

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Emblema endémico de las Galápagos: explorando las alianzas con hongos dentro de la rizósfera y filósfera del genus *Scalesia*

Dariel Andrés Salvador Guncay

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 20 de diciembre del 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Emblema endémico de las Galápagos: explorando las alianzas con hongos
dentro de la rizósfera y filósfera del genus *Scalesia***

Dariel Andrés Salvador Guncay

Nombre del profesor, Título académico

Pieter Marinus Johannes van 't Hof, Ph.D

Quito, 20 de diciembre del 2023

© 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:	Dariel Andrés Salvador Guncay
Código:	00212613
Cédula de identidad:	0940405764
Lugar y fecha:	Guayaquil, 20 de diciembre del 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

El género *Scalesia* es un genus único de plantas que se extendió entre las islas Galápagos por procesos de radiación adaptativa, similar a los pinzones de Darwin. Incluso se ha reportado que son endémicas de algunas islas en concreto, pero poco conocimiento se tiene de su microbioma. Esto se realizó mediante la amplificación de marcadores ITS1/ITS2 de las rizósfera y filósfera de 8 especies de *Scalesia* correspondientes a la primera expedición en las que se muestrearon a 32 ejemplares provenientes de las islas Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal. Las secuencias pasaron por el análisis bioinformático para obtener la alfa y beta diversidad, además de gráficas de abundancia relativa y diferencial. En los índices de alfa diversidad se observó como las raíces tuvieron comunidades de hongos mayor riqueza que en las hojas, y que la diversidad en las diferentes islas o especies de *Scalesia* es similar. La beta diversidad reflejó cómo las comunidades son más parecidas entre raíces a diferencia de las hojas. Con la abundancia se mayor abundancia de ciertos órdenes en las hojas como *Capnodiales* y *Mycosphaerellales*. y que en las raíces no hubo resultados significativos. A pesar de que este primer contacto indica el estado de diversidad de los hongos entre rizósfera y filósfera de *Scalesia*, se espera tener un mayor alcance al analizar el resto de las muestras de otra expedición que se realizó en 2023. Además, se recolectaron ejemplares de *Pappobolus* que es el género más emparentado con más especies que permitirá realizar comparaciones entre los microbiomas de las Galápagos con Ecuador continental. Finalmente, con la continuación del proyecto del biobanco se cultivaron especies de los hongos adheridos a la rizósfera de *Scalesia* para su futura identificación.

Palabras clave: Radiación adaptativa, *Scalesia*, endemismo, Galápagos, microbioma, rizósfera, filósfera, *Pappobolus*, biobanco.

ABSTRACT

The genus *Scalesia* is a unique genus of plants that spread among the Galapagos Islands by processes of adaptive radiation, similar to Darwin's finches. They have even been reported to be endemic to particular islands, but little is known about their microbiome. This was done by amplifying ITS1/ITS2 markers from the rhizosphere and phyllosphere of 8 *Scalesia* species corresponding to the first expedition in which 32 specimens from Isabela, Santa Cruz and San Cristóbal islands were sampled. The sequences underwent bioinformatic analysis to obtain alpha and beta diversity, as well as relative and differential abundance graphs. In the alpha diversity indexes, it was observed that the roots had richer fungal communities than the leaves, and that the diversity in the different islands or species of *Scalesia* is similar. The beta diversity reflected how the communities are more similar among roots as opposed to leaves. With the abundance of certain orders in the leaves such as *Capnodiales* and *Mycosphaerellales*. and that in the roots there were no significant results..Although this first contact indicates the diversity status of fungi between rhizosphere and phyllosphere of *Scalesia*, it is expected to have a greater scope when analyzing the rest of the samples from another expedition to be conducted in 2023. In addition, specimens of *Pappobolus* were collected, which is the most closely related genus with more species that will allow comparisons between the microbiomes of the Galapagos and continental Ecuador. Finally, with the continuation of the biobank project, species of fungi attached to the *Scalesia* rhizosphere were cultured for future identification.

Key words: Adaptive radiation, *Scalesia*, endemism, Galapagos, microbiome, rhizosphere, phyllosphere, *Pappobolus*, biobank.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Las islas Galápagos como un laboratorio natural.....	11
1.2. Especies endémicas de las islas Galápagos	11
1.3. Microbiomas como apoyo evolutivo de <i>Scalesia</i>	12
1.4. Proyecto Barcode	13
1.5. Avances bioinformáticos para estudiar microbiomas	14
1.6. Biobanco de hongos	14
2. MÉTODOS	15
2.1. Recolección de muestras.....	15
2.2. Extracción de ADN.....	15
2.3. Procesamiento de los datos de las secuencias	16
2.4. Abundancia diferencial.....	16
2.5. Biobanking de hongos de la rizósfera de <i>Scalesia</i>	17
3. RESULTADOS	18
3.1. Alfa diversidad entre las muestras de <i>Scalesia</i> y entre las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz	18
3.2. Beta diversidad de la rizósfera y filósfera entre las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz	18
3.3. Abundancia relativa de la rizósfera y filósfera de <i>Scalesia</i>	19
3.4. Abundancias diferenciales de la rizósfera y filósfera entre <i>Scalesia affinis</i> en Isabela y Santa Cruz, y entre San Cristóbal con Santa Cruz	20
3.5. Expediciones <i>Pappobolus</i> 2023	20
3.6. Biobanco de la rizósfera de <i>Scalesia</i>	21
4. DISCUSIÓN	22
5. CONCLUSIONES	26
6. TABLAS.....	27
7. FIGURAS.....	29
8. REFERENCIAS	34
9. ANEXOS.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metadata de la expedición <i>Pappobolus</i>	27
Tabla 2. Resultados preliminares del proyecto del Biobanco.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alfa diversidad (a) entre especies de <i>Scalesia</i> y (b) entre las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz.....	29
Figura 2. Beta diversidad Unifrac Ponderada para las muestras de <i>Scalesia</i> presentes en las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz.	30
Figura 3. Abundancia relativa de las comunidades de hongos de las raíces y hojas de <i>Scalesia</i> . .	31
Figura 4. Abundancias diferenciales entre (a) <i>S. affinis</i> presente en dos islas, y (b) entre las islas Isabela y Santa Cruz.....	32
Figura 5. Muestreo de las expediciones Pappobolus 2023. (a) ejemplares recolectados. (b) salidas de expedición en alrededores del Pululahua, (c) visitas al herbario del INABIO.	33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. MAPAS DEL MUESTREO DE LA (a) PRIMERA EXPEDICIÓN DE SCALESIA EN 2021 Y (b) DE LA EXPEDICIÓN PAPPOBOLUS EN 2023.	38
ANEXO 2. PIPELINE EN QIIME2 PARA EL PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE HONGOS	39
ANEXO 3. CONSTRUCCIÓN DE UN CLASIFICADOR TAXONÓMICO CON UNITE	42
ANEXO 4. CONSTRUCCIÓN DE LOS ARCHIVOS DE PERFIL DE LAS RAÍCES Y HOJAS PARA STAMP	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las islas Galápagos como un laboratorio natural

Las Islas Galápagos, ubicadas en el Océano Pacífico ecuatorial, conforman un archipiélago que ha capturado la atención de la comunidad científica por su singularidad biológica y geológica. Colonizadas por especies únicas, algunas endémicas como las tortugas gigantes y los pinzones de Darwin, las Galápagos han sido moldeadas por procesos evolutivos distintivos (Sevilla, 2018). Estas islas, que varían en edades desde 0.05 a 3 millones de años, emergieron como resultado de la actividad volcánica y tectónica en la región. Está ubicada sobre una corriente ascendente de magma de la astenosfera que provoca la formación de nuevas islas, por ello se considera un *Hotspot* biológico (Dal Forno, et al., 2017). La teoría de las placas tectónicas revela que la placa de Nazca se desplaza hacia el este y se sumerge bajo la placa Sudamericana, generando la actividad volcánica que da origen a las Galápagos (Velásquez, 2009). La distribución de las islas exhibe patrones que reflejan la edad geológica, siendo las islas más antiguas al este y las más jóvenes al oeste, cerca del *Hotspot*. Este arreglo geográfico ha permitido el desarrollo de ecosistemas únicos en cada isla de las que se muestrea flora y fauna con historias peculiares como el género *Scalesia* (Hamann & Wium-Andersen, 1986).

