecosistema y que frente a la variable fecha de muestreo no hubo diferencias significativas ( $p>0,05$ ) (Anexo D).

El análisis de beta diversidad permitió ver agrupaciones cuando se analizó el ecosistema bajo cada una de las métricas (Bray Curtis  $p=0,002$ , Jaccard  $p=0,002$ , Weighted UNIFRAC

$p=0,009$  y Unweighted UNIFrac  $p=0,013$ ). Este no fue el caso para la variable fecha de muestreo en donde ningún índice fue significativo ( $p>0,05$ ) (Figura 3) (Anexo D).



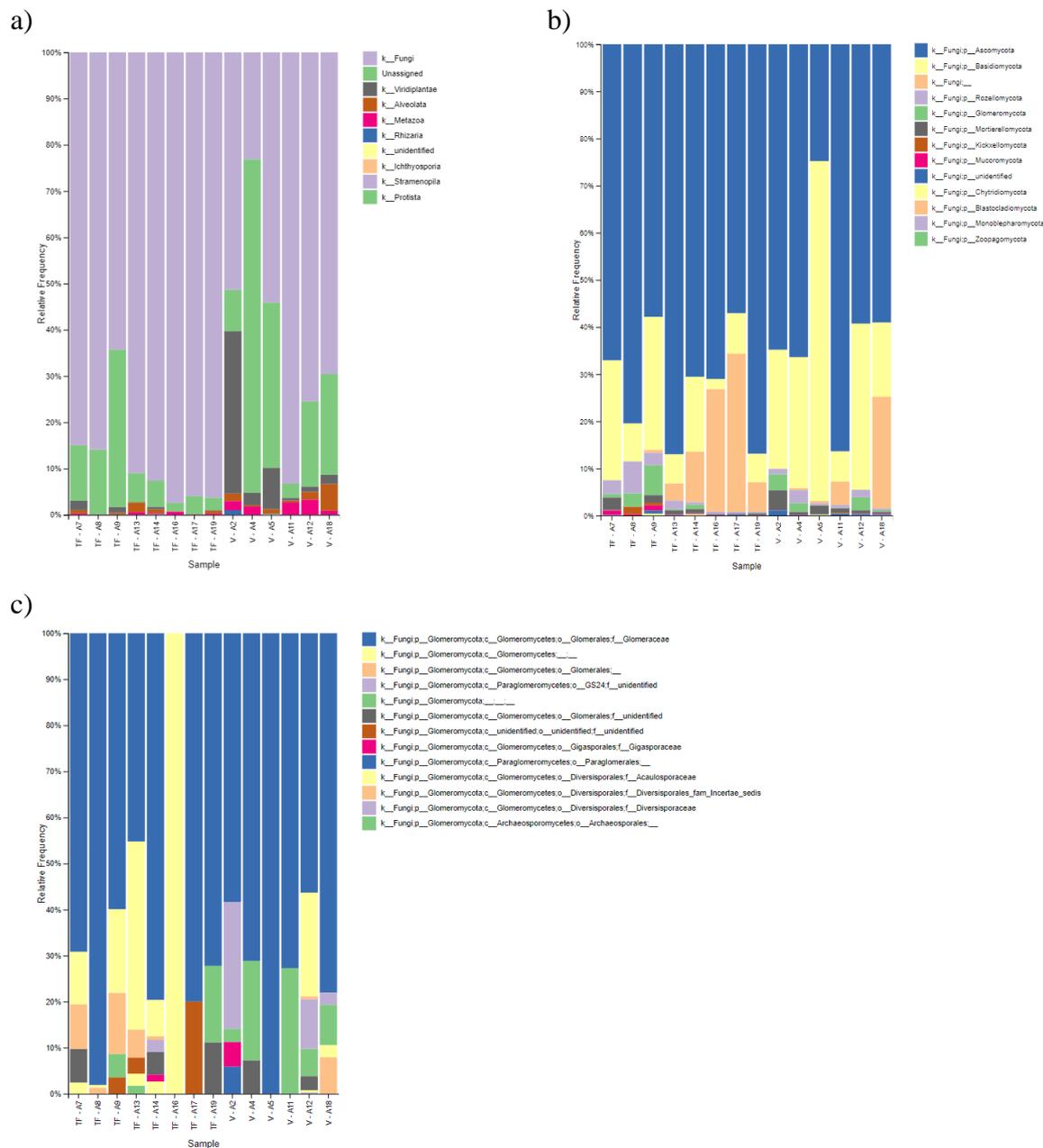
**Figura 3.** Análisis de Beta diversidad para las secuencias de 16S rRNA de las comunidades de bacterias y Archeae en la rizósfera de plántulas del género *Inga*, utilizando QIIME2.

#### 4. Composición fúngica asociada a la rizósfera de *Inga* sp.

A través del análisis taxonómico de las secuencias correspondientes a ITS, se pudo identificar que del microbioma asociado a la rizósfera de *Inga* sp. estaba descrito por 522 421 ASVs. De manera general se identificaron 10 reinos, 8 de los cuales estaban previamente descritos y 2 que aún no fueron identificados. Se observó que el reino predominante fue *Fungi* (77,52%), seguido por un reino no identificado representado por el 16,9% de los ASVs, a otros reinos con baja abundancia (Figura 4a).

Tras filtrar la tabla de ASVs con el fin de conservar las secuencias pertenecientes solo al reino *Fungi*, se identificó que en sus 404 968 ASVs existían 13 filos, 11 previamente descritos y 2 no identificados. En orden descendiente de abundancia se encontraron presentes los filos *Ascomycota* en un 68,6%, *Basidiomycota* en 18,59%, *Rozellomycota* en 2,06% y asombrosamente el filo *Glomeromycota* en un 1,42% y el 9,26% restante pertenecía a filos con menor abundancia (Figura 4b).

Al enfocarse específicamente en el filo *Glomeromycota* representado por 5747 ASVs, se encontró que estaba conformado por 13 familias, 4 familias previamente identificadas y 9 no identificadas. La familia predominante fue *Glomeraceae* con el 72,23%, la segunda familia identificada fue *Gigasporaceae* con el 0,57%, *Acaulosporaceae* con el 0,49%, y *Diversisporaceae* con el 0,03%, el 26,68% restante correspondió a ASVs que no se asignaron a ninguna familia (Figura 4c).

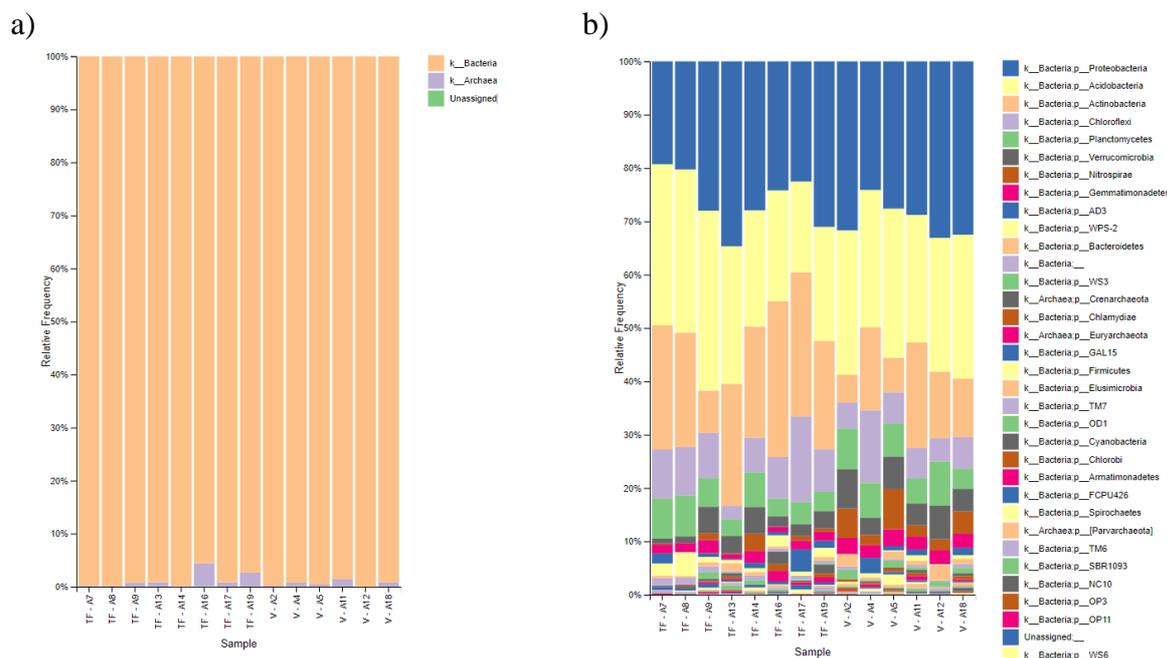


**Figura 4.** Composición micobiana asociada a la rizósfera de *Inga* sp. tomando en cuenta: a) todas las ASVs obtenidas de las ITS, b) ASVs pertenecientes al reino Fungi y c) ASVs del filo Glomeromycota.

## 5. Composición bacteriana de la rizósfera de *Inga* sp.

Al analizar la composición dentro de las secuencias obtenidas a partir del análisis del 16S rRNA, se identificaron 336 280 ASVs los cuales estaban representados por el 99,04% por el reino Bacteria, 0,96% por el reino Archaea y un porcentaje muy bajo no pudo ser asignado

(Figura 5a). A nivel de filo se identificaron 37 filios, 3 de los cuales pertenecían al reino Archaea, 1 filo a un reino no identificado previamente y 33 filios correspondientes a Bacteria. En orden descendente los filios pertenecientes a Bacteria estuvieron presentes en 28% el filo *Proteobacteria*, 25,79% *Acidobacteria*, 16,7% *Actinobacteria*, 7,46% *Chloroflexi*, 5,56% *Planctomycetes*, 4% *Verrucomicrobia* y 2,28% *Nitrospirae* y el 10,21% correspondió a 26 filios restantes (Figura 5b).



