

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales.

Microbiome Biobanking: Descubriendo microorganismos benéficos asociados al género *Scalesia* en las Islas Galápagos

María Clara Larrea Jara

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 17 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

*Microbiome Biobanking: Descubriendo microorganismos
benéficos asociados al género *Scalesia* en las Islas Galápagos*

María Clara Larrea Jara

Nombre del profesor, Título académico

Pieter Marinus Johannes van't Hof, PhD

Quito, 17 de mayo de 2024

© 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: María Clara Larrea Jara

Código: 00216557

Cédula de identidad: 1727098467

Lugar y fecha: Quito, 17 de mayo de 2024

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Scalesia es un género endémico de plantas que se extendió por las islas Galápagos como resultado de procesos de radiación adaptativa. Se ha reportado que hay 15 especies dentro del género que poseen diferentes características morfológicas que pueden ser el resultado de su genética y las interacciones de microorganismos con el organismo hospedero. Al saber que hay microorganismos involucrados en los cambios adaptativos es necesario analizar mediante un biobanking la diversidad microbiana con respecto a bacterias y hongos, los cuales ayudan a las plantas a poder fijar nutrientes, en su crecimiento y desarrollo, y en la defensa contra microorganismos patógenos. Se ha encontrado que las plantas poseen microambientes en los cuales hay distinto crecimiento de microorganismos, según las condiciones en las que se encuentren expuestos. Por ejemplo, para este proyecto se escogió la rizósfera, la cual corresponde al microbioma de la superficie cercana al suelo, alrededor de las raíces, y la filósfera, mejor conocida como el microbioma de hojas de las plantas, para poder analizar la cantidad de diversidad existente en individuos de diferentes especies de *Scalesia* provenientes de poblaciones de tres islas. Adicionalmente, debido al interés en funciones microbianas benéficas se decidió aislar posibles candidatas de bacterias fijadoras de nitrógeno para poder investigar si mediante inoculaciones en plantas trampa de fréjol y lenteja existe un efecto en las mismas, para lo cual se propuso utilizar bioensayos.

Palabras clave: Galápagos, *Scalesia*, endemismo, microbioma, rizósfera, filósfera, bacterias fijadoras de nitrógeno, bioensayos funcionales, efecto promotor de crecimiento.

ABSTRACT

Scalesia is an endemic genus of plants that spread through the Galapagos Islands as a result of adaptive radiation processes. It has been reported that there are 15 species of the genus that possess different morphological characteristics that may be the result of their genetics and the interactions of microorganisms with the host organism. Knowing that microorganisms are involved in adaptive changes, it is necessary to analyze by biobanking the microbial diversity respect to bacteria and fungi, which help plants to fix nutrients, in their growth and development, and in the defense against pathogenic microorganisms. It has been found that plants have microenvironments in which there is different growth of microorganisms, depending on the conditions in which they are exposed. For example, for this project we chose the rhizosphere, which corresponds to the microbiome of the surface near the soil, around the roots, and the phyllosphere, better known as the microbiome of plant leaves, in order to analyze the amount of diversity existing in individuals of different *Scalesia* species from populations of three islands. Additionally, due to the interest in beneficial microbial functions, it was decided to isolate possible candidates of nitrogen-fixing bacteria in order to investigate whether inoculations in bean and lentil trap plants have an effect on them, for which the use of bioassays was proposed.

Key words: Galapagos, *Scalesia*, endemism, microbiome, rhizosphere, phyllosphere, nitrogen-fixing bacteria, functional bioassays, growth-promoting effect.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Las Islas Galápagos como laboratorio natural	11
1.2 Especies endémicas de las islas Galápagos	11
1.3 Organismo modelo (<i>Scalesia</i>).....	12
1.4 Microbiomas del género <i>Scalesia</i>	12
1.5 Microorganismos benéficos	13
1.6 Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	13
1.7 Bioensayos para determinar la funcionalidad de las bacterias aisladas	14
2. MÉTODOS	15
2.1 Recolección de muestras	15
2.2 Extracción de ADN	15
2.3 Biobanking de bacterias y hongos de la rizósfera y filósfera de <i>Scalesia</i>	15
2.4 Protocolo para inoculación de bacterias en bioensayos	16
2.5 Bioensayos	17
2.6 Pruebas bioquímicas para caracterización bacteriana.....	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Biobanking: Diversidad de morfologías	18
3.2 Cantidad de morfotipos en bacterias.....	18
3.3 Cantidad de morfotipos en hongos	19
3.4 Funcionalidad bioensayos	19
3.5 Pruebas bioquímicas para caracterización bacteriana.....	20
4. DISCUSIÓN	22
5. CONCLUSIONES	26
6. TABLAS	27
7. FIGURAS	32
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
9. ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Cantidad de morfotipos y colonias para cada especie en cada isla en bacterias	27
<i>Tabla 2.</i> Cantidad de morfotipos y colonias para cada especie en cada isla en hongos.....	29
<i>Tabla 3.</i> Pruebas para posible identificación de especies bacterianas	31

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Biobanking bacterias según la especie e Isla.....	32
<i>Figura 2:</i> Biobanking hongos según la especie e Isla.....	33
<i>Figura 3:</i> Resultados obtenidos en relación a la biomasa y altura de fréjol.....	34
<i>Figura 4:</i> Resultados obtenidos en relación a la biomasa y altura de lenteja	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Mapa de las localidades seleccionadas para biobanking	40
--	----

INTRODUCCIÓN

1.1 Las Islas Galápagos como laboratorio natural

El archipiélago de Galápagos está ubicado aproximadamente a 1,000 km de distancia del Ecuador continental. Está constituido por 13 islas mayores, de las cuales 4 se encuentran pobladas, además hay más de 200 islas pequeñas, islotes y rocas (IGEPN, 2024). Las islas Galápagos son de origen volcánico y el *hotspot* volcánico cerca de las islas, está considerado como una de las zonas volcánicas con más actividad del mundo, con erupciones frecuentes en las islas más jóvenes como Fernandina e Isabela (IGEPN, 2024). Por un lado, a pesar de las condiciones adversas existe gran cantidad de biodiversidad única con altos niveles de endemismo, por lo que comúnmente se refiere a las islas Galápagos como laboratorio natural y desde 1959 se estableció a las Islas Galápagos como primer parque nacional de Ecuador (Ministerio del Ambiente, 2015). Por otro lado, las islas se encuentran expuestas a algunas amenazas ambientales, como resultado de la deforestación e introducción de especies, los cuales son puntos de gran importancia para la dirección del parque nacional Galápagos.

1.2 Especies endémicas de las Islas Galápagos

Las islas Galápagos poseen seis géneros de plantas endémicas; es decir, son exclusivas de esta región. En la clasificación de estas especies están: *Darwinithamnus*, *Macraea*, *Lecocarpus*, *Brachycereus* (Cactaceae), *Jasminocereus* (Cactaceae) y *Scalesia* (Asteraceae). Plantas del género *Scalesia* han logrado adaptarse relativamente rápido a las distintas condiciones que hay en cada isla (Castro & Vivanco, 2023). Adicionalmente, las especies endémicas pueden encontrarse en cualquier hábitat o zona de vegetación, sin embargo, se ha encontrado que la mayoría de especies crecen en tierras bajas semiáridas, un tercio de ellas crecen en tierras altas

húmedas y con una menor cifra de crecimiento de especies endémicas esta la zona litoral (León, s,f).

