

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Seréis mis testigos

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

Trabajo de fin de máster

Estudio metagenómico de la comunidad de hongos de ríos ubicados en zonas con diferentes usos de suelo

Autora: Augusta Yadira Cueva Agila

Director: Francisco Flores

Resumen

En los Andes tropicales, el cambio de uso del suelo ha provocado graves alteraciones en los patrones hidrológicos, la calidad del agua, las funciones de los ecosistemas y la biodiversidad en los arroyos. En estos ecosistemas, los hongos acuáticos juegan un papel relevante, sin embargo, su diversidad ha sido poco estudiada. Este estudio analiza los efectos del uso del suelo sobre la riqueza y composición de comunidades de hongos acuáticos en 12 arroyos andinos en el sur de Ecuador. Además, analiza la influencia del uso de suelo en los hongos patógenos. La estructura de las comunidades de hongos acuáticos se vio fuertemente influenciada por la conversión del uso del suelo. La presencia de hongos patógenos de animales y de plantas fue mayor en Zonas Urbanas. Nuestros resultados conducen a una mejor comprensión de la riqueza fúngica acuática existente en los arroyos tropicales andinos, así como resalta que la necesidad de minimizar el impacto ambiental en los ríos.

Palabras clave: Usos de suelo, ríos, hongos, hongos patógenos

Abstract

In the tropical Andes, land use change has caused serious alterations in hydrological patterns, water quality, ecosystem functions and biodiversity in streams. In these ecosystems, aquatic fungi play a relevant role; however, their diversity has been little studied. This study analyzes the effects of land use on the richness and composition of aquatic fungal communities in 12 Andean streams in southern Ecuador. In addition, it analyzes the influence of land use on pathogenic fungi. The structure of aquatic fungal communities was strongly influenced by land use conversion. The presence of animal and plant pathogenic fungi was higher in Urban Areas. Our results lead to a better understanding of the existing aquatic fungal richness in tropical Andean streams, as well as highlighting the need to minimize the environmental impact on rivers.

Key words: Land use, rivers, fungi, pathogenic fungi.

1. Introducción

En los Andes tropicales, el cambio de uso del suelo ha provocado graves alteraciones en los patrones hidrológicos, la calidad del agua, las funciones de los ecosistemas y la biodiversidad en los arroyos. En estos ecosistemas, los hongos acuáticos juegan un papel relevante. Sin embargo, su diversidad ha sido poco estudiada. Dada la creciente presión sobre los arroyos andinos, es fundamental conocer la diversidad de hongos y los impactos del cambio de uso del suelo en los hongos acuáticos, específicamente en la presencia de hongos patógenos por la especial relevancia de los mismos en la salud de las poblaciones aledañas.

Los hongos de agua dulce son organismos fundamentales, pero se sabe poco sobre su diversidad en regiones como los Andes tropicales debido a la falta de estudios y varias limitaciones para su identificación. La identificación convencional de hongos acuáticos utiliza la morfología tradicional y el desarrollo de conidia producidas por géneros anamórficos (Duarte et al., 2013; Graça, Hyde & Chauvet, 2016). Desafortunadamente, su éxito depende de la producción de conidia y el establecimiento de cultivos puros a partir de hojas colonizadas (Seena et al., 2010; Duarte et al., 2013). Esta identificación morfológica puede ser incorrecta debido a que varias especies pueden producir conidios similares (Seena et al., 2010). Además, la identificación imprecisa por esporas y las pocas claves de identificación dificultan la identificación fiable de la especie (Marvanová & Bärlocher, 2001; Seena et al., 2010). Por su parte, los métodos moleculares no dependen de la presencia de estructuras reproductivas porque el ADN se encuentra en todas las etapas del ciclo de vida de los hongos (Bärlocher, 2010), es decir, eluden la mayoría de los obstáculos de las técnicas convencionales (Duarte et al., 2013). En particular, la secuenciación de alto rendimiento ofrece plataformas para recuperar secuencias de buena parte del material genético presente en una muestra ambiental (Medinger et al., 2010), revelando patrones de diversidad de hongos acuáticos con mayor precisión (Duarte et al., 2017). Además, con estas herramientas se abre una ventana para la detección de una gran cantidad de diversidad fúngica oculta (Meiser, Bálint & Schmitt, 2014).

En los Andes Tropicales, a pesar de ser considerados un hotspot de biodiversidad y endemismo, los registros de hongos de agua dulce son escasos (Mittermeier et al., 1998, 2011; Myers et al., 2000). Entre los principales hallazgos para la región, Cedeño (2012) reportó la riqueza de especies de hongos acuáticos en los Andes Tropicales, específicamente en el páramo, identificando 115 especies. Sin embargo, este estudio no evaluó los impactos del cambio de uso de la tierra y otros factores de estrés ambiental en la diversidad de hongos acuáticos.

En el 2020 Ochoa y otros autores (datos sin publicar) desarrollaron un estudio para identificar las diferencias entre usos de suelo y tipo de hojarasca en la riqueza y composición de hongos acuáticos; así

como, determinar los estresores ambientales relacionados con el uso del suelo que determinan la composición de la comunidad de hongos acuáticos.

Por la riqueza de los datos generados en el estudio de Ochoa et al. 2020, el objetivo principal de este trabajo de titulación será complementar la identificación de hongos patógenos y su correlación con el uso de suelo. Específicamente se busca responder a las siguientes preguntas: ¿Existe una correlación entre los abundancia y diversidad de hongos patógenos de los 12 arroyos andinos ubicados en la zona Sur del Ecuador y el uso de suelo? ¿Hay mayor abundancia de hongos patógenos en los arroyos ubicados en zonas urbanas? Estudios como estos son críticos para los arroyos y ríos de la región Andina con una creciente presión antropogénica (Encalada et al., 2019).

2. Marco teórico

2.1 Estado de los ecosistemas fluviales y su diversidad microbiana.

Evaluar la diversidad microbiana de diversos entornos, desde los microbiomas asociados al huésped hasta las comunidades de vida libre en el agua, el suelo y el aire, es esencial para comprender la biodiversidad y mejorar la salud humana y la agricultura (Barea et. al., 2015; McFall-NgaiM et al., 2013).

Los arroyos andinos tropicales son ecosistemas biológica e hidrológicamente excepcionales y, al mismo tiempo, sustentan a una población humana en rápido crecimiento (Encalada et al., 2019). En consecuencia, la expansión de los asentamientos humanos ha afectado directamente a los arroyos. El cambio en el uso de la tierra es uno de los impactos antropogénicos más severos que ha modificado y deteriorado los ecosistemas fluviales en todo el mundo (Allan, 2004; Foley et al., 2005). La urbanización y la agricultura son los usos principales que han alterado los ecosistemas fluviales y reducido la biodiversidad acuática (Foley et al., 2005; Maloney & Weller, 2011; Miserendino et al., 2011). En los Andes tropicales, el desarrollo urbano y agrícola ha transformado rápidamente el paisaje, afectando directamente a los arroyos (Larsen et al., 2011; Encalada et al., 2019) al reducir los hábitats y la biodiversidad acuática (Larsen et al., 2011; Chará- Serna et al., 2015; Zúñiga-Sarango et al., 2020). Asimismo, la conversión del uso del suelo ha causado severas alteraciones en los arroyos como modificaciones en los patrones hidrológicos, deterioro de la calidad del agua, reducción de los procesos ecosistémicos (Knee & Encalada, 2013; Iñiguez-Armijos et al., 2016; Ochoa-Tocachi et al., 2016). Entre las consecuencias, lamentablemente, están el deterioro de la calidad del agua (Buytaert y De Bièvre, 2012; Jerves-Cobo et al., 2018), la modificación del hábitat y la pérdida de especies (Encalada et al., 2019), la alteración de los procesos ecosistémicos (Iñiguez-Armijos et al., 2016), la ruptura de las relaciones a nivel ecosistémico (Zúñiga-Sarango et al., 2020) y graves problemas sanitarios (Guerrero-Latorre et al., 2020). Esta degradación de los arroyos que drenan zonas urbanas se conoce como el "síndrome del arroyo urbano", resultado de múltiples factores de estrés (Walsh et al., 2005). Si bien este síndrome se ha estudiado principalmente en regiones templadas (ver Sabater et al., 2018), esta "patología" también se evidencia en arroyos andinos tropicales (Ríos-Touma y Ramírez, 2018). A pesar de estos serios problemas, el 50% de la biodiversidad andina permanece sin describir (Larsen et al., 2011), y los organismos microbianos acuáticos han sido menos estudiados en estos ecosistemas de agua dulce que en otros ecosistemas.