**Figura 5.** Composición microbiana asociada a la rizósfera de *Inga* sp. a) A nivel de reino y b) A nivel de filo.

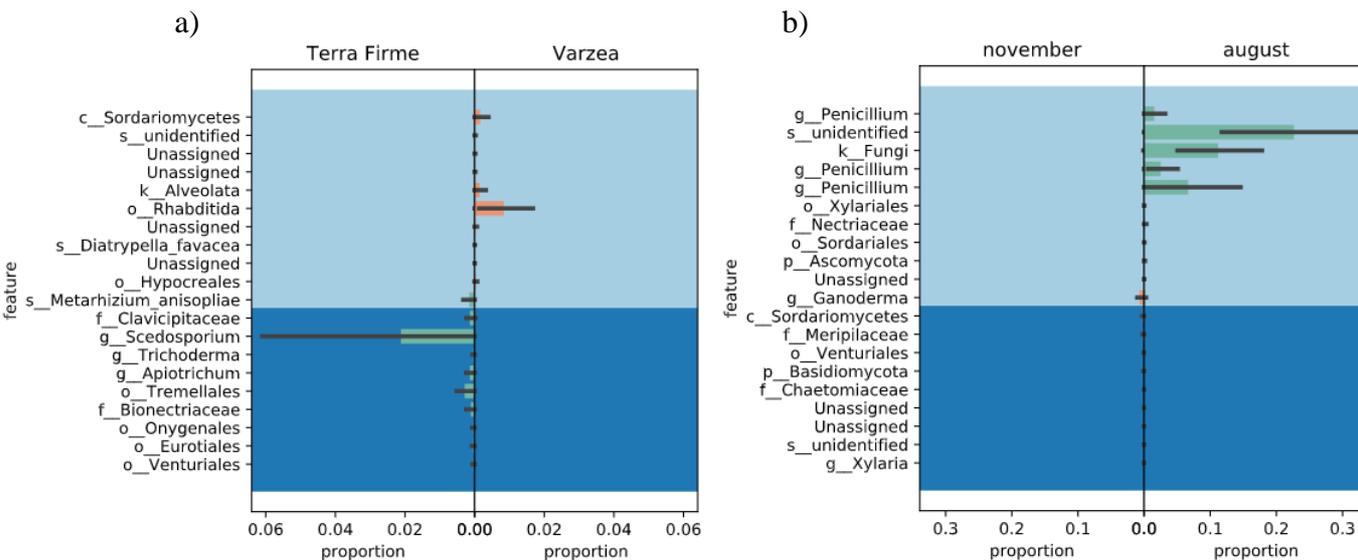
Se observó que el patrón de composición taxonómica fue similar entre las muestras, cuando se analiza tanto el lugar de muestreo como la fecha de muestreo, sin embargo, las proporciones fueron diferentes.

## 6. Comparación del microbioma entre los ecosistemas y entre fecha de muestreo

En el análisis de abundancia diferencial por ANCOM se intentó identificar el o los taxones abundantemente diferenciales al comparar los ecosistemas (Terra Firme vs Várzea) y al comparar la fecha de muestreo (noviembre 2018 vs agosto 2019).

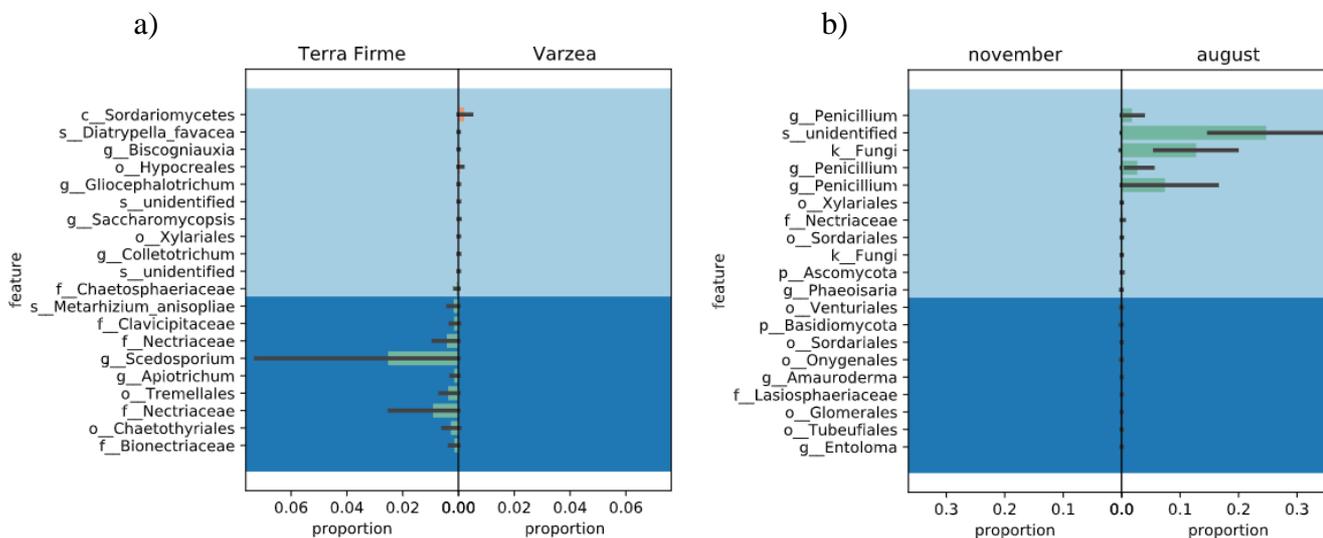
Al analizar todas las secuencias de ITS no se identificaron taxones abundantemente diferenciales para la variable ecosistema pero para la variable fecha de muestreo se observó que el taxón *k\_Fungi;p\_Basidiomycota;c\_Agaricomycetes;o\_Trechisporales* ( $W=144$ ,  $clr=2,43$ ) fue más abundante en Agosto 2019 al analizar en nivel taxonómico 6. Al analizar solo los ASVs pertenecientes al *Fungi*, tampoco existió un taxón abundantemente diferencial para la variable ecosistema, pero cuando se analizó fecha de muestreo el mismo taxón más abundante en agosto 2019 ( $W=70$ ,  $clr=3,05$ ). Finalmente, al analizar solo las secuencias pertenecientes al filo *Glomeromycota* no se identificaron taxones que diferían en cuanto a la fecha de muestreo, pero si hubo taxones diferentes por ecosistema. Así se presentó que dos taxones de clase no identificada ( $W=1$ ,  $clr=1,41$  y  $W=1$ ,  $clr=-0,99$ ) fueron abundantemente diferenciales en el Ecosistema Terra Firme.

Tras realizar el análisis de abundancia diferencial utilizando métricas de Gneiss se logró observar que cuando se analizan todos los ASVs existen un taxon de clase Sordariomycetes, un taxón del reino Alveolata y un taxón del orden Rhabditida que son más abundantes en el ecosistema Várzea mientras que en el ecosistema Terra Firme fue más abundante un taxón del género *Scedosporium* (Figura 6a). En cuanto a la fecha de muestreo se identificó que existen tres taxones perteneciente al género *Penicillum*, un taxón no identificado y un taxón del reino Fungi que son más abundantes en Agosto 2019 (Figura 6b).



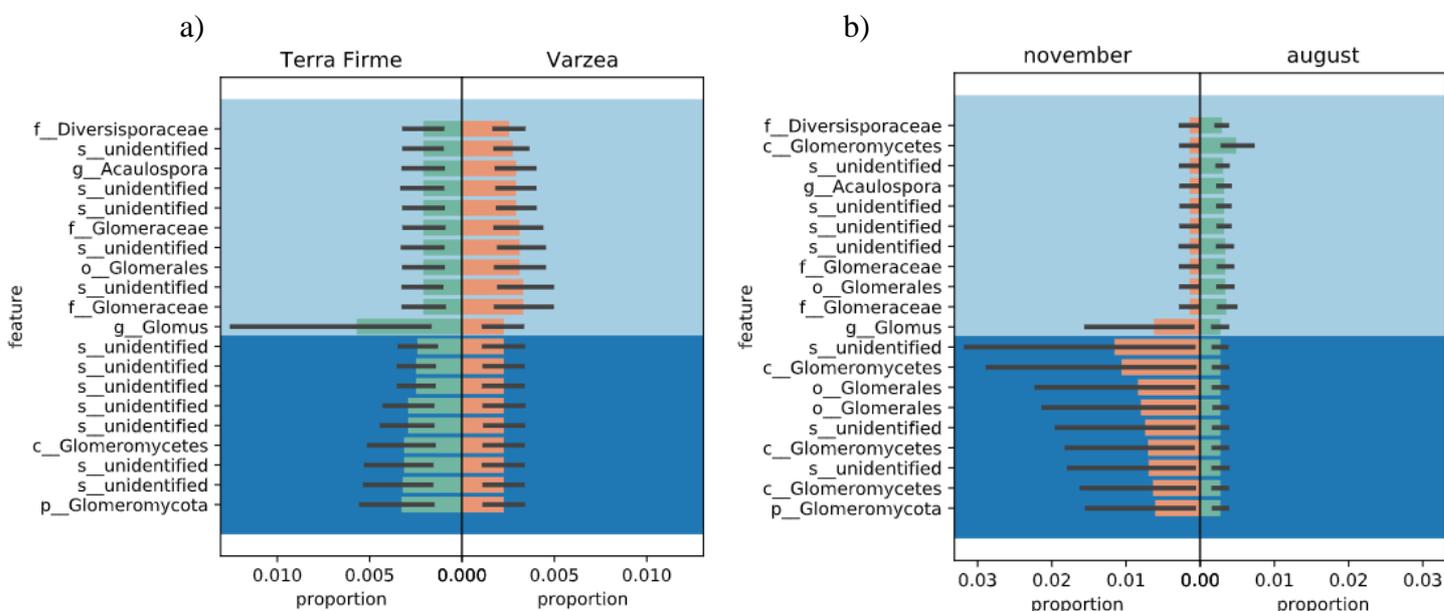
**Figura 6.** Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las ASVs totales de ITS, enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: Noviembre 2018 y Agosto 2019.