1.3 Organismo Modelo (*Scalesia*)

Adicionalmente, en Galápagos se pueden observar varios procesos en los que se ha dado radiación adaptativa en plantas, y el ejemplo más representativo de esto es *Scalesia*. Esta especie es un género proveniente de la familia Asteraceae, es endémica de las islas y está constituida por 15 especies arbustivas, 3 arbóreas y 6 subespecies (Jaramillo et al., 2017). Este grupo emblemático de plantas son consideradas como los “pinzones de Darwin” del reino vegetal, y esto se debe a su gran capacidad de radiación adaptativa, donde las distintas especies se lograron adaptar a vivir en diferentes zonas de vegetación, a lo largo de cada isla que compone todo el archipiélago (Jaramillo et al., 2017). También, se ha identificado que especies como *Scalesia pedunculata* habitan en zonas húmedas y especies como *Scalesia affinis* son capaces de vivir en grietas de lava (Jaramillo et al., 2017).

1.4 Microbiomas del género *Scalesia*

En un lugar megadiverso también hay microorganismos fundamentales para la vida en el planeta. La diversidad bacteriana y fúngica es esencial en las redes tróficas de los ecosistemas, tanto en cantidad de biomasa como en su actividad metabólica, contribuyendo así la generación de nutrientes dentro de los ciclos biogeoquímicos, o también en el desarrollo de las plantas (Cruz-Leyva et al., 2015). Para comprender la función de cada nicho de forma específica hay que identificar, cuantificar y caracterizar los microorganismos en las comunidades. Hablando desde un enfoque ecológico los microorganismos reciclan la materia disponible e interactúan de forma dinámica en los ciclos biogeoquímicos (Cruz-Leyva et al., 2015). Adicionalmente, el microbioma vegetal es el conjunto de microorganismos que viven juntos dentro de un mismo ecosistema vegetal, se ha encontrado que los microorganismos que interactúan de manera

directa con las plantas generalmente son benéficos para su salud y además ayudan en su desarrollo, nutrición, reproducción y defensa contra patógenos (INTAGRI, 2021). Las plantas pueden dividirse en diferentes microambientes y se ha encontrado que cada microbioma posee una composición única, y esto se debe a que los microorganismos que habitan en el suelo, rizósfera o superficie cercana a la raíz, filósfera u hojas, son distintos (INTAGRI, 2021).

1.5 Microorganismos benéficos

Las bacterias suelen establecer relaciones mutualistas donde hay beneficio mutuo. Estos microorganismos contribuyen al crecimiento de las plantas de distintas maneras porque logran proporcionar nutrientes como nitrógeno, fósforo o pueden convertir sustancias orgánicas en nutrientes inorgánicos para que las plantas las absorban en su forma soluble mediante las raíces (Desgarenes & Carrión, 2023). También, las bacterias pueden producir hormonas vegetales que ayudan en su crecimiento y desarrollo. Además, logran mejorar la disponibilidad de nutrientes, absorción de minerales, benefician a las plantas de forma indirecta ya que pueden combatir contra microorganismos fitopatógenos y pueden fijar nitrógeno para así hacerlo disponible (Desgarenes & Carrión, 2023). Por otro lado, los hongos también ayudan a absorber ciertos nutrientes, protegen a las plantas de enfermedades patógenas, promueven el crecimiento vegetal, ayudan al ciclado de nutrientes con la descomposición de materia orgánica disponible y pueden producir sustancias antibióticas (Garay et al., 2023).

1.6 Bacterias fijadoras de nitrógeno

Las plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno establecen una relación mutualista, esto quiere decir que se benefician mutuamente (García, 2011). Así, las bacterias pueden aprovechar el nitrógeno que está en el aire para generar compuestos que pueden absorberse. Mientras que las plantas pueden fijar el nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos nitrogenados que puedan ser asimilables (García, 2011). Además, las bacterias pueden adherirse a las raíces de

las plantas y formar abultamientos denominados nódulos, en donde se reproducen y fijan nitrógeno. A pesar de que en el ambiente la cantidad existente de nitrógeno es de alrededor del 78 % las plantas no pueden consumirlo cuando deseen. El nitrógeno es un nutriente clave para el desarrollo de los cultivos y responsable en procesos fotosintéticos. Dentro de los beneficios de estas relaciones mutualistas es que mediante la fijación biológica del nitrógeno se favorece en gran medida al crecimiento de las plantas (García, 2011).

1.7 Bioensayos para determinar la funcionalidad de las bacterias aisladas

Es indispensable realizar bioensayos para poder conocer el impacto en el fenotipo del organismo debido a la presencia de bacterias. El impacto puede incluir distintos efectos benéficos, negativos, toxicidad o hasta la muerte del organismo al que se le está sometiendo a la prueba (Cervantes et al., 2019). Dentro de estos se puede identificar la eficiencia que puede producir la inoculación de los microorganismos y con esto estandarizar nuevos protocolos para siguientes investigaciones. Para poder realizar un bioensayo se debe (1) identificar la sustancia a evaluar, (2) el sustrato que se utilizará (3) en que organismo se harán las pruebas y (4) como se evaluará si el tratamiento funcionó correctamente (Cervantes et al., 2019). En general, se opta por realizar bioensayos para decidir si la investigación sobre la inoculación será eficiente en las plantas modelo y además en base a esto se puede calcular la concentración que se debería usar para obtener algún efecto visible en los tratamientos realizados. (Cervantes et al., 2019). Adicionalmente, se emplean plantas modelo debido a su facilidad de cultivo, rápido crecimiento, facilidad de realizar experimentos controlados y genoma bien caracterizado, estas son fundamentales para poder comprender procesos biológicos básicos y aplicados. Y, además no se usan especies de *Scalesia* dentro del experimento controlado ya que es una especie endémica y que se encuentra en peligro de extinción, lo que limita su uso dentro del experimento para con esto preservar su conservación (Y. Abdurakhmonov, 2022).

MÉTODOS

2.1 Recolección de muestras

Se hizo una expedición en mayo del 2023, en las islas Galápagos, donde se recorrió 8 diferentes islas, y se recolectó 12 especies de *Scalesia*, se obtuvieron muestras de hojas raíces y suelos, y se muestreo un total de 90 muestras. Para poder conservar cada tejido recolectado se usó glicerol al 40% y se lo incubó a 4 grados centígrados, además se utilizó perlas de silicagel para remover la humedad en muestras secas. Por otro lado, se hizo una expedición en septiembre del 2023 en Quito, cerca de Guayllabamba, en donde se encontraron 2 especies del género *Pappobolus*, parientes cercanos de *Scalesia* en el continente, y de igual forma se recolectaron hojas, raíces y suelos, obteniendo de esta forma un total de 10 muestras.

