

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Caracterización de comunidades microbianas asociadas a
almohadillas en tres etapas de micro-sucesión vegetal**

Emilia Alejandra Loaiza Carrera

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Caracterización de comunidades microbianas asociadas a almohadillas en
tres etapas de micro-sucesión vegetal**

Emilia Alejandra Loaiza Carrera

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD

Nombre del profesor, Título académico

Esteban Suárez, PhD

Quito, 18 de diciembre 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: Emilia Alejandra Loaiza Carrera

Código: 00320844

Cédula de identidad: 1600739989

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre 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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Plantago rigida es una de las plantas dominantes en los páramos ecuatorianos, presenta altas tasas de acumulación de carbono y su crecimiento en forma de almohadilla es una de las adaptaciones que le permite colonizar ambientes extremos. Al ser una planta nodriza, facilita el crecimiento de otras especies sobre ella, que normalmente no podrían sobrevivir a las condiciones inhóspitas donde habita. Se ha hipotetizado que las nuevas plantas que crecen sobre la almohadilla podrían provocar una micro-sucesión vegetal, caracterizada por tres etapas: etapa 1 sin colonización, etapa 2 colonización intermedia y etapa 3 colonización casi completa. Esta micro-sucesión podría generar cambios en los microambientes de la matriz interna de las almohadillas, de la cual dependen los microorganismos asociados. En esta investigación se caracterizaron las comunidades microbianas asociadas a las tres etapas de micro-sucesión vegetal de *P. rigida* en Pichincha, Ecuador, utilizando la tecnología de secuenciación ONT. Los resultados mostraron que las bacterias son el grupo más numeroso presente en las almohadillas, seguido de arqueas y hongos. Mientras la composición de bacterias y hongos se mantuvo constante entre etapas, la de las arqueas cambió, con un aumento de géneros metanogénicos en la etapa 3. Esto se podría relacionar al aumento en las emisiones de metano detectadas en almohadillas en esta etapa. Se encontraron cuatro correlaciones significativas entre la abundancia de genes del metabolismo del metano de arqueas y la producción de este gas por las almohadillas. Los microorganismos asociados a la etapa 1 y 2 fueron más similares entre sí que con los de la etapa 3 y la diversidad de las comunidades microbianas tiende a aumentar conforme avanza la micro-sucesión. Este es el primer estudio que describe los microorganismos asociados a *P. rigida* en el Ecuador y se espera sirva de referencia para futuras investigaciones de los páramos andinos.

Palabras clave: *Plantago rigida*, almohadillas, micro-sucesión, arqueas, metano, diversidad.

ABSTRACT

Plantago rigida is one of the dominant plant species in the Ecuadorian páramos, it shows high rates of carbon accumulation, and its cushion-like growth is one of the adaptations that allows it to colonize extreme environments. Being a nurse plant, it facilitates the growth of other species on it, which normally cannot survive the inhospitable conditions where it lives. It has been theorized that the new plants growing on the cushion plant could cause plant micro-succession, in which three stages can be identified: stage 1 without colonization, stage 2 intermediate colonization and stage 3 almost complete colonization. This micro-succession could generate changes in the microenvironments of the internal matrix of the cushion plants, on which the associated microorganisms depend. In this research, the microbial communities associated with the three stages of plant micro-succession of *P. rigida* in Pichincha, Ecuador, were characterized using ONT sequencing technology. The results showed that bacteria are the most abundant group present in the cushion plants, followed by archaea and fungi. While the composition of bacteria and fungi remained constant across stages, that of archaea changed, with an increase in methanogenic genera in stage 3. This could be related to the increase in methane emissions detected in cushion plants at this stage. Four significant correlations were found between the abundance of archaeal methane metabolism genes and the production of this gas by cushion plants. Microorganisms associated with stages 1 and 2 were more similar to each other than those in stage 3 and the diversity of microbial communities tends to increase as micro-succession progresses. This is the first study that describes the microorganisms associated with *P. rigida* in Ecuador and is expected to serve as a reference for future research in the Andean páramos.

Key words: *Plantago rigida*, cushion plants, micro-succession, archaea, methane, diversity.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
MÉTODOS	16
Toma de muestras.....	16
Extracción de ADN y secuenciación.....	16
Procesamiento de lecturas crudas.....	16
Ensamblado de metagenomas, asignación taxonómica y anotado de genes	17
Rarificación y eliminación de secuencias contaminantes	17
Gráficos de abundancia relativa	17
Análisis de beta y alfa diversidad.....	17
Correlaciones entre abundancia de genes de arqueas y emisión de metano	18
RESULTADOS.....	19
Composición de las comunidades microbianas asociadas a <i>P. rigida</i>	19
Análisis de beta diversidad de las comunidades durante la micro-sucesión vegetal	20
Diversidad microbiana en las tres etapas de micro-sucesión vegetal.....	20
Relación entre la funcionalidad microbiana y las emisiones de metano.....	20
DISCUSIÓN	22
La micro-sucesión vegetal genera cambios en la composición de ciertas comunidades microbianas	22
Ciertos microorganismos asociados a la almohadilla podrían desempeñar roles ecológicos importantes	23
La diversidad microbiana tiende a cambiar entre etapas de micro-sucesión	24

Las emisiones de metano están relacionadas con genes funcionales de las arqueas encontradas.....	24
CONCLUSIONES	26
TABLAS	27
FIGURAS	28
REFERENCIAS.....	32
ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición taxonómica de organismos asociados a <i>Plantago rigida</i>	27
Tabla 2. Índices de alfa diversidad para las comunidades microbianas en cada etapa de micro-sucesión vegetal.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de micro-sucesión vegetal de <i>Plantago rigida</i>	28
Figura 2. Abundancia relativa de bacterias, arqueas y hongos asociados a <i>Plantago rigida</i> en las tres etapas de micro-sucesión vegetal.....	29
Figura 3. PCoA de las comunidades microbianas asociadas a <i>Plantago rigida</i> en las tres etapas de micro-sucesión	30
Figura 4. Correlación entre las emisiones de metano y las abundancias de KOs.....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Valores de NEE y emisiones de metano de <i>Plantago rigida</i> en las etapas de micro-sucesión vegetal	38
--	----

INTRODUCCIÓN

El páramo es un bioma diverso que se encuentra a grandes altitudes (entre 2800-4800 m.s.n.m.) dentro de las zonas ecuatoriales, principalmente en la cordillera de los Andes (Hofstede, Mena-Vásconez, y Robalino, 2023; Arroyo y Cavieres, 2013). Actualmente, los páramos son objeto de protección debido a los múltiples servicios ecosistémicos que ofrecen, como su capacidad de almacenar agua dulce de la que se abastecen las ciudades aledañas y actuar como un reservorio de carbono (Calispa, Eguiguren, Freire, y Paredes, 2023). En Ecuador, el páramo corresponde a un 5.94% del territorio nacional y está compuesto por varios ecosistemas que se caracterizan por su clima frío y húmedo, fuertes vientos, alta irradiación y un alto porcentaje de endemismo, aproximadamente de 60% para ciertos grupos taxonómicos (Hofstede et al., 2023). El Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (2012) clasifica los páramos dependiendo de la altitud y zona geográfica en la que se encuentran: páramos del norte y centro, que se ubican desde los 3300 m.s.n.m.; y los páramos del sur, que se sitúan a partir de los 2800 m.s.n.m.