Cuando se analizan los ASVs solo del reino *Fungi*, se puede observar que el taxón más abundante en Várzea fue de la clase *Sordariomycetes* mientras que para Terra Firme fue un taxón del género *Scedosporium* y dos miembros de la familia *Nectriaceae* (Figura 7a). Al evaluar la fecha de muestreo se encontró que tres taxones del género *Penicillium*, un taxón de especie no identificado y un taxón de reino *Fungi* fueron abundantemente diferenciales en agosto 2019 (Figura 7b). Estos resultados son similares a los obtenidos al analizar los ASVs totales.



**Figura 7.** Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las ASVs del reino Fungi, enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: noviembre 2018 y agosto 2019.

Finalmente, al analizar únicamente los ASVs del filo Glomeromycota se observó que el género *Glomus* fue más abundante en Terra Firme (Figura 8a). Cuando se analizó por fecha de muestreo se observó que un taxón de especie no identificada y un taxón de clase *Glomeromyces* estuvieron más abundantes en noviembre 2018 (Figura 8b). Los otros taxones tuvieron proporciones similares tanto al comparar Terra Firme frente a Várzea como al comparar noviembre 2018 vs agosto 2019.



**Figura 8.** Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las ASVs del filo Glomeromycota, enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: Noviembre 2018 y Agosto 2019.

## 7. Comparación de la composición bacteriana entre los ecosistemas y entre fecha de muestreo

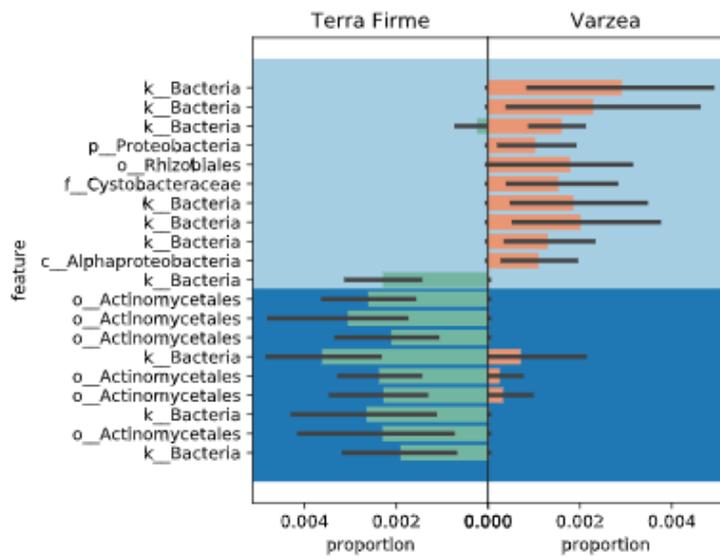
Los resultados obtenidos del análisis de abundancia diferencial de ANCOM indican que para la variable ecosistema en nivel taxonómico 4 correspondiente a orden, existen varios taxones abundantemente diferenciales. Para el ecosistema Várzea los filios Acidobacteria

(W=36, clr=2,53), Actinobacteria (W=9, clr=3,05) y Chloroflexi (W=5, clr=1,72) fueron abundantemente diferenciales, mientras que el taxón perteneciente al p\_Proteobacteria; c\_Gammaproteobacteria;o\_Pseudomonadales (W=4, clr=-1,29) y el taxón p\_Proteobacteria;c\_Alphaproteobacteria;o\_Caulobacterales (W=2, clr=-0,96) fueron abundantemente diferenciales para el ecosistema Terra Firme. Cuando se evaluó la variable fecha de muestreo se observó que en ningún nivel taxonómico hubo un taxón abundantemente diferencial.

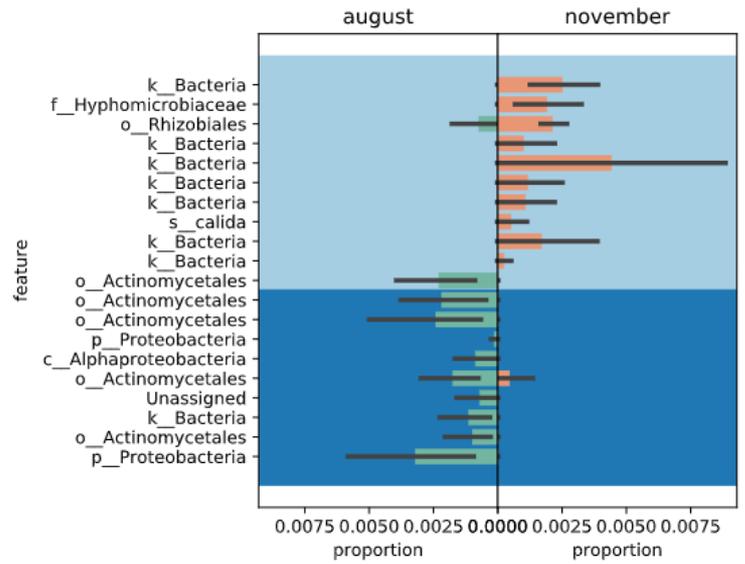
Usando el análisis de abundancia diferencial balanceada de Gneiss de las secuencias 16S rRNA y comparar los ecosistemas Terra Firme vs Várzea se observó que 6 taxones pertenecientes al reino Bacteria, un taxón del filo Proteobacteria, un taxón del orden Rhizobiales, uno de la familia *Cystobacteraceae* y uno perteneciente a la clase Alphaproteobacteria fueron más abundantes en el ecosistema de Várzea. Mientras que para el ecosistema Terra Firme 4 taxones correspondientes al reino Bacteria y 6 pertenecientes al orden Actinomycetales fueron más abundantemente (Figura 9a).

Cuando se analizó la variable fecha de muestreo se obtuvo que 7 taxones pertenecientes al reino Bacteria, un taxon de la familia *Hyphomicrobiaceae*, un taxón del orden Rhizobiales y un taxón de especie *Nitrospira calida* fueron más abundantemente en noviembre 2018, mientras que 5 taxon del orden Actinomycetales, dos taxones del filo Proteobacteria, un taxón de clase Alphaproteobacteria, un taxón del reino Bacteria y un taxón desconocido fueron más abundantes en Agosto 2019 (Figura 9b).

a)



b)



**Figura 99.** Comparación de la abundancia relativa utilizando métricas de Gneiss en las secuencias de 16S rRNA enfrentando a) Ecosistema: Terra Firme y Várzea y b) Fecha de muestreo: Noviembre 2018 y Agosto 2019.

## DISCUSIÓN

Las micorrizas arbusculares representan una asociación simbiótica con aproximadamente el 85% de las plantas vasculares (Garcés-Ruiz, *et. al.*, 2019), entre ellas las plantas de la familia *Fabaceae* como son las del género *Inga*. Este género también establece asociaciones con microorganismos como las micorrizas y las bacterias fijadoras de nitrógeno y es capaz de transformar el nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable (Soto, *et. al.*, 2012). A través del análisis molecular por secuenciación de muestras de rizósfera de *Inga* se pudo identificar que todas las muestras presentaron hongos micorrícicos arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno en diferentes proporciones. El secuenciamiento en la plataforma de Illumina MiSeq se llevó a cabo en esta investigación debido a su robustez en la caracterización de secuencias cortas de amplicones en muestras ambientales, además su precisión es de 99,9%, logra leer hasta 300 nucleótidos, presenta un alto rendimiento, produce gran cantidad de datos a bajo costo, hasta 1,5Gb por cada corrida a aproximadamente a \$10 por muestra (Garrido-Cárdenas, *et. al.*, 2017; Liu, *et. al.*, 2012).

En el presente estudio se recolectaron 19 muestras, sin embargo, tras el denoising 5 muestras tuvieron que ser removidas del análisis por presentar pocos recuentos de features, esto se atribuye a una posible degradación de los de ácidos nucleicos. Cabe recalcar que el remover estas muestras del análisis no implicó variaciones en el análisis de la comunidad microbiana debido a que no eran representativas. Una limitación del estudio es el número pequeño de muestra, sin embargo, a nivel ecológico se ha establecido que los cambios en la composición del suelo y la influencia de los factores bióticos y abióticos tienen un fuerte impacto en la estructura de la comunidad microbiana asociada a la planta hospedera (Ritter, *et. al.*, 2018). Estas muestras se recolectaron en la TBS de la USFQ el cual es un ambiente neotropical con alta heterogeneidad en la Amazonía, tanto en suelos como en vegetación y posiblemente en microorganismos, debido a que TBS presenta bosques tropicales que aún no han sido

investigados por la parte microbiana y también debido a que no se tiene conocimiento de las interacciones planta-microorganismos (Cisneros-Heredia, 2003).