2.2 Análisis de secuencias microbianas mediante variantes de secuencias de amplicones (ASVs por sus siglas en inglés)

Los avances en el análisis de conjuntos de datos de secuencias de amplicones han introducido un cambio metodológico en los estudios de la biodiversidad microbiana, pasando de la agrupación basada en la

identidad de secuencias (que produce unidades taxonómicas operativas, OTU) a métodos de eliminación de ruido (que producen variantes de secuencias de amplicones, ASV) (Callahan et al., 2017).

El estudio de Chiarello et al. (2022) comparó dos métodos ampliamente utilizados, DADA2 para ASVs y Mothur para OTUs, y encontraron que el método de procesamiento de datos tiene un efecto significativo en las diversidades alfa y beta, así como en la composición taxonómica. Los autores demostraron que la diferencia en los resultados de las pruebas y la conclusión ecológica se debe principalmente a las unidades operativas raras, que son más frecuentes en los métodos de agrupación basados en OTUs y, por tanto, tienen más impacto en los índices basados únicamente en la presencia/ausencia de unidades. Otras opciones metodológicas (rarefacción, umbral de identidad de las OTUs) tuvieron, en general, efectos menores, aunque la rarefacción y la agrupación de OTUs con un 99% de identidad tienden a conciliar las diferencias entre los enfoques basados en las OTUs y en los ASV.

En otro estudio, Glassman y Martiny (2018) examinaron el impacto de usar variantes de secuencia exactas (ESVs), como también se conoce a los ASVs, frente a unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en el análisis de comunidades microbianas, utilizando una extensa base de datos de muestras de hojarasca recogidas en diferentes puntos de elevación y en tres tiempos de muestreo. Los autores descubrieron que, aunque hubo diferencias cuantitativas en la riqueza microbiana detectada por los dos métodos, las métricas de diversidad alfa y beta estaban altamente correlacionadas entre sí, independientemente del enfoque utilizado (ESV o OTU), sugiriendo que los ESV ofrecen una mayor resolución genética y pueden simplificar las comparaciones entre estudios al eliminar la necesidad de volver a unir taxones cuando se fusionan conjuntos de datos. El estudio también resalta que los OTUs siguen siendo útiles para comparar diversidad en grandes conjuntos de datos y para identificar clados que comparten características.

Debido a las ventajas que muestran los ASVs, se ha producido un aumento en los pipelines bioinformáticos que buscan utilizar ASVs y minimizar la diversidad de secuencias especiosas (Edgar, 2016; Amir et al. 2017).

2.3 Hongos y sus características funcionales

El reino Fungi es uno de los más diversos, tanto taxonómica como funcionalmente (McLaughlin y Spatafora 2014; Hawksworth y Lücking 2017). Algunos grupos cumplen con roles esenciales para los ecosistemas o colonizan espacios de difícil acceso para los demás organismos (Mueller et al. 2005; Peay et al. 2016). Los hongos y los oomicetos patógenos se encuentran entre las plagas más dañinas en la silvicultura y la agricultura (Hyde et al. 2018; Lucas 2020), mientras que los oomicetos, los labyrinthulidae y los hongos unicelulares de los Aphelidiomycota, Chytridiomycota y Rozellomycota pueden ser los parásitos más comunes de la microfauna, los protozoos y las algas en los hábitats acuáticos (Archibald et al. 2017; Grossart et al. 2019). Los hongos también son agentes importantes de enfermedades en animales y en los humanos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Brown et al. 2012; de Hoog et al. 2018 ;

Hyde et al. 2018). Aunque las bacterias y los virus son los parásitos relativamente más importantes de los animales (Ryan et al. 2019), los quítridos y los hongos del suelo causan las enfermedades más devastadoras en anfibios y murciélagos, respectivamente (Fisher et al. 2012).

Debido al estilo de vida críptico de los hongos, los métodos de secuenciación de alto rendimiento han sido cada vez más utilizados para la identificación de estos organismos, dando lugar a conocimientos sin precedentes sobre la diversidad de hongos en entornos complejos, como el agua, el suelo, los tejidos vivos, entre otros (Nilsson et al. 2018; Větrovský et al. 2020). Las bases de datos de secuencias curadas como UNITE (Nilsson et al. 2019) e ISHAM (Irinyi et al. 2015) han mejorado enormemente la capacidad para clasificar las unidades taxonómicas operativas (OTU) fúngicas en especies, géneros o taxones de nivel superior.

La mayoría de los rasgos funcionales de los hongos se conservan a nivel de género y a veces en rangos taxonómicos superiores; por lo tanto, la identificación precisa a nivel de especie o género puede utilizarse para inferir rasgos funcionales de los taxones (Tedersoo et al. 2014; Nguyen et al. 2016; Zanne et al. 2020). Algunas de las bases de datos disponibles para inferir gremios funcionales e información de rasgos para taxones de la mayoría de los filos fúngicos son Tedersoo et al. (2014) FUNGuild (Nguyen et al. 2016), FacesOfFungi de Jayasiri et al. (2015), FunFun de Zanne et al (2020) y FungalTraits (Põlme et. Al. 2020).

FungalTraits, diseñada durante la reunión de micólogos forestales del Norte de Europa del año 2014, es una base de datos de rasgos y caracteres fúngicos, un conjunto de datos de hoja de cálculo independiente que sirve como un recurso que proporciona información ecológica general y asignación funcional para estudios ambientales. Esta base de datos ha sido fruto de la colaboración de un amplio grupo de investigadores internacionales y proporciona información exhaustiva sobre un número limitado de rasgos ecológicamente relevantes para el mayor número posible de taxones, con el fin de facilitar la filogenética comparativa basada en rasgos, así como análisis exhaustivos en ecología de comunidades. Además, es una base de datos fácil de utilizar pues está en un formato sencillo de hoja de cálculo de Excel y es continuamente actualizada por la comunidad científica internacional (Põlme et. Al. 2020). Según Tanunchai y otros autores (2023), FungalTraits muestra superioridad a FUNGuild, una de las bases de datos más utilizadas, específicamente la cantidad y la calidad de las anotaciones funcionales fúngicas fueron significativamente mejores en FungalTraits que en FunGuild para evaluar los gremios funcionales en hojas y acículas senescentes de 12 especies de árboles templados.

3. Materiales y métodos

3.1 Zona de muestreo

El trabajo de titulación partió de información recolectada en una investigación previa (Ochoa et al. Sin publicar). La zona de estudio está situada en una cabecera de cuenca del río Zamora, en el sur de los Andes ecuatorianos (Figura 1). A lo largo del valle se encuentra la ciudad de Loja, con aproximadamente 200.000 habitantes. La cuenca de estudio tiene un clima tropical húmedo influenciado por los regímenes amazónico y pacífico (Rollenbeck & Bendix, 2011) cubre un área de 276 km^2 y oscila entre 2.020 a 3.250 m.s.n.m. (Iñiguez-Armijos et al., 2014). El clima está influenciado por las masas de aire provenientes de la vertiente oriental de la Amazonía y por las masas de aire provenientes del oeste seco de Tumbes (Rollenbeck & Bendix, 2011). En consecuencia, la precipitación es temporal y espacialmente variable a lo largo del año en esta cuenca, teniendo su estación lluviosa en marzo, mientras que agosto es el mes más seco (Emck, 2007; Rollenbeck et al., 2007; Rollenbeck & Bendix, 2011).