1.2. Especies endémicas de las islas Galápagos

Existen casos bien documentados de endemismo en las Islas Galápagos, como los pinzones de Darwin, que han evolucionado en 17 especies a partir de un ancestro común debido a la presión selectiva impuesta por las condiciones ambientales locales. Este proceso de selección natural se centró en las modificaciones en la estructura de sus picos en respuesta a la variabilidad en la distribución de semillas a lo largo de las estaciones (de Vries, 2009). Este fenómeno se relaciona

con la expansión de la filogenia y procesos de radiación adaptativa, dando lugar a diversas especies que se originan de un ancestro común en una escala geológica relativamente breve (Enríquez-Moncayo & Flores, 2022; Loo, et al., 2019). Las Galápagos exhiben un endemismo notable en su flora, alcanzando aproximadamente el 32%, y destacando géneros distintivos como *Scalesia*. Este género, estrechamente emparentado con la familia *Asteraceae* que incluye a los girasoles (Itow, 1995), se cree por medio de relojes moleculares que tuvo un ancestro que migró desde el Ecuador continental hasta las Galápagos. En este entorno, *Scalesia* ha experimentado una diversificación que ha llevado a la aparición de 15 especies, algunas endémicas de islas específicas, otorgándoles el título de los "pinzones de Darwin" del reino vegetal (Fernández-Mazuecos, et al., 2020). Por otro lado, *Pappobolus*, un género presente en el continente ecuatoriano con 23 especies que representa un intrigante objeto de estudio al ser el género más emparentado a *Scalesia* con más especies reportadas que otros géneros de la misma familia. El interés sobre los microbiomas de *Scalesia* radica en las presiones selectivas que ha enfrentado al colonizar las islas, lo que ha inducido cambios morfológicos notables en aspectos como su forma de arbusto o árbol, el tamaño y forma de las hojas, e incluso la estructura de sus flores (Fernández-Mazuecos, et al., 2020; Cerca, et al., 2022). Este proceso evolutivo proporciona una perspectiva única sobre la adaptación de las especies a ambientes insulares, mientras que el estudio de *Pappobolus* en el continente contribuye al entendimiento de la diversidad y la evolución de la flora en la región continental ecuatoriana.

1.3. Microbiomas como apoyo evolutivo de *Scalesia*

Los microbiomas representan consorcios de microorganismos, su material genético y las interacciones en entornos específicos, como la rizósfera y la filósfera de las plantas (Masaquiza, 2019). Están conformados por bacterias, arqueas u hongos que varían en su composición debido a

los procesos de colonización y la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Ocupan nichos específicos en distintos medios, permitiendo la adaptación de las plantas a entornos desafiantes como las Galápagos mediante el reciclaje de nutrientes, protección contra patógenos, tolerancia al estrés y relaciones simbióticas (Aguilar, 2021; Hunt, et al., 2023). En el contexto de las Galápagos, la variación en la composición de los microbiomas entre islas se relaciona con las diferentes edades geológicas, afectando el asentamiento de microorganismos en los suelos y su posterior colonización en raíces y hojas (Wan, et al., 2021). Este estudio se enfoca en caracterizar los hongos del microbioma, que ha sido poco explorado en términos de fuentes de microorganismos benéficos para la adaptación. Se busca comprender patrones de diversidad en hojas y raíces entre islas y especies de *Scalesia*, establecer posibles asociaciones entre los microbiomas de las Galápagos y Ecuador continental, y determinar si es posible de extraer hongos rizosféricos mediante cultivo.

1.4. Proyecto Barcode

Este proyecto centrado en la identificación de especies de las Islas Galápagos mediante la secuenciación de ADN se presenta como una herramienta crucial para comprender la diversidad genética de *Scalesia* y la conformación de sus microbiomas. Dada la complejidad del ecosistema microbiológico, la aplicación de códigos de barras de ADN facilita la diferenciación precisa entre ellas. Este enfoque molecular contribuye a la caracterización taxonómicas de los hongos y bacterias más representativos en *Scalesia*. Asimismo, la identificación de taxones benéficos proporciona información esencial para la conservación y comprensión de la evolución única de estas plantas en un entorno insular. Su aplicación específicamente en estudios sobre el microbioma de *Scalesia*, amplía nuestra comprensión de las interacciones genéticas y microbianas en estas especies endémicas, lo que resulta fundamental para su conservación y manejo sostenible.

1.5. Avances bioinformáticos para estudiar microbiomas

El metabarcoding es una herramienta centrada en la secuenciación masiva del ADN y son utilizadas para estudios de microbiomas. Con esto se puede filtrar secuencias de una sola muestra y diferenciar entre hongos y bacterias, identificar especies con mayor precisión, y realizar análisis sobre la diversidad y composición en los microbiomas. En este caso se utilizaron secuencias de las regiones ITS que permitan una caracterización taxonómica general del microbioma (Mbareche, et al., 2020). Este enfoque es útil cuando se quiere caracterizar la composición de un microbioma más que identificar alguna especie en particular, lo cual se empareja con la finalidad de este estudio. Conocer el microbioma de *Scalesia* es el primer paso para explorar a mayor profundidad qué hongos podrían resultar benéficos para la adaptación de este género que actualmente cuenta con varias especies en estado vulnerable según la Lista Roja (Galapagos Conservation Trust, s.f.).

1.6. Biobanco de hongos

Los biobancos de hongos son instalaciones especializadas dedicadas a la recopilación, conservación y gestión de diversas muestras biológicas de hongos. Estos desempeñan un papel esencial en la preservación de la biodiversidad fúngica al almacenar cepas puras, esporas y material genético, facilitando así la investigación en áreas como la taxonomía, ecología, biología molecular y aplicaciones biotecnológicas (Ryan, et al., 2019). Los biobancos son cruciales para la conservación de plantas como *Scalesia* al ofrecer recursos esenciales para su preservación. La capacidad de conservar y caracterizar muestras botánicas fortalece los esfuerzos de conservación y proporciona conocimientos clave para abordar desafíos ambientales, especialmente en ecosistemas únicos como las Islas Galápagos (Paton, et al., 2020; Agnihotri, et al., 2018).

2. MÉTODOS

2.1. Recolección de muestras

Se muestrearon a 32 individuos de *Scalesia* presentes en las islas Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal (**ANEXO 1a**), de cada uno se recolectaron 6 muestras en total. Para las raíces, se tomaron 3 muestras de las que se sacudió el exceso de tierra adherida y se conservaron en tubos Falcon de 15 ml sin solución, fundas ziplock con silica gel, y las últimas se lavaron con agua estéril para guardarlos en tubos Eppendorf de 2ml (85% Lifeguard, 15% muestra). Estas dos últimas se guardaron en un cooler. Para las hojas se guardaron entre 2-3 hojas por muestra y se conservaron de la misma manera de las raíces hasta llegar al laboratorio para poder procesarlas. En las expediciones para *Pappobolus* se siguió el mismo protocolo de recolección para obtener 18 individuos en sectores cercanos a la Reserva Geobotánica Pululahua (**ANEXO 1b**). Solo cambió el modo de conservación de las muestras en solución con DNA/RNA Shield (Zymoresearch).

2.2. Extracción de ADN

Para extraer el DNA genómico de las muestras de rizósfera con suelo adherido, y muestras de la filósfera, se usó el Kit DNeasy PowerSoil® de Qiagen (USA) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Se giró brevemente el PowerBead Pro Tube para asegurar que las microesferas se hayan asentado. A continuación, se añadieron hasta 250 mg de suelo y 800 µl de Solución CD1, seguido de una breve agitación para mezclar. El PowerBead Pro Tube se fijó horizontalmente en un adaptador de vórtex, y se agitó en vórtex a velocidad máxima durante 10 minutos. Después de centrifugó el tubo a 15.000 x g durante 1 minuto, se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 ml. Se adicionó Solución CD2, se agitó y se centrifugó, transfiriendo el sobrenadante a otro tubo limpio. Luego, se añadió Solución CD3 y se cargó el lisado en una

columna de centrifugación MB, repitiendo el proceso para asegurar que todo el lisado pase por la columna. Se realizaron pasos adicionales, incluyendo la adición de Solución EA, Solución C5, Solución C6, y finalmente se centrifugó para obtener ADN listo para aplicaciones posteriores. La calidad del ADN se evaluó mediante Qubit al finalizar la extracción y estas muestras se mandaron a secuenciar a Genome Quebec [Canadá] utilizando la plataforma MiSeq de Illumina para caracterizar a los hongos por medio de sus regiones ITS1/ITS2 con los cebadores ITS1F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA e ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC.

2.3. Procesamiento de los datos de las secuencias

Se secuenciaron las muestras de la rizósfera y filósfera de las hojas mediante MiSeq, resultando en 121,021 reads y 110,210 reads, respectivamente. Los reads se procesaron en QIIME2 (V2023.5) según el pipeline detallado en el **ANEXO 2**. Después de importar las secuencias fastq, se visualizó en QIIME VIEW y se realizó el denoising en DADA2 para crear la feature table. Se llevaron a cabo filtrado y rarefacción, seguidos por el filtrado de repseqs para obtener la feature table final. Las secuencias se clasificaron con unite-ver9-99-classifier-29.11.2022.qza y se generaron archivos de clasificación taxonómica con la extensión .biom llamados 'table-with-taxonomy.biom' según el **ANEXO 3**. Finalmente, se crearon matrices de alfa y beta diversidad en QIIME, junto con un análisis de abundancia diferencial en STAMP. Para la alfa-diversidad, se empleó el índice Chao1, y para la beta-diversidad se utilizó una matriz de distancias Unifrac ponderada.