### **1. Diversidad microbiana asociada a la rizósfera del genus *Inga***

La riqueza y la homogeneidad de cada muestra de rizósfera de *Inga*, es decir la alfa diversidad, sugirieron que no existe diferencia entre el ecosistema de Terra Firme y Várzea ni entre las épocas de muestreo. Según Ritter, *et. al.*, (2020) esto se debe a que diferentes áreas en la Amazonía pueden presentar similar riqueza de especies, pero diferente composición y también debido a que la abundancia y la riqueza de los microorganismos no cambian drásticamente entre diferentes épocas del año. Existió la excepción para la homogeneidad y la riqueza, medida a través del índice de Evenness y Shannon, respectivamente, para época de muestreo de los ASVs solo del reino Fungi, en donde noviembre 2018 presentó mayor diversidad y riqueza que en agosto 2019; y también con la excepción de la homogeneidad por ecosistema para las secuencias 16S rRNA, en donde el ecosistema Terra Firme presentó mayor diversidad que el ecosistema Várzea similar a lo indicado por Ritter, *et. al.*, (2020), que a pesar de sonar contradictorio los hábitats que presentan menor fertilidad, son normalmente los hábitats con mayor diversidad microbiana. Estas variaciones del microbioma en la capa superficial del suelo en donde se desarrollan las raíces de la planta pueden estar influenciadas por la planta hospedera, por composición orgánica del suelo, por las características edáficas del suelo y por las condiciones climáticas del ambiente, como pueden ser las lluvias, las inundaciones la temperatura, el pH, la humedad, los minerales del suelo y por la composición de los microorganismos (Buee, *et. al.*, 2009; Zhao, *et. al.*, 2020). Se descartó que la planta hospedera haya sido un factor de influencia debido a que se muestrearon únicamente plántulas del género *Inga*.

El pH del suelo y sus minerales son los factores que mayor influencia tienen en la composición de la comunidad microbiana. Los suelos de los bosques ocasionalmente inundables como Várzea tienden a tener un pH ligeramente más ácido (Randall, 2017). Lo que concordó con lo obtenido en donde el pH de Terra Firme fue de 4,92 mientras que el de Várzea fue de 4,65. Esta ligera variación de pH pudo tener su efecto en la diferenciación de las comunidades bacterianas y micobianas al analizar la beta diversidad. Las secuencias ITS mostraron agrupaciones por ecosistema al analizar los índices de Jaccard, Weighted y Unweighted UniFrac mientras que al analizar las secuencias 16S rRNA las agrupaciones fueron evidentes bajo todos los índices. A pesar de que los hongos son menos sensitivos a los cambios de pH y presentan un rango amplio de pH en el que crecen sin inhibición de su desarrollo se puede decir que posiblemente el pH y otras condiciones tienen efecto sobre la comunidad de microorganismos. Por otro lado, Rousk, *et. al.*, (2010) indica que la rizósfera provee de un ambiente amortiguador en el que los cambios en el ambiente del suelo no resultan en variaciones en la comunidad fúngica asociada a la rizósfera, sin embargo, este hecho no lo observamos en el presente estudio. Para la comunidad bacteriana el pH, los nutrientes y en menor grado las condiciones climáticas están fuertemente correlacionadas con los cambios en la composición, riqueza y abundancia de la comunidad (Bahram, *et. al.*, 2018). Rousk, *et. al.*, (2010) indican que, la diversidad bacteriana en el suelo está estrechamente relacionada con el pH *in situ*, existiendo cambios en la comunidad por rangos de pH de hasta 0,5, esto se debe a que existen taxones bacterianos que crecen óptimamente en rangos de pH estrechos, lo que concuerda con las agrupaciones observadas al analizar las secuencias 16S rRNA por ecosistema.

Las condiciones edáficas como los nutrientes del suelo pueden formar nichos especializados en un determinado ambiente, por lo que variaciones ambientales pueden influir directamente en la comunidad microbiana. En el estudio de Barnes, *et. al.*, (2016) se indica que

los nutrientes como P, K, Mg, C y N pueden explicar las variaciones de la comunidad microbiana. Esto se corroboró con la observación de las agrupaciones tanto para las secuencias ITS como para las secuencias 16S rRNA y también gracias a que Hickey (2020) en su estudio de las condiciones edáficas del suelo de la TBS logró identificar que el ecosistema Terra Firme presentó mayor cantidad de N, Mo y V mientras que el ecosistema Várzea es rico en P, Mg, Ca, Cu, Mn, Na, Co, Ba. Ritter, *et. al.*, (2020) menciona que el bosque Terra Firme presenta un suelo más pobre comparado con el bosque Várzea que presenta mayor fertilidad y más macro y micronutrientes. Estos datos nos puedan dar un indicio para sospechar que el ecosistema Terra Firme logra establecer más asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno mientras que el ecosistema Várzea logra establecer mayor cantidad de asociaciones con los hongos micorrícicos arbusculares por la presencia más elevada de fósforo. Sin embargo, se identificó por análisis de beta diversidad exclusivamente de los ASVs correspondientes al filo *Glomeromycota* que no existe diferencia significativa entre los dos ecosistemas. Mientras, que la comunidad bacteriana si fue diferente entre los dos ecosistemas. Se sospechaba que el ecosistema Várzea al ser un suelo con mayor cantidad de nutrientes no formaría asociaciones simbióticas con microorganismos debido a que los nutrientes y la materia orgánica están disponibles para las plantas y que, el ecosistema Terra Firme formaría pocas asociaciones y tendría menor abundancia y diversidad debido a su baja concentración de ciertos nutrientes puesto que con las precipitaciones sus suelos tenderían a lixiviar los nutrientes (Ritter, Dunthorn, Anslan, de Lima, *et. al.*, 2020). Sin embargo, a través del análisis molecular se logró identificar que en la rizósfera de las plántulas de *Inga* se encontraban micorrizas arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno en ambos ecosistemas. En el ecosistema Terra Firme, el fósforo y el nitrógeno son nutrientes que presentan rápida lixiviación, mineralización y tienden a ser los nutrientes limitantes para el crecimiento de las plantas, por lo que para mejorar su absorción las plantas establecen asociaciones simbióticas por vía de las ácido fosfatasas con

hongos micorrícicos y con bacterias fijadoras de nitrógeno las cuales almacenan estos nutrientes y los vuelven disponibles durante periodos de rápida mineralización o de lixiviación (Randall, 2017). En cambio, en el ecosistema Várzea el cual está sujeto a inundaciones ocasionales la mineralización de estos macronutrientes es inhibida por su acumulación en la hojarasca y en el humus. Por lo que el nitrógeno es tomado por las micorrizas arbusculares a partir del humus del suelo con ayuda de enzimas proteolíticas (Lunt & Hedger, 1996).

Otro factor edáfico constituye la humedad del suelo, que para el mes de noviembre 2018 fue de 72,10% y para agosto 2019 74,34%. Según De Oliveira & de Oliveira, (2010), la humedad del suelo esta correlacionada con la colonización de los hongos micorrícicos arbusculares a las raíces de las plantas y a la colonización de bacterias cerca de las raíces debido a los metabolitos exudados por las plantas (Barnes, *et al.*, 2016).

Las condiciones climáticas como las precipitaciones y las inundaciones también juegan un rol importante en la variación de la comunidad microbiana (Ritter, *et al.*, 2018). En el presente estudio en donde se recolectaron las muestras en agosto y noviembre las precipitaciones fueron similares, por lo que no se justifica la variación de la comunidad por esta razón. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que en la región de los Andes los meses más lluviosos son diciembre, abril y mayo (Varela y Ron, 2020) por lo que las aguas de los Andes descienden hasta alcanzar el río Tiputini e inundan el ecosistema Várzea, lo que promueve la lixiviación de nutrientes como el fósforo, el nitrógeno, el potasio y también deficiencia de oxígeno en el ambiente (Randall, 2017), la cual disminuye su concentración del 20% a <1% (Fierer, 2017), logrando la proliferación de microorganismos anóxicos y disminuyendo el crecimiento de bacterias aerobias, es decir, su composición microbiana es diferente a los del ecosistema Terra Firme. Únicamente los ASV del reino Fungi y, mostraron diferencia significativa en la homogeneidad y riqueza para la variable época de muestreo, lo que puede explicarse por las condiciones ambientales diferentes entre agosto y noviembre que aparte de

las inundaciones y las precipitaciones la temperatura fue de 25,58°C en noviembre 2018 y de 23,89°C en agosto 2019.

## **2. Taxonomía microbiana asociada a la rizósfera del genus *Inga***

En el análisis de las secuencias de ITS se identificaron 5 776 secuencias representativas en los 522 421 ASVs, mientras que en el del marcador 16S rRNA se obtuvieron 4 277 secuencias representativas en los 336 280 ASVs. Lo que concuerda con lo mencionado Bahram, *et. al.*, (2018) en su estudio de la estructura microbiana de la superficie del suelo en donde indica que la abundancia de los hongos en la capa superficial del suelo es superior a la de las bacterias.

Los hongos asociados a las raíces de las plantas conectan la biomasa aérea (las plantas) con el ecosistema bajo suelo logrando participar en procesos ecológicos cruciales. Los hongos patogénicos pueden causar enfermedades, los hongos benéficos promueven la absorción del agua y de minerales y mejoran la resistencia y la adaptabilidad de la planta al ecosistema, y los hongos saprófitos viven y se alimentan de materia orgánica en descomposición por lo que juegan un rol ecológico funcional y por lo general se encuentran en la superficie del suelo (Buee, *et. al.*, 2009; Zhao, *et. al.*, 2020).

