

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Exploración del ensamblaje microbiano asociado a plántulas
del género Inga en ecosistemas de Terra Firme y Várzea de la
Amazonia Ecuatoriana**

Alejandro Steven Valdivieso Proaño

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 13 de mayo de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Exploración del ensamblaje microbiano asociado a plántulas del género
Inga en ecosistemas de Terra Firme y Várzea de la Amazonia Ecuatoriana.**

Alejandro Steven Valdivieso Proaño

Nombre del profesor, Título académico

Pieter Marinus Johannes van 't Hof, PhD.

Quito, 13 de mayo de 2022

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Alejandro Steven Valdivieso Proaño

Código 00204416

Cédula de identidad: 1752002509

Lugar y fecha: Quito, 13 de mayo de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

En ecosistemas biodiversos como la Amazonía, la biota vegetal interactúa de manera directa e indirecta con microorganismos en respuesta a relaciones simbióticas que establecen. Aunque se sabe de la existencia de estas interacciones, son pocos los estudios que caracterizan el ensamblaje microbiano asociado a plantas amazónicas, limitando el conocimiento sobre el papel de los microorganismos sobre su huésped vegetal y en procesos ecológicos amazónicos.

Por ello, en este estudio se caracterizó el ensamblaje microbiano asociado a la rizósfera de plántulas del género *Inga* en los ecosistemas de Terra Firme y Várzea. Además se estableció la importancia de los hongos micorrízicos arbusculares como agentes de colonización en ecosistemas amazónicos. Para ello, se realizaron análisis moleculares y bioinformáticos de los marcadores 16S rRNA e ITS de muestras de la rizósfera de plántulas de miembros del género *Inga* para establecer índices de diversidad, taxonomía y redes de correlación microbiana. Esto se complementó con el establecimiento del estado micorrizal de plantas Amazónicas y potencial de colonización de sus suelos.

Se estableció un microbioma central compartido entre los ecosistemas con 13 filos microbianos de los cuales 9 fueron bacterianos y 4 fúngicos. Los filos bacterianos y fúngicos presentaron un patrón de co-exclusión y en ambos ecosistemas hubo una gran riqueza de especies microbianas, sin embargo, su composición fue diferente condicionada especialmente por las características fisicoquímicas de Várzea. Como resultado de una revisión de la literatura, la mayor parte de plantas amazónicas del Ecuador se asocian con hongos micorrízicos arbusculares y estas denotan una predominancia de colonización en Terra Firme Respecto a Várzea.

Este estudio es el primer estudio en caracterizar las comunidades microbianas asociadas a plantas de la amazonia ecuatoriana, por lo cual, esta información es útil para entender los roles

Palabras claves: Amazonía, microbioma, rizósfera, hongos micorrízicos arbusculares, bioinformática, *Inga*

ABSTRACT

In biodiverse ecosystems such as the Amazon, plant biota interact directly and indirectly with microorganisms in response to the symbiotic relationships they establish. Although the existence of these interactions is known, few studies characterize the microbial assembly associated with Amazonian plants, limiting the knowledge about the role of microorganisms on their plant host, and in Amazonian ecological processes.

Therefore, this study characterized the microbial assembly associated with the rhizosphere of seedlings of the genus *Inga* in Terra Firme and Várzea ecosystems. In addition, the importance of arbuscular mycorrhizal fungi as colonization agents in Amazonian ecosystems was investigated. For this purpose, molecular and bioinformatic analyses of 16S rRNA and ITS markers from rhizosphere samples of *Inga* seedlings were carried out to establish diversity indexes, taxonomy, and microbial correlation networks. This was complemented with the establishment of the mycorrhizal status of Amazonian plants and their soil colonization potential.

A central microbiome shared between the ecosystems was established with 13 microbial phyla of which 9 were bacterial and 4 fungal. The bacterial and fungal phyla showed a pattern of co-exclusion and in both ecosystems, there was a great richness of microbial species. Their composition was however different, especially by the physicochemical characteristics of Várzea soils. As a result of a literature review, most Amazonian plants in Ecuador were known to associate mostly with arbuscular mycorrhizal fungi and these denote a predominance of colonization in Terra Firme compared to Várzea ecosystems.

This is the first study to characterize the microbial communities associated with plants in the Tiputini Biodiversity Station under pristine Ecuadorian Amazon, so this information is useful to understand the roles of the microbial communities in the colonization of the Amazonian plants.

Key words: Amazon, microbiome, rhizosphere, arbuscular mycorrhizal fungi, bioinformatics, *Inga*

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	11
2.	METODOLOGÍA	15
2.1	Descripción del área de estudio y muestreo experimental	15
2.2	Análisis propiedades Físicoquímicas, extracción de ADN y secuenciamiento.....	15
2.3	Análisis Bioinformático	15
2.3.1.	Demultiplexing, Control de Calidad y Filtrado de Secuencia: DADA2.	15
2.3.2	Índices de Alfa y Beta Diversidad, Análisis Taxonómico & Microbioma Central.....	15
2.3.4	Análisis de Abundancia Diferencial y Redes de Correlación Microbiana.	16
2.3.5	PCA: Composición Físicoquímico vs Comunidades Microbianas.	16
2.4	Evaluación Potencial Micorrízico: Porcentaje Medio de Infección (MIP)	17
2.5	Estado Micorrizal de Plantas Amazónicas del Ecuador: Revisión Bibliográfica	17
3.	RESULTADOS	18
3.1	Análisis Bioinformático.....	18
3.1.1.	Control de Calidad y Filtración Secuencias ASVs	18
3.1.2.	Análisis de Alfa y Beta Diversidad	18
3.1.3.	Análisis Taxonómico: Composición Bacteriana.....	18
3.1.4.	Análisis de Microbioma Central.....	19
3.1.5.	Abundancia Diferencial y Redes de Correlación Microbiana.....	19
3.2	Asociación de los parámetros físicoquímicos vs Comunidades Microbianas (PCA)	20
3.3.	Evaluación Potencial Micorrízico Rizosférico.....	21
3.4.	Estado Micorrizal de Plantas Amazónicas del Ecuador: Revisión Bibliográfica	21
4.	DISCUSIÓN	22
5.	CONCLUSIONES	26
6.	TABLAS	27
7.	FIGURAS	29
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
9.	ANEXOS	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Construcción del Microbioma Central establecido para los Ecosistemas	27
Tabla 2. Índice de Correlación Microbiana entre las comunidades fúngicas y bacterianas.	27
Tabla 3. Porcentaje de Colonización Micorrizal de suelos de Terra Firme y Várzea basado en el método de Porcentaje Medio de Infección (MIP)	28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conformación del Microbioma Central compartido por Terra Firme y Várzea	29
Figura 2. Gráfico de Barras de la Abundancia Diferencial de Filos Bacterianos para los Ecosistemas de Terra Firme y Várzea	29
Figura 3: Redes de Correlación Microbiana por el coeficiente de correlación de Spearman	30
Figura 4: Gráfica de Componentes Principales de las propiedades fisicoquímicos, la abundancia microbioma y los ecosistemas: Terra Firme y Várzea	31

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: GENERALIDADES DE LAS LECTURAS POSTERIOR AL PROCESO DE DEMULTIPLEXING	37
ANEXO 2: INDICES DE DIVERSIDAD BETA PARA LOS ECOSISTEMAS DE TERRA FIRME Y VÁRZEA.....	37
ANEXO 3: BARRAS DE DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA A NIVEL DE FILO	38
ANEXO 4: ESTADO MICORRIZAL DE 162 ESPECIES VEGETALES DE LA AMAZONIA ECUATORIANA	39

1. INTRODUCCIÓN

Los microbios o microorganismos han sido fundamentales en el mantenimiento de la vida en la tierra (Turner, James y Pool, 2013). Las plantas como los animales comúnmente son colonizados por bacterias, hongos, virus y parásitos con respuestas benéficas para el hospedador (simbiosis) o patogénicas en dependencia de los mecanismos de virulencia y ciclo vital del microorganismo (Vandenkoornhuysen et al, 2015). Una comunidad microbiana en una localización específica es la definición en consenso de un microbioma (Berg et al, 2020), y en las plantas el microbioma vegetal es un componente esencial en la productividad y funcionalidad, así como en su salud (Turner, James y Pool, 2013).

La rizósfera de una planta es la zona del suelo proximal a las raíces de común interacción con microorganismos (Berendsen, Pieterse, Bakker, 2012), con un ancho aproximado de 3-5mm (Goss-Souza et al, 2019). De acuerdo con su funcionalidad, los microorganismos rizosféricos han sido caracterizados como: bacterias promotoras de crecimiento, degradadoras de residuos orgánicos, y hongos y bacterias antagonistas de patógenos asociados a las raíces de las plantas (Pedraza, et al, 2010). También, algunos de estos microorganismos como los hongos endófitos pueden colonizar tejidos radicales (Pedraza, et al, 2010) y otros como hongos micorrízicos llegar a situarse en células del sistema radical (Willis, Rodrigues, Harris, 2012), ambos sin efectos adversos sobre la planta, por el contrario, contribuyen con el crecimiento de la planta al proveerles de nutrientes poco móviles como el fósforo y agua (Pedraza, et al, 2010).

El ensamblaje microbiano de la rizósfera es afectado tanto por factores bióticos como abióticos. El tipo de suelo afecta de manera directa la fisiología de las plantas y como consecuencia promueve un cambio en los patrones de exudación (Bulgarelli et al, 2012; Berg y Smalla, 2009). Además los patrones biogeoquímicos establecidos en los ecosistemas dan forma a la riqueza y rotación microbiana. Se destacan entre estos el fósforo, la humedad del suelo, el carbono orgánico y el pH (Ritter et al, 2021).

La Amazonía es un asombroso reservorio de especies vegetales y animales, y comprende la selva tropical y el sistema fluvial más grande del mundo (Wesseling et al, 2010). Son pocos los estudios que han caracterizado el microbioma de la rizósfera de plantas de regiones prístinas como la Amazonia. Explorar en ensamble microbiológico vegetal de la selva Amazónica es importante porque un cambio en el equilibrio del microbioma, por causas ambientales o antropogénicas, puede ser perjudicial para este punto crítico de biodiversidad (Fonseca et al, 2018).