2.4. Abundancia diferencial

Antes de cargar archivos en la plataforma de STAMP, se crearon manualmente los archivos de perfil para raíces y hojas según el **ANEXO 4**. Posteriormente, al subir este archivo con la metadata

correspondiente a la plataforma de STAMP, se seleccionó "Two-Groups" en propiedades y "White's non-parametric t-test" con corrección en "Benjamini-Hochberg FDR" en pruebas estadísticas. Se agruparon las muestras por islas o especies de *Scalesia*, se eligió "Extended error bar" como tipo de gráfica en el centro, y se procesaron las muestras según lo deseado.

2.5. Biobanking de hongos de la rizósfera de *Scalesia*

Se diluyó 39 g de PDA en 1 L de agua destilada estéril, este medio se dejaría en autoclave. Luego se enfría con agua hasta que se pueda manipular al tacto de la piel. Dentro de una cámara de flujo laminar se mezcló 4 ampolletas de gentamicina (80g/2ml) con el PDA líquido. Se vertió este medio en cajas Petri autoclavadas y se dejaron solidificar previo a su guardado en refrigeradora. Las muestras de *Scalesia* seleccionadas correspondieron a muestras de raíces conservadas en glicerol de la primera y segunda expedición. Se tomaron 8 muestras correspondientes a una población de cada grupo para tener una visión general de los hongos presentes de las islas Isabela, Santa Cruz, San Cristóbal y Floreana. Dentro de la cámara, se dispensó 900 µl agua destilada estéril 10 en tubos Eppendorf de 1.5 ml para cultivar por duplicado en diluciones de hasta 10^{-5} . Luego, se dispensó 100 µl de la muestra en el tubo de la dilución 10^{-1} y se hizo traspasos con 100 µl a los tubos de las diluciones consecuentes. Se vertió 100 µl de cada dilución en dos placas para el cultivo por duplicado y se extendió con una asa de vidrio flameada con alcohol al 96% y enfriada en el agar de la caja petri. Se incubaron las cajas en una cámara sin luz a 25 °C durante 2-3 semanas hasta que crezcan los hongos y se puedan realizar inmediatamente los traspasos a otras cajas. Para esto se utilizaron palillos de madera flameados y se recolectaron los hongos individualmente para pinchar en una caja nueva 5 puntos en forma de X. Se dejaron crecer en la misma cámara a las mismas condiciones y se hizo la identificación de morfotipos hasta el momento.

3. RESULTADOS

3.1. Alfa diversidad entre las muestras de *Scalesia* y entre las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz

Las **Figuras 1a y 1b** muestran la alfa diversidad mediante el índice de Chao1 para medir la riqueza de especies para diversas especies de *Scalesia* (**Figura 1a**), valores altos simbolizan mayor riqueza y valores bajos menor riqueza. En relación con las raíces, se observó que *S. pedunculata* y *S. aspera* presentaron mayor riqueza de hongos, mientras que, en las hojas, esta distinción correspondió a *S. pedunculata* y *S. cordata*. Además, se llevó a cabo un análisis de diversidad considerando las muestras de *Scalesia* recolectadas en las islas Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal (**Figura 1b**). Respecto a las raíces, la isla Santa Cruz exhibió la comunidad de hongos de mayor riqueza, seguida por San Cristóbal y luego Isabela. En cuanto a las hojas, esta fue mayor en San Cristóbal, seguido por Isabela y finalmente Santa Cruz. Es importante destacar que en ninguno de los casos las tendencias parecen significativas, ya que el valor-p fue mayor a 0.05. Estos resultados sugieren que no hay diferencias estadísticamente significativas en la riqueza de hongos entre las especies de *Scalesia* y las diferentes islas analizadas. Aun así, por el momento se muestra que *S. pedunculata* es la especie de *Scalesia* con mayor riqueza de hongos tanto para raíces como hojas. Además, las muestras de las raíces presentaron valores de riqueza más elevados que en las hojas.

3.2. Beta diversidad de la rizósfera y filósfera entre las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz

La **Figura 2** presenta la diversidad beta con la métrica Unifrac ponderada para las muestras de *Scalesia* recopiladas en las islas Isabela (rojo), San Cristóbal (azul) y Santa Cruz (naranja). En

estas se considera tanto la riqueza como la abundancia para determinar las disimilitudes o parentescos según las distancias entre las muestras. Se observa que los puntos entre las muestras son relativamente cercanos, sugiriendo que, en general, las comunidades de hongos presentes en ambas localidades son similares entre sí. En cambio, con las hojas se evidencia una dispersión más notable, lo que indica una comunidad de hongos menos parecida entre sí. Es relevante señalar que el valor-p asociado con estos resultados fue inferior a 0.05, lo que resalta la significancia estadística de las observaciones realizadas. Este hallazgo refuerza la conclusión de que existe una diferencia significativa en la comunidad de hongos entre las muestras de *Scalesia* tomadas de las distintas islas, al menos en el apartado de las hojas. A diferencia de las raíces en donde parece que estas comunidades son bastantes parecidas y cercanas.

3.3. Abundancia relativa de la rizósfera y filósfera de *Scalesia*

En la **Figura 3** se ilustra la abundancia relativa de las comunidades de hongos presentes en las raíces y hojas de *Scalesia*. Se observa una notable disparidad en la diversidad del microbioma entre las raíces y las hojas. Las raíces exhiben más diversidad, aunque de igual manera entre los órdenes más abundantes destacan *Botryosphaariales* (rojo), *Hypocreales* (verde claro) y *Eurotiales* (cian), indicando la coexistencia de diversos tipos de hongos en este microambiente específico en comparación con las hojas. En el análisis de las hojas, se destaca una marcada prevalencia de ciertos órdenes fúngicos. Específicamente, en las hojas de la isla Santa Cruz, sobresale la presencia dominante del orden *Capnodiales*, representado en tonos cian. En contraste, en las hojas de San Cristóbal, el orden *Mycosphaerellales*, identificado por tonos amarillos, se muestra como el predominante.

3.4. Abundancias diferenciales de la rizósfera y filósfera entre *Scalesia affinis* en Isabela y Santa Cruz, y entre San Cristóbal con Santa Cruz

La **Figura 4a** exhiben la abundancia diferencial de *S. affinis* en dos localidades, Isabela (azul) y Santa Cruz (verde). Se destaca que ninguna de las familias de hongos muestra una compartición tan abundante como los hongos pertenecientes a la familia *Aspergillaceae* en las raíces. En este contexto, se aprecia una diversidad más limitada de hongos en las hojas en comparación con las raíces. Adicionalmente, se exploró la diversidad entre las islas San Cristóbal (naranja) y Santa Cruz (verde) según lo mostrado en la **Figura 4b**. Se observa que ninguna de las familias de hongos presenta una compartición significativa en ninguna de las dos islas, ni en las raíces ni en las hojas.

3.5. Expediciones *Pappobolus* 2023

En esta expedición se exploraron áreas cercanas a la Reserva Geobotánica Pululahua, donde se recolectaron un total de 18 muestras de tres especies diferentes de *Pappobolus*: *Pappobolus sp.*, *P. nigrescens* y *P. imbaburensis* (**ANEXO 1B**). En la **Tabla 1** se proporcionan detalles sobre la metadata de la expedición *Pappobolus*, incluyendo la fecha de recolección, códigos de identificación establecidos (por ejemplo, Y01), la especie identificada, coordenadas en formato UTM, altitud y detalles sobre las muestras de ADN extraídas.

Las **Figuras 5a, 5b y 5c** ofrecen una visualización detallada del muestreo llevado a cabo durante las expediciones *Pappobolus* 2023. La **Figura 5a** presenta ejemplares de *Pappobolus* presumiblemente recolectados, mostrando tanto las hojas como las flores. La **Figura 5b** captura al equipo de expedición recolectando estos ejemplares en puntos estratégicos cercanos a la Reserva Geobotánica Pululahua. Además, se llevaron a cabo visitas al herbario del INABIO para llevar a

cabo comparaciones morfológicas entre las hojas y flores de *Pappobolus* reportadas y aquellas recolectadas durante la expedición como se muestra en la **Figura 5c**.