En cuanto a su fauna, se han reportado mamíferos como el zorro andino, el venado de cola blanca y el oso andino, entre otras especies. Así como alberga una alta diversidad de aves, reptiles, anfibios, peces e insectos, adaptados a las condiciones extremas de este bioma (Anaguano-Yancha, Paucar-Cabrera, Sagredo, García, y Ríos, 2023). Por otro lado, la flora de los páramos ecuatorianos se ha clasificado dentro de cinco formas de vida principales: arbustos esclerófilos, pajonales, rosetas gigantes, hierbas acaulescentes y plantas formadoras de almohadillas (Ortiz et al., 2023).

De manera más específica, las almohadillas o cojines son uno de los grupos vegetales más interesantes, ya que su forma de crecimiento particular les ayuda a adaptarse a diferentes ambientes, incluidos el páramo andino, los Alpes europeos y zonas desérticas (Martínez-Amigo y Jaramillo, 2024). En cuanto a su estructura, las almohadillas se asemejan a una cúpula

cubierta de hojas compactas, que cuentan con un sistema de raíces profundas. Estas características generales les permiten protegerse de vientos extremos, aislarse de la temperatura externa y almacenar humedad para crear microambientes más cálidos en su interior y así asegurar su supervivencia (Martínez-Amigo y Jaramillo, 2024).

A nivel mundial existen alrededor de 338 especies de plantas formadoras de almohadillas, pero en los páramos ecuatorianos, las predominantes son *Plantago rigida*, *Distichia muscoides* y algunas especies del género *Azorella* (Martínez-Amigo y Jaramillo, 2024). La dominancia de *P. rigida* es evidente en las turberas de bajas elevaciones (a partir de los 3000 m.s.n.m.). En este ecosistema el suelo permanece inundado por periodos prolongados y, por tanto, las especies vegetales que viven allí deben adaptarse a altos niveles freáticos constantes (Suárez, Chimbolema, y Jaramillo, 2022). Respecto a esto, se ha reportado que otras especies del género *Plantago* podrían presentar aerénquima, un tejido vegetal que permite el transporte de oxígeno desde las raíces hasta la planta bajo condiciones anóxicas. (Suárez, Chimbolema, Chimner, y Lilleskov, 2021). Por otro lado, *P. rigida* presenta una altura máxima de 20cm y su distribución se extiende a lo largo de la cordillera andina ecuatoriana (Suárez et al., 2022).

P. rigida presenta roles ecológicos importantes para los páramos de la región, empezando por sus altas tasas de acumulación de carbono, siendo incluso mayores que otras especies de almohadillas (Sánchez, Chimner, Hribljan, Lilleskov, y Suárez, 2017). Además, las condiciones de estas turberas, como los suelos húmedos anóxicos, limitan la descomposición de materia orgánica provocando que se libere menos carbono al ambiente (Martínez-Amigo y Jaramillo, 2024). Las almohadillas son sensibles a cambios en su ecosistema, como los provocados por el cambio climático y otras actividades antropogénicas, por lo que son indicadores de la salud de los lugares donde habitan (Wang, Sun, Liu, Wang, y Zeng, 2021). Igualmente, las almohadillas son consideradas como especies fundadoras, pues

son las primeras en colonizar ecosistemas recién formados o restaurados. Por último, se las llama especies nodrizas, ya que facilitan el crecimiento de otras plantas sobre ellas que normalmente no podrían sobrevivir a las condiciones extremas de estos hábitats de forma independiente (Wang, Sun, Liu, Wang, y Zeng, 2021; Martínez-Amigo y Jaramillo, 2024).

Respecto a esta última capacidad, se ha observado que *P. rigida* presenta diferentes patrones de sucesión o de micro-sucesión vegetal en los páramos ecuatorianos (Martínez-Amigo y Jaramillo, 2024). Estos patrones se definen de acuerdo con el nivel de colonización de otras especies de plantas sobre la almohadilla y así se pueden describir tres etapas diferenciadas. En la etapa 1 se observa a *P. rigida* sin colonización vegetal, en la etapa 2 se identifica una colonización intermedia de plantas y finalmente en la etapa 3 la almohadilla se encuentra casi completamente cubierta por otras especies (**Figura 1**) (E. Suárez, comunicación personal, 11 de julio de 2023). La micro-sucesión podría no resultar beneficiosa para el desarrollo de *P. rigida* e incluso podría generar una competencia entre las especies de plantas, contribuyendo con el colapso o destrucción de las almohadillas que ha sido reportado en turberas andinas. Aún se desconoce las causas de este fenómeno, pero se ha especulado que la proliferación de plantas específicas sobre las almohadillas, la reducción del nivel freático y cambios en la temperatura ambiental podrían explicar este proceso de sucesión (Martínez-Amigo y Jaramillo, 2024).

Por otro lado, no solo las plantas cumplen un papel fundamental dentro de las turberas, sino que los microorganismos también participan en ciclos biogeoquímicos esenciales, siendo las bacterias, hongos y arqueas las comunidades más relevantes (Andersen, Chapman, y Artz, 2013). Por ejemplo, las bacterias contribuyen a la transformación de la materia orgánica en los suelos de estos humedales y la abundancia de ciertos grupos podría determinar si este ambiente se comporta como una fuente o un sumidero de carbono (Kitson y Bell, 2020). De igual forma, los hongos pueden crear relaciones con las raíces de las plantas (micorrizas) para facilitar la

absorción de ciertos nutrientes y mejorar su desarrollo (Andersen et al., 2013). Por último, algunos géneros de arqueas son capaces de fijar carbono y nitrógeno, pero también otros grupos son metanógenos, por lo que su aumento podría contribuir a la emisión de gas metano (CH_4) a la atmósfera (Kitson y Bell, 2020).

A pesar de la importancia ecológica de las bacterias, arqueas y hongos en estos ambientes, existen pocas investigaciones que describan la presencia y abundancia de estos grupos y su relación con las almohadillas (Roy et al., 2013; Dumas et al., 2024; Řeháková et al., 2015; Rodríguez-Echeverría et al., 2021). Por ello, el objetivo de este estudio fue caracterizar las comunidades microbianas asociadas a *P. rigida* en tres etapas de microsucesión vegetal mediante la tecnología de Oxford Nanopore.