Existen varios estudios que describen los microbiomas de sistemas de cultivo (como el arroz y soja) en cronología de paso de selva amazónica a cultivo agrícola (Goss-Sousa, 2019). Este último estudio especialmente describe los microorganismos asociados a la rizósfera en la selva amazónica y como estos fluctúan en su abundancia a medida que se da paso a un sistema agrícola permanente. Entre ellos se destacan Proteobacteria y específicamente las α -Proteobacteria representando la mayoría de los taxones que habitan en la rizósfera (Goss-Sousa, 2019), ocupando nichos relacionados con ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, azufre y carbón (Remigi, 2016) o también como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Brígido, Glick y Oliveira 2017). Las β -Proteobacteria, halladas en abundancias mayoritarias, se reconocen como importantes en el ciclo del nitrógeno y más específicamente en la fijación del nitrógeno asociado con leguminosas (Goss-Sousa, 2019). También se destacan las Acidobacteria, como uno de los filos más dominantes en ecosistemas naturales y que reducen en abundancia a medida que el suelo nativo se convierte en un sistema agrícola (Jesus et al, 2009). Mediante análisis de co-ocurrencia se ha encontrado una alta correlación de las Acidobacteria con Actinobacteria en la rizósfera (Barberán et al, 2012), llegando a concluir que ambos filos son bioindicadores de la intervención antropogénica de los suelos nativos (Goss-Sousa, 2019). Los Bacteriodetes también están presentes y similar a las α -Proteobacteria, son microorganismos promotores del crecimiento vegetal (Goss-Sousa, 2019). Finalmente, se encuentran Aquificae, y Cloroflexi asociado con el metabolismo quimioorganotrófico dado que oxidan el hidrógeno o reducen los compuestos de azufre con oxígeno o nitrato como aceptor de electrones. Nitrospirae relacionado con el ciclo de

nitrógeno específicamente la oxidación de nitritos (Le Roux et al. 2016).

El género *Inga* es un conjunto de árboles y arbustos pequeños y medianos de la familia *Fabaceae* (Soto, Pacheco y Zambrano, 2012) que se encuentran ampliamente distribuidas en el Neotrópico (Lima, Santos y La Porta, 2018). Se han reportado aproximadamente 300 especies de árboles del género *Inga* (Soto, Pacheco y Zambrano, 2012) y son reconocidas ecológicamente por su capacidad para transformar el nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable (Barron, Purves y Hedin, 2010). Muchas especies de este género crecen rápidamente y presentan una alta productividad contribuyendo a la fertilidad del suelo en su hábitat (Lima, Santo y La Porta, 2019). Los bosques de Terra Firme y Várzea son hábitats comunes de las plantas del género *Inga* (Kursar et al, 2009), a su vez que representan dos de los ecosistemas predominantes de la región Amazónica. Los bosques de Terra Firme se encuentran sobre el nivel máximo de inundación de ríos y arroyos, y normalmente se encuentran bien drenados y abajo de un dosel cerrado que permite un proceso de lixiviación fuerte, y como consecuencia, escasas de nutrientes. Los bosques parcialmente inundados denominados Várzea se encuentran inundados por ríos de aguas blancas. Estos traen consigo grandes cantidades de sedimentos ricos en nutrientes en suspensión hacia las llanuras forestales (Brendin et al, 2020).

Existe poca información que describa las asociaciones microbianas a árboles del género *Inga*. Hickey (2020) describe micorrizas del filo Glomeromycota en raíces de plántulas del género *Inga* en la Estación de Biodiversidad Tiputini en la Amazonia Ecuatoriana. Iglesias, Salas, Leblanc y Nygren, (2011) estudiaron la respuesta de *Theobroma cacao* e *Inga edulis* frente a un hongo formador de micorrizas arbusculares (HMA) del género *Glomus* y concluyeron que los HMA pueden jugar un papel importante en el ciclo y la absorción de nutrientes de las plantas en un suelo ácido en condiciones tropicales húmedas. Arévalo (2022) en su tesis concluyó que las principales comunidades fúngicas presentes en la rizósfera de plántulas de *Inga* en Terra Firme y Várzea son diferentes en diversidad y riqueza en dependencia de la época de muestreo. Los filos Ascomycota, Basidiomycota, Rozellomycota, Glomeromycota y Chytridiomycota fueron los

filos predominantes en ambos ecosistemas. Respecto al ensamblaje bacteriano, no registra la literatura investigaciones que caractericen bacteriológicamente la rizósfera de árboles del género *Inga*, sin embargo si se registra la construcción de redes de correlación de microorganismos en ecosistemas como Terra Firme, Várzea, Igapo y Campinas (Ritter, 2021).

En Ecuador, los estudios de asociación micorriza-planta se centran en el potencial de inóculo de los hongos micorrízicos para la mejora del crecimiento de especies de árboles nativos útiles para la forestación en sitios sobreexplotados y abandonados como consecuencia de los procesos de deforestación. (Urgilés et al, 2009, Schusler, Kruger y Úrgiles, 2015). También se estudian los hongos micorrizales asociadas a orquídeas en el Neotrópico con fines comerciales (Tupac, Mosquera y Flanagan, 2013). Sin embargo, no se ha encontrado información en la literatura que describa la diversidad de hongos micorrízicos, su planta huésped y tipo de asociación en la Amazonia Ecuatoriana. De la misma forma, no se ha publicado estudios respecto al potencial micorrízico de especies de HMA de la Amazonía y su potencial para asociarse con raíces y colonizarlas.

El objetivo de este estudio fue la exploración del ensamblaje microbiano presente en asociación con plántulas de *Inga* sp. en bosques de Terra Firme y Várzea de la Estación de Biodiversidad Tiputini, ubicada en una zona prístina de la Amazonía Ecuatoriana. A su vez, la determinación del potencial micorrízico de la rizósfera de plántulas de *Inga* sp. y su importancia en el desarrollo vegetal. Finalmente, la descripción de las relaciones micorrícicas y la flora Amazónica Ecuatoriana, para establecer la forma de asociación micorrícica y la forma de vida del huésped. Para lograr estos objetivos se muestreó suelo rizosférico de plántulas de *Inga* sp. para secuenciar a través de la plataforma Illumina, y la caracterización de los genes ITS y 16S rRNA, y ensayos de potencial micorrízico en condiciones del laboratorio. Adicionalmente, se estableció una revisión sistemática de literatura para establecer el tipo de asociación micorrícica presente en la flora de la Amazónica Ecuatoriana, y su relación con la forma de vida y habito vegetal.

2. METODOLOGÍA

2.1 Descripción del área de estudio y muestreo experimental

La Estación de Biodiversidad Tiputini (ETB) fue el sitio seleccionado para el estudio presente. Se encuentra ubicada en la selva Amazónica Ecuatoriana, específicamente, en la provincia de Orellana, Ecuador a 256 km ESE (este sureste) de la ciudad de Quito. La reserva natural comprende un total de 640 hectáreas de bosque marcadas principalmente por bosques de Terra Firme en un 90% del total de la extensión de la estación, Bosques de Várzea (bosques de tierras bajas inundadas parcialmente por aguas) y Bosques de Igapo. Del mes de junio del 2018 a febrero del 2020 se realizaron 3 expediciones de campo a la Estación de Biodiversidad Tiputini para muestrear la rizósfera de plántulas del género *Inga* en varios puntos de Terra Firme y Várzea.

2.2 Análisis propiedades Fisicoquímicas, extracción de ADN y secuenciamiento

El muestreo, procesamiento de las muestras y análisis de los parámetros fisicoquímicos de suelos de Terra Firme y Várzea se estableció como la metodología detallada en Hickey (2020). Se extrajo ADN de 19 muestras de la rizósfera de plántulas del género *Inga* a través de lisis mediada por esferas mecánicas. Se purificó el ADN con el kit DNeasy Power Soil (Qiagen, EE.UU.) y el material genético fue enviado a la empresa Baseclear (Países Bajos) para el secuenciamiento de las regiones V3-V4 del marcador 16S rRNA para caracterización bacteriana y el marcador ITS para caracterización fúngica mediante la plataforma Illumina MiSeq®.

2.3 Análisis Bioinformático

2.3.1 Demultiplexing, Control de Calidad y Filtrado de Secuencia: DADA2.

Las lecturas en archivos FASTQ fueron analizadas a través plataforma bioinformática QIIME2 (v. 2020.8). Las secuencias fueron demultiplexeados en QIIME2, y *denoised* mediante el artefacto DADA2. Se cortaron las regiones a partir de 260 pb para mantener un puntaje de calidad admisible. Se generaron tablas de secuencias representativas, abundancia relativa y estadísticos de las lecturas.

2.3.2 Índices de Alfa y Beta Diversidad, Análisis Taxonómico & Microbioma

Central.

Los análisis de Alfa y Beta Diversidad se realizaron en QIIME2 mediante el artefacto q2-diversity. Se estableció una profundidad de muestreo de 18 000 lecturas por muestra para asegurar que los datos para las métricas de diversidad sean uniformes. Se redujeron de 19 muestras a 14 muestras ajustadas en los análisis (8 Terra Firme y 6 Várzea). Se asignó taxonomía a las secuencias del archivo de secuencias representativas obtenido en los pasos anteriores en base al clasificador Naive Bayes y el artefacto de QIIME2 q2-feature-classifier como complemento. El clasificador se entrenó en la base de datos GreenGenes 13_8 99%. El archivo de taxonomía de QIIME se transformó a un formato visible mediante el comando QIIME taxa barplot. La variable de referencia en visualización fue el ecosistema. A partir de la herramienta bioinformática en línea con *Microbiome Analyst*, se construyeron microbiomas centrales: compartido entre los dos ecosistemas, únicamente de Terra Firme y únicamente de Várzea a partir del archivo de taxonomía y abundancia relativa de ASVs para hongos (datos de hongos obtenido de Arévalo, 2021) y bacterias.

2.3.4 Análisis de Abundancia Diferencial y Redes de Correlación Microbiana.

Se utilizó el artefacto q2-gneiss en QIIME2 versión 2019.0 para obtener diferencias en la abundancia en base a agrupamientos de correlación. Además se utilizó el comando QIIME gneiss correlation-clustering para obtener un archivo hierchary.qza que diseña un árbol en dependencia de la frecuencia de los ASVs de cada grupo. Las redes de correlación microbiana se construyeron a partir del Coeficiente de correlación de Spearman con un umbral de correlación de 0,7 y valor $p > 0.05$ en *Microbiome Analyst* subsección *Correlation Analysis*. Se establecieron valores y gráficas de correlación para el microbioma total (hongos y bacteria; datos de hongos obtenidos de Arévalo, 2021).

2.3.5 PCA: Composición Físicoquímico vs Comunidades Microbianas.

Se utilizó el software R para la construcción de gráficas de Componentes Principales (PCA) de la Composición Físicoquímica de los suelos de Terra Firme y Várzea (Hickey, 2020), su tendencia

en los ecosistemas e interacción con las comunidades microbianas. Para ello se usaron el paquete VEGAN, que permitió la realización de un PERMANOVA función “adonis”, el paquete DEVTOOLS y el script “*Principal Component Analysis for Soil Properties*” ($p > 0,05$).