En el estudio de las secuencias ITS en general se identificó que el 77,52% de ASVs pertenecían al reino Fungi, esto hecho no llama la atención ya que el marcador ITS es el marcador genético utilizado como Gold-Standard para la identificación de hongos (Ritter, Dunthorn, Anslan, de Lima, *et al.*, 2020). Sin embargo, con este marcador también se logra identificar otras especies de eucariotas como fue el tercer subreino más abundante Viridiplantae o plantas verdes con el 3,58% en este subreino hubo predominancia del filo Anthophyta y presencia del filo Chlorophyta es decir, plantas terrestres y algas verdes respectivamente

(Ruhfel, *et al.*, 2014), estos taxones estuvieron presentes en mayor frecuencia en el ecosistema Várzea lo que sugiere que este subreino prefiere ambientes más húmedos y con mayor cantidad de nutrientes; el subreino Alveolata estuvo presente en un 1,2%, pertenece al reino Protista; el subreino Metazoa con el 0,72 % pertenece al reino Animalia y además se identificaron otros subreinos también pertenecientes al reino Protista en un 0,09%. Según Thakur y Geisen (2019), existe una cadena trófica a nivel de los microorganismos del suelo en donde las bacterias y los hongos sirven de alimento para protistas, nemátodos y otros microartrópodos. Los nemátodos pertenecientes al reino Metazoa, se alimentan principalmente de hongos al penetrar las hifas con el estilete, las microartrópodos (k\_Metazoa) prefieren a las bacterias y plantas y en menor proporción a los hongos, mientras que los protistas son generalistas pudiendo sobrevivir a partir del consumo de hongos y bacterias y excluyendo a bacterias productoras de toxinas como las *Pseudomonas* (Hua, *et. al.*, 2014), por lo que no es de asombrarnos que los hayamos encontrado en el análisis de las secuencias de ITS ya que estos microorganismos forman parte de la microbiota del suelo. Además, estos factores bióticos pueden afectar la abundancia y composición del microbioma y también las interacciones de los hongos micorrícicos y de las bacterias con las plantas, sin embargo, muchos pueden contribuir a la mineralización de los nutrientes y a la descomposición de la materia orgánica, beneficios que reciben directamente las plantas (Ingham, *et. al.*, 1985). Se identificó un alto porcentaje de ASVs (16,89%) pertenecientes a un reino no identificado por lo que se requiere mayor investigación para caracterizar e identificar nuevas especies a nivel molecular.

Dentro del reino Fungi varios filos fueron identificados, como el filo Ascomycota que fue el más abundante, seguido del filo Basidiomycota y que los filos Rozellomycota, Glomeromycota, Zygomycota y Chytridiomycota estuvieron presentes en menor proporción, similar a lo identificado por Zhao, *et. al.* (2020) en su estudio de la estructura de comunitaria

de los hongos asociados a las raíces en donde indica que los hongos Ascomycota presentan una tasa evolutiva más rápida y una mayor diversidad de especies, por lo que logran adaptarse a diferentes ambientes, además los hongos de este filo pueden ser saprófitos y patótrofos por lo que sobreviven exitosamente en la hojarasca o humus del suelo tanto de Terra Firme como de Várzea (Richardson, *et. al.*, 2001). Barnes, *et. al.*, (2016) en su estudio de la diversidad microbiana en los Andes Bolivianos también reportó que el filo más abundante fue Ascomycota seguido de Basidiomycota, Zygomycota, Rozellomeycota y Glomeromycota. El filo Basidiomycota es el principal filo de hongos que tiene la capacidad de degradar la lignina de la hojarasca y de la madera gracias a que presentan enzimas lignolíticas, sus hifas son tolerantes a condiciones ácidas por lo que muestran ventaja sobre las bacterias en muchos de los ecosistemas de la Amazonía, este grupo incluye a las ectomicorrizas las cuales inicialmente pueden actuar como parásitos necrotróficos antes de ser saprofitos (Kuyper, 2000). Los hongos del filo Rozellomeycota son encontrados en ambientes acuáticos y también en ambientes terrestres principalmente de hábitat anóxicos, son patógenos obligados de otros eucariotas como algas, amebas y otros hongos (Tedersoo, *et. al.*, 2017). La comunidad de los hongos Glomeromycota, que incluye a hongos simbioses micorrícicos, se encuentra reducida (Barnes, *et. al.*, 2016). Lo que concuerda con lo obtenido en el presente estudio en donde la composición de la comunidad de hongos formadores de micorrizas del filo Glomeromycota fue del 1,42%. Estos hongos micorrícicos, en bosques selváticos, logran formar asociaciones simbióticas principalmente para la toma de nutrientes participando en los procesos de mineralización del nitrógeno y del fósforo (Richardson, *et. al.*, 2001). Este filo incluyó 13 familias, *Glomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Diversisporaceae* y 9 familias no identificadas previamente que representaron el 26,52%. La familia *Glomeraceae* fue la familia predominante con una abundancia relativa de 72,23% del total de la comunidad de AMF. Lo que concuerda con lo mencionado por Peña-Venegas, *et. al.*, (2019) quienes indican que *Glomeraceae* y

*Acaulosporaceae* son los hongos micorrícicos arbusculares más comunes en los suelos de la Amazonía gracias a su alta afinidad con las plántulas de *Inga* y también a las condiciones ambientales en donde se encuentran (Garcés-Ruiz, *et. al.*, 2019). Los hongos micorrícicos del filo *Gigasporaceae* representaron 0,57% de ASVs, este tipo de hongo tienen la mayor parte de sus estructuras en la zona extra radicular, la densidad de sus hifas es superior a la de cualquier otro AMF. Al igual que los *Acaulosporaceae* colonizan a su planta hospedera a través de esporas y a pesar de que tienen un lento periodo de crecimiento y colonización, una vez establecidas proveen mayor cantidad de nutrientes que *Glomeraceae* y *Acaulosporaceae* (Goss, *et. al.*, 2017). Los hongos micorrícicos de la familia *Acaulosporaceae*, con una abundancia relativa de 0,49%, son considerados tolerantes al estrés, y han sido reportados en suelos ácidos, en condiciones ambientales duras y en elevaciones de hasta 2500 msnm aproximadamente. En el presente estudio esta familia fue identificada en suelos de pH ligeramente ácido (4,65 y 4,92 para Várzea y Terra Firme, respectivamente) y a una altura de 190 a 270 msnm, lo que demuestra su capacidad de colonizar diferentes ambientes (Garcés-Ruiz, *et. al.*, 2019). Los hongos del orden Diversisporales de la familia *Diversisporaceae* se encontraron en aproximadamente el 0,03%, esta familia se caracteriza por presentar formas complejas de esporas. Las 8 familias AMF que no fueron identificadas representaron una abundancia relativa de 26,52% lo que concuerda con lo mencionado por Garcés-Ruiz, *et. al.*, (2019) quienes indican que el porcentaje de micorrizas arbusculares identificadas molecularmente en la rizósfera de las plantas es muy limitado y aún existe una gran cantidad de taxones no identificados, es decir, que las bases de datos aún carecen de anotaciones taxonómicas (Buee, *et al.*, 2009). Por lo que sigue siendo necesario continuar las investigaciones para ir obteniendo bases de datos cada vez más completas.

Del análisis de las secuencias de 16S rRNA, se determinó que 99,04% de los ASVs correspondían al dominio de las bacterias y que apenas el 0,96% prevalecían las arqueas, datos

similares a los encontrados por Fonseca, *et. al.*, (2018) en su estudio comparativo de la rizósfera vs el suelo en la Amazonía Brasileira en donde las arqueas estuvieron presentes en <1%. Los filos más abundantes del Dominio Bacteria fueron Proteobacteria (28%), Acidobacteria (25,79%), Actinobacteria (16,7%), Chloroflexi (7,46%) y Planctomycetes (5,56%), Verrucomicrobia (4%) y Nitrospirae (2,28%). Estos filos dominantes para la muestra de la presente investigación también resultaron dominantes en muchas otras publicaciones del análisis del microbioma del suelo de la Amazonía y además se indica que el aumento de la abundancia relativa de las Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria sugiere que la rizósfera tiene el potencial de seleccionar las bacterias benéficas para la planta las cuales participan en funciones metabólicas básicas los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y en descomposición (Fonseca, *et. al.*, 2018; Rodrigues, *et. al.*, 2013). Además, Trivedi, *et. al.*, (2016) indica que estos tres filos, junto con Planctomycetes son los más abundantes en ecosistemas naturales que no han sufrido efectos antropogénicos y de hecho sirven como indicador biológico del estado del ecosistema, contrario a lo que ocurre con el filo Chloroflexi y Verrucomicrobia cuya predominancia se refleja en suelos agrícolas. Por otro lado, en el estudio de Ritter, *et. al.*, (2018) sobre los efectos de las propiedades fisicoquímicas del suelo en la comunidad microbiana en la Amazonía se encontró que el filo predominante también fue Proteobacteria, pero seguido del filo Chloroflexi y Actinobacteria, se atribuyó su presencia al pH ligeramente ácido del sitio de muestreo, lo que concuerda con la presencia de estos filos en el ecosistema Terra Firme y Várzea de la presente investigación cuyos pH fueron ácidos. Los miembros del filo Proteobacteria son conocidos como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas pues facilitan la adquisición de nutrientes y participan activamente en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre y además, proveen protección contra enfermedades (Trivedi, *et. al.*, 2016). Las bacterias del filo Acidobacteria son abundantes en pH ácidos de hasta 5 y en suelos con baja cantidad de nutrientes, además son tolerantes a las

fluctuaciones de humedad del suelo. Se ha descrito que este filo está presente en alrededor del 20% de la comunidad bacteriana en los suelos, lo que concuerda con lo obtenido en el presente estudio en donde se identificó una abundancia relativa de 25,79%. Actinobacteria conforma un filo de bacterias que participan activamente en la descomposición de la materia orgánica, es decir, en el ciclo del carbono por lo que no hay variación de su abundancia entre los dos ecosistemas ni entre la época de muestreo pues siempre existe hojarasca y materia orgánica que descomponer; este filo es altamente resistente a la radiación, a los cambios de temperatura y a la desecación, además son capaces de exudar antibióticos inhibiendo el crecimiento de otras bacterias (Rampelotto, *et. al.*, 2013). Los microorganismos pueden influenciar el ciclo del nitrógeno y del carbono, en este sentido, la presencia de los filos Acidobacteria y Nitrospirae en la rizósfera de Inga confirma la existencia de bacterias oxidantes de amonio y que el proceso de nitrificación se está llevando a cabo. Para el reino de los procariotas el porcentaje de secuencias no determinadas es mucho menor al del reino Fungi, apenas llega al 0,1% versus el 16,89% de secuencias desconocidas en el análisis de las secuencias ITS.