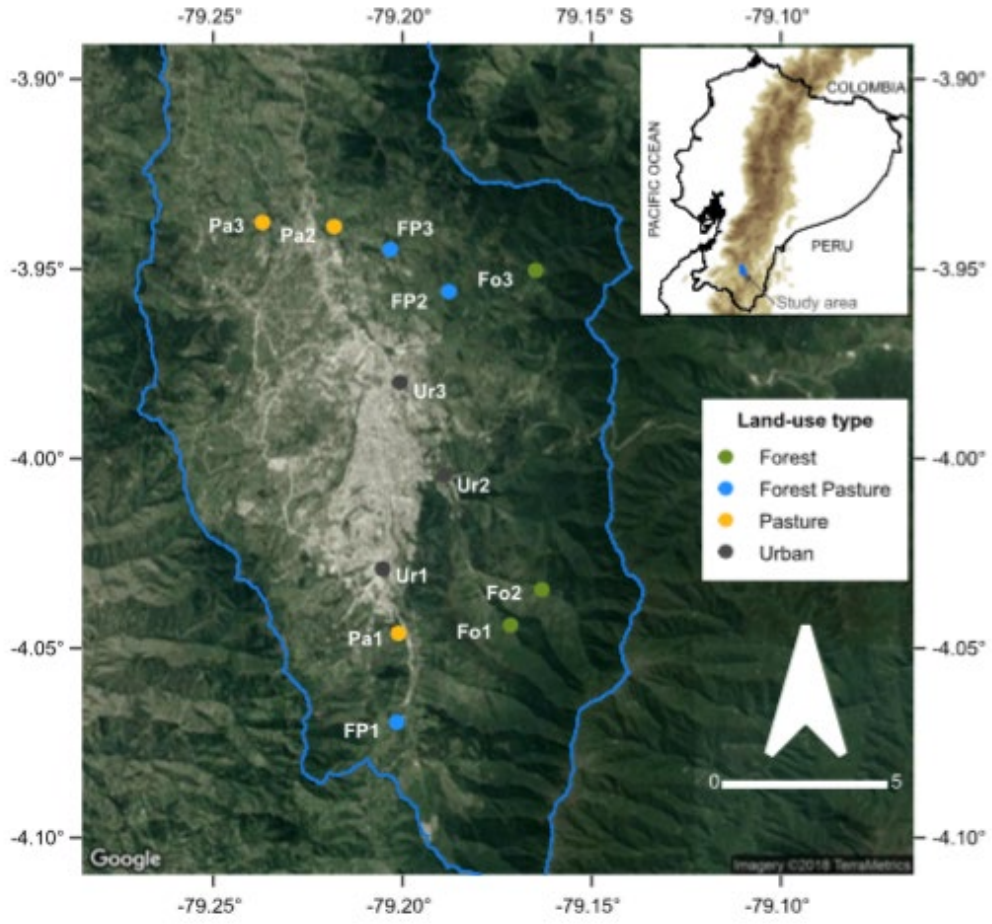


Figura 1. Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreo. Los códigos y los colores en la figura identifican el uso de suelo Fo= bosque; FP= bosque pastizal; Pa= pastizal; Ur = zona urbana (Ochoa et al. Sin publicar).

La vegetación nativa está compuesta por bosque montano alto, bosque montano nublado, páramo arbustivo y matorral montano (Tapia-Armijos et al., 2015). Desde 1960, la vegetación nativa ha sido sustituida principalmente por pastos y en menor medida por cultivos y plantaciones de árboles (pinos, eucaliptos y alisos). El desarrollo urbano se ha extendido a lo largo del río principal mostrando alteraciones permanentes en el sistema fluvial como canalización, sedimentación, cargas de aguas residuales, descargas de aguas pluviales, acumulación de residuos sólidos y contaminación por metales pesados (Zúñiga-Sarango et al., 2020).

En el estudio mencionado, Ochoa y otros autores seleccionaron 12 arroyos de bajo orden influenciados por cuatro tipos contrastados de uso del suelo a lo largo de los márgenes ribereños: bosque, bosque-pastizal, pastizal y zona urbana, con tres arroyos replicados por uso del suelo (n = 12) (Figura 1). En cada arroyo, se estableció un sitio de muestreo: un tramo de 60 m de longitud con una pendiente similar. Además, se determinaron varios factores de estrés ambiental relacionados con la degradación de los arroyos a lo largo del gradiente de uso del suelo estudiado. Los parámetros hidráulicos, como la anchura y profundidad del canal y la velocidad de la corriente, se midieron con una cinta métrica y un caudalímetro (FP311, Global Water Inc., TX, EE.UU.). Los parámetros fisicoquímicos como la temperatura, la conductancia específica, el pH y la concentración de oxígeno disuelto (O2) se determinaron con una sonda multisensor portátil (YSI 556, Yellow Springs Instruments Inc., OH, EE.UU.). Además, se tomaron muestras de agua (500 ml) para analizar el nitrógeno inorgánico disuelto (DIN = nitrato + nitrito + amonio), el fosfato y la turbidez en el laboratorio aplicando métodos estándar (APHA, 2017). Todos estos parámetros se midieron en cuatro transectos transversales por sitio en cuatro momentos diferentes espaciados semanalmente.

3.2 Muestreo de hongos y amplificación de ITS

En cada lugar de muestreo, se colocó a unos 20 m de distancia, cuatro bolsas de malla (15 × 15 cm) de 500µm de abertura de malla rellenas con 4± 0,05 g de hojas senescentes, secadas al aire, de *Alnus acumminata* Kunth. (aliso), *Croton rimbachii* Croizat. (croton) y *Eucalyptus globulus* Hill. (eucalipto). Las bolsas de hojarasca se ataron con hilos de nailon a barras de hierro clavadas en el lecho del arroyo y se incubaron durante 30 días (agosto-septiembre de 2016) para permitir la colonización de hongos acuáticos (Romaní et al., 2009). Una vez colonizadas, las bolsas de hojarasca se recuperaron, se colocaron en bolsas zip-lock y se transportaron al laboratorio a

oscuras y en frío (Bärlocher et al., 2010). En el laboratorio, las hojas se enjuagaron con agua desionizada para eliminar los sedimentos adheridos. A continuación, se cortaron al azar cuatro discos de hoja (20 mm de diámetro) por bolsa y se almacenaron en placas de Petri a -80 °C hasta la extracción del ADN.

La extracción de ADN se realizó según el método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Parte de la región del espaciador transcrito interno (ITS), que incluye las regiones ITS2, 5.8S y 5' de la subunidad grande (LSU) del ARN ribosomal, se amplificó utilizando los cebadores 5.8S_Fun (5'-CAACTTTYRRCAAYGGATCWCT-3') e ITS4_Fun (5'-AGCCTCCGCTTTGATATGCTTAART-3') diseñados para la secuenciación Illumina por Taylor et al. (2016). Se eligieron estos cebadores porque se comprobó que amplifican en un alto porcentaje hongos del Ascomycota y Basidiomycota y minimizan la amplificación de otros eucariotas (Taylor et al., 2016).

La PCR se realizó con la polimerasa GoTaq en un volumen final de 20 µL utilizando 4 µL de tampón GoTaq 5X (que contiene 1,5mM de MgCl2), 0,4 µL de dNTPs 10mM, 1,0 µL de 10uM de cebador 5. 8S_Fun, 1,0 µL de 10uM de ITS4_Fun, 0,4 µL de 25mM MgCl2, 0,2 µL de GoTaq Polymerase, 12 µL de agua destilada desionizada estéril y 1 µL de ADN total. Para amplificar ITS 2 se realizó una PCR de retoque siguiendo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 2m; 8 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, temperatura de recocido a 58°C durante 45 s y extensión a 72°C durante 1 m con un 0. 5°C de disminución de la temperatura de recocido por ciclo; 26 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, temperatura de recocido a 54°C durante 45 s y extensión a 72°C durante 1 m y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 m. El éxito de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los amplicones se purificaron con el sistema Wizard SV Clean-up (Promega). Tras la purificación, se determinó la concentración utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Los amplicones se secuenciaron utilizando la tecnología Illumina MiSeq→ (IMGM Laboratories GmbH, Martinsried, Alemania) mediante la cual se generaron lecturas emparejadas de 300 pb de longitud.