2.4 Evaluación Potencial Micorrízico: Porcentaje Medio de Infección (MIP)

Para evaluar el potencial de colonización micorrícica de suelos Amazónicos se diseñó un experimento de Porcentaje Medio de Infección (MIP) (West Virginia University, 2019). En 42 tubos Falcon de 50cc (21 para Terra Firme y 21 para Várzea; experimento por triplicado) se colocaron 40,5 cc de matriz estéril (arena de río previamente esterilizada por dos ciclos) y 4,5 cc de inóculo (suelos) para establecer un sustrato con una relación 1:10. A cada tubo se colocó una semilla germinada de sorgo (planta trampa) y se colocó en un ambiente controlado de temperatura. Posterior a 21 días, mediante el procedimiento de recolección, tinción y contaje por microscopia descrito por McGonigle et al (1990) se evaluó el porcentaje de colonización micorrizal inicial del inóculo sobre las raíces de la planta trampa. Se establecieron valores promedios y desviación estándar de los porcentajes de colonización para cada muestra de estudio.

2.5 Estado Micorrizal de Plantas Amazónicas del Ecuador: Revisión Bibliográfica

Se construyó una lista de datos de la flora Amazónica de Ecuador a partir de estudios de vegetación encontrados en la búsqueda bibliográfica. Se determinó el estado de micorrizas de las plantas utilizando las listas de verificación de Brundrett (2009) y Wang & Qui (2006) del estado de micorrizas de las familias de plantas terrestres. Finalmente, se realizó un análisis de Chi cuadrado para comprender si el estado micorrízico está asociado con el origen de su huésped.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis Bioinformático

3.1.1. Control de Calidad y Filtración Secuencias ASVs

El secuenciamiento de 19 muestras de rizósfera de plántulas del género *Inga* se realizó por ambos sentidos: *forward* y *reverse*; Sin embargo, las secuencias en sentido *reverse* no fueron de la calidad esperada y se optó trabajar únicamente con las secuencias en sentido *forward*, tal y como lo explica Arévalo (2021). Se obtuvieron un total de 605 112 secuencias crudas en sentido *forward* y posterior al filtrado de calidad (*denoising*) por DADA2, se obtuvieron 4277 secuencias representativas con un *quality score* (qs) de 30.

3.1.2. Análisis de Alfa y Beta Diversidad

El índice de alfa diversidad Faith ($p=0,03$) fue estadísticamente significativo en Terra Firme y Várzea. Para los demás indicadores: Diversidad de Shannon, *Observed Features* y *Evenness* no hubo diferencias significativas. Los indicadores de beta diversidad fueron estadísticamente significativos en la comparación de la abundancia de ASVs entre ecosistemas. Se formaron agrupaciones distintivas para los indicadores *Bray Curtis* ($p=0,003$), *Jaccard* ($p=0,001$), *Unweighted Unifrac* ($p=0,01$) y *Weighted Unifrac* ($p=0,009$) (Anexo 2).

3.1.3. Análisis Taxonómico: Composición Bacteriana

Se identificaron un total 336 280 ASV microbianos con el marcador molecular de identificación 16S rRNA. Del total de ASVs, el 99,04% pertenecían al reino Bacteria, 0,96% al reino Archaea y un valor menor a 0,001% no fue asignado taxonómicamente. Se establecieron 37 filos microbianos de los cuales 33 fueron bacterianos, 3 de arqueas y 1 no fue asignado. De los 33 filos bacterianos, aquellos que mantuvieron una mayor abundancia relativa fueron: Proteobacteria (28,00%), Acidobacteria (25,76%), Actinobacteria (16,70%), Chloroflexi (7,46%), Planctomycetes (5,56%), Verrucomicrobia (4,00%), y Nitrospirae (2,28%) (Anexo 3). Estos corresponden a un total del 91,90% de abundancia entre los filos bacterianos. Existe una similitud en la frecuencia relativa entre la distribución de filos de Terra Firme y Várzea.

3.1.4. Análisis de Microbioma Central

A partir del análisis del microbioma central realizado en *Microbiome Analyst* se estableció un núcleo microbiano general (tanto para Terra Firme y Várzea), y un microbioma central solo para Terra Firme o Várzea (Tabla 1). Esto al nivel taxonómico de filo. Se encontró que tanto Terra Firme como Várzea comparten los filos microbianos enlistados y visualizados en la Figura 1 en manera descendiente en medida de su prevalencia total.

Los filos Verrucomicrobia, Gemmatinomadetes y Glomeromycota aumentan su prevalencia en Várzea en comparación de Terra Firme (Tabla 1). El filo no identificado disminuye su prevalencia en Várzea en comparación con Terra Firme, y finalmente en Várzea se establece a Nitrospirae como un filo de diferencial, es decir, Terra Firme no posee como parte de microbioma central; a su vez que, el filo Rozellomycota desaparece del microbioma central de Várzea a diferencia de su presencia en Terra Firme (Tabla 1). Los porcentajes explican la prevalencia de los filos en las muestras de estudio, es decir, que tanto estos prevalecen en las 14 muestras pertenecientes a 8 de Terra Firme y 6 de Várzea.

3.1.5. Abundancia Diferencial y Redes de Correlación Microbiana

A partir del análisis diferencial con *Gneiss* establecido para la variable ecosistema que compara las comunidades bacterianas, con el marcador 16S rRNA se establece que para el nivel taxonómico de filo Nitrospirae, Acidobacteria, Proteobacteria y Planctomycetes son más abundantes en Várzea, y Actinobacteria y Verrucomicrobia son más abundantes en Terra Firme (Figura 2). Redes de Correlación Microbiana se establecieron a partir del Indicador de Correlación de *Spearman*, un valor de $p < 0,05$ como estadístico de correlación y 0,7 como umbral de correlación entre taxones. Son 14 filos microbianos aquellos que interactúan con el sistema microbiano en general, de manera positiva o negativa. Acidobacteria, Ascomycota, Gemmatinomadetes y Nitrospirae son filos predominantes con mayor cantidad de links de correlación (>3) (Tabla 2). Se indica la cantidad total de enlaces de correlación para los 14 filos microbianos (Figura 3). Se destacan las correlaciones entre los 4 filos más predominantes antes

mencionados (Figura 3A) Modulan de la siguiente manera: Acidobacteria de manera positiva a Gemmatimonadetes (CC= 0,82), Proteobacteria (CC=0,84), TM6 (CC= 0,73), Verrucomicrobia (CC=0,82) y WS3 (CC= 0,71); y de manera negativa a Ascomycota (CC= -0,75). Ascomycota de manera negativa a Gemmatimonadetes (CC= -0,83), Nitrospirae (CC= -0,77), SBR1093 (CC= -0,72) y Verrucomicrobia (CC= -0,72). Gemmatimonadetes de manera positiva a Nitrospirae (CC= 0,90), Planctomycetes (CC= 0,79), Proteobacteria (CC= 0,81), SBR1093 (CC= 0,72), Spirochaetes (CC= 0,70), Verrucomicrobia (CC= 0,84) y WS3 (CC= 0,74). Finalmente, Nitrospirae de manera positiva SBR1093 (CC= 0,79), Spirochaetes (CC=0, 77), Verrucomicrobia (CC= 0,81) y WS3 (CC= 0,81) (Tabla 2).

Se denota una tendencia en las correlaciones que indica que cuando un taxón fúngico es determinante en la correlación respecto a un taxón bacteriano, su valor de correlación agrupada (CC) es negativa (co-exclusión) y afecta de esa forma a dicho taxón bacteriano. Es patrón es similar en la correlación con el taxón determinante bacteria respecto al taxón hongo. Este último se ve afectado negativamente. Cuando la correlación es en el mismo taxón (hongo-hongo o bacteria-bacteria) la relación es positiva (Figura 3).

3.2 Asociación de los parámetros fisicoquímicos vs Comunidades Microbianas (PCA)

Se estableció un análisis de componentes principales que relacionaba la composición física química muestreada como se describió en el paso metodológico 2.3 con la variable de interés: ecosistema. De esa forma, se construyó un gráfico de componentes principales que resulto de manera visual en una distribución diferencial entre la abundancia de los parámetros fisicoquímicos y las muestras correspondientes a 3 de Terra Firme y 3 de Várzea.

Los elementos Aluminio (Al), Calcio (Ca), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Hierro (Fe), Potasio (K), Magnesio (Mg), Manganeso (Mn), Sodio (Na), Níquel (Ni), Fósforo (P), Plomo (Pb), Vanadio (Vn), Zinc (Zn), y el pH fueron más determinantes en la construcción del componente principal en Várzea, mientras que, los valores del Molibdeno, Conductividad y Nitrógeno total fueron determinantes y diferenciables en Terra Firme. Sin embargo, el estadístico

de prueba ($p < 0,05$) resultó en 0,1. Esto establece que aunque las diferencias entre los ecosistemas sean visibles, estadísticamente no es significativo (Figura 4A).

Se determinó que Magnesio (Mg), Sodio (Na), Calcio (Ca), Cobalto (Co) y Cobre (Cu) son determinantes para la construcción y el ensamblaje del microbioma en Várzea. Se consideró los elementos con un estadístico menores a $p > 0,05$.

En Terra Firme no se establecieron elementos del parámetro físico químicos que fueran influyentes en el ensamblaje microbiano (Figura 4B).

3.3. Evaluación Potencial Micorrízico Rizosférico

El promedio de porcentaje de infección micorrízico con inóculo de Terra Firme determinó un 57,66% de infección con una desviación estándar de 10,41. Mientras que el promedio de porcentaje de infección micorrízico con inóculo de Várzea fue de 49,13% con una desviación estándar de 13,92. El porcentaje de colonización fue mayor en Terra Firme respecto a Várzea. Los valores de desviación estándar sugieren homogeneidad en los datos muestreados (Tabla 3).

3.4. Estado Micorrizal de Plantas Amazónicas del Ecuador: Revisión Bibliográfica

Un total de 162 especies de plantas vasculares se obtuvo a partir de la revisión bibliográfica. De esta lista, 64% fueron especies nativas, 28% exóticas y 6% endémicas. Respecto al tipo funcional de plantas 36% fueron herbáceas, 35% leñosas, 27% gramíneas Y 2% leguminosas.

El establecimiento del estado micorrizal por Wang y Qui (2006) y Brundrett (2009) resultó en que el 85% de especies de plantas que normalmente se asocian a hongos micorrízicos arbusculares, 2% de las especies pertenecen a familias que se asocian con hongos ectomicorrízicos, 5% de las especies de plantas no forman asociación micorrízica, y un 8% de las especies de plantas no se encontraron registros sobre su estado de asociación.

De esa forma, se determinó que la a mayoría de especies vegetales forman algún tipo de asociación con hongos micorrízicos arbusculares. Tanto las plantas nativas como no-nativas poseen un estado planta-micorriza y la prueba de Chi cuadrado no fue significativa lo que sugiere que estas dos variables son independientes entre sí.