2.2 Extracción de ADN

Para poder extraer ADN de las muestras tanto en rizósfera como en filósfera, se usó el Kit DNeasy Powersoil de Qiagen (Estados Unidos) y se siguió el protocolo correspondiente. Además, la calidad de ADN se evaluó mediante la utilización del equipo Nanodrop y las muestras obtenidas se mandarán próximamente a secuenciar mediante la tecnología Illumina NextSeq en la empresa Genome Quebec. Mediante la secuenciación se logrará caracterizar: hongos (ITS) por medio de sus regiones ITS1/ITS2 con sus cebadores ITS1F e ITS2, bacterias (16S) con sus regiones V5-V7 y cebadores 799F y 1193R, arqueas (16S) con su región V4 y cebadores 515F y 806R, y Earth Soil Microbiome Project con sus regiones LSU-SSU y sus cebadores WANDA y AML2 (Oliveira & Azevedo, 2022).

2.3 Biobanking de bacterias y hongos de la rizósfera y filósfera de *Scalesia*

Primero, se preparó el medio de cultivo YMA con Red Gongo, para diferenciar a las bacterias fijadoras de nitrógeno. Se usó 10g de Manitol, 0,5 de H₂HPO₄. 0,2 de MgSO₄.7H₂O, 0,1 de NaCl y 0,5 de extracto de levadura, se añadió cada reactivo en un matraz Erlenmeyer, se añadió

1L de agua destilada estéril, se agitó, midió el pH con un potenciómetro. Luego, se añadió 15g de agar y 0,15g de red Congo, se colocó en una placa para calentar la mezcla con agitación para poder homogenizar. De igual forma, para observar el crecimiento de bacterias se usó el medio TSA, donde se diluyó 40gr del medio en agua destilada estéril y se le agregó 250 mg de natamicina para evitar el crecimiento fúngico. Ambos medios fueron autoclavados y dispensados en cajas Petri estériles dentro de la cámara de flujo laminar. Por otro lado, se hicieron dos medios para observar el crecimiento de hongos, un medio fue YEPD, para este se diluyó 65 gr del medio en agua destilada estéril, se autoclavó para después agregar dos antibióticos (clorafemicol y tetraciclina) para poder evitar el crecimiento de bacterias. Además, se hizo el medio PDA para el que se diluyó 39 gr del medio en agua destilada estéril, se autoclavó, para luego agregar los mismos antibióticos. Con los medios listos se seleccionaron las muestras de *Scalesia* las cuales correspondían a las raíces y hojas las cuales se conservaron en glicerol. Para empezar con el biobanking (**ANEXO 1**) se usó un subset de 7 individuos, de 6 especies, de 3 diferentes islas; Isla Santa Cruz, Santiago y Fernandina. Para cada muestra se hicieron diluciones seriadas, de forma específica para filósfera se usó la dilución 10^{-1} y para rizósfera 10^{-3} y 10^{-5} , se colocó a cada dilución en cada caja Petri y se homogenizó con perlas estériles. Luego, se incubaron a las cajas a 28°C durante 21 días para hongos y a 38°C por 3 días a las bacterias.

2.4 Protocolo para inoculación de bacterias en bioensayos

Al observar crecimiento de bacterias en el medio YMA, se procedió a escoger dos muestras, de forma específica: *Scalesia affinis* de la Isla Santa Cruz y *Scalesia affinis* de la Isla Fernandina, para aislar sus colonias, de las cuales se les hizo un estriamiento para obtener colonias puras. Luego, se las inoculó en TSB, el cual es un medio líquido, y se las dejó en incubación por agitación por 24 horas, para al día siguiente observar la turbidez como resultado

del crecimiento bacteriano. Luego, se centrifugó a 5000x a los cultivos bacterianos durante 15 minutos para obtener el pellet bacteriano, se descartó el sobrenadante y se añadió suero fisiológico estéril para resuspender el pellet. Después, se midió la turbidez mediante el espectrofotómetro, para observar la concentración deseada de 1×10^6 bacterias para empezar con la inoculación.

2.5 Bioensayos

Se plantó alrededor de 30 semillas de lenteja y fréjol para que puedan germinar y con esto elegir las que se encuentren en mejores condiciones para iniciar con el diseño experimental. Para empezar el diseño, se realizó un tratamiento con suelo de Galápagos de la Isla Santa Cruz (10%) y Arena (90%), los cuales fueron previamente autoclavados, y se pusieron 4 inóculos bacterianos de manera aleatoria, en las plantas trampa de lenteja y fréjol, y adicionalmente se realizó un control sin inóculos. Dentro de los semilleros se colocaron a las plantas con el sustrato, se esperó alrededor de 2 días para que las plantas se logren aclimatar correctamente y en el tercer día se inició con la inoculación. Cada 2 días se inoculó 1 ml de las bacterias en cada planta, hasta que la preparación del inóculo se acabe y después se las regó con agua estéril hasta que se cumplieran dos semanas.

2.6 Pruebas bioquímicas para caracterización bacteriana

Se realizaron tinciones Gram, para esto se recogió la muestra a partir de colonias puras, se la fijó flameándola, se agregó azul violeta y se esperó 1 minuto, se la enjuagó con agua destilada. Luego, se agregó lugol durante 30 segundos, se volvió a enjuagar con agua. Después, se colocó alcohol acetona por 15 segundos, se enjuagó. Y, finalmente se agregó safranina por 1 minuto y se enjuagó. Para que después se pueda observar la muestra en el microscopio óptico y adicionalmente se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa.

RESULTADOS

3.1 Biobanking: Diversidad de morfologías

Dentro de las muestras utilizadas para realizar el biobanking, se obtuvieron resultados de distintas morfologías para cada una de las muestras que fueron cultivadas. En la **Tabla 1** se presenta un resumen de la cantidad del número de colonias bacterianas aisladas y la diversidad de morfotipos encontrados, a que tejido corresponde, y que especie de *Scalesia* como huésped pertenece la muestra, además se encuentra la isla de la que proviene. Por otro lado, en la **Tabla 2** se presenta el mismo orden de resultados, pero para hongos, es decir dentro de la tabla se observa un resumen de la cantidad del número de colonias bacterianas aisladas y la diversidad de morfotipos encontrados, a que tejido corresponde, y que especie de *Scalesia* como huésped pertenece la muestra, además se encuentra la isla de la que proviene

3.2 Cantidad de morfotipos en bacterias

En la **Figura 1** se observa la diferencia de diversidad que hay en cada una de las especies con relación a las bacterias dentro de las distintas islas. Por ejemplo, dentro de estas en la Isla Fernandina para la especie *Scalesia affinis* hubo diferentes morfotipos, en cuanto a la rizósfera se encontró una cantidad de 10 morfotipos, mientras que en filósfera se encontraron 6 morfotipos distintos. En la Isla Santiago habían dos especies: *Scalesia atractyloides*, en la que se encontraron 14 morfotipos para rizósfera, mientras que para filósfera tan solo 3 morfotipos y *Scalesia stewartii*, para la cual se encontraron 10 morfotipos en la rizósfera y para la filósfera 3. Y, finalmente se analizó la diversidad de 4 especies de *Scalesia* en la Isla Santa Cruz en la que se encontró: 5 morfotipos para rizósfera y 3 para filósfera en *Scalesia affinis*, también se contabilizó 9 morfotipos para rizósfera y 2 para filósfera en *Scalesia retroflexa*, además en *Scalesia aspera* se obtuvieron 9 morfotipos para rizósfera y 8 para filósfera. Y, finalmente en *Scalesia crockeri* se encontraron 16 morfotipos en la rizósfera y 4 en muestras de filósfera.