3.6. Biobanco de la rizósfera de *Scalesia*

En la **Tabla 2** se presentan los resultados preliminares del proyecto del Biobanco, detallando un total de 8 muestras cultivadas junto con información relevante. Cada muestra cuenta con su código específico, la asociación con la muestra de *Scalesia* sp. correspondiente, la isla de origen, la fecha de cultivo, la realización del traspaso de los hongos y los resultados obtenidos hasta la fecha actual, que es el 08/12/2023. Es importante destacar que estas muestras se obtuvieron de diversas expediciones de *Scalesia*, incluyendo aquellas provenientes de la isla Floreana, lo que amplía la diversidad geográfica de la recolección.

Un paso crucial en el proyecto involucra la identificación de los morfotipos de los hongos presentes en todas las muestras, con un enfoque particular en las 4 muestras que avanzaron hasta la etapa de aislamiento.

4. DISCUSIÓN

Se exploraron los microbiomas de las comunidades fúngicas por medio de los patrones de diversidad y abundancias en la rizósfera y filósfera de *Scalesia*. En cuanto a la alfa diversidad no se encontraron valores significativos que nos indiquen si existe mayor riqueza entre las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz, o entre las 8 especies definidas de *Scalesia* en esta primera expedición. Según la **Figura 1b** en el apartado de raíces pareciera que la isla Santa Cruz es más rica que San Cristóbal e Isabela, mientras que en las hojas la isla San Cristóbal muestra tener más riqueza. No obstante, en ambos casos el valor-p es mayor a 0.05 lo que justificaría que estas tendencias no son significativas. Aun así, cabe mencionar que este estudio se enfoca en el análisis de microbiomas con un número de muestras considerablemente bajo siendo esta 32 muestras en total que se redujeron a 27 por los procesos de filtrado y rarefacción a fin de eliminar del análisis a las muestras de menor calidad y reducir el sesgo de muestreo. Con esto se obtuvieron 6 muestras de Isabela, 8 de San Cristóbal y 13 de Santa Cruz con las que aún se ve un muestreo no emparejado en el que se recolectaron más muestras de Santa Cruz y, por ello, esta isla tiene mayor profundidad de análisis que las otras dos. De todas formas, el equipo del proyecto Barcode se encarga de realizar más expediciones para aumentar el número de muestras como ocurre con las expediciones de *Scalesia* del 2023 con la cual ya se han detectado incluso 14 de las 15 especies reportadas entre 10 de las islas en las Galápagos (García, 2023).

Asimismo, hay que considerar que, si bien estas tendencias no son significativas, incluso con un mayor muestreo se podría esperar patrones de diversidad similares dada la escala geológica de formación de las islas. De acuerdo con (Geist, et al., 2014), Galápagos por su origen volcánico emergió con 13 islas principales en las que las más ancianas son las islas Santa Cruz y San Cristóbal con 2 y 2.4 millones de años respectivamente, y luego Isabela con 1.5 millones de años

como una de las islas más jóvenes. Se especula que las más antiguas otorgaron más tiempo para que algunas especies, incluyendo microorganismos, se adaptaran a sus condiciones ambientales. Esto las conduciría al asentamiento y colonización, en particular de los suelos y luego las hojas, por los hongos que se pudieron encontrar durante el análisis que se acentuaron en los suelos y hojas de la flora que también se condicionó a sobrevivir en las islas. Por lo tanto, se esperaría en futuras observaciones de estos microbiomas que se respete la tendencia de que las islas más antiguas presenten mayor riqueza en sus comunidades fúngicas. Asimismo, como se muestra en la **Figura 1a**, entre los géneros de *Scalesia* con mayor riqueza destacan *S. pedunculata* y *S. aspera* en raíces, y *S. pedunculata* junto a *S. cordata* en hojas. Este es el primer vistazo que se tiene de las comunidades de hongos de los microbiomas de este género. Aunque en ninguno de los casos se muestre un valor-p que genere significancia de estos resultados deberían considerarse como tendencias bases en las que *S. pedunculata* parece ser el género con mayor riqueza en su microbioma que el resto tanto en hojas como raíces.

Si se analizan las comunidades a mayor profundidad entonces se llega a comprender cómo se componen los microbiomas a través de las abundancias relativas y diferenciales. Según la **Figura 3**, en primera instancia las comunidades de hongos presentan comunidades con distintas conformaciones en raíces y hojas dadas las distribuciones de las abundancias de los hongos. De hecho, en las hojas se remarca un tipo de patrón por la predominancia de ciertos órdenes. Entre estos se remarcan *Capnodiales* y *Mycosphaerellales*, grupos de hongos que destacan por especies que son fitopatógenas y atacan principalmente a las hojas de sus hospedadores (Abdollahzadeh, et al., 2020). No se ha reportado algún tipo de contaminación en las hojas de las muestras de *Scalesia* que indique que sea nociva. Aun así, existe riesgo para otras plantas que sí puedan mostrar síntomas dado que estos hongos son generalmente esporulados (De Hoog, 2014). Por un lado, en

un vistazo más profundo hacia las abundancias diferenciales de las familias de hongos representadas en la **Figura 4a** indican que no existe ningún tipo de compartición notorio de las comunidades de hongos entre las islas San Cristóbal y Santa Cruz. Por otro lado, algunas especies como *S. affinis* se pudieron encontrar en más de una isla, proviniendo las muestras de Isabela y Santa Cruz con las que se crearon las abundancias diferenciales de la **Figura 4b**. En primer lugar, se observa cómo se respeta la tendencia establecida de mayor diversidad en las raíces que en las hojas dado que solo se mostró una familia de hongos. En segundo lugar, es notorio como casi ninguna de las familias de hongos es compartida en las raíces salvo algunos casos de hongos que no pudieron clasificarse y el grupo más abundante de *Aspergillaceae*. Esta familia de hongos se caracteriza en general por contar con hongos saprófitos que degradan la materia orgánica con la que entran en contacto y recirculan los nutrientes necesarios para la formación de humus que mejora la calidad de los suelos para la adaptación de la flora. Aparentemente, parte de estos hongos se pudieron encontrar con el proyecto del biobanco según la **Tabla 2**. Algunas muestras se cultivaron hasta la etapa de aislamiento y se diferencian, a primera vista, morfologías macroscópicas correspondientes a *Aspergillaceae*. Si bien estos hongos presentan distintas morfologías se puede distinguir principalmente por la formación de estructuras mohosas de tonalidad verdosa que se distingue en las muestras CAF 2.2 como muestra de la primera expedición de *Scalesia* en Isabela, y HAF 1.2 junto a HPE 1.2 como muestras de las expediciones más recientes en Floreana. Lo que indica que podría existir cierta compartición del microbioma entre las raíces de distintas islas. Esto va de acorde con la beta diversidad mostrada en la **Figura 2** en la que las comunidades son más parecidas en las raíces que en las hojas a pesar de que las muestras provinieron de distintas islas. Aun así, falta su observación a través de microscopio con la que deberían distinguir hifas y conidios como estructuras de este hongo (Houbraken, de Vries &

Samson, 2014). Además, para mejorar la separación del componente fúngico de las raíces y evitar contaminación se tendría que aplicar más antibióticos aparte de gentamicina como la tetraciclina la cual actúa como un supresor de la síntesis proteica en bacteriana y por tanto limitaría su crecimiento en los medios de PDA (Begum, et al., 2020). Se proyecta que con la recuperación del material orgánico de la rizósfera se puedan identificar hongos benéficos para el crecimiento y adaptación de *Scalesia* que se puedan emplear en caso de que ocurran perturbaciones en su medio. Una alternativa orgánica para este fin es la construcción de comunidades sintéticas las cuales exploran las combinaciones que se dan entre microorganismos elegidos para explorar qué interacciones apuntan hacia una finalidad deseada (Xu, et al., 2023). En este caso sería la preservación de ejemplares de *Scalesia* que se encuentran en estado vulnerable. Otro enfoque que ayudaría a esta finalidad sería el secuenciamiento de muestras ya exploradas con marcadores ITS1/ITS4 que, a diferencia del ITS1/ITS2, este permite secuenciar la región completa ITS con lo que se llegaría a un nivel de identificación taxonómica más detallada a una especie de hongos en específico. Aparte, puede que el procesamiento de los datos realizados en STAMP no haya sido el idóneo. De hecho, las herramientas que ofrece se ajustan mejor al análisis de microbiomas bacterianos (Mitchell, et al., 2020), y este software no cuenta con guías definitivas para tratar con secuencias de hongos y pide del pre-procesamiento de información que dificulta la definición de un protocolo.

En cuanto a la conexión con los microbiomas del Ecuador continental se espera que con las muestras las expediciones *Pappobolus* 2023 (**Figura 5a, 5b, 5c**) se puedan comparar los patrones de diversidad de microbiomas hallados de momento en la rizósfera y filósfera de *Scalesia*. De hecho, según la **Tabla 1**, 11 de las 18 muestras ya se mandaron a secuenciar con esta finalidad. Incluso para la especie de *Pappobolus* no definida hasta la fecha.