4. DISCUSIÓN

Se ha reportado que el género *Inga* se asocia con hongos micorrízicos arbusculares del género *Glomus* (Salas, Leblanc y Nygren, 2011) y que en general las plantas de la familia *Fabaceae* se asocian a bacterias fijadoras de nitrógeno (Franché, Lindsstrom y Elmerich, 2008). En este estudio se caracterizaron las comunidades microbianas de la rizósfera de plántulas de *Inga* en los ecosistemas de Terra Firme y Várzea, dos de los tres ecosistemas Amazónicos predominantes en Ecuador (Betts, Malhi y Roberts, 2008).

La riqueza de especies, como valor de diversidad Alfa, fue significativa tanto para Terra Firme como Várzea ($p > 0,05$). Esto explica que en ambos ecosistemas existe una variedad filogenética de especies de microorganismos (Chao, Chiu y Jost, 2016), siendo Várzea el ecosistema con mayor riqueza. La riqueza de especies en la rizósfera de plantas en la Amazonia se explica por alta diversidad de funciones metabólicas que estas realizan como metabolismo de fósforo, nitrógeno y azufre (Fonseca et al, 2018). Además, las tasas que miden los procesos ecosistémicos se basan a la riqueza y diversidad de especies (Griffiths y Philippot, 2013) explicando de esa forma que la riqueza de especies microbiana encontrada sostienen los procesos ecológicos masivos que se dan en los bosques Amazónicos como mantenedores principales de la diversidad de organismos vivos. La mayor riqueza de especies bacterianas en Várzea a comparación a Terra Firme se debe a la entrada anual de sedimentos aluviales ricos en nutrientes aprovechados por los microorganismos para las diversas funciones metabólicas (Myster, 2014).

Los indicadores de beta diversidad *Jaccard*, *Bray Curtis*, *Unweighted Unifrac* y *Weighted Unifrac* fueron significativos indicando diferencias en la composición taxonómica entre Terra Firme y Várzea. Los micro- y macronutrientes, y el pH son parámetros específicos que afectan la composición taxonómica en ambos ecosistemas (Arevalo, 2021, Ritter et al, 2021).

Un microbioma central compartido entre los dos ecosistemas se estableció con filos fúngicos y bacterianos por su gran importancia en los roles ecológicos en plantas del género *Inga* y en general

como en ecosistemas Amazónicos (Neu, Allen y Roy, 2021). Los filos bacterianos Proteobacteria, Planctomycetes, Actinobacteria y Verrucomicrobia son filos comunes en los suelos Amazónicos de Terra Firme y Várzea (Kim et al, 2007; Bredin et al, 2021), y están altamente relacionado con ciclos biogeoquímicos de carbono y nitrógeno (Souza et al, 2019; Navarrete et al, 2015; Fuerts y Sagulenko, 2011). Gemmatinomadetes, un filo poco estudiado ecológicamente aparece en este estudio como predominante y parte del microbioma central compartido y su vez con una prevalencia total en Várzea. Esto se puede deber a que soporta condiciones altas de estrés por lo que puede estar relacionado con el estrés hídrico elevado (Mujakic, Piwosz y Koblizek, 2022) propia de las inundaciones en el ecosistema. En general, los filos fúngicos Ascomycota y Basidiomycota son grandes descomponedores de materia orgánica en los bosques Amazónicos (Fonseca et al, 2018). *Glomeromycota* está asociada a hongos micorrízicos arbusculares y estos a su vez son simbioses estrictos de las raíces de las plantas siendo factores de crecimiento vegetal en condiciones de estrés (Begum et al, 2019). En nuestro estudio esto puede deberse al estrés hídrico (saturación de agua) o la baja cantidad de nutrientes en Terra Firme.

Los filos Proteobacteria, Acidobacteria, Nitrospirae y Planctomycetes fueron abundantemente diferentes en Várzea respecto a Terra Firme. Se ha registrado a Proteobacteria como filo con mayor frecuencia en lagos Amazónicos y planicies con pulsos de inundación periódica (Santos, Toyama, Souza de Oliveira y Pellon, 2019). Sin embargo, se conoce Proteobacteria como microorganismos con la capacidad de adaptación ecosistémico en bosques de Terra Firme, e Igapo (Ritter et al, 2018). También se ha encontrado que Acidobacteria y Proteobacteria habitan mejor en pH ácidos y son buenos competidores en condiciones de acidez y altas temperaturas (>40°) (Navarrete et al, 2013). El ecosistema de Várzea posee un pH de 4,65 de Terra Firme un pH de 4,92. Esta ligera diferencia puede condicionar en la abundancia de un taxón respecto al otro ecosistema. La presencia de Nitrospirae y Planctomycetes es consistente en ambientes inundados. La modulación de especies fijadores de nitrógeno, como aquellas que están en todo el filo Nitrospirae como favorecidas por inundaciones (Parolin y Wittmann, 2010).

Las redes de correlación microbiana establecidas en este estudio mostraron un patrón de co-exclusión entre los filos bacterianos y los filos fúngicos. Este patrón de co-exclusión explica la intolerancia de los microorganismos frente la presencia de otros (Albayrak, Khaniov, Golovko y Fofanov, 2018). Para ello se utilizó un indicador de correlación $>0,70$ y este a su vez explica una correlación entre dos nudos moderada y fuerte (Martínez, Tuya, Martínez y Abreu, 2009). Es decir, la correlación, sea de coocurrencia o co-exclusión era significativa entre los filos analizados. Varios estudios han encontrado patrones de coocurrencia entre bacterias y hongos explicadas por la colonización y superposición de un nicho, y alimentación cruzada (Fan et al, 2019). Sin embargo, se sabe poco respecto a los patrones de co-exclusión entre bacterias y hongos en ecosistemas tropicales o Amazónicos. Se infiere la competencia por los recursos y la capacidad de crecimiento autónomo de los hongos, es decir, normalmente existen asociaciones hongos-hongos suficientes para la adaptación de este en un medio (Ferreira de Queiroz et al, 2021).

Los resultados respecto al análisis de componentes principales, parámetros fisicoquímicos y ensamblaje de las comunidades microbianas demostraron que el magnesio (Mg), sodio (Na), calcio (Ca), cobalto (Co) y cobre (Cu) están correlacionados con las comunidades microbianas en Várzea. Una correlación entre los componentes fisicoquímicos en Várzea y las comunidades bacterianas se debe a la disponibilidad de nutrientes y la capacidad de microorganismos para usarlos en proceso metabólicos como cofactores o catalizadores redox (Morel y Price, 2003). Además también se conoció que Várzea posee mayores abundancias nutricionales como consecuencia de periodos de inundaciones que arrastra una cantidad considerable de sedimentos alto en micronutrientes (Bredin et al, 2021). No se conoce mucho respecto al papel de los micronutrientes disponibles en la rizósfera de plantas Amazónicas por lo que es necesario estudio de funcionalidad que acople micronutrientes y ensamblaje de comunidades microbianas.

A partir de la evaluación del potencial micorrízico de los suelos amazónicos se determinó que los inóculos de Terra Firme tenían una mayor probabilidad de colonizar raíces de plantas en

condiciones de estrés. Un mayor promedio de colonización infiere sobre la densidad de propágulos micorrízicos en el medio (Andragano, 2016). Una diferencia porcentual mayor en la colonización por estos suelos es dada por que los bosques de Terra Firme son bosques no inundables y con suelos ácidos y escasos en nutrientes. Además, factores como el tipo de suelo y la baja humedad inducen a una mayor colonización de especies formadoras de esporas en suelos de Terra Firme (Oliveira et al, 2013), y además que en condiciones de estrés o deficiencia de sustrato los HMA absorben verticalmente carbono, fósforo, calcio y magnesio en rizodepósitos (Sommer et al, 2017)

Los estudios de flora sugieren un predominio de la flora asociada con hongos micorrízicos arbusculares. Se ha reportado una baja riqueza de ectomicorrizas en la región del PN Yasuní (Teodosso et al, 2010). El predominio de la micorriza arbusculares sobre la flora ectomicorrízica en esta región podría explicarse por los tipos de ecosistemas condicionados por el clima que conducen a una rápida descomposición y liberación de nutrientes del suelo a partir de la hojarasca, lo que podría favorecer las asociaciones de micorriza arbusculares.

En un estudio sobre la influencia de los nutrientes del suelo en la estructura del nicho en parcelas del bosque Yasuní, reportaron niveles bajos de fósforo, nitrógeno y pH y sugieren que la disponibilidad de recursos del suelo juega un papel importante en el ensamblaje de las comunidades de árboles tropicales; de esa forma infiriendo, que la cantidad de recursos disponibles en los suelos condicionan los niveles de asociación y estrategias de supervivencia vegetal (Womack et al, 2015). De esta forma, las comunidades microbianas y especialmente los hongos formadores de micorrizas pueden liderar estrategias para la mantención vegetal de la basta diversidad en estas regiones del mundo.

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se describe por primera vez el ensamblaje microbiano asociado a la rizósfera de las plántulas de *Inga* en dos ecosistemas de la Amazonia Ecuatoriana. Tanto Terra Firme como Várzea presentan una riqueza de especies microbianas (dado por índices de Alfa diversidad) que permiten el mantenimiento de la vida vegetal en la Amazonia Ecuatoriana. También se demostró que tanto Terra Firme como Várzea poseen una estructura microbiana diferente en abundancia y diversidad taxonómica.

Se estableció un microbioma central compartido entre los dos ecosistemas con un total de 14 filos microbianos establecidos en 9 filos bacterianos y 3 fúngicos. Estos filos están relacionados con el reciclaje de nutrientes y descomposición de materia orgánica. Se obtuvo una red de correlación microbiana que explicaba un patrón de co-exclusión entre bacterias y hongos debido a la competencia por nutrientes y autonomía de crecimiento. A su vez, se explicó que existen redes de coocurrencia entre bacteria-bacteria y hongo-hongo.

Se encontró una tendencia entre los parámetros fisicoquímicos y los ecosistemas, considerando a Várzea más rico en nutrientes respecto a Terra Firme y que a su vez elementos como sodio (Na), calcio (Ca), cobre (Cu), magnesio (Mg) y potasio (K) serán importantes en el ensamblaje microbiano en Várzea.

Basada en la revisión de literatura, se encontró una predominancia de hongos micorrízicos arbusculares en la flora de la Amazonía Ecuatoriana explicando que estos actúan sobre suelos con pocos o bajos nutrientes, ayudando a soportar estrés hídrico o condiciones generales de estrés vegetal y esto se complementó con los porcentajes de colonización de suelos Amazónicos, obteniendo un mayor porcentaje y probabilidad de colonización micorrícica por parte de los suelos de Terra Firme.