3.3 Cantidad de morfotipos en hongos

En la **Figura 2** se observa la diferencia de diversidad que hay con relación a hongos en cada una de las especies dentro de las distintas islas. Por ejemplo, dentro de estas en la Isla Fernandina para la especie *Scalesia affinis* hubo diferente cantidad de morfotipos, en cuanto a la rizósfera se encontró una cantidad de 8 morfotipos, mientras que en filósfera no se encontró crecimiento. En la Isla Santiago habían dos especies: *Scalesia atractyloides*, en la que se encontraron 8 morfotipos para rizósfera, mientras que para filósfera hubo 3 morfotipos y *Scalesia stewartii*, para la cual se encontraron 6 morfotipos en la rizósfera y para la filósfera 1. Y, finalmente se analizó la diversidad de 4 especies de *Scalesia* en la Isla Santa Cruz en la que se encontró: 12 morfotipos para rizósfera y 1 para filósfera en *Scalesia affinis*, también se contabilizó 3 morfotipos para rizósfera y 0 para filósfera en *Scalesia retroflexa*, además en *Scalesia aspera* se obtuvieron 7 morfotipos para rizósfera y 1 para filósfera. Y, finalmente en *Scalesia crockeri* se encontraron 7 morfotipos en la rizósfera y ninguno en la filósfera.

3.4 Funcionalidad bioensayos

Para poder observar la funcionalidad de los bioensayos, se escogieron 25 semillas para fréjol y 25 para lenteja, 4 inóculos bacterianos y 1 control sin inóculo bacteriano. Dentro de la **Figura 3** se pueden observar los resultados para fréjol, donde las plantas control no tuvieron gran diferencia con respecto a la altura y biomasa. Mientras que, en las plantas que fueron tratadas con un inóculo de una bacteria candidata se vio un incremento en ambas, altura y biomasa de las plántulas, de forma aún más específica con los tres primeros inóculos existió mayores cambios dentro de la planta trampa, y en el que se podría deducir que hay mayores cambios fenotípicos es en la planta que poseía el inóculo 1. Por otro lado, en la **Figura 4**, el patrón es muy similar, ya que dentro del control no se observó una diferencia significativa en las plantas de lenteja, mientras que mediante la inoculación bacteriana si existieron cambios fenotípicos,

y mediante la gráfica se podría deducir que el inóculo que generó mejores resultados fue el candidato número 3.

3.5 Pruebas bioquímicas para caracterización bacteriana

En la **Tabla 3** se puede observar que se realizaron distintas pruebas bioquímicas para lograr una posible identificación bacteriana. Se escogieron 3 cepas bacterianas de distintas especies huésped de *Scalesia*, provenientes de 3 islas. Además, se obtuvieron los siguientes resultados: en la especie *Scalesia affinis*, de la Isla Santa Cruz en los resultados de las pruebas bioquímicas dio un resultado positivo para catalasa y negativo para oxidasa, en cuanto a la tinción esto dio como resultado Bacilo Gram positivo y de acuerdo con la literatura las posibles especies bacterianas serían: *Bacillus subtilis* o *Bacillus amyloliquefaciens* (Álvarez-López et al., 2014). En la especie *Scalesia affinis*, de la Isla Santa Cruz en los resultados de las pruebas bioquímicas dio un resultado positivo para catalasa y negativo para oxidasa, en cuanto a la tinción esto dio como resultado Bacilo Gram positivo y de acuerdo con la literatura la posible especie bacteriana sería: *Bacillus megaterium* (Núñez Reinoso & Sierra Arias, 2018). Adicionalmente, en la especie *Scalesia affinis*, de la Isla Fernandina en los resultados de las pruebas bioquímicas dio un resultado positivo para catalasa y negativo para oxidasa, en cuanto a la tinción esto dio como resultado Bacilo Gram negativo y de acuerdo con la literatura las posibles especies bacterianas serían: *Burkholderia ssp* o *Rhizobium spp* (Ortiz-Villajos, 2017). También, se analizaron especies de la Isla Santiago en la especie *Scalesia atractyloides*, en los resultados de las pruebas bioquímicas dio un resultado positivo para catalasa y negativo para oxidasa, en cuanto a la tinción esto dio como resultado Cocos Gram positivo y de acuerdo con la literatura las posibles especies bacterianas serían: *Micrococcus ssp* o *Enterococcus ssp* (Lopardo, 2014). Se hizo un análisis de la misma especie, pero con una colonia distinta para observar si hay diversidad microbiana y se encontró que; en los resultados de las pruebas bioquímicas dio un

resultado negativo para catalasa y negativo para oxidasa, en cuanto a la tinción esto dio como resultado Bacilos Gram negativo y de acuerdo con la literatura la posible especie bacteriana sería: *Pseudomonas spp.* Y, finalmente se analizó la especie *Scalesia stewartii*, de la Isla Santiago, y en las pruebas bioquímicas dio un resultado positivo para catalasa y negativo para oxidasa, en cuanto a la tinción esto dio como resultado Bacilos Gram negativo y de acuerdo con la literatura las posibles especies bacterianas serían: *Burkholderia ssp* o *Rhizobium spp* (Ortiz-Villajos, 2017).

DISCUSIÓN

Para comenzar, los microorganismos son los seres más numerosos y primitivos que existen en la Tierra. Son capaces de colonizar cualquier ambiente, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en constante interacción con las plantas (Arias et al., 2010). Los microorganismos son clave para que se dé un buen funcionamiento dentro de los sistemas biológicos y son útiles para mantener la vida en el planeta ya que participan en distintos procesos metabólicos y ecológicos (Arias et al., 2010). También, se ha encontrado que son capaces de vivir solos o en asociaciones con otros seres vivos. Por ejemplo, dentro o sobre diferentes tejidos de plantas viven hongos micorrícicos y bacterias como *Rhizobium* dentro de nódulos radicales, en su mayoría se puede encontrar microorganismos benéficos a lado de microorganismos como agentes causales de enfermedades de plantas, los cuales proliferarían en momentos de disbiosis (Arias et al., 2010).

En este estudio científico, y debido a la gran importancia de los microorganismos benéficos se propuso analizar el microbioma de diferentes tejidos vegetales de seis especies de *Scalesia* provenientes de las islas Galápagos para observar la cantidad de morfotipos en bacterias **Tabla 1** y hongos **Tabla 2**. Se ha determinado que hay diferencias en la cantidad de colonias y morfotipos obtenidos con relación a las especies e islas analizadas, esto se puede dar como resultado de los distintos ambientes y condiciones ecológicas. También factores ambientales cómo la temperatura, humedad, vegetación y tipo de suelo pueden influir en la diversidad y distribución de los microorganismos en cada isla (Romero, 2010). Un ejemplo de esto es la disponibilidad de nutrientes, cuando se tiene acceso a estos hay la presencia de especies vegetales específicas y la interacción de estas con otros organismos pueden favorecer en gran medida el desarrollo de ciertos morfotipos (Romero, 2010). También, es indispensable mencionar que las características climáticas, geográficas y oceanográficas únicas para cada una de las islas Galápagos pueden promover la adaptación y evolución de distintas cepas de

bacterias y hongos asociados a plantas endémicas de las islas, contribuyendo de esta forma en la variabilidad de morfologías y composición de comunidades microbianas en las diferentes ubicaciones (Romero, 2010).