3.3 Análisis bioinformáticos

El análisis de las secuencias se realizó en R 4.0.3 (R Core Team, 2020), utilizando el pipeline DADA2 específico para ITS (Callahan et al., 2016 & Callahan 2022). ITS tiene tasas altas de inserciones y deleciones, y, por tanto, es una región muy variable en longitud (con variaciones que oscilan entre

200 a 600 bp). Este pipeline incluye la eliminación de cebadores que pueden estar presentes en algunas lecturas cuando la región ITS amplificada es más corta que la longitud de lectura. La eliminación de los cebadores se realizó utilizando Cutadapt 3.1 (Martin_2011)

Para el corte y filtrado de secuencias de ITS se utilizó la función `*filterAndTrim*` para realizar el corte y filtrado de las secuencias, con `maxN` establecido en 0 para eliminar secuencias con nucleótidos ambiguos. El parámetro `maxEE` se fijó en 2 para ambas direcciones, lo que permite un máximo de 2 errores esperados en cada lectura. `truncQ` se estableció en 2 para truncar las lecturas en la primera base con una puntuación de calidad inferior a este valor. Se especificó una longitud mínima (`minLen`) de 50 nucleótidos para mantener las secuencias. El parámetro `rm.phix` se estableció en `TRUE` para eliminar secuencias del genoma PhiX. El pipeline incluye el aprendizaje de las tasas de error para obtener una corrección precisa de las secuencias (función *learnErrors*). Esto permitió aplicar un modelo de error para la posterior inferencia de secuencias, utilizando la función *dada* para identificar variantes únicas en las secuencias. El enfoque incluyó el uso de "pooling" para mejorar la detección de secuencias menos comunes. El análisis indicado se realizó para dos grupos de lecturas: obtenidas con la plataforma MiSeq (67 muestras) y con la plataforma HiSeq (59 muestras). Del primer grupo se obtuvieron 1302 ASVs y del segundo 3543 ASVs. Se unificaron las tablas obteniendo para las 67 muestras del estudio un total de 4101 ASVs. Otro paso importante del pipeline es la eliminación de quimeras, es decir, secuencias artificialmente combinadas que podrían sesgar el análisis que resultó en un total de 1396 ASVs.

Para la asignación taxonómica, se utilizó la base de datos de referencia UNITE para hongos (Abarenkov et al. 2023). Posteriormente se utilizó el paquete `phyloseq` (McMurdie & Holmes, 2013) para procesar datos de secuencias genéticas y metadatos, permitiendo una gestión eficiente de datos y una posterior creación de un árbol filogenético. Los metadatos se importaron en formato CSV para proporcionar información contextual sobre las muestras. Se generó un archivo FASTA que contiene las secuencias de las variantes amplicónicas (ASVs) para la identificación precisa de las mismas.

Para el análisis de la diversidad fúngica, se utilizó el paquete `microeco` (Wang et al., 2012) en R, que permite integrar y analizar datos de microbioma ambiental de manera eficiente. Se creó un objeto `microeco` a partir de datos de secuenciación, filtrando específicamente por aquellos taxones asignados al reino Fungi. Para explorar la estructura de la comunidad fúngica y su relación

con los usos del suelo, se llevaron a cabo análisis de diversidad alfa y beta, utilizando métodos de rarefacción y cálculos de diversidad basados en índices ecológicos comunes. Los resultados fueron visualizados mediante gráficos de barras y PCoA para ilustrar diferencias significativas en la composición y diversidad entre los diferentes usos del suelo.

3.4 Análisis de Características Fúngicas

Para evaluar si el uso de suelo afecta a la abundancia de hongos patógenos se analizó se utilizó FungalTraits (Põlme et al., 2020) para asociar posibles funciones a las ASV fúngicas en función de su taxonomía a nivel de género. Esta base de datos está disponible en formato Excel, la asignación se realiza con la Función BUSCARV de Excel. La base de datos permite asignar el Estilo de vida primario, Estilo de vida secundario, Capacidad de interacción endofítica, entre otras características. Para este estudio se utilizó únicamente el estilo de vida primario de cada ASV.

3.5 Análisis estadísticos

Este estudio utilizó varias pruebas estadísticas. Se utilizó el análisis multivariante de la varianza (PERMANOVA) (Anderson, 2001) para evaluar diferencias en la composición de las comunidades fúngicas entre los distintos tipos de uso de suelo, lo que permite determinar si las medias vectoriales de los grupos son estadísticamente distintas en la población. Además, se calcularon las distancias de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957) para evaluar la diversidad beta entre las muestras, utilizando pruebas de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945) para comparar las medianas de las distancias entre grupos de usos de suelo.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de normalidad para las abundancias relativas de los hongos patógenos utilizando el test de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965), acompañadas de histogramas y gráficos QQ Plot para visualizar la distribución de los datos. Estas herramientas son fundamentales para evaluar la adecuación de los datos a la suposición de normalidad requerida por muchas pruebas estadísticas. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) para determinar diferencias entre grupos, seguido por un análisis posthoc utilizando la prueba de Dunn (Dunn, 1964) con ajuste de Bonferroni (Bonferroni, 1936) para controlar el error tipo I en comparaciones múltiples.

Para la visualización de los resultados, se emplearon gráficos de barras y boxplot generados mediante el paquete `ggplot2` en R. Este enfoque no solo proporciona una representación clara de los resultados, sino que también permite una interpretación visual detallada de las diferencias y similitudes entre los grupos analizados.

4. Resultados

4.1 Riqueza de hongos en diferentes usos de suelo

Como se puede observar en el Diagrama de Venn (Fig. 2), se identificaron un total de 1396 secuencias de variante del amplicón (ASVs) de hongos, distribuidas en los cuatro usos de suelo: Bosque, Bosque-Pastizal, Pastizal y Zona Urbana. El 67.4% de ASVs están compartidas entre las categorías de uso de suelo (941 ASVs) y el 32.6% (455 ASVs) es específico a cada una de las categorías. Las especies fúngicas resilientes o adaptativas de diversos ambientes son 291 (20.8%).

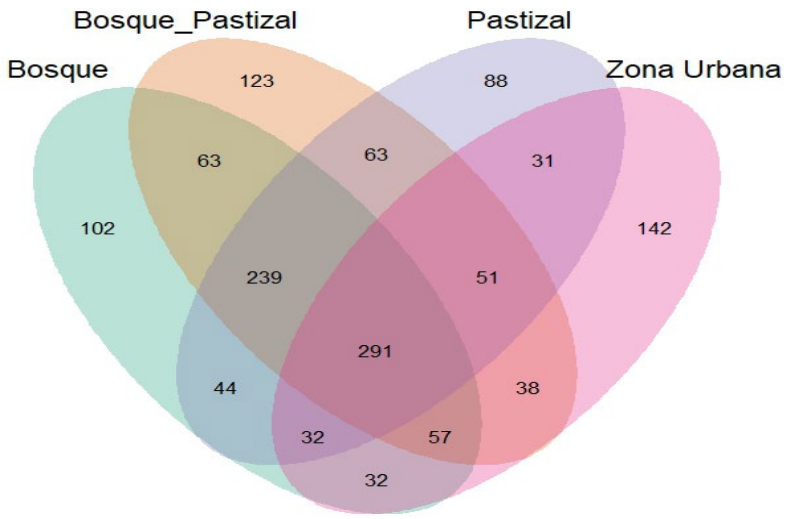


Figura 2. Diagrama de Venn con los ASVs (Amplicon Variant Sequence) para los cuatro usos de suelo.