6. TABLAS

Tabla 1. Construcción del Microbioma Central establecido para los Ecosistemas de Terra Firme (Izquierda) y Várzea (Derecha). Valor de prevalencia en todas las muestras establecidas = 0,0-1,0 donde 0=menos prevalente y 1=prevalente en todas las muestras.

Terra Firme		Várzea	
Filo Microbiano	Prevalencia	Filo Microbiano	Prevalencia
Proteobacteria	1,00	Verrucomicrobia	1,00
Planctomycetes	1,00	Proteobacteria	1,00
Chloroflexi	1,00	Planctomycetes	1,00
Basidiomycota	1,00	Gemmatimonadetes	1,00
Ascomycota	1,00	Chloroflexi	1,00
Actinobacteria	1,00	Basidiomycota	1,00
Acidobacteria	1,00	Ascomycota	1,00
Verrucomicrobia	0,71	Actinobacteria	1,00
Gemmatimonadetes	0,50	Acidobacteria	1,00
No asignado	0,50	Nitrospirae	0,83
Nitrospirae	0,43	Glomeromycota	0,33
Rozellomycota	0,29	Bacteroidetes	0,33
Glomeromycota	0,29	No identificado	0,33

Tabla 2. Índice de Correlación Microbiana entre las comunidades fúngicas y bacterianas. Los valores de correlación positiva indican una modulación de coocurrencia entre los dos nudos (taxones) y los valores de correlación negativa indican una modulación de co-exclusión entre los dos nudos (taxones). Realizado a partir del Coeficiente de Correlación de Spearman con un valor de coocurrencia $CC > 0,7$.

Taxon1	Taxon2	Correlation	P.value	Statistic
Acidobacteria	Ascomycota	-0.7538	0.0018	798
	Gemmatimonadetes	0.8286	0.0003	78
	Proteobacteria	0.8462	0.0001	70
	TM6	0.7393	0.0025	118.620.280.353.477
	Verrucomicrobia	0.8286	0.0003	78
	WS3	0.713	0.0042	130.570.789.480.076
Actinobacteria	Basidiomycota	-0.8066	0.0005	822
Bacteroidetes	Verrucomicrobia	-0.7363	0.0027	790
	Verrucomicrobia	0.7934	0.0007	94
	WPS_2	-0.7055	0.0048	776
Chlamydiae	WS3	0.7307	0.003	122.535.391.077.106

Taxon1	Taxon2	Correlation	P.value	Statistic
Chloroflexi	Elusimicrobia	0.7011	0.0052	136
	GAL15	0.8198	0.0003	82
Elusimicrobia	Mucoromycota	-0.7616	0.0016	801.526.556.128.092
Gemmatimonadetes	Proteobacteria	0.7275	0.0032	124
	Nitrospirae	0.9077	0	42
	Planctomycetes	0.7934	0.0007	94
	Proteobacteria	0.8154	0.0004	84
	SBR1093	0.724	0.0034	125.570.529.760.817
	Spirochaetes	0.7064	0.0047	133.570.490.115.544
	Verrucomicrobia	0.8418	0.0002	72
Nitrospirae	SBR1093	-0.7798	0.001	809.791.523.294.894
	Spirochaetes	-0.7143	0.0041	779.996.965.792.815
	Planctomycetes	0.7011	0.0052	136
	SBR1093	0.7983	0.0006	917.507.742.609.766
	Spirochaetes	0.7722	0.0012	103.670.070.591.409
Planctomycetes	Verrucomicrobia	0.8154	0.0004	84
Proteobacteria	WS3	0.8146	0.0004	843.672.486.629.975
SBR1093	Verrucomicrobia	0.7802	0.001	100
Verrucomicrobia	Verrucomicrobia	0.7538	0.0018	112
Ascomycota	Spirochaetes	0.7496	0.002	113.912.243.650.171
	WS3	0.8499	0.0001	682.964.518.570.569
	Gemmatimonadetes	-0.8374	0.0002	836
	Nitrospirae	-0.7758	0.0011	808
Mucoromycota	Spirochaetes	-0.7295	0.0031	786.934.637.313.246
	WS3	0.7484	0.0021	114.499.992.674.136
	Rozellomycota	0.7351	0.0027	120.526.541.476.364

Tabla 3. Porcentaje de Colonización Micorrizal de suelos de Terra Firme y Várzea basado en el método de Porcentaje Medio de Infección (MIP). Valor numérico correspondiente a porcentaje de colonización resultante. La Tabla Izquierda correspondiente a Terra Firme (n=6) y la Tabla derecha correspondiente a Várzea (n=7).

Terra Firme	
# Muestra	%
Inga 24	46,11
Inga 25	57,45
Inga 26	74,59
Inga 27	44,63
Inga 31	65,49
Inga 34	57,7
PROMEDIO	57.662
DESVIACIÓN ESTANDAR	10,41

Várzea	
# Muestra	%
Inga 20	25,97
Inga 21	47,81
Inga 22	44,33
Inga 23	67,3
Inga 28	37,5
Inga 29	66,5
Inga 30	54,53
PROMEDIO	49.134
DESVIACIÓN ESTANDAR	13.92

7. FIGURAS

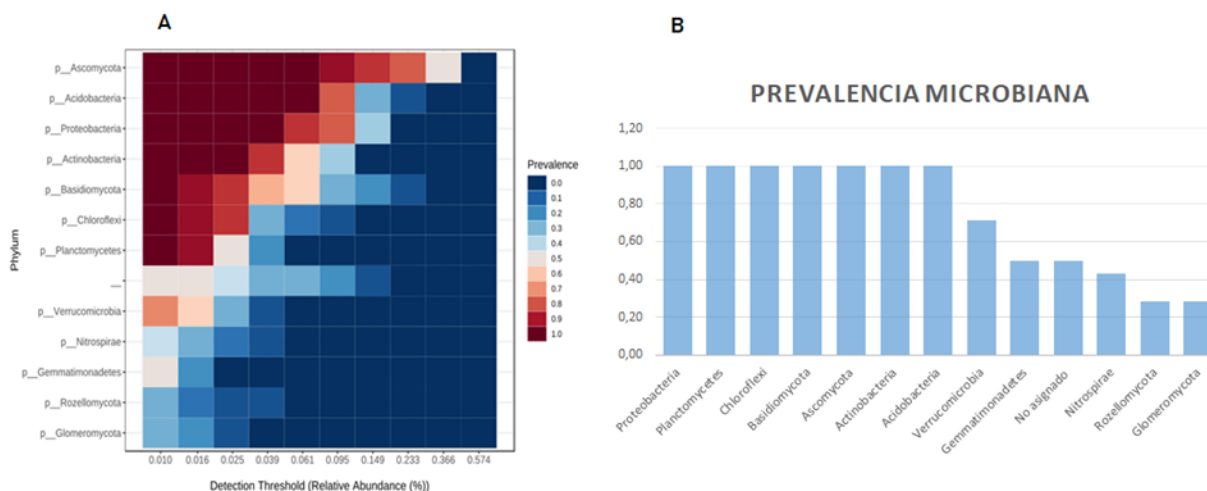


Figura 1. Conformación del Microbioma Central compartido por Terra Firme y Várzea. 1A. Mapa de calor de prevalencia en los dos ecosistemas. Siendo 0,0 sin prevalencia en los dos ecosistemas y 1,0 total prevalencia en los dos ecosistemas. Eje x: *Detection Threshold* y Eje y: *Phylum*. **1B.** Gráfico de barras que visualiza los principales filios microbianos y su prevalencia en los ecosistemas. 7 filios tienen prevalencia 1,0 (e.g. 5 bacterianos, 2 fúngicos).

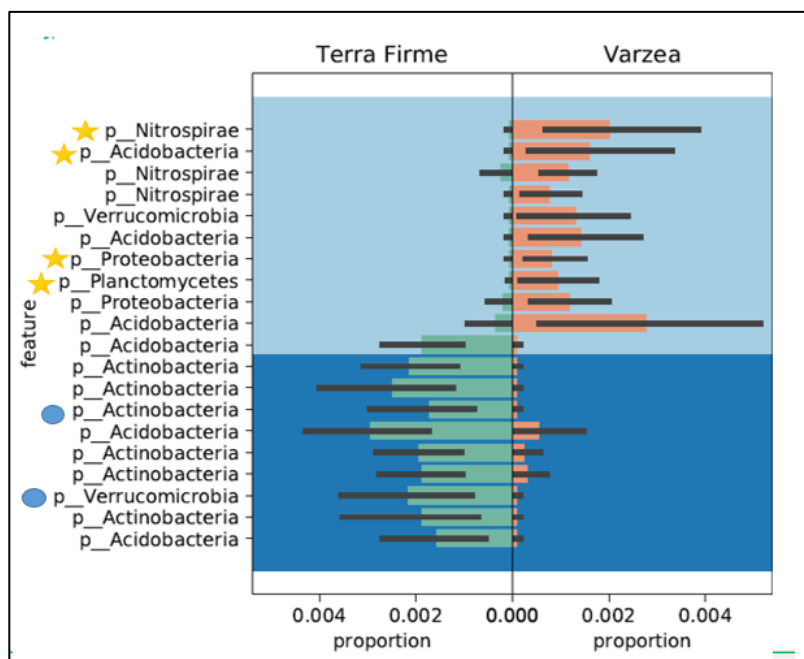


Figura 2. Gráfico de Barras de la Abundancia Diferencial de Filios Bacterianos para los Ecosistemas de Terra Firme y Várzea. Los filios Nitrospirae, Acidobacteria, Proteobacteria y Planctomycetes son abundantemente diferencial en Várzea (“estrellas”), mientras que Acidobacteria y Verrucomicrobia son abundantemente diferencial en Terra Firme (círculos). Análisis de Gneiss basado en agrupamientos de correlación.