MÉTODOS

Toma de muestras

El estudio se llevó a cabo en el Parque Nacional Cayambe-Coca, ubicado en la provincia de Pichincha, Ecuador. En este lugar, se escogieron dos almohadillas de la especie *P. rigida* en cada una de las tres etapas de micro-sucesión, obteniendo un total de seis individuos. Después, se utilizó un barreno de 60cm desinfectado con etanol al 70% y lavado con agua destilada para tomar una muestra del punto más alto de cada almohadilla. Se removió la capa vegetal y se colectaron los primeros 10cm de la muestra en una funda de plástico estéril, ya que de acuerdo con He et al. (2023) a dicha profundidad se encuentra la mayor diversidad de microorganismos en el suelo. Las fundas se almacenaron a -80°C en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Extracción de ADN y secuenciación

Para la extracción de ADN de las seis muestras se utilizó el kit DNeasy® PowerSoil® Pro (QIAGEN, Alemania). Se midió la concentración del ADN con el equipo Qubit3 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y se midió su calidad con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Se prepararon dos librerías de ADN utilizando el kit Native Barcoding 24 V14 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) y usando barcodes distintos para cada una de ellas. Se realizaron tres corridas de secuenciación usando una flowcell y el equipo MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), en las dos primeras corridas se utilizó la primera librería preparada, mientras que en la tercera corrida se usó la segunda librería.

Procesamiento de lecturas crudas

Se utilizó la herramienta Porechop 0.2.3_seqan2.1.1 (Wick, Judd, Gorrie, y Holt, 2017) para eliminar las secuencias de adaptadores y barcodes de las lecturas crudas obtenidas de la secuenciación. Después, se realizó un análisis de calidad y tamaño de las lecturas con la

herramienta Nanoplot 1.42.0 (De Coster y Rademakers, 2023).

Ensamblado de metagenomas, asignación taxonómica y anotado de genes

Se usó el flujo de trabajo de SqueezeMeta 1.6.3 (Tamames y Puente-Sánchez, 2019) para realizar un co-ensamblado *de novo* de las lecturas en forma de contigs. Luego, se usó la base de datos GenBank nr y el software DIAMOND v0.9.25 (Buchfink, Xie, y Huson, 2014) para realizar la asignación taxonómica de los genes y posteriormente la de los contigs. Además, se calculó la abundancia de los contigs al contabilizar el mapeo de las lecturas crudas a los contigs ya ensamblados. Finalmente, se utilizó el software Prodigal 2.6.3 (Hyatt et al., 2010) para la predicción de genes y la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para el anotado funcional de estos.

Rarificación y eliminación de secuencias contaminantes

En R 4.1.2 (R Core Team, 2023) se continuó con la limpieza de secuencias contaminantes, que incluyen aquellas que no pudieron ser clasificadas al menos a nivel de filo, las que no tuvieron conteos en ninguna muestra y que no resultaron de interés para este trabajo. Después, se hizo una rarificación de las secuencias utilizando el paquete AMOR 0.1-2 (Herrera Paredes, 2018) para crear un dataset que contenía los contigs de todos los niveles taxonómicos identificados y que fue rarificado a 20400 lecturas.

Gráficos de abundancia relativa

Se utilizó el paquete ohchibi 0.0.0.9000 (Salas Gonzalez, 2019) para calcular la abundancia relativa del dataset y realizar gráficos de barras apiladas de la composición de organismos a diferentes niveles taxonómicos.

Análisis de beta y alfa diversidad

Usando el paquete vegan 2.6-6.1 (Oksanen, et al., 2024) se calculó la disimilitud de Bray-Curtis entre las composiciones de cada etapa de micro-sucesión vegetal presentes en el dataset y con el paquete ohchibi 0.0.0.9000 se realizó un análisis de coordenadas principales

(PCoA) para visualizar sus diferencias y similitudes. Además, se utilizó el paquete *vegan* 2.6-6.1 para realizar un análisis de similitudes (ANOSIM) y probar si las diferencias entre las composiciones de las etapas eran estadísticamente significativas. También se usó este paquete para calcular dos índices de alfa diversidad (Shannon e Inverso de Simpson), así como para determinar la equitatividad de las comunidades. Se realizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre las etapas de micro-sucesión vegetal.

Correlaciones entre abundancia de genes de arqueas y emisión de metano

Se utilizó el paquete *SQMtools* 1.6.3 (Puente-Sánchez, García-García, y Tamames, 2020) para realizar un subset del grupo de arqueas y luego un subset de los genes relacionados con el metabolismo del metano, donde se identificaron 44 KOs (KEGG Orthology) o familias de genes. Luego, usando el paquete *stats* 4.1.2 (R Core Team, 2023) se calculó la correlación de Spearman entre la abundancia de dichos genes y las emisiones de metano de las almohadillas en cada etapa de micro-sucesión vegetal. Se utilizó el paquete *ggplot2* 3.5.1 (Wickham, 2016) para graficar el coeficiente de cada correlación y destacar las que presentaron correlaciones estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Composición de las comunidades microbianas asociadas a *P. rigida*

A partir del dataset se obtuvo las abundancias de todos los organismos identificados, con lo cual se pudo calcular la proporción de bacterias, arqueas y hongos en las tres etapas de micro-sucesión vegetal. La **Tabla 1** muestra que el mayor porcentaje corresponde a las bacterias, siendo de aproximadamente 98% en las tres etapas. En cuanto a las arqueas, se observa que su abundancia cambia entre las etapas, primero disminuye de 0.64% en la etapa 1 a 0.59% en la etapa 2 y luego aumenta a 0.90% en la etapa 3. Los hongos se encuentran en porcentajes más bajos que las arqueas y su proporción disminuye de un 0.71% en la etapa 1 a 0.48% en la etapa 3.

De igual forma, se obtuvieron gráficos de abundancia relativa para cada uno de los grupos de microorganismos mencionados a distintos niveles taxonómicos: filos de bacterias, géneros de arqueas y órdenes de hongos (**Figura 2**). En la **Figura 2A** no se observan mayores diferencias en la composición de las bacterias entre las etapas, pero se ve que los filos Proteobacteria (~40%) y Acidobacteria (~30%) son los más abundantes. En cambio, en la **Figura 2B** se muestra que los grupos de arqueas son distintos entre las etapas, siendo los géneros *Methanocella* (~37%) y *Candidatus Nitrosotalea* (~30%) los más numerosos en la etapa 1. Luego, la proporción de *Methanocella* aumenta en la etapa 2, mientras que *Candidatus Nitrosotalea* se reduce. Finalmente, en la etapa 3 estos dos géneros disminuyen y *Methanobacterium* incrementa notablemente (~47%). Aun así, *Methanocella* y *Methanobacterium* en conjunto representan más del 50% de la composición de arqueas en cada etapa, pero en la tercera es donde existe un mayor porcentaje de estas (~70%). En la **Figura 2C** se observan cambios menos drásticos en la composición de hongos entre las etapas, donde la abundancia de los grupos no sigue un patrón particular a lo largo de la micro-sucesión. En este caso, los órdenes predominantes en todas las etapas corresponden a los Glomerales

(~20%), Mucorales (~15%), Helotiales (~10%) y Diversisporales (~9%).

Análisis de beta diversidad de las comunidades durante la micro-sucesión vegetal

El PCoA (**Figura 3**) señala que las muestras de las etapas 1 y 2 se agrupan entre sí, mientras que las de la etapa 3 se separan de las otras dos. Esto sugiere que las comunidades de las etapas 1 y 2 tienden a ser más similares entre sí, mientras que la de la etapa 3 tiende a ser diferente, a pesar de que las diferencias no resultan ser significativas ($p > 0.05$) y el estadístico R tenga un valor bajo (0.06).