Las asociaciones simbióticas que establecen las plantas tanto con bacterias como con hongos sugiere que las plantas pueden seleccionar taxonómicamente y funcionalmente grupos de microorganismos que les provean de nutrientes como el fósforo, el potasio y la fijación de nitrógeno (Fonseca, *et. al.*, 2018).

### **3. Abundancia diferencial microbiana asociada a la rizósfera del genus *Inga***

La abundancia diferencial con ANCOM logra hacer inferencias de la abundancia de los taxones a nivel ecosistema, utilizando datos de abundancia relativa a nivel de espécimen (Mandal, *et. al.*, 2015). Se identificó que para la variable fecha de muestreo el taxón k\_Fungi;p\_Basidiomycota;c\_Agaricomycetes;o\_Trechisporales (L6) fue más abundante en

agosto 2019, este hongo saprófito es un degradador de la materia orgánica y de la hojarasca a través de sus enzimas lignolíticas (Kuyper, 2000), se presume que se lo encontró con mayor abundancia en agosto 2019 debido a que en este mes hubo mayor cantidad de humedad 74,34% comparada con la humedad en noviembre 2018 que fue del 72,10%, siendo el 75% - 85% el grado idóneo de humedad para llevar a cabo una descomposición aeróbica, según Garrido (2014), un grado superior de humedad hiciera que el agua ocupe todos los poros del suelo lo que impediría que los microorganismos descomponedores accedan al aire.

Del análisis de las secuencias 16S rRNA, se logró identificar que los filos Acidobacteria, Actinobacteria y Chloroflexi fueron más abundantes en el ecosistema Várzea, lo que pudo deberse a su capacidad de sobrevivir a pH más ácidos (4,65) comparado con el ecosistema Terra Firme, además de que estos microorganismos son más tolerantes a las fluctuaciones de humedad que se observa en el bosque Várzea debido a las inundaciones ocasionales, además el filo Actinobacteria son buenos descomponedores de la materia orgánica por lo que su presencia es acorde ya que Várzea presenta una capa más gruesa de materia orgánica (Rampelotto, *et. al.*, 2013; Barnes, *et. al.*, 2016; Ritter, *et. al.*, 2018; Hickey, 2020). Por otro lado, se identificó que el taxón p\_Proteobacteria;c\_Gammaproteobacteria;o\_Pseudomonadales y el taxón p\_Proteobacteria;c\_Alphaproteobacteria;o\_Caulobacterales fueron abundantemente diferenciales para el ecosistema Terra Firme lo que se justifica por el hecho de que este filo facilita la adquisición de nutrientes a las plantas y participan activamente en la solubilización del fosfato (Qessaoui, *et. al.*, 2019; Trivedi, *et. al.*, 2016).

La abundancia diferencial por Gneiss realiza un balance entre los ASVs al comparar una variable dicotómica y permite identificar los 10 taxones predominantes y su proporción para cada categoría (Morton, *et. al.*, 2017). Cuando se analizó los ASVs del reino Fungi se identificó que el ecosistema Várzea presenta una ligera mayor proporción que el taxón Sordariomycetes, mientras que para el ecosistema Terra Firme hubo predominancia de un taxón del género

*Scedosporium* y dos taxones de la familia *Nectriaceae*. Por época de muestreo se identificó que 3 taxones del género *Penicillium*, uno de especie no identificada, pero del orden Eurotiales y uno del reino Fungi estuvieron presentes preferiblemente en agosto 2019. Todos estos taxones predominantes pertenecen al filo Ascomycota que en la Amazonía son los microorganismos predominantes capaces de descomponer la materia orgánica y que se encuentran ampliamente distribuidos en los ecosistemas (Richardson, *et. al.*, 2001). Tomando en cuenta los ASVs solo de los ITS pertenecientes a Glomeromycota se identifica que Terra Firme se asocia principalmente a micorrizas del orden Glomerales mientras que en Várzea además se asocia a hongos micorrícicos del orden Diversisporales. Por fecha de muestreo se identifica que, tanto en noviembre 2018 como en agosto 2019, *Inga* también se asocia con hongos del orden Glomerales. Por lo que se puede decir que independientemente del taxón, *Inga* logra establecer asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos sin importar el ecosistema ni la época de muestreo.

Del análisis de abundancia diferencial por Gneiss a partir de las secuencias 16S rRNA se puede observar que los taxones identificados tanto en ecosistemas como en la época de muestreo y sus proporciones varían ampliamente entre las categorías de las variables dicotómicas, esto se puede atribuir al hecho de que las bacterias son más susceptibles a las condiciones edáficas y climáticas del ambiente. Incluso Bahram, *et. al.*, (2018) indica que las variables ambientales afectan la abundancia y diversidad de las bacterias y hongos en la rizósfera, conducen a consecuencias en las interacciones microbianas y simbióticas y, favorecen o perjudican los ciclos de los nutrientes llevados a cabo por los hongos y más aún por bacterias ya que son menos resilientes a los cambios ambientales que estamos viviendo como la acidificación de los suelos, la contaminación con nitrógeno, los cambios en las precipitaciones y en las inundaciones. En el ecosistema Várzea, el cual presentó menor cantidad de N y Mo, debido a la lixiviación de los nutrientes por las inundaciones y precipitaciones, se

identificó que las plántulas de *Inga* establecieron mayor cantidad de asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno como son las del orden Rhizobiales, estas bacterias requieren molibdeno como cofactor para la enzima nitrato reductasa requerida para la fijación de este nutriente (Kaiser, *et. al.*, 2005).

#### **4. Perspectivas Futuras**

A pesar de que se han realizado varios estudios sobre este tema, en donde se han identificado a nivel molecular varias especies de hongos y bacterias asociado a la superficie de las raíces de *Inga*, aún queda por verificar y cuantificar la asociación simbiótica de los AMF a las raíces a través de recuento de esporas y de la identificación de estructuras micorrícicas a nivel microscópico. Además, queda por realizar redes de asociación que permitan entender una posible interacción entre los hongos y las bacterias en la rizósfera de *Inga*, para este tipo de estudios se podría incluir más muestras que cubran el área Sur y Sureste de la estación de biodiversidad Tiputini de la USFQ y también muestras de rizósfera de plántulas de *Inga* que crezcan fuera de los senderos para establecer si el sitio de crecimiento de la planta tiene influencia en la comunidad microbiana.

## CONCLUSIONES

El presente estudio describe por primera vez el micobioma y el microbioma, específicamente las micorrizas arbusculares y bacterias fijadoras asociado a la rizósfera de plántulas del género *Inga* sp. en la Reserva de Biodiversidad Tiputini en la Amazonía del Ecuador.

Los factores abióticos como las condiciones edáficas del suelo y las condiciones climáticas del ambiente, así como también los factores bióticos como los seres vivos presentes en el suelo y en su superficie afectan la diversidad de las comunidades microbianas.

En cuanto a los análisis llevados a cabo con las secuencias de ITS se logró identificar que la diversidad alfa no fue significativamente diferente entre diferentes ecosistemas neotropicales, mientras que para las secuencias de 16S rRNA fue significativa únicamente para el índice de Evenness.

La diversidad beta de las secuencias ITS varió dependiendo de la forma de análisis. Al analizar los ASVs de manera general se identificó que a nivel de Ecosistema los índices significativos fueron Jaccard y Weighted UNIFRAC, mientras que para fecha de muestreo Bray Curtis, Unweighted y Weighted UNIFRAC fueron significativos y formaron agrupamientos. Al analizar las secuencias pertenecientes al 16S rRNA, los agrupamientos fueron evidentes bajo todos los índices (Bray Curtis, Jaccard, Weighted y Unweighted UNIFRAC) para la variable ecosistema, mientras que para la fecha de muestreo no fueron significativos.

Los análisis taxonómicos de las secuencias de ITS mostraron que de 522 421 ASVs identificadas el 77,52% pertenecieron al reino *Fungi*, y de estas el 1,42% fueron del filo *Glomeromycota*. En cuanto a la taxonomía analizada con las secuencias 16S rRNA, representada por 336 280 ASVs, se observó que el reino *Bacteria* estuvo presente en un 99,04% y dentro de este el filo predominante fue *Proteobacteria* con el 28%.