4.2 Abundancia de hongos en diferentes usos de suelo

Si analizamos con detalle, a nivel de género, la abundancia relativa de los ASVs, se puede evidenciar una marcada diferencia entre la Zona Urbana y las zonas de Bosque, Bosque-Pastizal y Pastizal (Fig. 3), de hecho, la zona urbana se muestra como un grupo claramente distinto de los demás (Fig. 4). Los géneros *Tetrachaetum* e *Hydrocina* están presentes en mayor proporción en

las zonas de Bosque, Bosque-Pastizal y Pastizal. Mientras que *Purpureocillium* tiene mayor proporción en la Zona Urbana, seguido del género *Dimorphospora*.

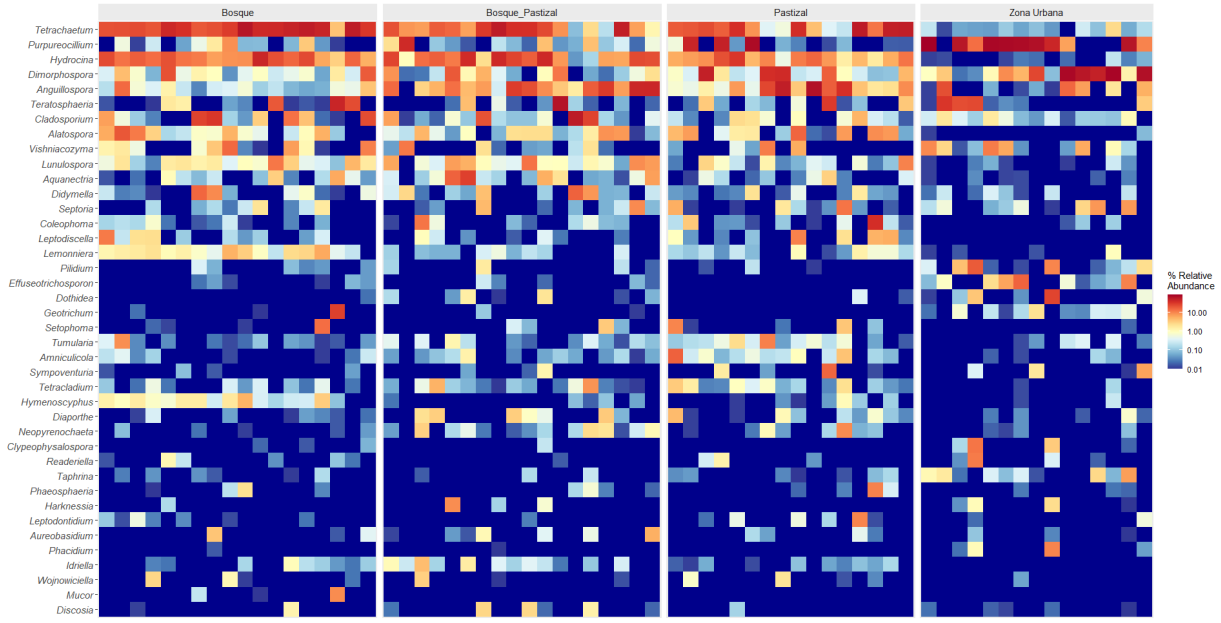


Figura 3. Mapa de calor que presenta los géneros y su abundancia relativa en los cuatro usos de suelo.

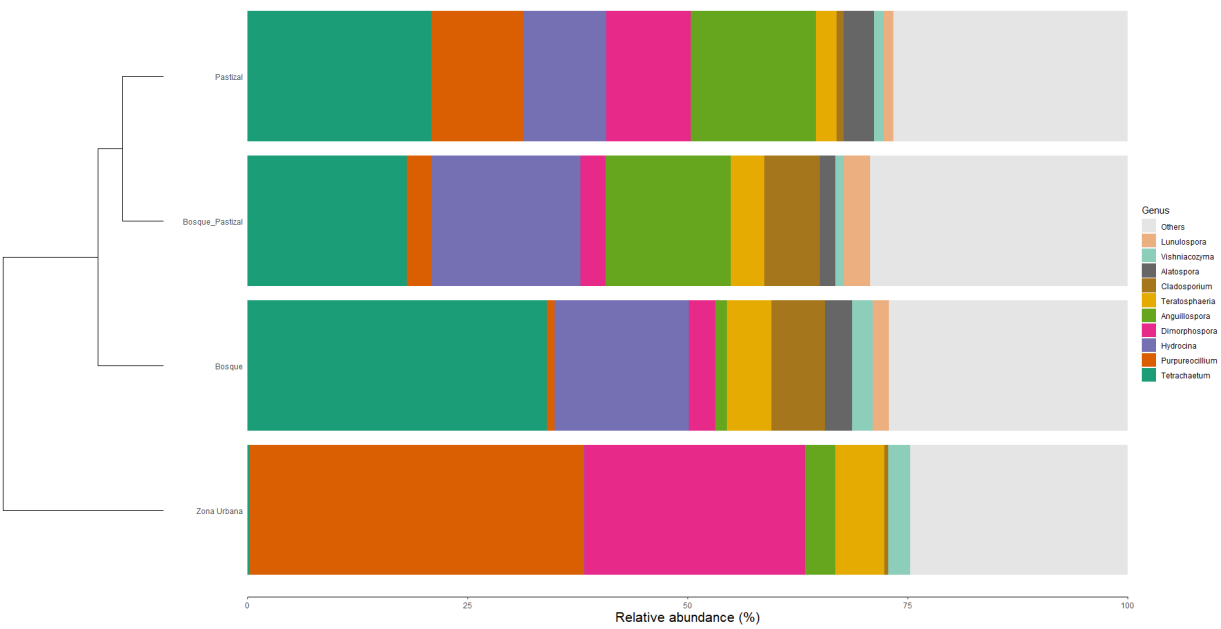


Figura 4. Abundancia relativa de los once géneros con mayor prevalencia.

4.3 Diversidad beta

El análisis de coordenadas principales (PCoA) ha permitido visualizar las diferencias en la composición de comunidades fúngicas entre los usos de suelo: Bosque, Bosque Pastizal, Pastizal y Zona Urbana. Los dos ejes principales explican un 38.2% de la variación total en la diversidad

beta de las comunidades fúngicas, con el primer eje (PCo1) explicando el 23.8% y el segundo eje (PCo2) el 14.4% de la variabilidad (Fig. 5). Este nivel de explicación destaca la importancia de los gradientes ambientales subyacentes que diferencian estas comunidades. La representación gráfica del PCoA muestra una agrupación notable entre las muestras de cada tipo de uso de suelo. En particular, las muestras de Bosque se caracterizan por una agrupación más compacta, indicando una homogeneidad significativa en las comunidades fúngicas dentro de este entorno. En contraste, las muestras de Zona Urbana están ampliamente dispersas, lo que sugiere una gran heterogeneidad en la composición fúngica, probablemente debido a la variabilidad en la intervención urbana y la contaminación. Las muestras de Pastizal y Bosque Pastizal muestran una variabilidad intermedia y algunas características comunes, posiblemente reflejando una mezcla de influencias ambientales tanto naturales como antropogénicas.