Diversidad microbiana en las tres etapas de micro-sucesión vegetal

En la **Tabla 2** se muestra que el índice de diversidad de Shannon tiende a aumentar mientras avanzan las etapas de micro-sucesión, siendo mayor a 4 en todas. La misma tendencia se observa en el índice inverso de Simpson, el cual indica la riqueza de las especies, donde sus valores incrementan desde 15.21 a 16.50 a medida que avanzan las etapas. En cambio, la equitatividad se refiere a que tan equitativamente están distribuidos los individuos de las especies en una comunidad, y su valor se mantiene igual en las etapas 1 y 2 y aumenta un poco en la etapa 3. Esto globalmente podría sugerir una tendencia al aumento de diversidad a medida que avanza la micro-sucesión vegetal, a pesar de que las diferencias entre etapas no son significativas ($p > 0.05$).

Relación entre la funcionalidad microbiana y las emisiones de metano

En el **Anexo 1A** se observa que las almohadillas en las tres etapas de micro-sucesión vegetal presentan valores negativos de Net Ecosystem Exchange (NEE), indicando que en todas existe una acumulación de dióxido de carbono (CO_2). No obstante, esta capacidad de almacenamiento de carbono de la almohadilla se va reduciendo conforme avanzan las etapas. Por otro lado, el **Anexo 1B** muestra que las emisiones de metano disminuyen entre la etapa 1 y 2, pero en la etapa 3 la liberación de este gas aumenta considerablemente. Este último patrón podría coincidir con el resultado del aumento de arqueas productoras de metano

(principalmente *Methanocella* y *Methanobacterium*) en la etapa 3 que se observa en la **Figura 2B**. Debido a esta posible relación, se realizó un anotado funcional de genes, donde se encontraron 44 familias de genes (KOs) de la ruta metabólica del metano, presentes en las arqueas identificadas. Y se intentó establecer posibles correlaciones entre la abundancia de los 44 KOs con las emisiones de metano de las almohadillas.

En la **Figura 4** se muestra el coeficiente de correlación de Spearman para los 44 KOs, de los cuales, solo 4 tuvieron correlaciones significativas. Estos incluyen a: K11645 (fructosa-bifosfato aldolasa, clase I), K00441 (subunidad beta de la coenzima F420 hidrogenasa), K00169 (subunidad alfa del piruvato ferredoxina oxidorreductasa) y K10946 (subunidad C de la monooxigenasa de metano/amoniaco). Los tres primeros KOs presentaron correlaciones positivas de 0.89, 0.85 y 0.85 respectivamente. En cambio, el último KO tuvo una correlación negativa de -0.85. Los 40 KOs restantes (**Figura 4**) no mostraron correlaciones significativas. Dentro de estos, 23 KOs tienen correlaciones positivas y en su mayoría son familias de genes asociados a la ruta de la metanogénesis a partir de dióxido de carbono y acetato. 11 KOs tienen una correlación negativa y gran parte de estos están encargados de la asimilación de formaldehído, uno de los productos de la metanotrofia u oxidación de metano. Los 6 KOs restantes no tienen una correlación con las emisiones de metano (rho de 0).

DISCUSIÓN

La micro-sucesión vegetal genera cambios en la composición de ciertas comunidades microbianas

Los resultados de la **Tabla 1** muestran que las bacterias son los organismos más abundantes asociados a *P. rigida* en sus diferentes etapas de micro-sucesión. Esto concuerda con lo reportado en otros estudios, ya que las bacterias son uno de los microorganismos más numerosos y diversos que se encuentran en el suelo (Trivedi, Leach, Tringe, Sa, y Singh, 2020). La abundancia de este grupo no presentó mayores diferencias entre las etapas, probablemente porque no existió un cambio en la disponibilidad de nutrientes que afectara a la supervivencia de estas y también se conoce que son resilientes a múltiples cambios en su ambiente (Trivedi et al, 2020). Por otro lado, se encontró que las arqueas tienen porcentajes menores al 1% en las tres etapas. Esto puede deberse a que son menos abundantes y diversas cuando se encuentran asociadas a otros organismos eucariotas como las plantas, aunque son más predominantes en las turberas inundadas (Andersen et al., 2013; Jung, Kim, Taffner, Berg, y Ryu, 2020). Además, se observa que la abundancia de arqueas aumenta ligeramente en la etapa 3. Esto podría explicarse en parte por el avance en la micro-sucesión, donde se van acumulando capas de materia orgánica de las plantas de etapas anteriores y se podrían crear microhábitats donde existan las condiciones anóxicas y el sustrato necesario para que las arqueas proliferen (Andersen et al., 2013). En cuanto a los hongos, estos microorganismos se encuentran en porcentajes más bajos que las arqueas y su proporción disminuye conforme avanzan las etapas. Este pequeño cambio puede ser explicado nuevamente por el aumento de las capas de materia orgánica en la tercera etapa, que podrían generar un ambiente más anaerobio donde la mayoría de los hongos no están adaptados para sobrevivir (Andersen et al., 2013).

Ciertos microorganismos asociados a la almohadilla podrían desempeñar roles ecológicos importantes

En la **Figura 2A** se observa que Proteobacteria y Acidobacteria son los filos predominantes de bacterias en todas las muestras. Esto coincide con lo reportado en estudios similares en otras especies de almohadillas, donde destacan a Acidobacteria, Actinobacteria y Proteobacteria como los grupos más abundantes (Dumas et al., 2024; Rodríguez-Echeverría et al., 2021). En el suelo estas bacterias cumplen con varias funciones. Por ejemplo, las Proteobacterias realizan fotosíntesis y fijación de carbono y nitrógeno, lo que beneficia a las plantas con las que están asociadas (Marian, Licciardello, Vicelli, Pertot, y Perazzolli, 2021). Las Acidobacterias son capaces de regular los ciclos de carbono, azufre y principalmente el de nitrógeno, por lo que también permiten que estos compuestos estén más disponibles en el suelo y puedan ser aprovechados por otros organismos (Kalam et al., 2020).

La **Figura 2B** señala que los géneros más abundantes de arqueas en las almohadillas son *Methanobacterium* y *Metanocella*, los cuales se caracterizan por producir metano a partir de la vía de la metanogénesis hidrogenotrófica, es decir, utilizando dióxido de carbono e hidrógeno como sustrato (Buan, 2018). Dentro de la literatura revisada, no se mencionan a las arqueas como parte de las comunidades microbianas asociadas a almohadillas. Aunque, existen otras investigaciones que señalan la presencia de arqueas en turberas, como la de Andersen et al. (2013), donde reporta a *Methanobacterium*, *Metanocella* y otros grupos metanogénicos como los géneros dominantes en este ecosistema.