Por otro lado, algo que se puede observar en la **Figura 1** y **Figura 2**, es que hay mayor cantidad de morfotipos en la rizósfera que en la filósfera, y esta tendencia se observa para todas las islas que fueron muestreadas. Se conoce muy poco sobre la estructura de las comunidades microbianas asociadas a las plantas, en especial en plantas endémicas, como en el caso de *Scalesia*. Y, se ha determinado que la presencia de microorganismos en las plantas puede variar, en el caso específico de las hojas la variación se puede deber a la posición en la que se encuentra, su anatomía, la luz que recibe y la disponibilidad de agua (Vásquez & Rocha, 2024). Además, se ha encontrado que microorganismos que predominan en la filósfera son los epifíticos, esto quiere decir, organismos que están en la superficie de la planta. Los microorganismos que mayormente se han encontrado en la superficie de las hojas de las *Scalesias* son bacterias y en menor proporción también hay la presencia de hongos (Vásquez & Rocha, 2024). Por otro parte, las raíces son consideradas como un componente importante de diversidad microbiana en asociaciones con su planta huésped. Dicha zona del suelo compuesta por raíces vivas, se encuentra dentro de una superficie estable, comúnmente conocida como la rizósfera (Vásquez & Rocha, 2024). Los microorganismos que interactúan en esta región de la planta generan un efecto benéfico, en especial las bacterias que se encuentran en las raíces, ya que promueven el crecimiento de las plantas. En resumen, se considera que el suelo es un ambiente más estable y protegido, ya que hay menos fluctuaciones de humedad y temperatura, comparado con las hojas (Vásquez & Rocha, 2024). Además, el suelo contiene restos vegetales y compuestos orgánicos que sirven de alimento para gran variedad de microorganismos, mientras que las hojas poseen menor cantidad de materia orgánica disponible, la cual sirve de fuente de nutrientes para los microorganismos (Vásquez

& Rocha, 2024). Por las razones descritas se puede confirmar los resultados, en los que se menciona que existe mayor diversidad de microorganismos dentro de la rizósfera que en la filósfera.

En cuanto a la funcionalidad de los bioensayos se puede observar en la **Figura 3** y **Figura 4**, que la inoculación de bacterias candidatas que previamente fueron aisladas en medios selectivos para bacterias fijadoras de nitrógeno, pudo generar mayor altura y mayor cantidad de biomasa en plantas trampa de fréjol y lenteja bajo condiciones controladas de un invernadero. Esto se puede dar debido a la capacidad de ciertas bacterias para mejorar la salud de las plantas y promover el crecimiento vegetal. Hay un grupo de bacterias conocidas como promotoras de crecimiento (PGPR), las cuales ayudan a estimular el desarrollo de las plantas al facilitar la absorción y disponibilidad de nutrientes y además promover la resistencia ante la presencia de microorganismos patógenos (Ortiz, 2016). También, la presencia de bacterias en la rizósfera de las plantas contribuye significativamente al crecimiento y rendimiento de las mismas, lo que se refleja en los resultados obtenidos como mayor biomasa y altura (Ortiz, 2016). Cuando las bacterias interactúan con las raíces de las plantas, pueden tener un rol positivo, estimulando componentes del metabolismo del huésped vegetal (Ortiz, 2016).

Finalmente, la identificación de especies bacterianas es indispensable ya que mediante esto se puede determinar la presencia de bacterias específicas dentro de algún ambiente. Como se observa en la **Tabla 3** se hicieron pruebas de catalasa y oxidasa, además se realizaron tinciones Gram para con base a la morfología analizar la posible especie bacteriana que habita en la rizósfera de las especies de *Scalesia*. Las pruebas de identificación son necesarias para realizar control de calidad e investigación científica para comprender la diversidad bacteriana, sus roles ecológicos y sus interacciones con el medio ambiente (Bou et al., 2011). Adicionalmente, las primeras 3 muestras corresponden a los inóculos que se utilizaron para los bioensayos, y debido a la posible caracterización microbiana se puede deducir que las bacterias que estuvieron

involucradas en el proceso corresponden al grupo de microorganismos promotores de crecimiento, es por esta razón que la inoculación funcione adecuadamente.

La finalidad de este trabajo fue conocer de manera general la diversidad existente en cuanto a microorganismos dentro de la especie endémica de *Scalesia*, el descubrimiento de la diversidad de microorganismos en la especie tiene grandes implicaciones importantes dentro de la conservación de la biodiversidad. Además, la comprensión de la interacción entre los microorganismos y sus huéspedes puede ayudar a desarrollar estrategias efectivas para lograr conservar especies que se encuentren en peligro de extinción. La investigación de diversidad microbiana en ecosistemas únicos podría lograr mejor comprensión en relación a los cambios morfológicos que poseen las especies como resultado de la adaptación. Por otro lado, identificar bacterias fijadoras de nitrógeno como candidatas prometedoras para el crecimiento en bioensayos permite que se abran nuevas investigaciones sobre agricultura sostenible, este tipo de microorganismos benéficos podrían ser utilizados como inóculos, lo que permitiría el crecimiento de las plántulas y así generar una reintroducción de la especie de *Scalesia* ya que el objetivo es aumentar la población de las mismas para protegerla de una posible extinción futura.

CONCLUSIONES

Para concluir, se logró extraer ADN de manera exitosa de muestras previamente colectadas en 2023 de la rizósfera, filósfera, y suelos testigos de un total de 90 individuos del genus *Scalesia* y 10 individuos del genus *Pappobolus* como outgroup y uno de tres géneros del continente que son genéticamente más cercanos al genus *Scalesia* para próximamente enviar a secuenciar con la plataforma NextSeq (Genome Quebec, Canadá). Por otro lado, con respecto al biobanking se logró realizar el cultivo en medios específicos para que se pueda analizar la diversidad existente de microorganismos por especie en tres islas distintas. Se encontró que en la rizósfera hay mayor diversidad de morfotipos comparando con la filósfera, sin embargo, en cuanto al análisis por especie se notó que no existe gran diversidad por especie analizada, lo cual puede atribuirse a las condiciones que hay en cada una de las islas. Por otro lado, se planteó observar si hubo funcionalidad por parte de los bioensayos, y en estos se logró determinar cambios fenotípicos en las plantas que estuvieron en contacto con las bacterias candidatas. Además, las pruebas bioquímicas fueron de gran ayuda para identificar la morfología de cada inóculo usado y con esto buscar las posibles especies bacterianas que intervinieron en el proceso. Finalmente, como perspectivas a futuro dentro del contexto del proyecto, es necesario secuenciar las muestras del género *Scalesia* para determinar las especies bacterianas específicas, seguir analizando las muestras faltantes para observar mayor diversidad, y descubrir especies fijadoras de nitrógeno ya que estas podrían ser una alternativa sostenible para disminuir la contaminación ambiental. Además, la conservación de *Scalesia* es crucial ya que cada vez hay menos individuos dentro de su hábitar, por lo que el realizar investigaciones científicas garantizaría la supervivencia de las especies vegetales y el identificar las funciones de la biodiversidad microbiana generaría mejor comprensión para ayudar a esta planta endémica que se encuentra en peligro de extinción.