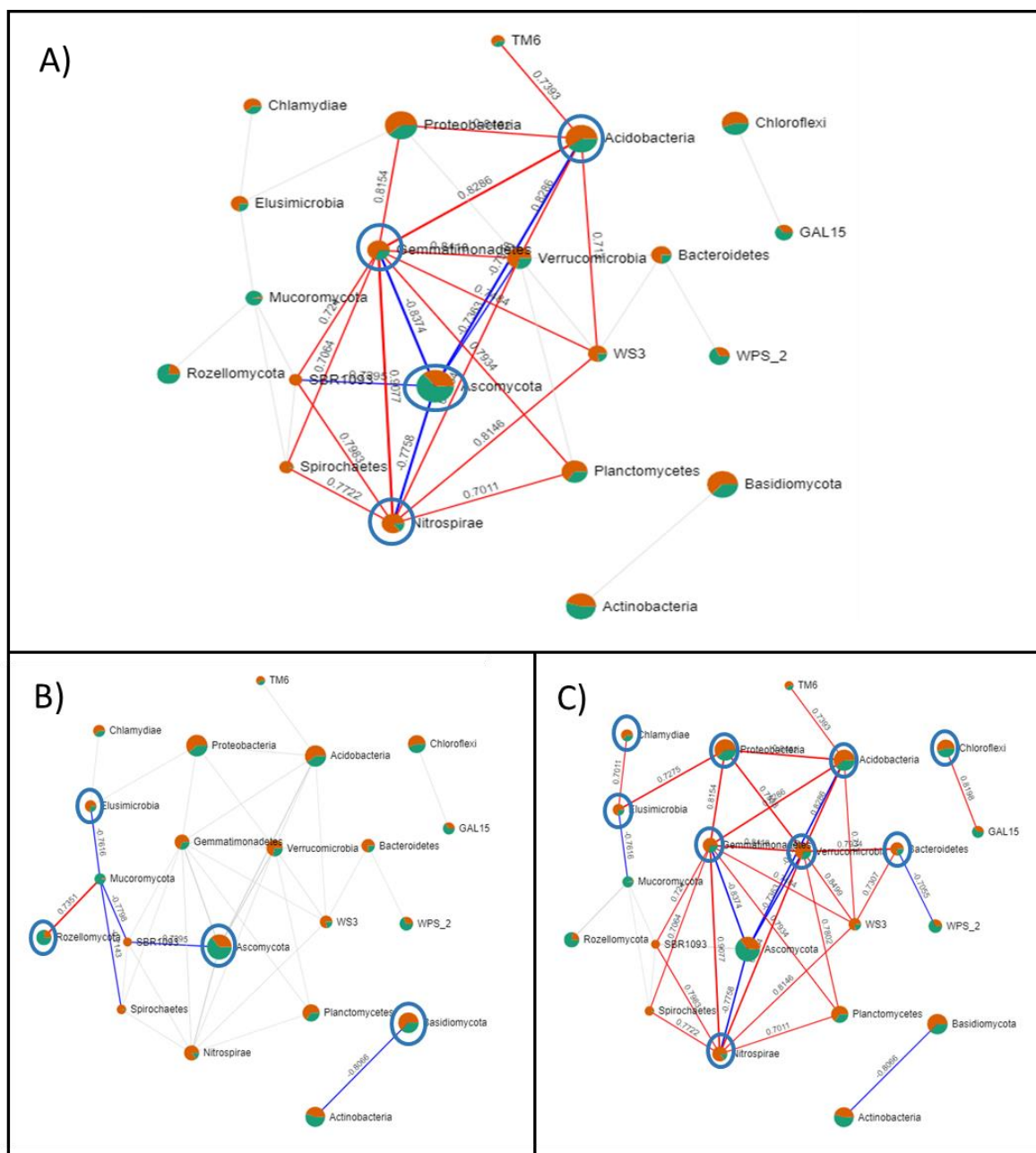


Figura 3: Redes de Correlación Microbiana por el coeficiente de correlación de Spearman. Nodos representados por filo microbianos y enlaces de unión presentados como correlación dada por el coeficiente de correlación de Spearman. Línea de unión naranja: correlación positiva (co-ocurrencia); Línea de unión azul: correlación negativa (co-exclusión). Coeficiente de correlación por agrupamiento $CC > 7$. **3A.** Marcación de Redes de los 4 principales filos con mayor correlación en el microbioma: Acidobacteria, Ascomycota, Gemmatimonadetes y Nitrospirae. **3B.** Marcación de Redes de correlación de Hongos respecto el microbioma. Marcados únicamente filos fúngicos y principales correlaciones en el microbioma. **3C.** Marcación de Redes de correlación de Bacterias respecto el microbioma. Marcados únicamente filos bacterianos y principales correlaciones en el microbioma

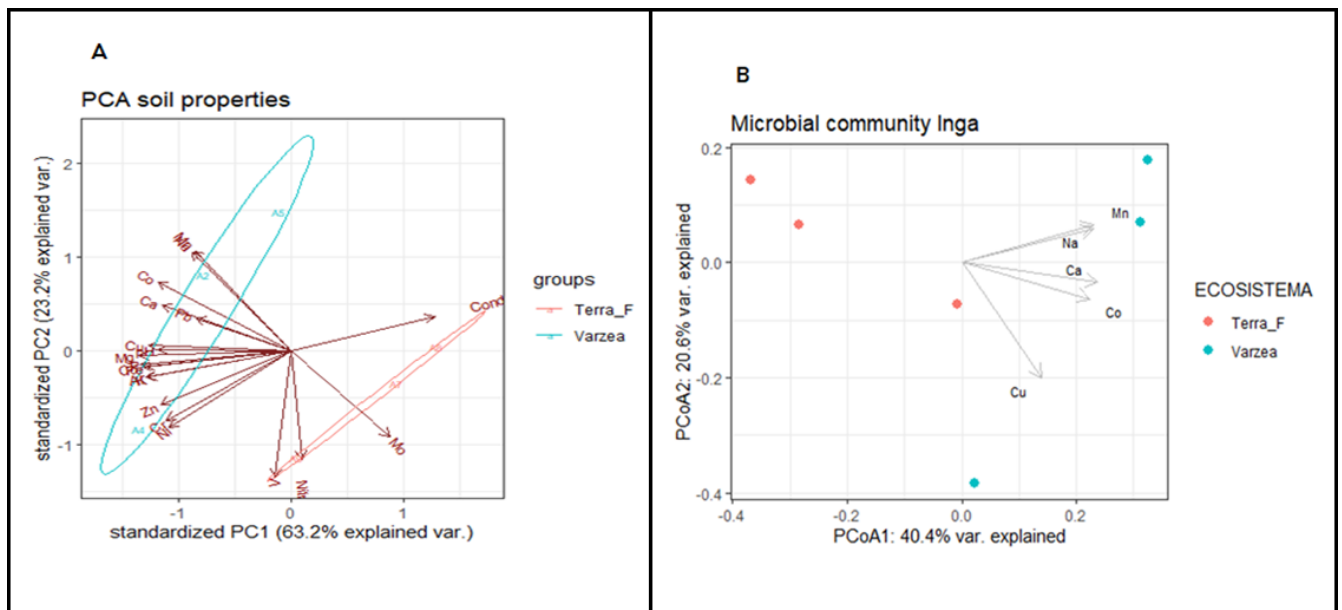


Figura 4: Gráfica de Componentes Principales de las propiedades fisicoquímicas, la abundancia microbioma y los ecosistemas: Terra Firme y Várzea. 4A. Análisis de Componente Principales de función Parámetro Fisicoquímico por Ecosistema. Valor estadístico $p > 0,1$. **4B** Análisis de Componentes Principales de función Parámetro Fisicoquímico vs Abundancia de las Comunidades Bacterianas por Ecosistema: Valor estadístico $p > 0,05$.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albayrak, L., Khaniov, K., Golovko, G., Fofaov, Y. (2018). Detection of multi-dimensional co-exclusion patterns in microbial communities. *Bioinformatics*. 34(21) doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty414>
- Arevalo, J. (2021). Exploración e identificación del microbioma de la rizósfera del genus Inga en la Amazonía Ecuatoriana. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Barberan, A., Bates, S., Casamayor, E., Fierer, N. (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *The ISME Journal Multidisciplinary of Microbial Ecology*. 6, 343- 351.
- Barron, A., Purves, D., Hedin, L. (2010). Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. *Oecologia*. 165, 511-520. doi: <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1838-3>
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M., Raza, S., Khan, M., Ashraf, M., Ahmed, N., Zhang, L. (2019). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. 10, *Frontiers in Plant Science*. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>
- Berendsen, R., Pieterse, C., Bakker, P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 17(8), 478-486. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Champomier, M.C et al. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 8(103). doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Berg, G., Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 68(1), 1-13. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Betts, R., Malhi, Y., Roberts, T. (2008). The future of the Amazon: new perspectives from climate, ecosystem and social sciences. *Biological Sciences*. 363, 1498. doi: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0011>
- Bredin, Y., Hess, L., Scabin, A., Dunthorn, M., Haugaasen, T., Peres, C., Nilsson, H., Antonelli, A., Ritter, C. (2021). Above- and below-ground biodiversity responses to the prolonged flood pulse in central western Amazonia, Brazil. *bioRxiv The Pre-Print Server for Biology*. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.28.441795>
- Boer, W., Folman, L., Summerbell, R., Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(4), 795-811. doi: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.005>
- Boon, E., Meehan, C., Whidden, C., Wong, D., Langille, M., Beiko, R. (2014). Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. *FEMS Microbiology Reviews*. 38(1), 90-118. doi: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12035>
- Bredin, Y., Hawes, J., Peres, C., Haugaasen, T. (2020). Structure and Composition of Terra Firme and Seasonally Flooded Várzea Forests in the Western Brazilian Amazon Forest. *Forests*. 11 (12), 1361. doi: <https://doi.org/10.3390/f11121361>
- Brígido, C., Glick, B., Oliveira. (2016). Survey of Plant Growth-Promoting Mechanisms in

- Native Portuguese Chickpea Mesorhizobium Isolates. *Microbial Ecology*. 73, 900-915. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0891-9>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F., Amann, R., Eickhorst, T., Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*. 488, 91-95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>
- Chao, A., Chiu, C., Jost, L. (2016). *Phylogenetic Diversity Measures and Their Decomposition: A Framework Based on Hill Numbers*. In: Pellens, R., Grandcolas, P. (eds) Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. Topics in Biodiversity and Conservation, vol 14. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22461-9>
- Fan, X., Gao, J., Pan, K., Li, D., Dai, H., Li, X. (2019). More obvious air pollution impacts on variations in bacteria than fungi and their co-occurrences with ammonia-oxidizing microorganisms in PM2.5. *Environmental Pollution*. 251, 668-680. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.004>
- Ferreria de Queiroz, M., Monteiro, J., Viana, A., Bezerra, C., Lavelle, P., Silva, S. (2021). Litter thickness and soil pH influence the diversity of saprotrophic fungi in primary forest fragments in the Amazon. *Pedobiologia*. 89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2021.150771>
- Fonseca, J., Hoffmann, L., Azeredo, B., Giordano, V., Rodrigues, M., Martins, A., Boschiero, C., Rodrigues, W., Silva, R. (2018). Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. *Gene*. 389-397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.039>
- Franche, C., Lindstrom y Elmerich. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*. 321, 35-59.
- Fonseca, J.P., Hoffman, L., Azeredo, C., Giodiano, V.H., Rodrigues, M., Azevedo, Boschiero, C., Rodrigues, W., Silva R. (2018). Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. *Gene*. 642, 389-397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.039>
- Fuerts, J., Sagulenko, E. (2011). Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Review Microbiology*. 9, 403-413. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2578>
- Goss-Souza, D., Mendes, L.W., Rodrigues, J.L.M et al. (2019). Ecological Processes Shaping Bulk Soil and Rhizosphere Microbiome Assembly in a Long-Term Amazon Forest-to-Agriculture Conversion. *Microbial Ecology*. 79, 110-122. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01401-y>
- Hassan, S., Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*. 63(9), 3429-3444. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/err4307>
- Hickey, A. (2020). The hidden symbiont: Exploring arbuscular mycorrhizae in the Ecuadorian Amazon. Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- Iglesias, L., Salas, E., Leblanc, H., Nygren, P. (2011). Response of *Theobroma cacao* and *Inga edulis* seedlings to cross-inoculated populations of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agroforestry Systems*. 63. doi: <https://doi.org/10.1007/s10457-011-9400-9>