En cuanto a los hongos, la **Figura 2C** muestra que los Glomerales, Mucorales, Heliotiales y Diversisporales son los órdenes más numerosos asociados a *P. rigida*. En otros estudios también se ha reportado a estos órdenes asociados con las almohadillas (Dumas et al., 2024; Rodríguez-Echeverría et al., 2021). El rol que cumplen estos organismos es muy diverso. Los Glomerales y Mucorales son micorrizas arbusculares (Goss, Carvalho, y Brito, 2017),

mientras que los Helotiales incluyen grupos de ectomicorrizas (Bruyant, Moënné-Loccoz, y Almario, 2024). Se ha reportado que estos podrían formar relaciones simbióticas con las raíces de plantas que crecen sobre las almohadillas. En cambio, algunos hongos del orden Mucorales causan el deterioro de la materia orgánica húmeda (Uppuluri, Alqarihi, e Ibrahim, 2020).

La diversidad microbiana tiende a cambiar entre etapas de micro-sucesión

En la **Figura 3** se muestra que los organismos de las etapas 1 y 2 tienden a ser más similares entre sí que con los de la etapa 3. Esto podría coincidir con la acumulación de capas de materia orgánica en la etapa 3, que crea condiciones diferentes a las presentes en las etapas 1 y 2 como la disponibilidad de nutrientes y la cantidad de gases almacenados, haciendo que otros grupos prosperen más en la última etapa, como las arqueas. Esta misma razón podría explicar la tendencia del aumento en la diversidad y equitatividad de estas comunidades al avanzar la micro-sucesión (**Tabla 2**). Considerando esto, la falta de significancia estadística de las pruebas ANOSIM y Kruskal-Wallis podría ser atribuida a la poca cantidad de muestras analizadas (Andrade, 2020). Por lo que, se recomienda ampliar el número de muestras para llegar a conclusiones más certeras.

Las emisiones de metano están relacionadas con genes funcionales de las arqueas encontradas

Se encontró que *P. rigida* va perdiendo la capacidad de acumulación de carbono conforme avanzan las etapas (**Anexo 1A**) y se observa un aumento notable en sus emisiones de metano en la etapa 3 (**Anexo 1B**). La reducción del carbono acumulado podría deberse al cambio de vegetación en la micro-sucesión, pues la almohadilla va muriendo mientras que las plantas que la reemplazan en las etapas siguientes probablemente no tengan la misma capacidad de fijación de carbono. Además, el carbono en forma de dióxido de carbono que no se está fijando podría servir como sustrato para que las arqueas metanógenas proliferen y produzcan más metano (Buan, 2018).

La **Figura 4** muestra que la abundancia de 4 KOs está significativamente correlacionada con las emisiones de metano de las almohadillas. K11645 participa en la vía de la pentosa fosfato, generando productos intermediarios que pueden participar en la glucólisis y producir piruvato (Morrison, 2020). Por su parte, K00169 está involucrado en la transformación de piruvato en acetil-CoA y CO_2 (Ikeda et al., 2005). Ambos KOs presentan una correlación positiva fuerte ($\rho > 0.7$) (Schober, Boer, y Schwarte, 2018). Este resultado es esperado, ya que estas familias de genes están presentes en procesos de obtención de energía que pueden producir dióxido de carbono, materia prima clave de la metanogénesis hidrogenotrófica. Por otro lado, K00441 codifica para una enzima que genera F_4H_2 , un transportador de electrones que participa directamente en la metanogénesis hidrogenotrófica (Hendrickson y Leigh, 2008) y también presentó una correlación positiva fuerte. Estas correlaciones positivas concuerdan con los géneros de arqueas más abundantes, *Methanobacterium* y *Methanocella*, que producen metano a través de esta vía metabólica. Finalmente, K10946 oxida el metano en metanol, siendo parte de la vía de la metanotrofia (Messerschmidt, 2010) y presenta una correlación negativa fuerte ($\rho < -0.7$) (Schober, Boer, y Schwarte, 2018). Este resultado es consistente con su función, pues este KO participa en la oxidación o degradación de metano. En el estudio de Costa et al. (2019) mencionan que existen arqueas capaces de oxidar metano de forma anaeróbica, siendo el orden Methanosarcinales uno de ellos. En este orden se encuentra el género *Methanosarcina*, el cual también fue identificado en asociación con *P. rigida*, pero con una abundancia reducida en las tres etapas (**Figura 2B**).

CONCLUSIONES

Este estudio es uno de los pocos que intentan caracterizar los microorganismos asociados a las almohadillas, específicamente a *P. rigida*, y es incluso el primero que se realiza en los páramos andinos tomando en cuenta las distintas etapas de micro-sucesión que pueden presentar estas plantas. Además, es el único que describe la presencia y abundancia de arqueas relacionadas a las almohadillas. Las bacterias fueron los microorganismos dominantes en todas las etapas de sucesión, seguidas por arqueas y hongos en menor proporción. El avance de la micro-sucesión no provocó un cambio notable en la abundancia de los filos bacterianos y órdenes fúngicos identificados, pero sí en los géneros de arqueas, donde se observó un aumento de productores de metano en la etapa 3. Este hecho podría vincularse con el incremento de las emisiones de metano de las almohadillas en la misma etapa de micro-sucesión. Además, las correlaciones entre la abundancia de genes de arqueas y la producción de metano refuerzan esta idea. Las correlaciones positivas corresponden a familias de genes que promueven o están implicadas en la vía de la metanogénesis, mientras que la correlación negativa involucra una familia de genes encargada de la metanotrofia. Por último, las almohadillas en la etapa 3 tienden a tener una composición de microorganismos distinta y un aumento de diversidad que podría indicar un impacto de la micro-sucesión a nivel microbiano.

Identificar y describir las comunidades microbianas que se encuentran asociadas a este tipo de plantas es importante, ya que estas cumplen con roles cruciales para la supervivencia de las almohadillas en las condiciones ambientales extremas donde se desarrollan. Principalmente, estos microorganismos facilitan la obtención de nutrientes y contribuyen con la tolerancia de estas plantas al estrés abiótico.

TABLAS

Tabla 1. Composición taxonómica de organismos asociados a *Plantago rigida*

Composición taxonómica	Micro-sucesión vegetal		
	Etapas 1	Etapas 2	Etapas 3
Bacterias	98.23	98.50	98.32
Arqueas	0.64	0.59	0.90
Hongos	0.71	0.54	0.48

Todos los valores se encuentran en porcentaje y corresponden a la proporción de cada grupo en relación con el total de microorganismos encontrados.

Tabla 2. Índices de alfa diversidad para las comunidades microbianas en cada etapa de micro-sucesión vegetal

Índices de alfa diversidad	Micro-sucesión vegetal			Valor p
	Etapas 1	Etapas 2	Etapas 3	
Shannon	4.09 ± 0.08	4.11 ± 0.08	4.18 ± 0.12	0.56
Inverso de Simpson	15.21 ± 1.80	15.69 ± 1.72	16.50 ± 2.44	0.56
Equitatividad	0.59 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.56

Se presentan los valores promedios de cada índice con su desviación estándar y se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para obtener el valor p, que indica la significancia estadística (<0.05).

FIGURAS



Figura 1. Etapas de micro-sucesión vegetal de *Plantago rigida*

A) Etapa 1: sin colonización vegetal. **B)** Etapa 2: colonización vegetal intermedia. **C)** Etapa 3: colonización vegetal casi completa.