5. CONCLUSIONES

Este estudio es la primera toma de contacto sobre el perfil del microbioma de hongos de *Scalesia* en las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz. De momento se comprende que las raíces tienen un microbioma con mayor riqueza que las hojas, y que existen hongos más abundantes en las hojas que las raíces. Por ello, en las hojas se refiere un tipo de patrón de diversidad en el que predominan los órdenes *Capnodiales* y *Mycopharellales*, estos podrían incluir algunas especies que sean fitopatógenas de las hojas a pesar de que no se han reportado casos de infección en las muestras de *Scalesia* de esta expedición. También destaca la predominancia del orden *Aspergillaceae* en las raíces. *Pappobolus* es un objeto de estudio prometedor para conectar los microbiomas de las Galápagos con el continente. Estas pasaron por el mismo protocolo de muestreo y algunas muestras ya están secuenciadas, al ser *Pappobolus* el género más cercano y emparentado se espera encontrar patrones de diversidad en los perfiles de microbiomas que permitan comprender el rol que cumplieron los hongos en la radiación adaptativa de *Scalesia*.

Es fundamental aprovechar otras oportunidades de los microbiomas como ocurre con el proyecto del biobanco. El género *Scalesia* se encuentra en un estado de conservación vulnerable y perder este recurso biológico sería perder una oportunidad única que solo acontece en las Galápagos. Por ello, rescatar a los hongos adheridos a sus raíces permitiría continuar con nuevas alternativas de conservación biológica como ocurre con los Syncoms de los hongos benéficos que se reporten eventualmente. Se tienen que mejorar los protocolos de cultivo para evitar contaminación bacteriana y la preservación de los hongos. También se tendría que explorar las muestras de hojas de Isabela que cuentan con un hongo no clasificado que podría ayudar a la expansión de este componente que mejora las condiciones de supervivencia y conservación de *Scalesia*.

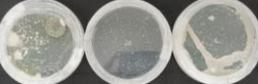
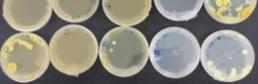
6. TABLAS

Tabla 1. Metadata de la expedición *Pappobolus*.

DATE [Collection]	CODE	Species [Compared morphologically with Herbaria collections]	N coordinates	S coordinates	Altitude [masl]	DNA extracted
9/22/2023	Y01	<i>Pappobolus sp.</i>	17N-0789232	UTM 0003100	2335	NO
9/22/2023	Y02	<i>Pappobolus sp.</i>	17N-0789223	UTM 0006144	2339	YES
9/22/2023	Y03	<i>Pappobolus sp.</i>	17N-0789223	UTM 0006144	2339	NO
9/22/2023	Y04	<i>Pappobolus sp.</i>	17N-0788064	UTM 0009040	2110	NO
9/22/2023	Y05	<i>Pappobolus imbaburensis</i>	17N-0788061	UTM 0009035	2110	YES
9/22/2023	Y06	<i>Pappobolus imbaburensis</i>	17N-0788061	UTM 0009035	2110	YES
10/6/2023	Y07	<i>Pappobolus imbaburensis</i>	17N-0797977	UTM 0006022	2915	YES
10/6/2023	Y08	<i>Pappobolus imbaburensis</i>	17N-0797992	UTM 0006029	2916	NO
10/6/2023	Y09	<i>Pappobolus imbaburensis</i>	17N-0797800	UTM 0006060	2916	NO
10/6/2023	Y10	<i>Pappobolus sp.</i>	17N-0799227	UTM 0004356	2870	NO
10/6/2023	Y11	<i>Pappobolus imbaburensis</i>	17N-0789256	UTM 0006161	2348	YES
10/6/2023	Y12	<i>Pappobolus sp.</i>	17N-0792596	UTM 0009787	2604	YES
10/6/2023	Y13	<i>Vigeria sp.</i>	17N-0789276	UTM 0006162	2357	NO
10/6/2023	Y14	<i>Pappobolus imbaburensis</i>	17N-0789277	UTM 0006162	2357	NO
10/20/2023	Y15	<i>Pappobolus nigrescens</i> (Heiser) Panero	17N-0778988	UTM 0004131	2714	YES
10/20/2023	Y16	<i>Pappobolus nigrescens</i> (Heiser) Panero	17N-0778985	UTM 0004129	2715	YES
10/20/2023	Y17	<i>Pappobolus nigrescens</i> (Heiser) Panero	17N-0778997	UTM 0004132	2714	YES
10/20/2023	Y18	<i>Pappobolus nigrescens</i> (Heiser) Panero	17N-0778955	UTM 0003781	2624	YES
10/20/2023	Y19	<i>Pappobolus nigrescens</i> (Heiser) Panero	17N-0779048	UTM 0003920	2620	YES

Se presentan los datos de las muestras de *Pappobolus* con su fecha de recolección, código establecido (Ej. Y01), la especie identificada a comparación de las diferencias morfológicas vistas en los herbarios, coordenadas en formato UTM, altitud y a cuáles se realizó la extracción de ADN.

Tabla 2. Resultados preliminares del proyecto del Biobanco.

Código	<i>Scalesia</i> sp.	Isla	Fecha de cultivo	Traspaso	Foto	Morfotipos
CAF 2.2	<i>Scalesia affinis</i>	Isabela	15/11/23	SÍ		3
GPE 1	<i>Scalesia pedunculata</i>	Santa Cruz	22/11/23	NO		0
HPE 1.2	<i>Scalesia pedunculata</i>	Floreana	21/11/23	SÍ		2
GCR 2	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	22/11/23	NO		1
KDI 1.2	<i>Scalesia divisa</i>	San Cristobal	22/11/23	SÍ		4
CAF 3.2	<i>Scalesia affinis</i>	Isabela	15/11/23	NO		1
HAF 1.2	<i>Scalesia affinis</i>	Floreana	22/11/23	SÍ		6
GAF 1.2	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	21/11/23	NO		2

Se presentan un total de 8 muestras cultivadas con su respectivo código, a qué muestra de *Scalesia* sp. correspondía, de qué isla provino, la fecha de cultivo, si se hizo el traspaso de los hongos y los resultados hasta la fecha actual 08/12/2023. Las muestras provinieron de varias expediciones de *Scalesia* en la que se adjuntaron incluso aquellas provenientes de la isla Floreana. Luego se identificaron los morfotipos de los hongos en todas las muestras, en especial, a las 4 que pasaron hasta la etapa de aislamiento.

7. FIGURAS

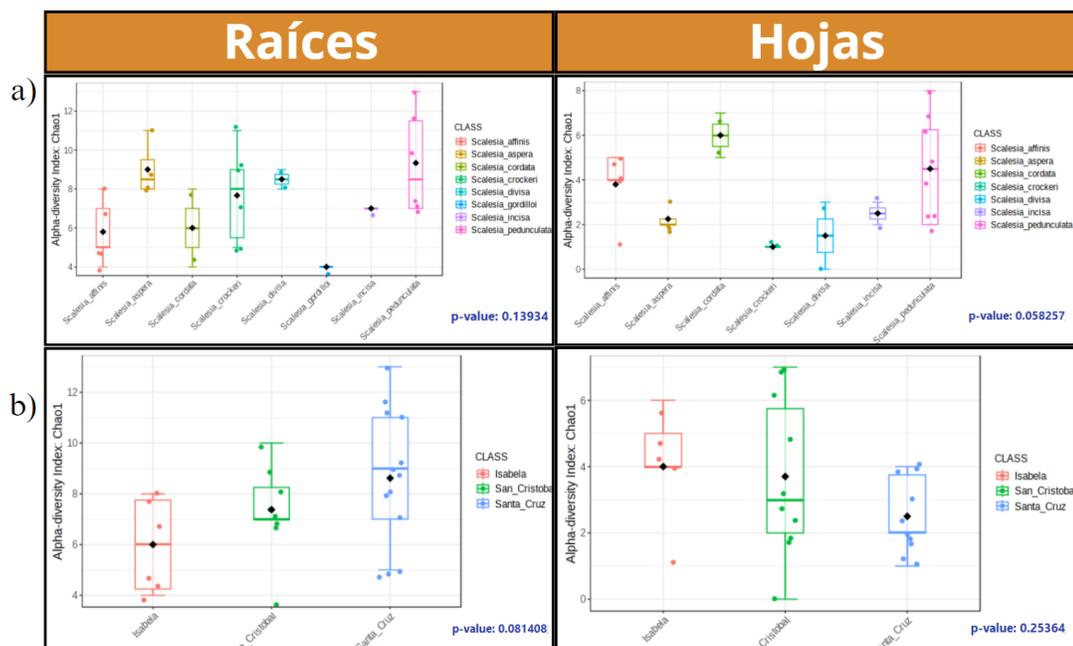


Figura 1. Alfa diversidad (a) entre especies de *Scalesia* y (b) entre las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz.