TABLAS

Tabla 1. Cantidad de morfotipos y colonias para cada especie en cada isla en bacterias

Tejido	Especie	Isla	Colonias	Morfotipos
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	6	3
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	100	3
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	8	3
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	4	3
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	4	3
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	1	1
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	4	2
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	1	1
Phyllo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	5	3
Phyllo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	8	5
Phyllo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	6	2
Phyllo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	2	2
Phyllo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	0	0
Phyllo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	4	2
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	7	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	4	2
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	2	2
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	4	2
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	29	6
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	1	1
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	0	0
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	0	0
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	5	2
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	1	1
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	9	5
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	0	0
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	1	1
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	100	2
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	100	5
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	100	3
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	100	6

Phyllo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	1	1
Phyllo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	3	2
Phyllo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	0	0
Phyllo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	100	3
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	100	3
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	3	2
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	55	3
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	100	6
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	100	3
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	11	3
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	60	2
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	100	2

Descripción: Se usaron 7 individuos, de 6 especies de *Scalesia* en 3 diferentes islas, además se uso la rizósfera identificada en la tabla como (Rhizo) y filósfera identificada como (Phyllo) para observar la diversidad de morfotipos y cantidad aproximada de colonias.

Tabla 2. Cantidad de morfotipos y colonias para cada especie en cada isla en hongos

Tejido	Especie	Isla	Colonias	Morfotipos
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	0	0
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	0	0
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	1	1
Phyllo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	0	0
Phyllo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	0	0
Phyllo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	0	0
Phyllo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	0	0
Phyllo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	1	1
Phyllo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	26	2
Phyllo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	0	0
Phyllo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	1	1
Phyllo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	0	0
Phyllo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	0	0
Phyllo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	1	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	10	2
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	6	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	90	2
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	3	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	50	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Fernandina	1	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	2	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	6	4
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	150	2
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	5	3
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	14	1
Rhizo	<i>Scalesia affinis</i>	Santa Cruz	1	1
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	34	1
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	0	0
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	1	1
Rhizo	<i>Scalesia retroflexa</i>	Santa Cruz	1	1
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	2	1
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	2	2

Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	2	2
Rhizo	<i>Scalesia aspera</i>	Santa Cruz	4	2
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	9	3
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	3	1
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	2	2
Rhizo	<i>Scalesia atractyloides</i>	Santiago	9	2
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	13	2
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	1	1
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	2	2
Rhizo	<i>Scalesia crockeri</i>	Santa Cruz	5	2
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	2	2
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	2	1
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	2	2
Rhizo	<i>Scalesia stewartii</i>	Santiago	1	1

Descripción: Se usaron 7 individuos, de 6 especies de *Scalesia* en 3 diferentes islas, además se uso la rizósfera identificada en la tabla como (Rhizo) y filósfera identificada como (Phyllo) para observar la diversidad de morfotipos y cantidad aproximada de colonias.

Tabla 3. Pruebas para posible identificación de especies bacterianas

Especie de <i>Scalesia</i>	Isla	Resultado prueba bioquímica	Resultado tinción Gram	Posible especie bacteriana según la literatura	
<i>Scalesia affinis</i>	Isla Santa Cruz	Catalasa + Oxidasa -	<i>Bacillus</i> Gram positiva	<i>Bacillus subtilis</i> o <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
<i>Scalesia affinis</i>	Isla Santa Cruz	Catalasa + Oxidasa -	<i>Bacillus</i> Gram positiva	<i>Bacillus megaterium</i>	
<i>Scalesia affinis</i>	Isla Fernandina	Catalasa + Oxidasa -	<i>Bacillus</i> Gram negativa	<i>Burkholderia</i> spp o <i>Rhizobium</i> spp	
<i>Scalesia atractyloides</i>	Isla Santiago	Catalasa + Oxidasa -	<i>Cocos</i> Gram positiva	<i>Micrococcus</i> spp o <i>Enterococcus</i> spp	
<i>Scalesia atractyloides</i>	Isla Santiago	Catalasa - Oxidasa -	<i>Bacillus</i> Gram negativa	<i>Pseudomonas</i> spp	
<i>Scalesia stewartii</i>	Isla Santiago	Catalasa + Oxidasa -	<i>Bacillus</i> Gram negativa	<i>Burkholderia</i> spp o <i>Rhizobium</i> spp	

Descripción: Se realizaron las pruebas a 3 diferentes especies de *Scalesia*, las cuales provienen de 3 diferentes islas, donde se obtuvieron los resultados de pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa), resultados de las tinciones Gram y además se identificaron las posibles especies bacterianas según la literatura.