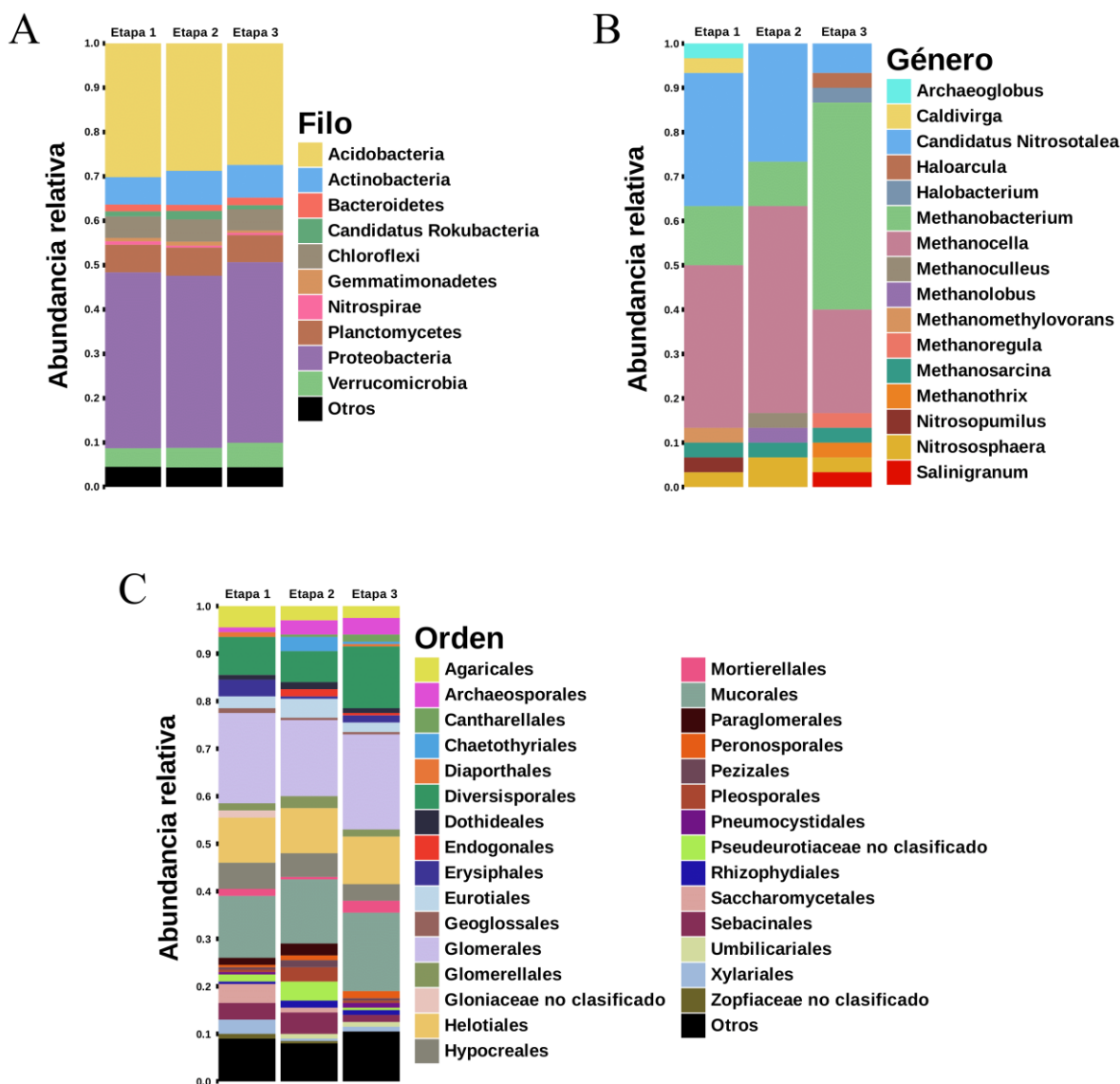


Figura 2. Abundancia relativa de bacterias, arqueas y hongos asociados a *Plantago rigida* en las tres etapas de micro-sucesión vegetal

Los paneles de la figura muestran la abundancia relativa de: **A)** Los 10 filos bacterianos más abundantes, **B)** Los géneros de arqueas más abundantes, **C)** Los 30 órdenes de hongos más abundantes.

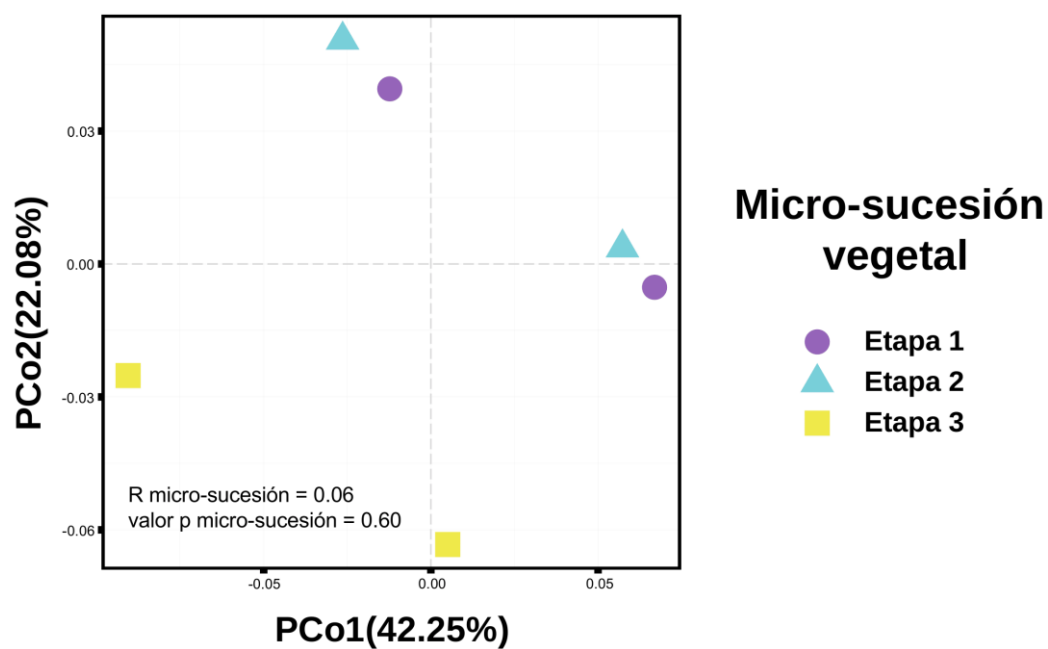


Figura 3. PCoA de las comunidades microbianas asociadas a *Plantago rigida* en las tres etapas de micro-sucesión

El PCoA se construyó usando la matriz de disimilitud de Bray-Curtis y se utilizó la prueba ANOSIM para obtener el estadístico R y el valor p que denota la significancia estadística (< 0.05).