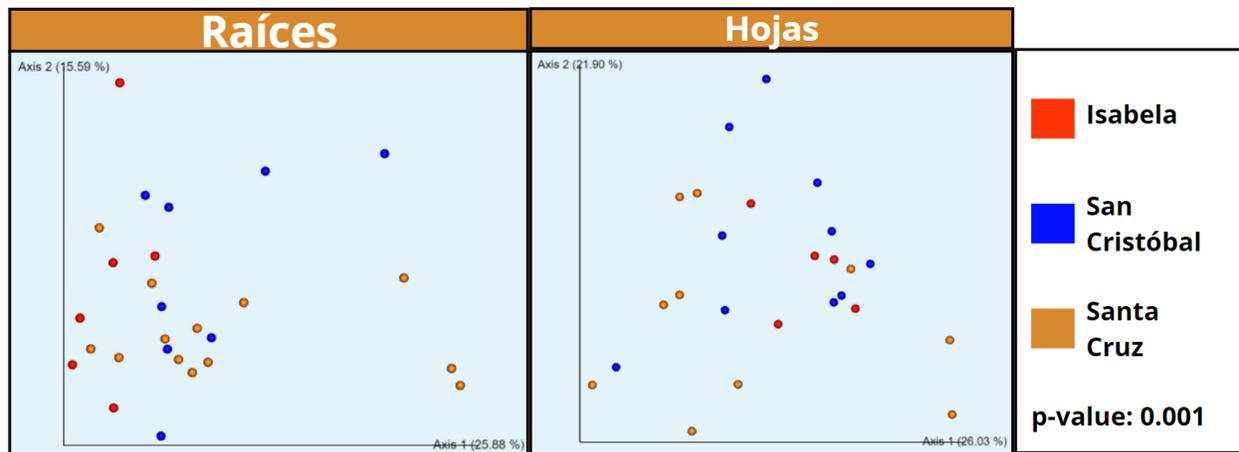


Figura 2. Beta diversidad Unifrac Ponderada para las muestras de Scalesia presentes en las islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz.

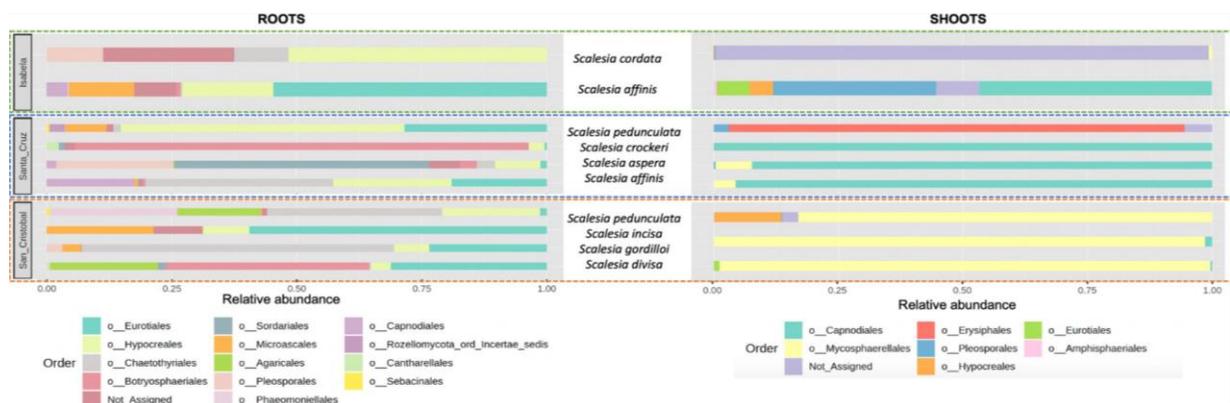


Figura 3. Abundancia relativa de las comunidades de hongos de las raíces y hojas de *Scalesia*.

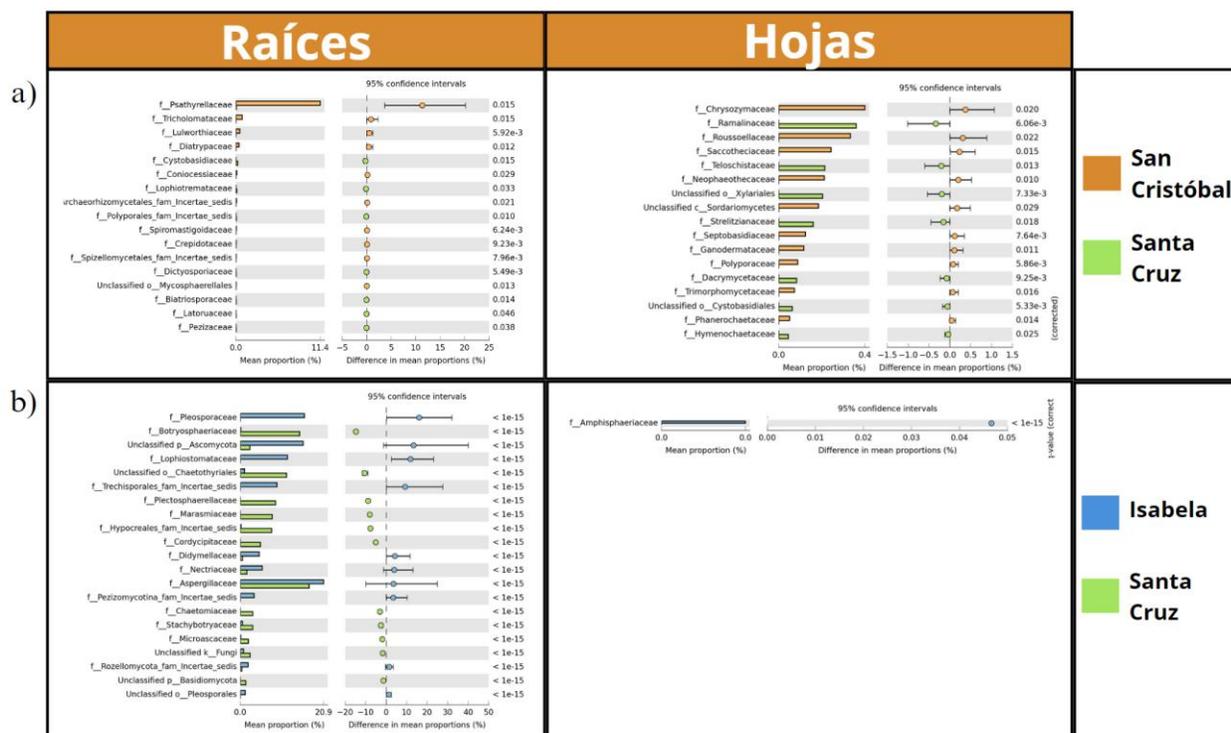


Figura 4. Abundancias diferenciales entre (a) *S. affinis* presente en dos islas, y (b) entre las islas Isabela y Santa Cruz.



Figura 5. Muestreo de las expediciones Pappobolus 2023. (a) ejemplares recolectados. (b) salidas de expedición en alrededores del Pululahua, (c) visitas al herbario del INABIO.

8. REFERENCIAS

- Abdollahzadeh, J., Groenewald, J. Z., Coetzee, M. P. A., Wingfield, M. J., & Crous, P. W. (2020). Evolution of lifestyles in Capnodiales. *Studies in Mycology*, 95(1), 381-414.
- Agnihotri, R., Maheshwari, H. S., Sharma, A. K., & Sharma, M. P. (2018). Biobank for conservation of arbuscular mycorrhizal (AM) Fungi. *Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches*, 199-221.
- Aguilar, S. (2021). Análisis de la composición de consorcios microbianos de Galápagos con capacidad de remediación de aguas residuales (Bachelor's 34iste, Quito).
- Begum, K., Bassères, E., Miranda, J., Lancaster, C., Gonzales-Luna, A. J., Carlson, T. J., ... & Garey, K. W. (2020). In vitro activity of omadacycline, a new tetracycline analog, and comparators against *Clostridioides difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(8), 10-1128.
- Cerca, J., Petersen, B., Guevara, J., Rivera, A., Birkeland, S., Vizueta, J., & Martin, M. (2022). The genomic basis of the plant island syndrome in Dar'in's giant daisies, bioRxiv. Recuperado de <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.26.477903v1.full.pdf>
- Dal Forno, M., Bungartz, F., Yáñez-Ayabaca, A., Lücking, R., & Lawrey, J. D. (2017). High levels of endemism among Galapagos basidiolichens. *Fungal diversity*, 85, 45-73.
- de Vries, T. (2009). Los pinzones de Darwin y otras aves de Galápagos: lo que Charles Darwin vio y no percibió. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 30(1-2).
- De Hoog, G. S. (2014). Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in unexplored habitats. *Fungal Diversity*, 65(1), 1-2.