- Jesus EC, Marsh TL, Tiedje JM et al. (2009). Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal Multidisciplinary of Microbial Ecology*. 3, 1004–1011
- Kaiser, B., Gridley, K., Brady, J., Phillips, T., Tyerman, S. (2005). The Role of Molybdenum in Agricultural Plant Production. *Annals of Botany*. 96(5), 745-754. doi: <https://doi.org/10.1093/aob/mci226>
- Kim, J., Sparovek, G., Longo, R., De Melo, W., Crowley, D. (2007). Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. *Soil Biology & Biochemistry*. 39, 684-690. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.08.010>
- Kursar, T., Dexter, K., Lokvam, J., Pennington, R., Richardson, J., Weber, M., Murakami, E., Drake, C., Coley, P. (2009). The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. *PNAS*. 106 (43), 18073-18078. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0904786106>
- Laurance, W., Fearnside, P., Laurance, S., Delamonica, P., Lovejoy, T., Merona, J., Chambers, J., Gascon, C. (1999). Relationship between soils and Amazon forest biomass: a landscape-scale study. *Forest Ecology and Management*. 118, 127-138.
- Le Roux, X., Bouskill, N., Niboyet, A., Barthes, L., Dijkstra, P., Field, C., Hungate, B., Lerondelle, C., Pommier, T., Tang, J., Terada, A., Tourna, M., Poly, F. (2016). Predicting the Responses of Soil Nitrite-Oxidizers to Multi-Factorial Global Change: A Trait-Based Approach. *Frontiers in Microbiology*. 7, 628. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00628>
- Lima, N., Santos, V., La Porta. (2018). Quimiodiversidade, Bioatividade e Quimiosistemática do Gênero *Inga* (FABACEAE): *Uma Breve Revisão*. *Revista Virtual de Química*. 10(3): 459-473.
- Martinelli, L., Piccolo, M., Townsend, A., Vitousek, P., Cuevas, E., McDowell, W., Robertson, G., Santos, O., Treseder, K. (1999). Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. *Biogeochemistry*. 46, 45-65. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1006100128782>
- Martínez, R., Tuya, M., Martínez, M., Abreu, A. (2009). El coeficiente de correlación de los Rangos de Spearman: Caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 8(2).
- Mujakic, I., Piwosz, K., Koblizek, M. (2022). Phylum Gemmatimonadota and Its Role in the Environment. *Microorganism*. 10 (1), doi: <https://doi.org/10.3390/microorganismos10010151>
- Myster, R. (2014). Interactive effects of flooding and treefall gap formation on Terra Firme forest and Várzea forest seed and seedling mechanisms and tolerances in the Ecuadorean Amazon. *Community Ecology*. 15(2), 212-221. doi: <https://doi.org/10.1556/ComEC.15.2014.2.10>
- Morel, F., Price, N. (2003). The Biogeochemical Cycles of Trace Metals in the Oceans. *Science*. 300 (5621). Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1083545>
- Navarrete, A., Tsai, S., Mendes, L., Faust, K., Hollander, M., Cassman, N., Raes, J., Van Veen, J., Kuramae, E. (2015). Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. *Molecular Ecology*. 24(10), 2433-2448. doi: <https://doi.org/10.1111/mec.13172>
- Neu, A., Allen, E., Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges

- and prospects. *PNAS*. 118(5). doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>
- Oliveira, S., Marciano, L., Lima, B., Aparecida, C., Avelar, P., Souza, F. (2014). Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30, 1239-1250. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1547-2>
- Parolin, P., Wittmann, F. (2010). Struggle in the flood: tree responses to flooding stress in four tropical floodplain systems. *AoB Plants*. doi: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq003>
- Pedraza, R., Teixeira, K., Scavino, A., García de Salamone, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V., Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Revista Corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11(2), 155-164.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, Van der Putten, W. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Review*. 11, 789-799
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J., Masson, C. (2016). Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology*. 24(1), 63-75. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>
- Ritter, C., Forster, D., Azevedo, J., Antoneli, A., Nilsson, R., Trujillo, M., Dunthorn, M. (2021). Assessing Biotic and Abiotic Interactions of Microorganisms in Amazonia through Co-Occurrence Networks and DNA Metabarcoding. *Microbial Ecology*. 82, 746-760. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01719-6>
- Ritter, C., Zizka, A., Barnes, C., Nilsson, H., Roger, F., Antonelli, A. (2018). Locality or habitat? Exploring predictors of biodiversity in Amazonia. *Ecography*. 42(2), 321-333. doi: <https://doi.org/10.1111/ecog.03833>
- Ritter, C., Faurby, S., Bennett, D., Naka, L., Steege, H., Zizka, A., Haanel, Q., Nilsson, H., Antonelli, A. (The pitfalls of biodiversity proxies: Differences in richness patterns of birds, trees and understudied diversity across Amazonia. *Scientific Reports*. 9 (19205). doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55490-3>
- Ritter, C., Zizka, A., Roger, F., Tuomisto, H., Barnes, C., Nilsson, 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*. doi: [10.7717/peerj.5661](https://doi.org/10.7717/peerj.5661). eCollection 2018.
- Sombroek, W. (1984). Soils of the Amazon Region. The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. Junk Publisher. Netherlands.
- Soto, J., Pachecho, D., Zambrano, O., Ortega, J. (2012). Revisión Florística del Género Inga Miller (Leguminosidae, Mimosoideae) en el Estado de Zulia, Venezuela. *Acta Botánica de Venezuela*. 35(1), 27-52.
- Santos, C., Toyama, D., Souza de Oliveira, T., Pellon, F. (2019). Flood Season Microbiota from the Amazon Basin Lakes: Analysis with Metagenome Sequencing. *Microbiology Resource Announcements*. 8(17). doi: <https://doi.org/10.1128/MRA.00229-19>
- Satinsky, B., Fortunato, C., Doherty, M., Smith, C., Sharma, S., Ward, N., Krusche, A., Yager, P., Richey, J., Moran, M., Crump, B. (2015). Metagenomic and metatranscriptomic inventories of the lower Amazon River, May 2011. *Microbiome* 3 (39). doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0099-0>
- Steffi, M., Lauber, M., Reitmeier, S., Kacprowski, T., Baumbach, J., Haller, D., List, M. (2021).

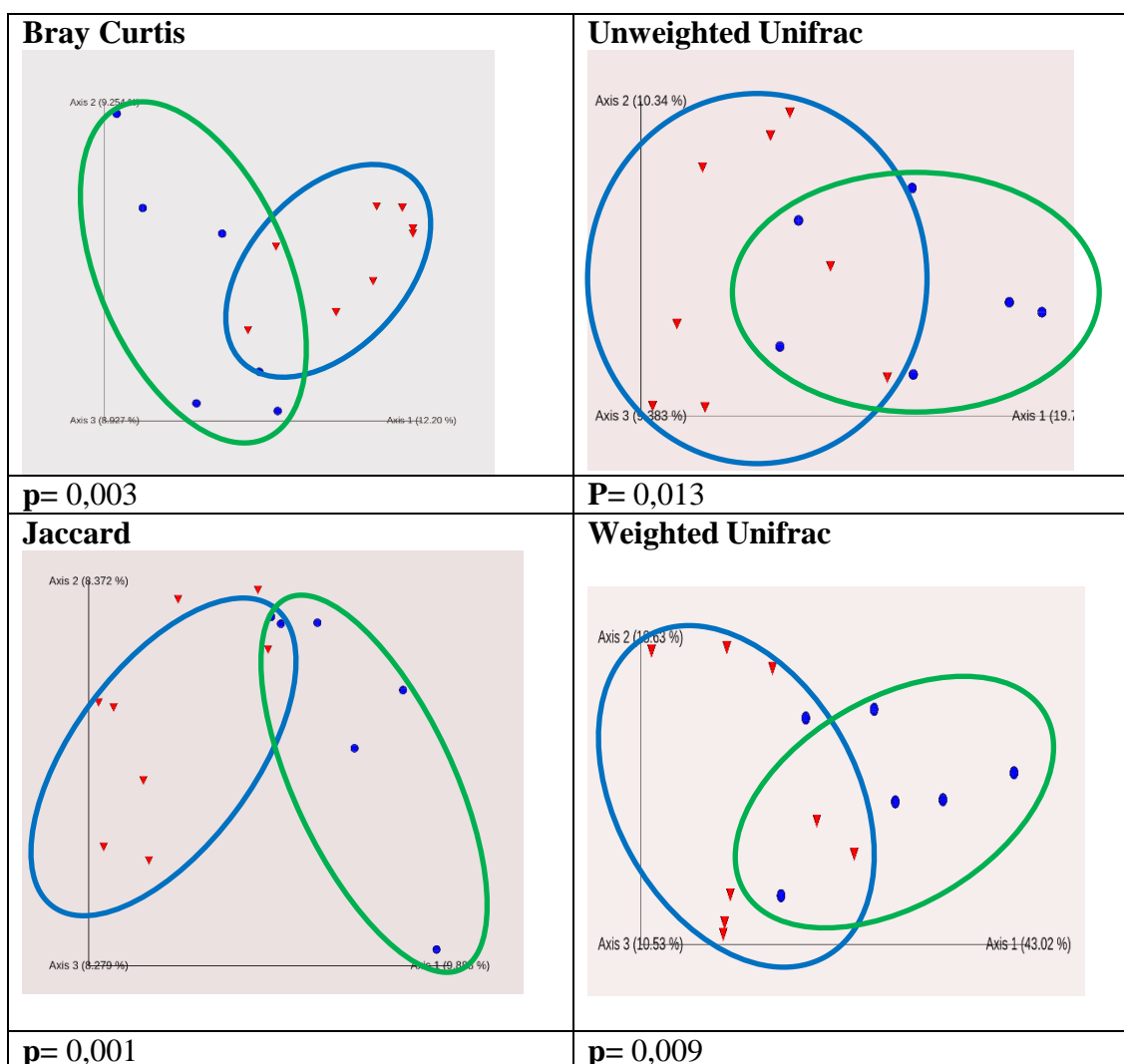
- Network analysis methods for studying microbial communities: A mini review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 19, 2687-2698. doi: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>
- Souza, D., Mendes, L., Borges, C., Rodrigues, J., Tsai, S. (2019). Amazon forest-to-agriculture conversion alters rhizosphere microbiome composition while functions are kept. *FEMS Microbiology Ecology*. 95(3). doi: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz009>
- Tedersoo, L., Sadam, A., Zambrano, M., Valencia, R., Bahram, M. (2010). Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in Western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *The ISME journal*. 4(4), 465-471.
- Turner, T., James, E., Poole, F. (2013). The Plant Microbiome. *Genome Biology*. 209 (14). doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>
- Vandenkoornhuyse, P., Mahé, S., Ineson, P., Staddon, P., Ostle, N., Cliquet, J.B., Francez, A., Ajustadory, A., Young, P. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. *PNAS*. 104(43), 16970-16975. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0705902104>
- Vandenkoornhuyse, P., Quaisier, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufrense, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. 206 (4), 1196-1206. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Timmusk, S., Paalme, V., Pavlicek, T., Bergquist, J., Vangala, A., Nevo, E. (2011). Bacterial Distribution in the Rhizosphere of Wild Barley under Contrasting Microclimates. *PLoS ONE*. 6(3). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017968>
- Willis, A., Rodrigues, B., Harris, P. (2012). The Ecology of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Critical Review in Plant Sciences*. 32 (1). doi: <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.683375>
- Wesselingh, F., Hoorn, C., Kroonenberg, S., Antonelli, A., Lundberg, J., Vonhof, H., Hooghiemstra, H. (2010). On the origin of Amazonian landscapes and biodiversity: a synthesis. Amazonia: Landscape and Species Evolution: A Look into the Past Edited. Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-18113-6
- Womack, A., Artaxo, P., Ishida, F., Mueller, R., Saleska, S., Wiedemann, K., Bohannan, B., Green, J. (2015). Characterization of active and total fungal communities in the atmosphere over the Amazon rainforest. *Biogeosciences*. 12 (21).
- Zhao, B., Xing, P., Wu, Q. (2020). Interactions between bacteria and fungi in macrophyte leaf litter decomposition. *Environmental Microbiology*. 23(2), 1130-1144. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.1526>
- Zuñiga, A., Muñoz, G., Bustos, A., Ramírez, F., Delgado, M., Valle, S., Díaz, L. The nitrogen fixing specie *Sophora cassioides* (Fabaceae), is nutritionally favored and their rhizosphere bacteria modified when is co-cultivated with the cluster root forming *Embothrium coccineum* (Proteaceae). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 18(3). doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162018005001801>