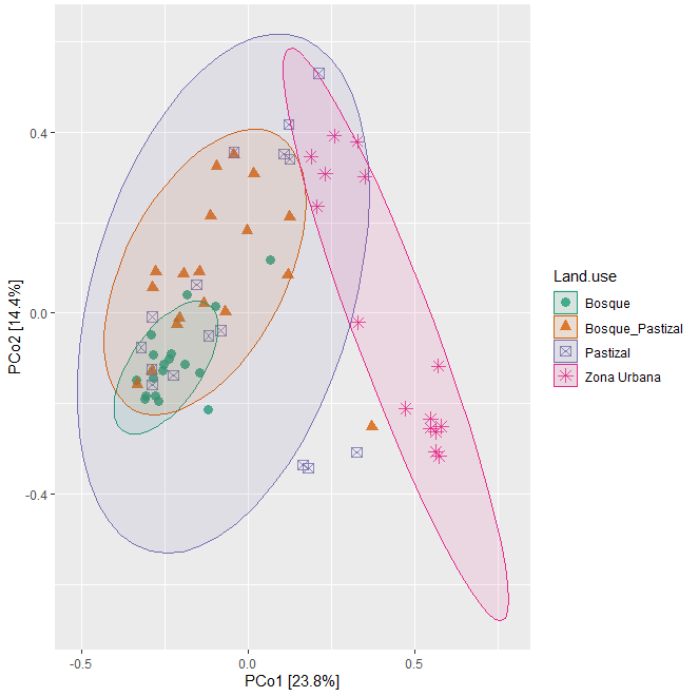


Figura 5. Análisis de Componentes Principales (PCoA) para los cuatro usos de suelo.

La Figura 6 y la Tabla 1 presentan un análisis exhaustivo de la diversidad beta de comunidades fúngicas utilizando la distancia de Bray-Curtis y un análisis PERMANOVA para comparar los diferentes usos de suelo. La distancia de Bray-Curtis revela diferencias significativas en la composición de las comunidades fúngicas entre bosque y los demás usos de suelo.

Las comparaciones significativas ($p < 0.0012$) entre Bosque y Zona Urbana, así como entre Bosque-Pastizal y Zona Urbana, indican una marcada divergencia en las comunidades fúngicas de

áreas naturales versus áreas urbanizadas. Esto se refleja claramente en la Tabla 1 donde el mayor valor de F (14.206099) y R^2 (0.31425182) para la comparación entre Bosque y Zona Urbana sugiere que los cambios drásticos en el hábitat debido a la urbanización alteran significativamente la composición fúngica. Similarmente, la comparación entre Bosque-Pastizal y Zona Urbana muestra un F significativo de 8.906730 y un R^2 de 0.22318867, reafirmando la influencia del entorno urbano en la diversidad fúngica.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre Bosque-Pastizal y Pastizal (p = 0.227), lo que indica una similitud relativa en la composición de sus comunidades fúngicas. Este resultado sugiere que los gradientes menos extremos de cambio en el uso del suelo no afectan tan marcadamente la composición fúngica como lo hace la urbanización.

Tabla 1. Análisis PERMANOVA de la diversidad de comunidades fúngicas entres diferentes usos de suelo

Usos de suelo	F	R2	p.valor	p. ajustado	Significancia
Bosque vs Bosque_Pastizal	3.900682	0.10291852	0.001	**0.0012**	**
Bosque vs Pastizal	2.923341	0.08370737	0.001	**0.0012**	**
Bosque vs Zona Urbana	14.206099	0.31425182	0.001	**0.0012**	**
Bosque_Pastizal vs Pastizal	1.229427	0.03699813	0.227	0.2270	
Bosque_Pastizal vs Zona Urbana	8.906730	0.22318867	0.001	**0.0012**	**
Pastizal vs Zona Urbana	5.819670	0.16713743	0.001	**0.0012**	**

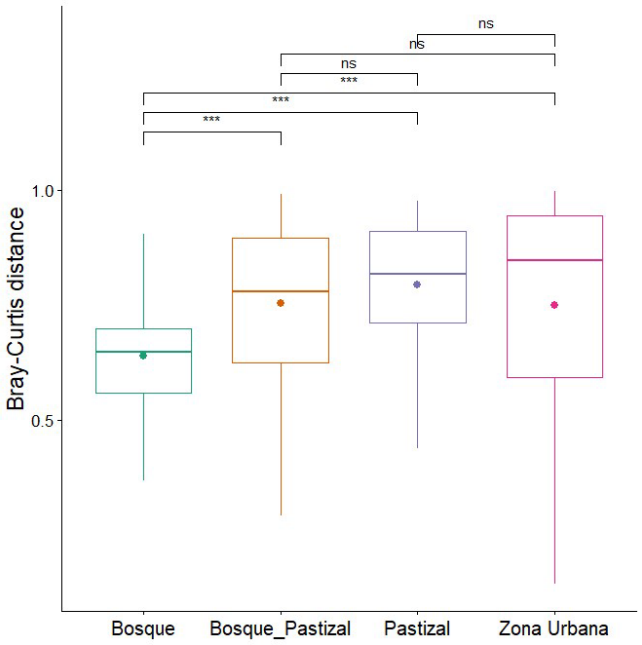


Figura 6. Diversidad Beta de hongos en cuatro zonas con diferente uso de suelo.

4.4 Abundancia relativa de especies según su estilo de vida primario.

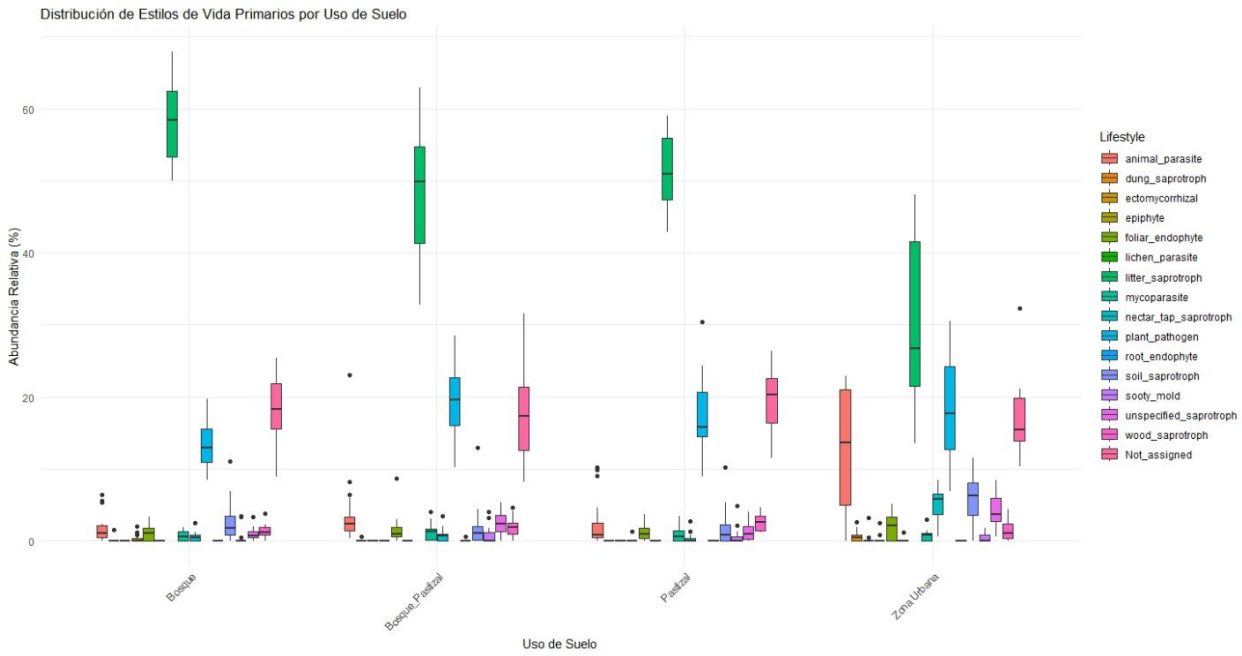


Figura 7. Distribución de estilos de vida primarios por uso de suelo: Bosque, Bosque-Pastizal, Pastizal y Zona Urbana.

El grupo de hongos saprótrofos de la hojarasca muestra abundancias relativamente altas en todos los tipos de uso de suelo. La Zona Urbana muestra una mayor abundancia de hongos parásitos de animales, así como presencia de parásitos de plantas.