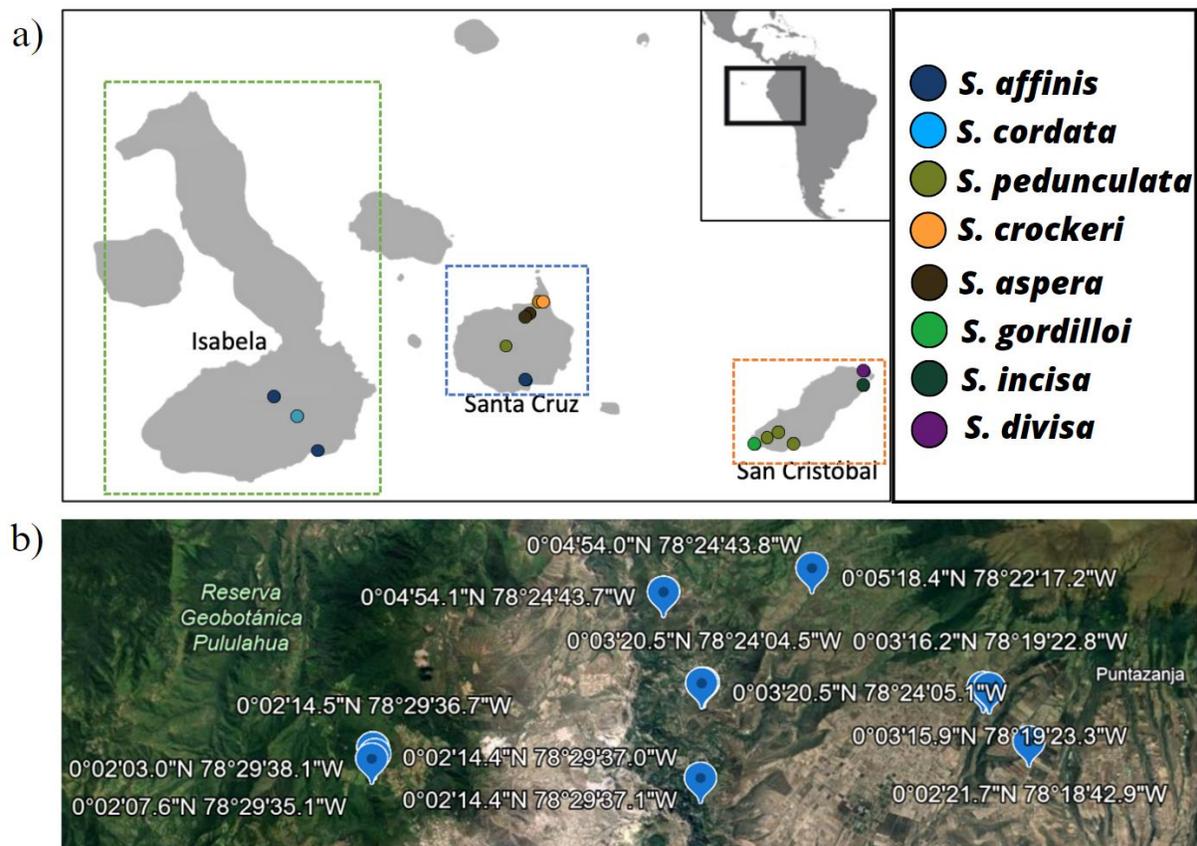
- Enríquez-Moncayo, C. P., & Flores, F. J. (2022). Determinación de la filogenia del género *Scalesia*, endémico de las islas Galápagos, mediante el genoma del cloroplasto para el estudio de la hibridación entre sus especies. Trabajo de titulación para Ing. en Biotecnología, ESPE. Recuperado de <https://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/36106/1/T-ESPE-052699.pdf>
- Fernández-Mazuecos, M., Vargas, P., McCauley, R. A., Monjas, D., Otero, A., Chaves, J. A., ... & Rivas-Torres, G. (2020). The radiation of Darwin's giant daisies in the Galápagos Islands. *Current Biology*, 30(24), 4989-4998.
- Galapagos Conservation Trust (s.f), *Scalesia*. Galapagos Conservation. Recuperado de galapagosconservation.org.uk/species/steriosia/
- García, J. (2023). ¿Cómo Los Microorganismos Podrían Ayudar A Las Plantas A Sobrevivir En Condiciones Adversas?. Portal de Noticias – USFQ. Recuperado [de https://noticias.usfq.edu.ec/2023/05/como-los-microorganismos-podrian-ayudar.html](https://noticias.usfq.edu.ec/2023/05/como-los-microorganismos-podrian-ayudar.html)
- Geist, D. J., Snell, H., Snell, H., Goddard, C., & Kurz, M. D. (2014). A paleogeographic model of the Galápagos Islands and biogeographical and evolutionary implications. *The Galápagos: a natural laboratory for the earth sciences*, 145-166.
- Hamann, O., & Wium-Andersen, S. (1986). *Scalesia gordilloi* sp. nov.(Asteraceae) from the Galapagos Islands, Ecuador. *Nordic journal of botany*, 6(1), 35-38.
- Houbraken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in applied microbiology*, 86, 199-249.

- Hunt, C. A., Jones, M. E., Bustamante, E., Zambrano, C., Carrión-Klier, C., & Jäger, H. (2023). Setting Up Roots: Opportunities for Biocultural Restoration in Recently Inhabited Settings. *Sustainability*, 15(3), 2775.
- Itow, S. (1995). Phytogeography and ecology of *Scalesia* (Compositae) endemic to the Galápagos Islands.
- Loo, W. T., García-Loor, J., Dudaniec, R. Y., Kleindorfer, S., & Cavanaugh, C. M. (2019). Host phylogeny, diet, and habitat differentiate the gut microbiomes of Darwin's finches on Santa Cruz Island. *Scientific Reports*, 9(1), 18781.
- Masaquiza, C. E. (2019). Caracterización morfológica y molecular de hongos asociados a la rizósfera de plantas de café en la isla Santa Cruz–Galápagos (Bache'or36istesis, Quito: UCE).
- Mbareche, H., Veillette, M., Bilodeau, G., & Duchaine, C. (2020). Comparison of the performance of ITS1 and ITS2 as barcodes in amplicon-based sequencing of bioaerosols. *PeerJ*, 8, e8523.
- Mitchell, K., Ronas, J., Dao, C., Freise, A. C., Mangul, S., Shapiro, C., & Moberg Parker, J. (2020). PUMAA: A platform for accessible microbiome analysis in the undergraduate classroom. *Frontiers in Microbiology*, 11, 584699.
- Paton, A., Antonelli, A., Carine, M., Forzza, R. C., Davies, N., Demissew, S., ... & Dickie, J. (2020). Plant and fungal collections: Current status, future perspectives. *Plants, People, Planet*, 2(5), 499-514.

- Ryan, M. J., McCluskey, K., Verkleij, G., Robert, V., & Smith, D. (2019). Fungal biological resources to support international development: challenges and opportunities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9), 139.
- Sevilla, A. (2018). El misterio del isteriosoios. Las islas Galápagos en Ecuador y la o"ra" El Origen de las Espec"es". *HiSTOReLo. Revista de historia regional y local*, 10(19), 123-155.
- Velásquez, C. V. (2009). Subdivisión de la Placa de Nazca en tres nuevas placas tectónicas y su incidencia con la sismicidad peruana actual. *Revista del Instituto de investigación de la Facultad de minas, metalurgia y ciencias geográficas*, 12(23), 77-87.
- Wan, X., Chen, X., Huang, Z., & Chen, H. Y. (2021). Contribution of root traits to variations in soil microbial biomass and community composition. *Plant and Soil*, 460, 483-495.
- Xu, Y., Chen, Z., Li, X., Tan, J., Liu, F., & Wu, J. (2023). Mycorrhizal fungi alter root exudation to cultivate a beneficial microbiome for plant growth. *Functional Ecology*, 37(3), 664-675.

9. ANEXOS

ANEXO 1. MAPAS DEL MUESTREO DE LA (a) PRIMERA EXPEDICIÓN DE SCALEZIA EN 2021 Y (b) DE LA EXPEDICIÓN PAPPOBOLUS EN 2023.