FIGURAS

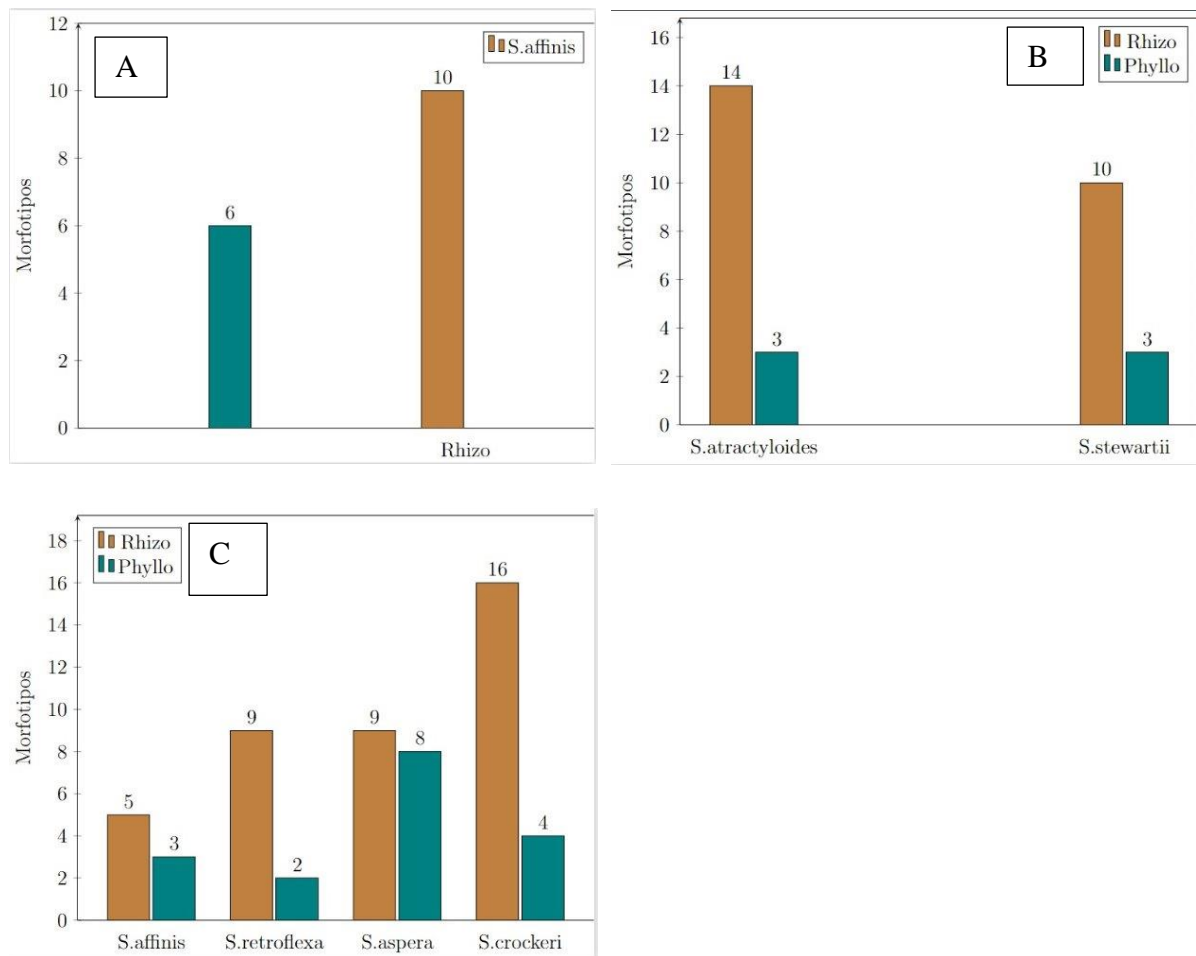


Figura 1: Biobanking bacterias según la especie e Isla

Descripción: Se usaron 7 individuos, de 6 especies de *Scalesia* en 3 diferentes islas. La primera ubicada en la parte superior izquierda (A) corresponde a la Isla Fernandina, la que está al lado derecho corresponde a la Isla Santiago (B) y la que se encuentra en la parte inferior izquierda (C) corresponde a la Isla Santa Cruz. Dentro de cada Isla se puede observar la variedad de morfotipos con relación a la rizósfera y filósfera de cada especie.

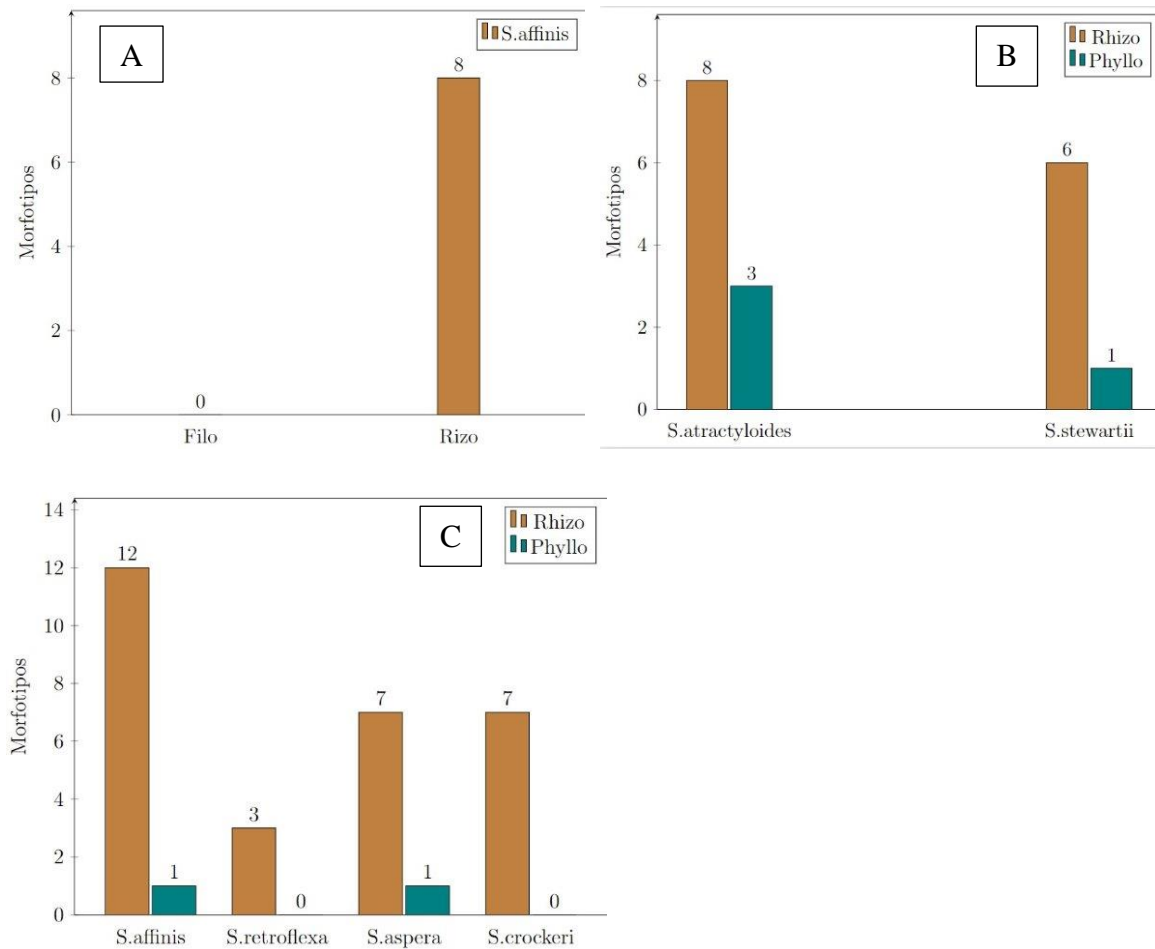


Figura 2: Biobanking hongos según la especie e Isla

Descripción: Se usaron 7 individuos, de 6 especies de *Scalesia* en 3 diferentes islas. La primera ubicada en la parte superior izquierda (A) corresponde a la Isla Fernandina, la que está al lado derecho (B) corresponde a la Isla Santiago y la que se encuentra en la parte inferior izquierda (C) corresponde a la Isla Santa Cruz. Dentro de cada Isla se puede observar la variedad de morfotipos con relación a la rizósfera y filósfera de cada especie.

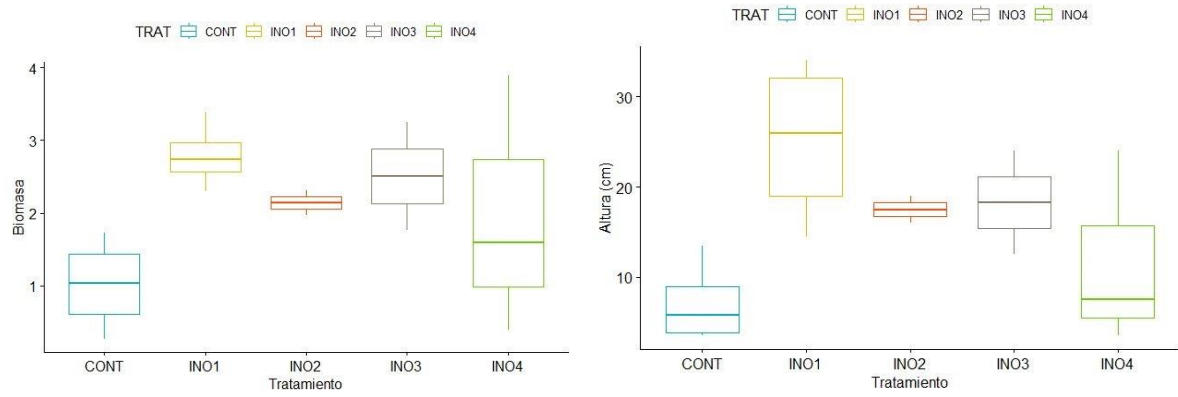


Figura 3: Resultados obtenidos en relación a la biomasa y altura de fréjol

Descripción: Se observa como en el control no existió gran cambio, pero al analizar las distintas inoculaciones se observan diferencias en cuanto a la biomasa y altura de las plantas de fréjol.