Al realizar el análisis de abundancia diferencia de ANCOM de las secuencias ITS se observó que para ecosistema no fue significativo, mientras que para fecha de muestreo existió un taxón abundantemente diferencial en agosto 2019, en nivel de taxonomía 6 fue un taxón perteneciente al filo *Basidiomycota*. La abundancia diferencia de ANCOM de las secuencias del 16S rRNA, al contrario que lo observado con las secuencias de ITS, no fue significativa para fecha de muestreo, pero al analizar la variable ecosistema se observó que en nivel taxonómico 4 (orden) los filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi* fueron abundantemente diferenciales en el ecosistema Várzea, mientras que el filo *Proteobacteria* fue diferencialmente abundante en Terra Firme.

Finalmente, al analizar la abundancia diferencial con Gneiss se observó que, tanto para las secuencias ITS como para las de 16S rRNA, existen diversos taxones que son abundantemente diferenciales al analizar ecosistema como fecha de muestreo.

## REFERENCIAS

- Anderson, M. (2001). Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Volume. 58. Number 3. Pp. 626– 639.
- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M., Bengtsson-Palme, J., Anslan, S., Coelho, L. P., Harend, H., Huerta-Cepas, J., Medema, M. H., Maltz, M. R., Mundra, S., Olsson, P. A., Pent, M., Pölme, S., Sunagawa, S., Ryberg, M., ... Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560(7717), 233–237. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386-6>
- Baldrian, P. (2019). *The known and the unknown in soil microbial ecology*. January, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz005>
- Barnes, C. J., Maldonado, C., Frøslev, T. G., Antonelli, A., & Rønsted, N. (2016). Unexpectedly high beta-diversity of root-associated fungal communities in the Bolivian Andes. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01377>
- BaseClear, S. V. 2020. Next Generation Sequencing Project. Van Rossen, D. Holanda.
- Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184(3), 449–456. <https://doi.org/10.12957/rdc.2015.18854>
- Bokulich, N., Kaehler, B., Rideout, J., Dillon, M., Bolyen, Ev., Knight, R., Huttley, G., Caporaso, G. (2018) Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* 6, 90.
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., Holmes, S. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. No. 13. Volume 7. Pp. 581-583.
- Cañarte, E., Peñaherrera, L., Daniel Navia, Danilo Vera, Macas, L., Paz, L., Duchicela, J., Garcés-Carrera, S., & Publicación. (2020). *Catálogo de organismos asociados a especies agrícolas en la provincia de Galápagos-Ecuador*.
- Caporaso, G., Lauber, C., Costello, E., Berg, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J., Knight, R. (2011). Moving Pictures of the human microbiome. *Genome Biology*. Version 12. Volume 5.
- Cisneros-Heredia, D. F. (2003). Herpetofauna de la Estación de Biodiversidad Tiputini, Amazonía Ecuatoriana: Ecología de una comunidad taxonómicamente diversa con comentarios sobre metodologías de inventario. *Memorias Del I Congreso de Ecología y Ambiente, Ecuador País Megadiverso*. CD. Universidad San Francisco de Quito. Quito., March. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2340.5607>
- de Oliveira, A. N., & de Oliveira, L. A. (2010). Influence of edapho-climatic factors on the sporulation and colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in two Amazonian native

- fruit species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(3), 653–661. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300021>
- de Oliveira Freitas, R., Buscardo, E., Nagy, L., dos Santos Maciel, A. B., Carrenho, R., & Luizão, R. C. C. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungal communities along a pedo-hydrological gradient in a Central Amazonian terra firme forest. *Mycorrhiza*, 24(1), 21–32. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0507-x>
- Earl, J. P., Adappa, N. D., Krol, J., Bhat, A. S., Balashov, S., Ehrlich, R. L., Palmer, J. N., Workman, A. D., Blasetti, M., Sen, B., Hammond, J., Cohen, N. A., Ehrlich, G. D., & Mell, J. C. (2018). *Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes*. 1–26.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Fonseca, J. P., Hoffmann, L., Cabral, B. C. A., Dias, V. H. G., Miranda, M. R., de Azevedo Martins, A. C., Boschiero, C., Bastos, W. R., & Silva, R. (2018). Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. *Gene*, 642, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.039>
- Garcés-Ruiz, M., Senés-Guerrero, C., Declerck, S., & Cranenbrouck, S. (2019). Community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with native plants growing in a petroleum-polluted soil of the Amazon region of Ecuador. *MicrobiologyOpen*, 8(4), 1–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.703>
- Garcés-ruiz, M., Senés-guerrero, C., Declerck, S., Pirttilä, A. M., & Pagano, M. C. (2017). *Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community Composition in Carludovica palmata, Costus scaber and Euterpe precatoria from Weathered Oil Ponds in the Ecuadorian Amazon*. 8(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02134>
- Garrido-cardenas, J. A., Garcia-maroto, F., Alvarez-bermejo, J. A., & Manzano-agugliaro, F. (2017). *DNA Sequencing Sensors: An Overview*. 1–15. <https://doi.org/10.3390/s17030588>
- Garrido, G. (2014). *Efecto de la humedad en la biodegradacion de residuos sólidos urbanos, mediante tratamiento mecánico biológico*.
- Goss, M. J., Carvalho, M., & Brito, I. (2017). New Tools to Investigate Biological Diversity and Functional Consequences \* \*With Diederik van Tuinen. *Functional Diversity of Mycorrhiza and Sustainable Agriculture*, 131–141. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804244-1.00007-1>
- Hickey, A. (2020). *The hidden symbiont: Exploring arbuscular mycorrhizae in the Ecuadorian Amazon*. Universidad San Francisco de Quito.
- Hua, J., Jiang, Q., Bai, J., Ding, F., Lin, X., & Yin, Y. (2014). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and fungivorous nematodes on the growth and arsenic uptake of tobacco in arsenic-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 84, 176–184.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.07.004>

- Ingham, R. E., Trofymow, J. . a ., Ingham, E. R. ., & Coleman, D. C. . (1985). Interactions of Bacteria , Fungi , and their Nematode Grazers : Effects on Nutrient Cycling and Plant Growth Author ( s ): Published by : Ecological Society of America Stable. *Ecological Monographs*, 55(1), 119–140.
- Jansson, J. K., & Hofmockel, K. S. (2018). ScienceDirect The soil microbiome — from metagenomics to metaphenomics. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.013>
- Kaiser, B. N., Gridley, K. L., Brady, J. N., Phillips, T., & Tyerman, S. D. (2005). The role of molybdenum in agricultural plant production. *Annals of Botany*, 96(5), 745–754. <https://doi.org/10.1093/aob/mci226>
- Kruskal, W., Wallis, W. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47:260, 583–621.
- Kuyper, T. (2000). Fungal Species Diversity and Forest Ecosystem Functioning in The Netherlands. In *Biological Station* (pp. 101–108).
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). *Comparison of Next-Generation Sequencing Systems*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Lunt, P. H., & Hedger, J. N. (1996). A survey of mycorrhizal infection of trees in the terra firme rainforest, cuyabeno, ecuador. *Mycologist*, 10(4), 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(96\)80010-3](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(96)80010-3)
- Mandal, S., Van, W., White, R., Eggesbo, M., Knight, R., Peddada, S. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health and Disease*. Volume 26.
- Morton, J., Sanders, J., Quinn, R., McDonald, D., Gonzalez, A., Vásquez, Y., Navas, J., Jin, S., Metcalf, J., Hyde, E., Lladser, M., Dorrestein, P., Knight, R. (2017). Balance Trees Reveal Microbial Niche Differentiation. *American Society for Microbiology*. Volume 2. Issue 1.
- Moura, J. B., & Cabral, J. S. R. (2019). Mycorrhizal Fungi in South America. In *Mycorrhizal Fungi in South Americ*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4>
- Nilsson, H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., Porter, T., Bengtsson-Palme, J., Walker, D., Filipe, D. S., Gamper, A., Larsson, K. H., Koljalg, U., Edgar, R., & Abarenkov, K. (2015). A Comprehensive , Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts. *Microbes and Environments*, 30(2), 145–150. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14121>
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., & Da silva, G. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *International Mycological Association*, 2(2), 191–199.