ANEXO 2. PIPELINE EN QIIME2 PARA EL PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE HONGOS

Definir escritorio: `cd /mnt/c/Users/acg_a/OneDrive/Escritorio/Scalesia/Withrarefaction2`

0. Activar ambiente conda: `conda activate qiime2-2023.5`

1. Importación de archivos de secuencias de muestras

```
qiime tools import \
  --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \
  --input-path /mnt/c/Users/acg_a/OneDrive/Escritorio/Scalesia/manifestITS_R.txt \
  --output-path paired-end-demux-R.qza \
  --input-format PairedEndFastqManifestPhred33V2
```

2. Generación de resumen (summary)

```
qiime demux summarize \
  --i-data paired-end-demux-R.qza \
  --o-visualization paired-end-demux-R.qzv
```

3. Denoising (DADA2)

```
qiime dada2 denoise-paired \
  --i-demultiplexed-seqs paired-end-demux-S.qza \
  --p-trim-left-f 6 \
  --p-trim-left-r 6 \
  --p-trunc-len-f 256 \
  --p-trunc-len-r 256 \
  --o-table table-dada2-S.qza \
  --o-representative-sequences rep-seqs-dada2-S.qza \
  --o-denoising-stats denoising-stats-dada2-S.qza
```

***DEFINIR LÍMITES DE LOS EXTREMOS -f y -r SEGÚN LO DESEADO LUEGO DE REVISAR paired-end-demux-R.qzv en QIIME VIEW.**

3.2 Generación de resúmenes (Feature table y resumen de la FeatureData)

```
qiime feature-table summarize \
  --i-table table-dada2-R.qza \
  --o-visualization table-dada2-R.qzv \
  --m-sample-metadata-file metadata_scalesia-R.tsv
```

```
qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data rep-seqs-dada2-R.qza \
  --o-visualization rep-seqs-dada2-R.qzv
```

```
qiime metadata tabulate \
  --m-input-file denoising-stats-dada2-R.qza \
  --o-visualization denoising-stats-dada2-R.qzv
```

4. Filtrado de secuencias:

```
qiime feature-table filter-samples \
  --i-table table-dada2-S.qza \
  --p-min-frequency 30000 \
  --o-filtered-table filtered-table-dada2-S.qza
```

***DEFINIR EL FILTRADO SEGÚN LO DESEADO LUEGO DE REVISAR denoising-stats-dada2-R.qzv en QIIME VIEW.**

***EN ESTE CASO SE ESTABLECIERON FILTRADOS DE 55000 (RAÍCES) Y 30000 (HOJAS).**

4.1 Rarefaction

```
qiime feature-table rarefy \
--i-table filtered-table-dada2-R.qza \
--p-sampling-depth 30000 \
--p-no-with-replacement \
--o-rarefied-table rarefied-table-R.qza
```

```
qiime feature-table summarize \
--i-table rarefied-table-R.qza \
--o-visualization rarefied-graphic-R.qzv
```

***DEFINIR EL FILTRADO SEGÚN LO DESEADO LUEGO DE REVISAR filtered-table-dada2-S.qza en QIIME VIEW**

***SE FILTRARON Y PASARON POR RAREFACCIÓN HASTA 55,000 (raíces) Y 30,000 (hojas) RESPECTIVAMENTE PARA REMOVER LAS SECUENCIAS AMBIGUAS Y OBTENER LA MISMA PROFUNDIDAD DE MUESTREO.**

5. Filtrado de rep-seqs

```
qiime feature-table filter-seqs \
--i-data rep-seqs-dada2-R.qza \
--i-table rarefied-table-R.qza \
--o-filtered-data rarefied-rep-seqs-dada2-R.qza
```

6. Visualización de feature table filtrada:

```
qiime feature-table summarize \
--i-table rarefied-table-R.qza \
--o-visualization rarefied-feature-table-R.qzv \
--m-sample-metadata-file metadata_scalesia-R.tsv
```

#visualizar (opcional)

```
qiime feature-table tabulate-seqs \
--i-data rep-seqs-dada2-R.qza \
--o-visualization rep-seqs-dada2-R.qzv
```

7. Clasificación taxonómica: para determinar la composición taxonómica de las muestras se asigna taxonomía a las secuencias

```
qiime feature-classifier classify-sklearn \
--i-classifier unite-ver9-99-classifier-29.11.2022.qza \
--i-reads rarefied-rep-seqs-dada2-R.qza \
--o-classification rarefied-taxonomy-unite-ver9-99-R.qza
```

#visualizar (opcional)

```
qiime metadata tabulate \
--m-input-file rarefied-taxonomy-unite-ver9-99-R.qza \
--o-visualization rarefied-taxonomy-unite-ver9-99-R.qzv
```

8. Composición taxonómica de las muestras con plots de barras

```
qiime taxa barplot \
  --i-table rarefied-table-R.qza \
  --i-taxonomy rarefied-taxonomy-unite-ver9-99-R.qza \
  --m-metadata-file metadata_scalesia-R.tsv \
  --o-visualization rarefied-taxa-bar-plots-unite-ver9-99-R.qzv
```

9. Generar un árbol para análisis de diversidad filogenéticos

```
qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree \
  --i-sequences rarefied-rep-seqs-dada2-S.qza \
  --o-alignment rarefied-aligned-rep-seqs-S.qza \
  --o-masked-alignment rarefied-masked-aligned-rep-seqs-S.qza \
  --o-tree rarefied-unrooted-tree-S.qza \
  --o-rooted-tree rarefied-rooted-tree-S.qza
```

10. Análisis de diversidad alfa y beta

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic \
  --i-phylogeny rarefied-rooted-tree-S.qza \
  --i-table rarefied-table-S.qza \
  --p-sampling-depth 30000 \
  --m-metadata-file metadata_scalesia-S.tsv \
  --output-dir core-metrics-results
```

11. Alfa diversidad

```
qiime diversity alpha-group-significance \
  --i-alpha-diversity core-metrics-results/faith_pd_vector.qza \
  --m-metadata-file metadata_scalesia-S.tsv \
  --o-visualization core-metrics-results/faith-pd-group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance \
  --i-alpha-diversity core-metrics-results/evenness_vector.qza \
  --m-metadata-file metadata_scalesia-S.tsv \
  --o-visualization core-metrics-results/evenness-group-significance.qzv
```

12. Beta diversidad

```
qiime diversity beta-group-significance \
  --i-distance-matrix core-metrics-results/weighted_unifrac_distance_matrix.qza \
  --m-metadata-file metadata_scalesia-R.tsv \
  --m-metadata-column Scalesia_sp. \
  --o-visualization core-metrics-results/weighted-unifrac-body-site-significance.qzv \
  --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance \
  --i-distance-matrix core-metrics-results/weighted_unifrac_distance_matrix.qza \
  --m-metadata-file metadata_scalesia-R.tsv \
  --m-metadata-column Scalesia_sp. \
  --o-visualization core-metrics-results/weighted-unifrac-subject-group-significance.qzv \
  --p-pairwise
```

ANEXO 3. CONSTRUCCIÓN DE UN CLASIFICADOR TAXONÓMICO CON UNITE

Training the QIIME2 Classifier with UNITE ITS Reference Sequences

Download files from UNITE (fungal ITS):

<https://unite.ut.ee/repository.php>

<https://doi.plutof.ut.ee/doi/10.15156/BIO/2483915>

Import the UNITE reference sequences into QIIME2

```
qiime tools import \  
--type 'FeatureData[Sequence]' \  
--input-path sh_refs_qiime_ver9_99_29.11.2022.fasta \  
--output-path unite-ver9_99_29.11.2022.qza
```

Import the taxonomy file

```
qiime tools import \  
--type 'FeatureData[Taxonomy]' \  
--input-path sh_taxonomy_qiime_ver9_99_29.11.2022.txt \  
--output-path unite-ver9-taxonomy_99_29.11.2022.qza \  
--input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat
```

Train the classifier

```
qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes \  
--i-reference-reads unite-ver9_99_29.11.2022.qza \  
--i-reference-taxonomy unite-ver9-taxonomy_99_29.11.2022.qza \  
--o-classifier unite-ver9-99-classifier-29.11.2022.qza
```

ANEXO 4. CONSTRUCCIÓN DE LOS ARCHIVOS DE PERFIL DE LAS RAÍCES Y HOJAS PARA STAMP

1. Se transformó 'table-with-taxonomy.biom' a un archivo de texto .txt, se modificó la columna taxonomy en Google Sheets, reemplazando los puntos y comas por comas, y se guardó como un archivo .tsv.
2. En Excel, se abrió este .tsv, se delimitaron las casillas por comas para separar la taxonomía de los hongos en nuevas columnas (Domain, Phylum, Class, Order, Family, Genus).
3. Se añadieron los valores obtenidos del archivo table.from_biom según las muestras y se eliminaron las muestras en la metadata que fueron excluidas en los procesos previos.
4. El archivo se guardó como el perfil de raíces o hojas en un .txt.