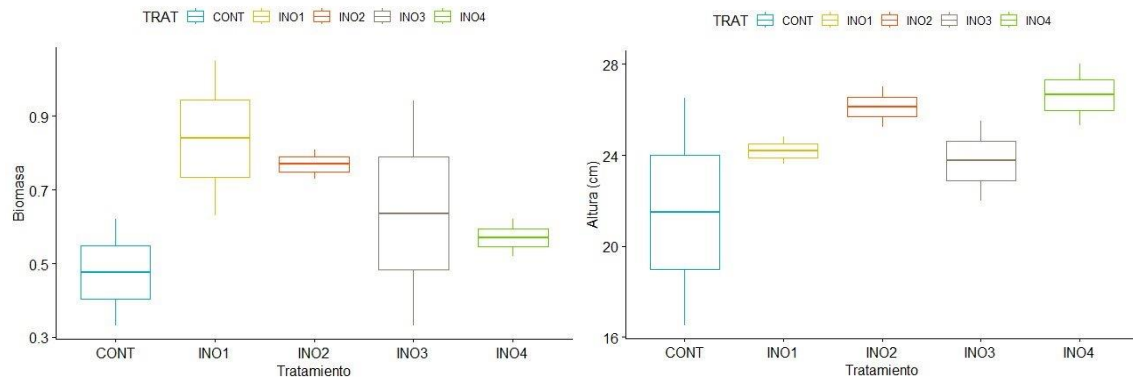


Figura 4: Resultados obtenidos en relación a la biomasa y altura de lenteja

Descripción: Se observa como en el control no existió gran cambio, pero al analizar las distintas inoculaciones se observan diferencias en cuanto a la biomasa y altura de las plantas de lenteja.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-López, C., Osorio-Vega, W., Díez-Gómez, M. C., & Marín-Montoya, M. (2014). Biochemical characterization of rhizosphere microorganisms from vanilla plants with potential as biofertilizers. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 226-241. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212014000200002&script=sci_arttext
- Arias, N. M., Pérez, A. L., Ricalde, S. L., & Yáñez, J. M. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos: Ciencia y cultura*, 15-23. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., Garcia, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-el-laboratorio-S0213005X11001571>
- Castro, V. & Vivanco, K. (2023). Descubriendo los secretos de la supervivencia de la planta endémica *Scalesia* a través de su microbioma. <https://www.galapagossience.org/descubriendo-los-secretos-de-la-supervivencia-de-la-planta-endemica-scalesia/>
- Cervantes, R. A. Á., Montelongo, G. M., Pech, P. G. G., Castro, C. A. S., & Acosta, F. D. J. T. (2019). Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrocencias*, 12(1). <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/BAC/article/download/2968/1305>
- Cruz- Leyva, M. C. D. L., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., & Rojas-Herrera, R. A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-

115. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000100008#:~:text=La%20detecci%C3%B3n%20e%20identificaci%C3%B3n%20de,metabolitos%20microbianos%20en%20procesos%20biotecnol%C3%B3gicos

Desgarenes, D. & Carrión, G. (2023). Las bacterias que ayudan a las plantas a crecer. [https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1360-las-bacterias-que-ayudan-a-las-plantas-a-crecer#:~:text=Las%20bacterias%20obtienen%20de%20las,se%20benefician%20mutuamente%20\(mutualismo\)](https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1360-las-bacterias-que-ayudan-a-las-plantas-a-crecer#:~:text=Las%20bacterias%20obtienen%20de%20las,se%20benefician%20mutuamente%20(mutualismo)).

Garay, E. Cruz, S. Castro, A. Los hongos invisibles en las plantas. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1476-los-hongos-invisibles-en-las-plantas#:~:text=hongos%20apoyan%20para%20la%20planta%2C%20est%C3%A1n%20hacer,crecimiento%20de%20flores%2C%20tallos%20y%20hojas%2C%20as%C3%AD>

García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos del Tomás*, (3), 173-186. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3761553.pdf>

GCT. (2024). Ecología y hábitats. 1/5: Zonas de hábitats. <http://descubriendogalapagos.ec/descubre/vida-en-las-islas/ecologia-habitats/zonas-habitables/>

IGEPN. (2024). Islas galápagos. <https://www.igepn.edu.ec/islas-galapagos>

Jaramillo, P. Peretó, J. Sabadell, M. Tapia, W. Morán, S. Bermeo, D. Deroy, T. Vega, R. & Díaz, C. (2017). Islas Galápagos: Evolución en acción. *Exposiciones temporales* <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Famigosconcepcion.org%2Fwp->

content%2Fuploads%2F2017%2F12%2FRevista8.pdf&psig=AOvVaw3x9493lhQz99
 QrHy8dL8Ox&ust=1715668891365000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&v
 ed=0CAUQn5wMahcKEwjg77DqgoqGAxUAAAAAHQAAAAAQBA

León, S. (s.f). Las plantas vasculares endémicas de galápagos y su estado de amenaza.
<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/galapagos/>

Lopardo, H. (2014). Cocos gram positivos catalasa negativos. <https://aam.org.ar/descargar-archivos/ParteII.pdf>

Ministerio del Ambiente. (2015). Parque Nacional Galápagos.
<http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/parque-nacional-gal%C3%A1pagos>

Núñez Reinoso, J. A., & Sierra Arias, C. D. (2018). *Identificación de microorganismos de suelos de la provincia de Pichincha, con capacidad de producir antibióticos de amplio espectro* (Bachelor's thesis).
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15186/1/UPS-QT12347.pdf>

Oliveira, M., & Azevedo, L. (2022). Molecular markers: An overview of data published for fungi over the last ten years. *Journal of Fungi*, 8(8), 803. <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/8/803>

Ortiz, J. A. F. (2016). *Doctorado en Ciencias Agropecuarias* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Sinaloa).
<https://cca.uas.edu.mx/images/posgrado/TesisDCA/COHORTE%202012-2016/FA/TESIS%20DCA-OLIVA%20ORTIZ.pdf>

Ortiz-Villajos Cano, S. P. (2017). *Puesta a punto de un método de aislamiento de los Rhizobium simbioses radiculares en una leguminosa de la Flora Valenciana* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/89037/ORTIZ-VILLAJOS%20>

%20Puesta%20a%20punto%20de%20un%20m%C3%A9todo%20de%20aislamiento
%20de%20los%20Rhizobium%20simbiontes%20radicular...pdf?isAllowed=y&sequence=1

Romero, M. D. B. (2010). *Atlas de organismos planctónicos en los humedales de Andalucía*.

Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.

https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal_web/rediam/contenidos_ordenacion/PDF/Atlas_Org_Planctonicos_1.pdf

Vásquez. E & Rocha. S. (2024). Plantas + microorganismos = holobiontes.

<https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1871-plantas-microorganismos-holobiontes>

Y. Abdurakhmonov, I. (Ed.). (2022). *Model Organisms in Plant Genetics*. IntechOpen. doi:

10.5772/intechopen.94797. 10.5772/intechopen.94797

ANEXO 1: Mapa de las localidades seleccionadas para biobanking