9. ANEXOS

**ANEXO 1: GENERALIDADES DE LAS LECTURAS POSTERIOR AL PROCESO DE
DEMULPLEXING**

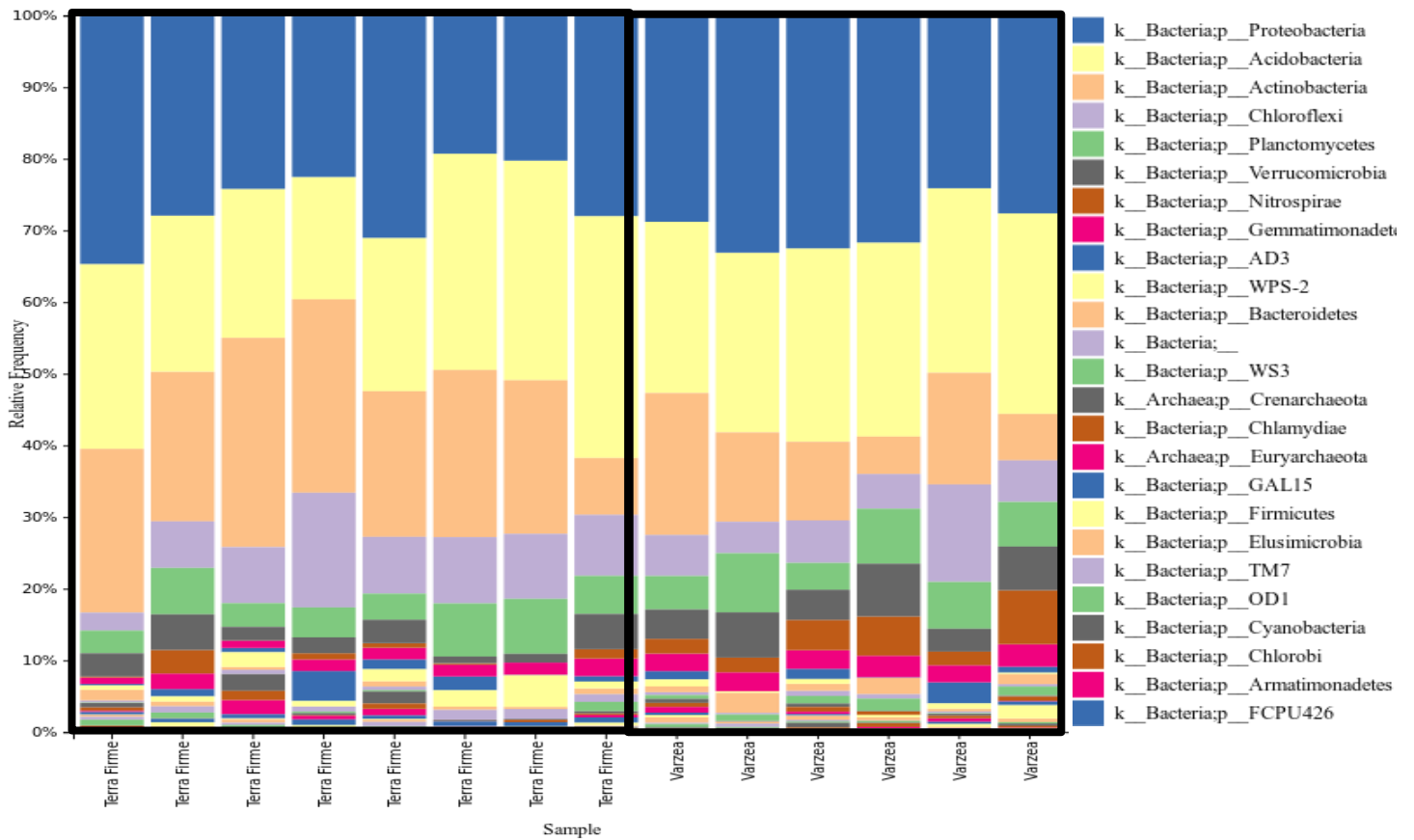
Métrica	Sample
Número de muestras	19
Número de features	4277
Frecuencia total	336318

**ANEXO 2: INDICES DE DIVERSIDAD BETA PARA LOS ECOSISTEMAS DE TERRA
FIRME Y VÁRZEA**



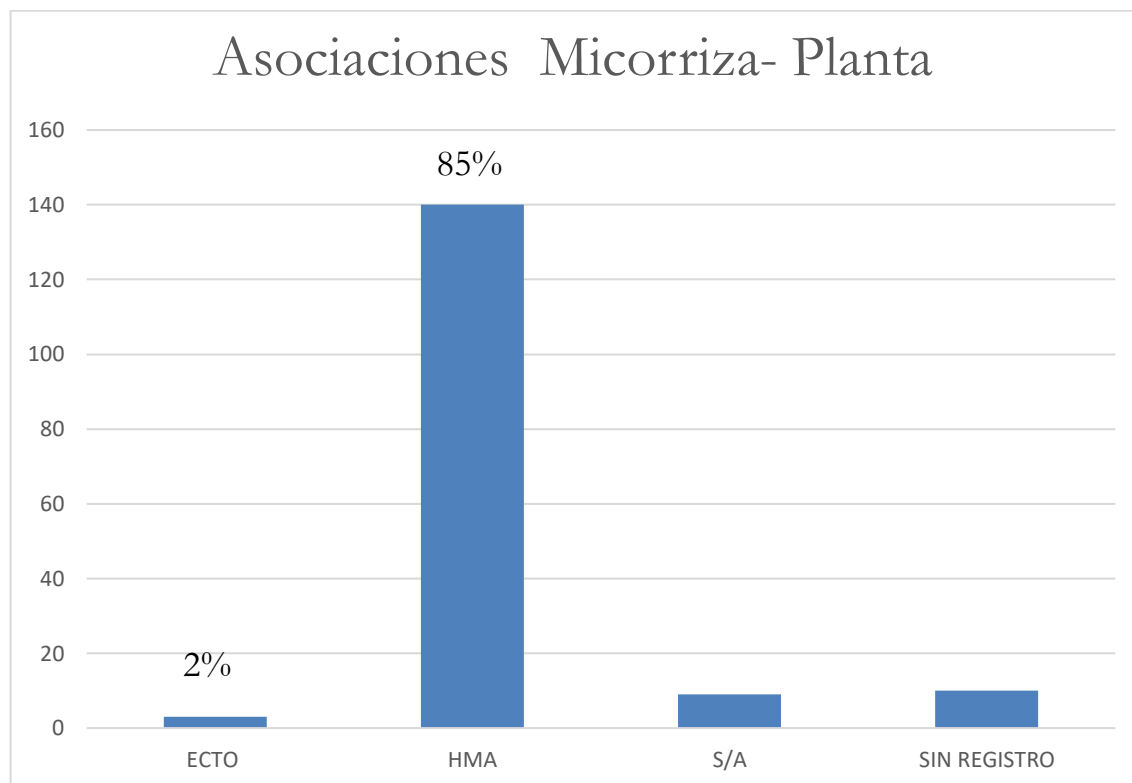
Descripción: Índices de Diversidad Beta establecidos para Terra Firme (línea azul) y Várzea (línea verde). Indices de Jaccard, Bray Curtis, Weighted Unifrac y Unweighted Unifrac significativos $p > 0,05$.

ANEXO 3: BARRAS DE DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA A NIVEL DE FILO



Descripción: Gráfico de Barras de Distribución Taxonómica Nivel 2 (Filo). Eje x: Ecosistemas de Terra Firme (8) y Várzea (4). Eje y: Frecuencia Relativa de los Filos Bacterianos

ANEXO 4: ESTADO MICORRIZAL DE 162 ESPECIES VEGETALES DE LA AMAZONIA ECUATORIANA



Descripción: Asociaciones micorriza-planta de un total de 162 especies vegetales de la Amazonia Ecuatoriana. ECTO= Ectomicorriza, HMA= Hongo Micorrízico Arbuscular, S/A= Sin Asociación, SIN REGISTRO= No se encontró registro en la literal de alguna asociación con la especie de planta. Valor porcentual de hongos micorrízicos arbusculares y hongos ectomicorrízicos registrados