- Peña-Venegas, C. P., Kuyper, T. W., Davison, J., Jairus, T., Vasar, M., Stomph, T. J., Struik, P. C., & Öpik, M. (2019). Distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities associate with different manioc landraces and Amazonian soils. *Mycorrhiza*, 29(3), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00891-5>
- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J. N., El Aalaoui, M., Akroud, H., Amarraque, A., Vaerenbergh, J. Van, Tahzima, R., Mayad, E. H., & Chebli, B. (2019). Applications of New Rhizobacteria *Pseudomonas* Isolates in Agroecology via Fundamental Processes Complementing Plant Growth. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>
- Ram, J., Chase, J., Bolyen, E., Ackermann, G., González, A., Knight, R., Caoraso, G. (2016). Keemei: cloud-based validation of tabular bioinformatics file formats in Google Sheets. *Gigascience*. No. 5, Volume, 27.
- Rampelotto, P. H., de Siqueira Ferreira, A., Barboza, A. D. M., & Roesch, L. F. W. (2013). Changes in Diversity, Abundance, and Structure of Soil Bacterial Communities in Brazilian Savanna Under Different Land Use Systems. *Microbial Ecology*, 66(3), 593–607. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0235-y>
- Randall, W. M. (2017). A comparison of the forest soils in the Peruvian Amazon: Terra firme, palm, white sand and igap. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 8(7), 130–134. <https://doi.org/10.5897/jssem2017.0644>
- Richardson, J. E., Pennington, R. T., Pennington, T., & Hollingsworth, P. (2001). Rapid Diversification of a Species-Rich Genus of Neotropical Rain Forest Trees. *Science*, 293(September), 2242–2246.
- Ritter, C. D., Dunthorn, M., Anslan, S., de Lima, V. X., Tedersoo, L., Nilsson, R. H., & Antonelli, A. (2020). Advancing biodiversity assessments with environmental DNA: Long-read technologies help reveal the drivers of Amazonian fungal diversity. *Ecology and Evolution*, 10(14), 7509–7524. <https://doi.org/10.1002/ece3.6477>
- Ritter, C. D., Dunthorn, M., Anslan, S., Xavier, V., Tedersoo, L., Henrik, R., & Antonelli, A. (2020). Advancing biodiversity assessments with environmental DNA: Long-read technologies help reveal the drivers of Amazonian fungal diversity. *Ecology and Evolution Wiley, May*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/ece3.6477>
- Ritter, C. D., Zizka, A., Barnes, C., Nilsson, R. H., Roger, F., & Antonelli, A. (2019). Locality or habitat? Exploring predictors of biodiversity in Amazonia. *Ecography*, 42(2), 321–333. <https://doi.org/10.1111/ecog.03833>
- Ritter, C. D., Zizka, A., Roger, F., Tuomisto, H., Barnes, C., Nilsson, R. H., & Antonelli, A. (2018). High-throughput metabarcoding reveals the effect of physicochemical soil properties on soil and litter biodiversity and community turnover across Amazonia. *PeerJ*, 2018(9). <https://doi.org/10.7717/peerj.5661>
- Rodrigues, J. L. M., Pellizari, V. H., Mueller, R., Baek, K., Jesus, E. D. C., Paula, F. S., Mirza, B., Hamaou, G. S., Tsai, S. M., Feigl, B., Tiedje, J. M., Bohannan, B. J. M., & Nüsslein, K. (2013). Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 110(3), 988–993.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1220608110>
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., Knight, R., & Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10), 1340–1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>
- Ruhfel, B., Gitzendanner, M., Soltis, P., Soltis, D., & Burleigh, G. (2014). From algae to angiosperms—inferring the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 14(23).
- Santoyo, G., Hernández-pacheco, C., Hernández-salmerón, J., & Hernández-león, R. (2017). *The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions : toward sustainable agriculture . A review*. 15(1), 1–15.
- Soto, J., Pacheco, D., Zambrano, O., & Ortega, J. (2012). REVISIÓN FLORÍSTICA DEL GÉNERO INGA Miller. *Acta Botánica Venezolana*, 35 No1, 27–52. <https://www.redalyc.org/pdf/862/86225571002.pdf>
- Taylor, T. N., Krings, M., & Taylor, E. L. (2015). Glomeromycota. *Fossil Fungi*, 103–128. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387731-4.00007-4>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Puusepp, R., Nilsson, R. H., & James, T. Y. (2017). Novel soil-inhabiting clades fill gaps in the fungal tree of life. *Microbiome*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0259-5>
- Thakur, M. P., & Geisen, S. (2019). Trophic Regulations of the Soil Microbiome. *Trends in Microbiology*, 27(9), 771–780. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.04.008>
- Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Anderson, I. C., & Singh, B. K. (2016). Response of soil properties and microbial communities to agriculture: Implications for primary productivity and soil health indicators. *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY2016), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00990>
- Varela, A. & Ron, S. (2020). Geografía y Clima del Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Vargas, L. (2020). *Morfología , fenología , taxonomía y distribución geográfica de las especies de Inga en Chiriquí , Panamá. December 2010*.
- Vasco-Palacios, A. M. (2016). *Ectomycorrhizal fungi in Amazonian tropical forests in Colombia*.
- Vasco-Palacios, A. M., Hernandez, J., Peñuela-Mora, M. C., Franco-Molano, A. E., & Boekhout, T. (2018). Ectomycorrhizal fungi diversity in a white sand forest in western Amazonia. *Fungal Ecology*, 31, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.10.003>
- Zhao, P. shan, Guo, M. shan, Gao, G. lei, Zhang, Y., Ding, G. dong, Ren, Y., & Akhtar, M. (2020). Community structure and functional group of root-associated Fungi of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* across stand ages in the Mu Us Desert. *Ecology and Evolution*, 10(6), 3032–3042. <https://doi.org/10.1002/ece3.6119>

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RESULTADOS PRELIMINARES .....	69
ANEXO B: METADATA.....	70
ANEXO C: ANÁLISIS DE ALFA Y BETA DIVERSIDAD EN LAS SECUENCIAS ITS..	71
ANEXO D: ANÁLISIS DE ALFA Y BETA DIVERSIDAD EN LAS SECUENCIAS 16S rRNA .....	72

## ANEXO A: RESULTADOS PRELIMINARES

**Tabla 1.** Condiciones Edáficas

<b>Parámetro</b>	<b>Terra Firme</b>	<b>Várzea</b>
pH	4,92	4,65
Macronutrientes	↑ N	↑ P, Mg, Ca
Micronutrientes	↑ Mo, V	↑ Cu, Mn, Na, Co, Ba

**Tabla 2.** Condiciones Climáticas

<b>Parámetro</b>	<b>Noviembre 2018</b>	<b>Agosto 2019</b>
Humedad	72,10%	74,34%
Temperatura	25,58°C	23,89°C
Precipitaciones	2,61mm/d	2,40mm/d

**Tabla 3.** Condiciones Biológicas

<b>Parámetro</b>	<b>Terra Firme</b>	<b>Várzea</b>
Total <i>Fabaceae</i>	97/737 (13,2%)	182/714 (25,4%)
Total <i>Inga</i>	42/737 (5,7%)	102/714 (14,2%)

## ANEXO B: METADATA

Tabla 4. Metadata

sampleID	ecosystem	trail	year	month
A1	Varzea	Chichico	2018	november
A2	Varzea	Chichico	2018	november
A3	Varzea	Chichico	2018	november
A4	Varzea	Chichico	2018	november
A5	Varzea	Chichico	2018	november
A6	Terra Firme	Guacamayo	2018	november
A7	Terra Firme	Guacamayo	2018	november
A8	Terra Firme	Guacamayo	2018	november
A9	Terra Firme	Guacamayo	2018	november
A10	Terra Firme	Guacamayo	2018	november
A11	Varzea	Lago	2019	august
A12	Varzea	Guacamayo	2019	august
A13	Terra Firme	Guacamayo	2019	august
A14	Terra Firme	Guacamayo	2019	august
A15	Varzea	Chorongo	2019	august
A16	Terra Firme	Chorongo	2019	august
A17	Terra Firme	Harpia	2019	august
A18	Varzea	Lago	2019	august
A19	Terra Firme	Chorongo	2019	august

### ANEXO C: ANÁLISIS DE ALFA Y BETA DIVERSIDAD EN LAS SECUENCIAS ITS

**Tabla 5.** Test estadístico para alfa y beta diversidad en las secuencias correspondientes a ITS. Test de *Kruskal-Wallis* (H) fue aplicado para los análisis de alfa diversidad, y el test PERMANOVA (F) fue aplicado para los análisis de beta diversidad. Las variables analizadas fueron ecosistema y fecha de muestreo (\*valores  $p < 0,05$  fueron estadísticamente significativos).

Diversidad	Diversidad alfa						Diversidad beta							
	Evenness		Faith		Shannon		Bray Curtis		Jaccard		Weighted UNIFRAC		Unweighted UNIFRAC	
Índices	H	p value	H	p value	H	p value	F	p value	F	p value	F	p value	F	p value
<b>ASVs Totales</b>														
Ecosistema	0,41	0,51	0,41	0,51	0,06	0,79	1,30	0,13	1,13	0,002*	2,0	0,04*	1,17	0,04*
Época de muestreo	2,39	0,12	1,14	0,69	1,66	0,19	2,69	0,002*	1,01	0,24	4,13	0,002*	1,12	0,11
<b>ASVs de <i>Fungi</i></b>														
Ecosistema	0,09	0,77	0,09	0,77	0,02	0,88	1,12	0,27	1,13	0,003*	1,17	0,25	1,24	0,03*
Época de muestreo	6,19	0,01*	0,34	0,56	4,20	0,04*	2,92	0,003*	1,04	0,10	6,30	0,003*	1,11	0,14
<b>ASVs de <i>Glomeromycota</i></b>														
Ecosistema	0,54	0,46	0,06	0,81	0,06	0,81	1,09	0,08	1,05	0,12	2,01	0,07	1,47	0,11
Época de muestreo	0,06	0,81	2,94	0,09	0,96	0,33	1,07	0,17	1,03	0,23	0,77	0,62	1,22	0,23

### ANEXO D: ANÁLISIS DE ALFA Y BETA DIVERSIDAD EN LAS SECUENCIAS 16S rRNA

**Tabla 6.** Test estadístico para alfa y beta diversidad en las secuencias correspondientes a 16S rRNA. Test de *Kruskal-Wallis* (H) fue aplicado para los análisis de alfa diversidad, y el test PERMANOVA (F) fue aplicado para los análisis de beta diversidad. Las variables analizadas fueron ecosistema y fecha de muestreo (\*valores  $p < 0,05$  fueron estadísticamente significativos).

Diversidad	Diversidad alfa						Diversidad beta							
	Evenness		Faith		Shannon		Bray Curtis		Jaccard		Weighted UNIFRAC		Unweighted UNIFRAC	
Índices	H	p value	H	p value	H	p value	F	p value	F	p value	F	p value	F	p value
Ecosistema	4,26	0,03*	3,26	0,07	0,60	0,43	1,39	0,002*	1,21	0,002*	3,58	0,009*	1,76	0,013*
Época de muestreo	0,81	0,36	0,06	0,79	2,01	0,15	1,04	0,27	1,02	0,24	1,54	0,16	1,02	0,36