Enfocando el análisis únicamente en los estilos de vida primarios relacionados con la patogenicidad de los hongos: parásitos de animales, patógenos de plantas, parásitos de hongos y parásitos de líquenes, podemos observar algunas diferencias significativas. Únicamente la abundancia relativa de patógenos de plantas sigue una distribución normal, en este grupo de hongos se realizó un análisis ANOVA con una prueba Tukey posthoc; sin embargo, esta prueba mostró resultados similares a la realizada con Kruskall Wallis para este grupo.

Se realizó una prueba de Kruskall Wallis que mostró diferencia significativa únicamente para los patógenos de animales y plantas. En estos dos grupos se empleó el test de Dunn con ajuste de Bonferroni para controlar la tasa de error Tipo I debido a múltiples comparaciones (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la Abundancia de Organismos entre Diferentes Usos de Suelo Utilizando el Test de Dunn con Ajuste de Bonferroni. Valores p ajustado en negritas muestran diferencias significativas

Estilo de vida	Patógeno de animales		Patógeno de plantas	
Comparación	Estadística z	p-valor ajustado	Estadística z	p-valor ajustado
Bosque vs Bosque_Pastizal	-1.89	0.1772	-3.38	**0.0021**
Bosque vs Pastizal	0.01	1.00	-2.3	0.0632
Bosque_Pastizal vs Pastizal	1.84	0.1954	0.97	0.9825
Bosque vs Zona Urbana	-3.23	**0.0037**	-2.52	**0.0350**
Bosque_Pastizal vs Zona Urbana	-1.43	0.4567	0.7	1.00
Pastizal vs Zona Urbana	-3.16	**0.0048**	-0.24	1.00

En cuanto al grupo de hongos patógenos de plantas, como se muestra en la Tabla 2, los resultados muestras diferencias estadísticamente significativas entre las áreas de Bosque y Bosque Pastizal (p-valor ajustado = 0.0021) y entre Bosque y Zona Urbana (p-valor ajustado = 0.0350). Para los hongos patógenos de animales las diferencias estadísticamente significativas se observaron entre Bosque vs Zona Urbana (p-valor ajustado = 0.0037) y entre Pastizal y Zona Urbana (p-valor ajustado = 0.0048). En ambos grupos de hongos hay diferencia entre el Bosque y la Zona Urbana.

5. Discusión

Los resultados del estudio muestran que el uso del suelo influye significativamente en la diversidad y composición de la comunidad de hongos acuáticos en los arroyos andinos tropicales. La abundancia relativa de hongos mostró una marcada diferencia en dependencia del uso del suelo; sobre todo en la Zona Urbana. La composición de la comunidad, difirió entre cada uso del suelo, hallazgos que corroboran estudios anteriores, en los que las comunidades de hongos acuáticos en arroyos prístinos son diferentes de los arroyos con cambios en la vegetación ribereña (Bärlocher et al., 2010; Tolkkinen et al., 2015).

La clara separación entre las comunidades fúngicas de la Zona Urbana y las áreas más naturales o rurales (Bosque, Bosque Pastizal y Pastizal) subraya cómo los gradientes de urbanización influyen en la estructura de estas comunidades. La diversidad fúngica en zonas urbanas, caracterizada por una alta dispersión, podría estar respondiendo a factores de estrés específicos como la contaminación, el cambio en la cobertura del suelo y las alteraciones microclimáticas.

La estructura de las comunidades de hongos acuáticos se vio fuertemente influenciada por la conversión del uso del suelo. En otras palabras, los ensamblajes de hongos acuáticos responden a múltiples factores de estrés (Tolkkinen et al., 2015). En la zona urbana se observó una mayor abundancia de hongos del género *Purpureocillium*, caracterizado como parásito de animales en su estilo de vida primario. Concretamente, *Purpureocillium lilacinum* ha sido reportado como un agente eficaz para inhibir nemátodos que afectan a plantas, como los nematodos de nudo de raíz y los quistes de papa (Barbosa Santos et al. 2023). A la vez, se han reportado casos de hialohifomicosis, una infección cutánea rara, causada por *Purpureocillium lilacinum.* En estos estudios se lo reporta como un patógeno oportunista emergente en humanos del que existen cada vez más casos descritos, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (Lu et al. 2023; Wang et al. 2023). Otro estudio reportado por Ross-Sánchez y otros autores (2024) examina un caso de endoftalmitis causada por *Purpureocillium lilacinum*, se ratifica su actuación como patógeno oportunista en humanos, llevando a infecciones severas como la endoftalmitis. La infección se manifiesta de manera devastadora en la visión, y su manejo es desafiante debido a la resistencia del hongo a los antifúngicos comunes y al diagnóstico tardío, frecuentemente complicado por el uso indebido previo de corticosteroides en muchos pacientes.

Chase (2010), señala a las perturbaciones antropogénicas como un filtro no aleatorio para la selección de especies con rasgos que permiten la persistencia en el medio perturbado. Dado que los hongos de agua dulce son relevantes en el ecosistema acuático, los efectos de la conversión del uso del suelo sobre la estructura de la comunidad fúngica pueden actuar sinérgicamente sobre las funciones del ecosistema, particularmente en la degradación de la hojarasca, el ciclo de nutrientes, la producción secundaria y los servicios ecosistémicos (Ferreira et al., 2014).

En cuanto al estilo de vida primario de las especies se observó una marcada diferencia, principalmente en los hongos parásitos de animales y de plantas, más prevalentes en zonas urbanas, subrayando el riesgo potencial no sólo para la salud animal, sino para la salud humana, destacando la importancia de minimizar el impacto ambiental en los ríos urbanos.

6. Conclusiones y Recomendaciones

El estudio muestra que las comunidades de hongos de los arroyos andinos cambian con cada uso del suelo. Muestra también que los hongos patógenos de animales y plantas están más presentes en zonas urbanas. Los cambios producidos por la conversión del uso del suelo pueden conducir a múltiples efectos adversos sobre la estructura y función de los ecosistemas andinos de agua dulce y sobre la presencia de hongos patógenos en las Zonas Urbanas. Es importante que estos resultados sean comunicados a los tomadores de decisiones y a la ciudadanía en general a fin de concientizar sobre la necesidad de minimizar el impacto ambiental en los ríos.

7. Bibliografía

1. Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., et al. (2023). UNITE: A database providing unified access to molecular data on fungal taxonomy. https://unite.ut.ee/

2. Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z. Z., Kightley, E. P., Thompson, L. R., Hyde, E. R., Gonzalez, A., & Knight, R. (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. mSystems, 2(2), e00191-16. https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16

3. Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32-46. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x

4. Archibald, J. M., Archibald, G. B., & Slamovits, C. H. (Eds.). (2017). Handbook of the Protists. Springer, Cham.

5. Barbosa Santos, et al. (2023). *Purpureocillium lilacinum*: A potential biocontrol agent for sustainable agriculture. *Preprints*. https://doi.org/10.20944/preprints202305.1926.v1

6. Barea, J. M. (2015). Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 15(2), 261–282.

7. Bärlocher F. (2010). Molecular approaches promise a deeper and broader understanding ofthe evolutionary ecology of aquatic hyphomycetes.Journal of the North AmericanBenthological Society29, 1027–1041.https://doi.org/10.1899/09-081.1

8. Bonferroni, C. E. (1936). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze, 8, 3-62.

9. Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecological Monographs, 27(4), 325-349.

10. Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. Science Translational Medicine, 4(165), 165rv113.

11. Callahan, B., McMurdie, P., & Holmes, S. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. ISME Journal, 11(12), 2639-2643. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119

12. Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods, 13(7), 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

13. Callahan, B. (2022). DADA2: Accurate sample inference from amplicon data with single-nucleotide resolution. Recuperado de https://benjjneb.github.io/dada2/index.html

14. Chase J.M. (2010). Stochastic community assembly causes higher biodiversity in moreproductive environments.Science328, 1388–1391.https://doi.org/10.1126/science.1187820

15. Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. Technometrics, 6(3), 241-252.

16. Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon reads. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/081257

17. Edgar, R. C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. Bioinformatics, 34(14), 2371-2375.

18. Emck P. (2007). A Climatology of South Ecuador.1–159

19. Ferreira V., Gulis V., Pascoal C. & GraçaM.A.S. (2014). Stream pollution and fungi. In:Freshwater Fungi and fungal-like organism. (Eds E.B.G. Jones, K.D. Hyde & K.-L.Pang), p. 489. De Gruyter

20. Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant, and ecosystem health. Nature, 484(7393), 186-194. https://doi.org/10.1038/nature10947

21. Glassman, S. I., & Martiny, J. B. H. (2018). Broadscale ecological patterns are robust to use of exact sequence variants versus operational taxonomic units. mSphere, 3(4), e00148-18. https://doi.org/10.1128/mSphere.00148-18

22. Grossart, H. P., Van den Wyngaert, S., Kagami, M., Wurzbacher, C., Cunliffe, M., & Rojas-Jimenez, K. (2019). Fungi in aquatic ecosystems. Nature Reviews Microbiology, 17(5), 339–354.

23. Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiology Spectrum, 1(79), 95.

24. Hyde, K. D., Al-Hatmi, A. M., Andersen, B., Boekhout, T., Buzina, W., Dawson, T. L., ... & Jones, E. G. (2018). The world's ten most feared fungi. Fungal Diversity, 93, 161-194.

25. Iñiguez-Armijos C., Leiva A., Frede H.G., Hampel H. & Breuer L. (2014).Deforestation andbenthic indicators: How much vegetation cover is needed to sustain healthy Andeanstreams?PLoS ONE9, 1–10.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105869

26. Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., & Vu, D. (2015). International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. Medical Mycology, 55(3), 313-337.

27. Jayasiri, S. C., Hyde, K. D., Ariyawansa, H. A., Bhat, J., Buyck, B., Cai, L., ... & McKenzie, E. H. C. (2015). The Faces of Fungi database: fungal names linked with morphology, phylogeny, and human impacts. Fungal Diversity, 74, 3-18.

28. Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. Journal of the American Statistical Association, 47(260), 583-621

29. Lucas, J. A. (2020). Plant pathology and plant pathogens. John Wiley & Sons, London.

30. Lu, K. L., Wang, Y. H., Ting, S. W., & Sun, P. L. (2023). Cutaneous infection caused by Purpureocillium lilacinum: Case reports and literature review of infections by Purpureocillium and Paecilomyces in Taiwan. *The Journal of Dermatology, 50*(10), 1088-1092. https://doi.org/10.1111/1346-8138.16806

31. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal, 17(1), 10-12. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200

32. Martin, M. (2011). Cutadapt version 3.1 [Software]. Available at https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/

33. McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., et al. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(9), 3229–3236.

34. McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLOS ONE, 8(4), e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

35. McLaughlin, D. J., & Spatafora, J. W. (2014). The Mycota 7. Systematics and Evolution. Springer, Heidelberg.

36. Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., ... & Bakker, P. A. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science, 332(6033), 1097–1100.

37. Mueller, U. G., Gerardo, N. M., Aanen, D. K., Six, D. L., & Schultz, T. R. (2005). The evolution of agriculture in insects. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 36, 563-595.

38. Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J. S., & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. Fungal Ecology, 20, 241-248.

39. Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2018). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. Nature Reviews Microbiology, 17(2), 95-109.

40. Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., ... & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. Nucleic Acids Research, 47(D1), D259-D264.

41. Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Talbot, J. M. (2016). Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. Nature Reviews Microbiology, 14(7), 434-447.

42. Põlme, S., Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Lindahl, B. D., Clemmensen, K. E., Kauserud, H., ... & Kõljalg, U. (2020). FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. Fungal Ecology.

43. R Development Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing.R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

44. Ryan, E. T., Hill, D. R., Solomon, T., Endy, T. P., Aronson, N. (2019). Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases e-book. Elsevier, Canada.

45. Rollenbeck R., Bendix J., Fabian P., Boy J., Dalitz H., Emck P.,et al.(2007). Comparison ofdifferent techniques for the measurement of precipitation in tropical montane rain forestregions.Journal of Atmospheric and Oceanic Technology24, 156–168.https://doi.org/10.1175/JTECH1970.1

46. Rollenbeck R. & Bendix J. (2011). Rainfall distribution in the Andes of southern Ecuadorderived from blending weather radar data and meteorological field observations.Atmospheric Research99, 277–289.https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2010.10.018

47. Romaní A.M., Artigas J., Camacho A., Graça M.A. & Pascoal C. (2009). La biota de los ríos:los microorganismos heterotróficos. In:Conceptos Y Técnicas En Ecologia Fluvial,Fundación. (Eds A. Elosegi & S. Sabater), pp. 169–218. Fundación BBVA

48. Ros-Sánchez, E., Oliver-Gutierrez, D., Buck, P., & et al. (2024). Purpureocillium lilacinum-related endophthalmitis: case report. Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection, 14 (1), Article 27. https://doi.org/10.1186/s12348-024-00412-2

49. Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika, 52(3/4), 591-611.

50. Tanunchai, B., Ji, L., Schroeter, S. A., Mohamed Wahdan, S. F., Hossen, S., Delelegn, Y., Buscot, F., Lehnert, A.-S., Alves, E. G., Hilke, I., Gleixner, G., Schulze, E.-D., Noll, M., & Purahong, W. (2023). FungalTraits vs. FUNGuild: Comparison of ecological functional assignments of leaf- and needle-associated fungi across 12 temperate tree species. Microbial Ecology, 85(2), 411–428. https://doi.org/10.1007/s00248-022-01973-2

51. Tapia-Armijos M.F., Homeier J., Espinosa C.I., Leuschner C. & De La Cruz M. (2015).Correction: Deforestation and forest fragmentation in South Ecuador since the 1970s-Losing a hotspot of biodiversity.PLoS ONE10, 3–4.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142359

52. Taylor D.L., Walters W.A., Lennon N.J., Bochicchio J., Krohn A., Caporaso J.G.,et al.(2016). Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing.Applied and EnvironmentalMicrobiology82, 7217–7226.https://doi.org/10.1128/AEM.02576-16

53. Tolkkinen M., Mykrä H., Annala M., Markkola A.M., Vuori K.M. & Muotka T. (2015). Multi-stressor impacts on fungal diversity and ecosystem functions in streams: Natural vs.anthropogenic stress.Ecology96, 672–683.https://doi.org/10.1890/14-0743.1

54. Větrovský, T., Morais, D., Kohout, P., Lepinay, C., Algora, C., Hollá, S. A., ... & Baldrian, P. (2020). GlobalFungi, a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. Scientific Data, 7(1), 1-14. https://doi.org/10.1038/s41597-020-00602-0

55.

56. Wang, Y., Naumann, U., Wright, S. T., & Warton, D. I. (2012). *mvabund–an R package for model-based analysis of multivariate abundance data*. Methods in Ecology and Evolution, 3(3), 471-474.

57. Wang Y, Bao F, Lu X, Liu H, Zhang F. Case Report: Cutaneous Mycosis Caused by Purpureocillium lilacinum. Am J Trop Med Hyg. 2023 Feb 20;108(4):693-695. doi: 10.4269/ajtmh.22-0608. PMID: 36806492; PMCID: PMC10077002.

58. Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

59. Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. Biometrics Bulletin, 1(6), 80-83

60. Zanne, A. E., Abarenkov, K., Afkhami, M. E., Aguilar-Trigueros, C. A., Bates, S., Bhatnagar, J. M., ... & Crowther, T. W. (2020). Fungal functional ecology: bringing a trait-based approach to plant-associated fungi. Biological Reviews, 95(2), 409-433.

61. Zúñiga-Sarango W., Gaona F.P., Reyes-Castillo V. & Iñiguez-ArmijosC. (2020). Disruptingthe Biodiversity–Ecosystem Function Relationship: Response of Shredders and LeafBreakdown to Urbanization in Andean Streams.Frontiers in Ecology and Evolution8,1–12.https://doi.org/10.3389/fevo.2020.592404

.