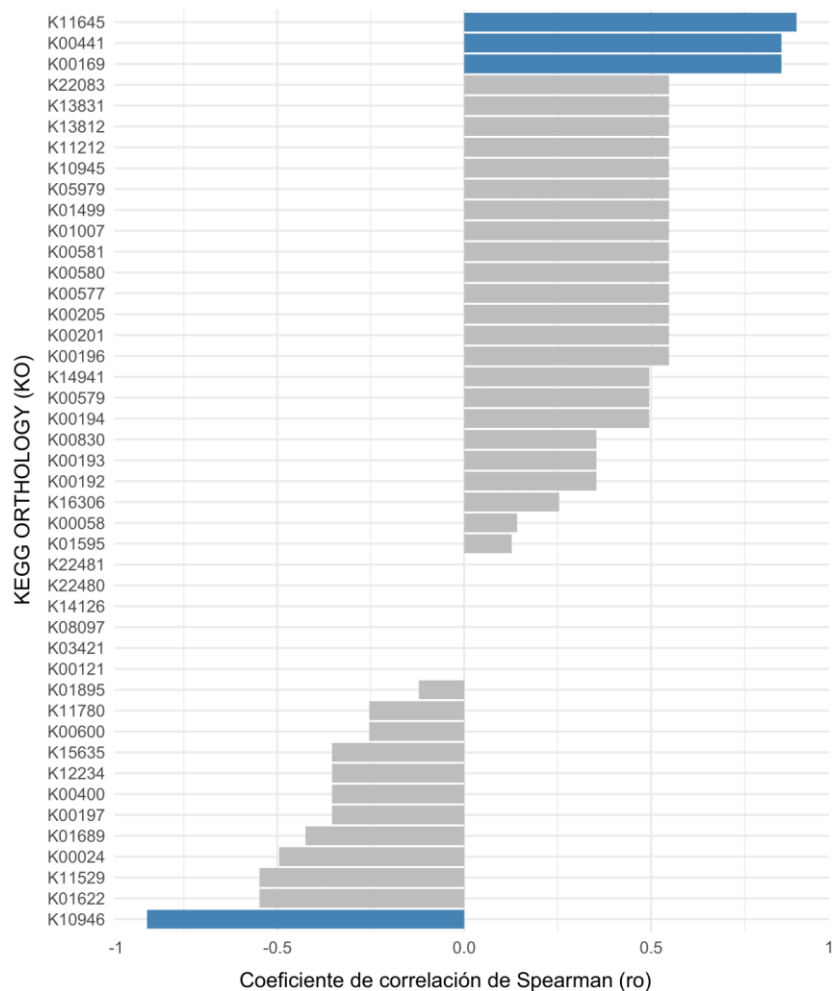


Figura 4. Correlación entre las emisiones de metano y las abundancias de KOs

Coeficientes de correlación de Spearman entre la abundancia de 44 KOs (familias de genes) relacionados con el metabolismo del metano de arqueas y las emisiones de este gas producidas por las almohadillas. En gris se encuentran las correlaciones no significativas (valor $p > 0.05$) y en azul las correlaciones significativas (valor $p < 0.05$).

REFERENCIAS

- Anaguano-Yancha, F., Paucar-Cabrera, A., Sagredo, Y., García, T. S., y Ríos, G. Z. (2023). La fauna de los páramos ecuatorianos: Riqueza, endemismo, adaptaciones y amenazas. En *Los páramos del Ecuador: Pasado, presente y futuro* (pp. 126-153). <https://doi.org/10.18272/usfqpress.71.c261>
- Andersen, R., Chapman, S., y Artz, R. (2013). Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review. *Soil Biology And Biochemistry*, 57, 979-994. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.003>
- Arroyo, M. T., y Cavieres, L. A. (2013). High-Elevation Andean ecosystems. En *Elsevier eBooks* (pp. 96-110). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384719-5.00428-7>
- Bruyant, P., Moënne-Loccoz, Y., y Almario, J. (2024). Root-associated helotiales fungi: Overlooked players in plant nutrition. *Soil Biology And Biochemistry*, 109363. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2024.109363>
- Buan, N. R. (2018). Methanogens: pushing the boundaries of biology. *Emerging Topics In Life Sciences*, 2(4), 629-646. <https://doi.org/10.1042/etls20180031>
- Buchfink, B., Xie, C., y Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1), 59-60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Calispa, M., Eguiguren, P. S., Freire, S. D. S., y Paredes, F. J. V. (2023). Los suelos de los páramos del Ecuador. En *Los páramos del Ecuador: Pasado, presente y futuro* (pp. 40-74). <https://doi.org/10.18272/usfqpress.71.c258>
- Costa, R., Okada, D., Delforno, T., y Foresti, E. (2019). Methane-oxidizing archaea, aerobic methanotrophs and nitrifiers coexist with methane as the sole carbon source. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 138, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.01.005>
- De Coster, W., y Rademakers, R. (2023). NanoPack2: population-scale evaluation of long-read

- sequencing data. *Bioinformatics*, 39(5). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad311>
- Dumas, K., Rosa, A., Yannic, G., Gallet, C., Calderon-Sanou, I., Lionnet, C., . . . Ibanez, S. (2024). How cushion plant communities structure nival soil biodiversity: a metabarcoding study in the French Alps. *Basic And Applied Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2024.08.002>
- Goss, M. J., Carvalho, M., y Brito, I. (2017). Diversity in Arbuscular Mycorrhizal Fungi *
*With Clarisse Brígido. En *Elsevier eBooks* (pp. 59-79). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804244-1.00004-6>
- He, H., Xu, M., Li, W., Chen, L., Chen, Y., Moorhead, D. L., . . . Fang, L. (2023). Linking soil depth to aridity effects on soil microbial community composition, diversity and resource limitation. *CATENA*, 232, 107393. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2023.107393>
- Hendrickson, E. L., y Leigh, J. A. (2008). Roles of Coenzyme F₄₂₀-Reducing Hydrogenases and Hydrogen- and F₄₂₀-Dependent Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenases in Reduction of F₄₂₀ and Production of Hydrogen during Methanogenesis. *Journal Of Bacteriology*, 190(14), 4818-4821. <https://doi.org/10.1128/jb.00255-08>
- Herrera Paredes, S. (2018). surh/AMOR: AMOR: Abundance Matrix Operations in R (0.1-2). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1196668>
- Hofstede, R., Mena-Vásconez, P., y Robalino, E. S. (2023). Introducción: ¿De qué hablamos al hablar de páramos? En *Los páramos del Ecuador: Pasado, presente y futuro* (pp. 14-33). <https://doi.org/10.18272/usfqpress.71.c257>
- Hyatt, D., Chen, G., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., y Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>

- Ikeda, T., Ochiai, T., Morita, S., Nishiyama, A., Yamada, E., Arai, H., . . . Igarashi, Y. (2005). Anabolic five subunit-type pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 340(1), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.155>
- Jung, J., Kim, J., Taffner, J., Berg, G., y Ryu, C. (2020). Archaea, tiny helpers of land plants. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 18, 2494-2500. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.005>
- Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R. Z., El-Enshasy, H. A., Dailin, D. J., y Suriani, N. L. (2020). Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>
- Kitson, E., y Bell, N. G. A. (2020). The Response of Microbial Communities to Peatland Drainage and Rewetting. A Review. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582812>
- Marian, M., Licciardello, G., Vicelli, B., Pertot, I., y Perazzolli, M. (2021). Ecology and potential functions of plant-associated microbial communities in cold environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab161>
- Martínez-Amigo, V., y Jaramillo, R. (2024). Cushion Plants from the Andes — an Overview of Current Knowledge and Some Research Needs. *Wetland Science And Practice*, 97-103. <https://www.researchgate.net/publication/378299333>
- Messerschmidt, A. (2010). Copper metalloenzymes. En *Elsevier eBooks* (pp. 489-545). <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00180-5>
- Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (2012). Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental. *Subsecretaría de Patrimonio Natural*. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/09/LEYENDA->

ECOSISTEMAS_ECUADOR_2.pdf

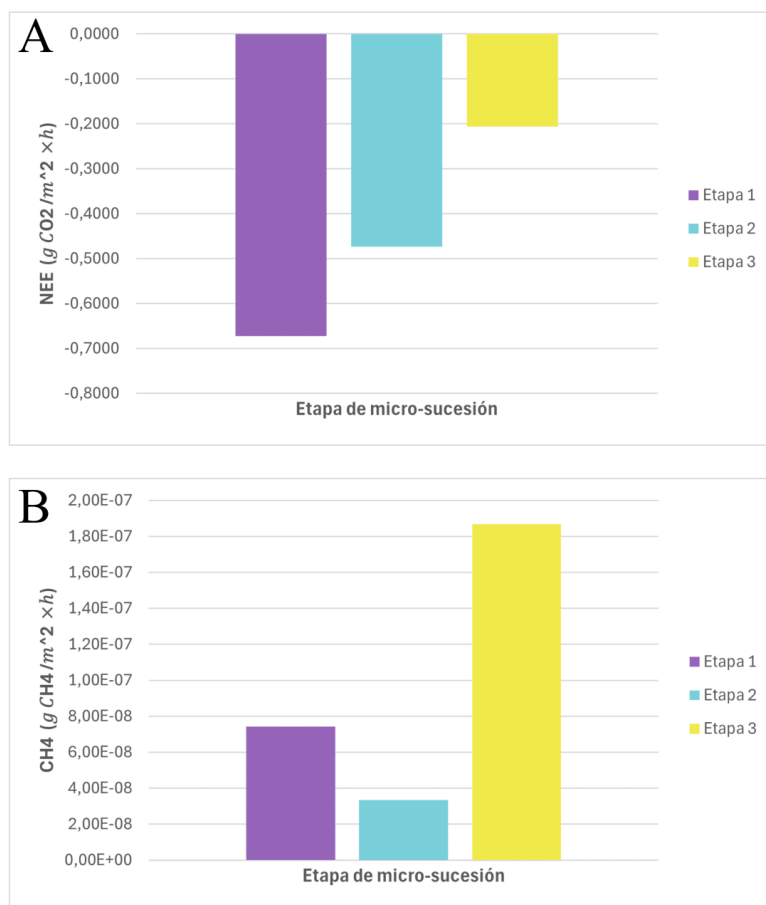
- Morrison, H. (2020). Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. En *Enzyme Active Sites and Their Reaction Mechanism* (pp. 91-96). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821067-3.00017-9>
- Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens M, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, Evangelista H, FitzJohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill M, Lahti L, McGlinn D, Ouellette M, Ribeiro Cunha E, Smith T, Stier A, Ter Braak C, Weedon J (2024). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.7-0. <https://vegandevs.github.io/vegan/>
- Ortiz, D. A. E., Mera, P. M., Romoleroux, C., Romoleroux, K., Sklenář, P., y Ulloa, C. U. (2023). La flora de los páramos ecuatorianos: Orígenes, diversidad y endemismo. En *Los páramos del Ecuador: Pasado, presente y futuro* (pp. 104-123). <https://doi.org/10.18272/usfqpress.71.c260>
- Puente-Sánchez, F., García-García, N., y Tamames, J. (2020). SQMtools: automated processing and visual analysis of 'omics data with R and anvi'o. *BMC Bioinformatics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03703-2>
- R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Řeháková, K., Chronáková, A., Křišťůfek, V., Kuchtová, B., Čapková, K., Scharfen, J., . . . Doležal, J. (2015). Bacterial community of cushion plant *Thylacospermum caespitosum* on elevational gradient in the Himalayan cold desert. *Frontiers In Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00304>
- Rodríguez-Echeverría, S., Delgado-Baquerizo, M., Morillo, J. A., Gaxiola, A., Manzano, M., Marquet, P. A., . . . Armas, C. (2021). Azorella Cushion Plants and Aridity are

- Important Drivers of Soil Microbial Communities in Andean Ecosystems. *Ecosystems*, 24(7), 1576-1590. <https://doi.org/10.1007/s10021-021-00603-1>
- Roy, J., Albert, C. H., Ibanez, S., Saccone, P., Zinger, L., Choler, P., . . . Geremia, R. A. (2013). Microbes on the Cliff: Alpine Cushion Plants Structure Bacterial and Fungal Communities. *Frontiers In Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00064>
- Salas Gonzalez, I. (2019). isaisg/ohchibi: iskali (v1.0.0). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2593691>
- Sánchez, M., Chimner, R., Hribljan, J., Lilleskov, E., y Suárez, E. (2017). Carbon dioxide and methane fluxes in grazed and undisturbed mountain peatlands in the Ecuadorian Andes. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. <https://doi.org/10.19189/map.2017.omb.277>
- Schober, P., Boer, C., y Schwarte, L. A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia & Analgesia*, 126(5), 1763-1768. <https://doi.org/10.1213/ane.0000000000002864>
- Suárez, E., Chimbolema, S., Chimner, R. A., y Lilleskov, E. A. (2021). Root biomass and production by two cushion plant species of tropical high-elevation peatlands in the Andean páramo. *Mires And Peat*, 27(18), 1-9. <https://doi.org/10.19189/map.2020.omb.sta.2131>
- Suárez, E., Chimbolema, S., y Jaramillo, R. (2022). Turberas de páramo en el Ecuador: notas sobre ecología, conservación, y restauración de un ecosistema. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/365676162>
- Tamames, J., y Puente-Sánchez, F. (2019). SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. *Frontiers In Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., y Singh, B. K. (2020). Plant-microbiome

- interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607-621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Uppuluri, P., Alqarihi, A., y Ibrahim, A. S. (2020). Mucormycoses. En *Elsevier eBooks* (pp. 600-612). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21013-3>
- Wang, Y., Sun, J., Liu, B., Wang, J., y Zeng, T. (2021). Cushion plants as critical pioneers and engineers in alpine ecosystems across the Tibetan Plateau. *Ecology And Evolution*, 11(17), 11554-11558. <https://doi.org/10.1002/ece3.7950>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., y Holt, K. E. (2017). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial Genomics*, 3(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000132>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

ANEXOS

Anexo 1. Valores de NEE y emisiones de metano de *Plantago rigida* en las etapas de micro-sucesión vegetal



A) Valores de NEE (Net Ecosystem Exchange) de *P. rigida* en las tres etapas de micro-sucesión. **B)** Emisiones de metano de *P. rigida* en las tres etapas de micro-sucesión.