

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍAS VIRTUALES**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**CARLOS ROLANDO ROSERO ERAZO**

**3 DE SEPTIEMBRE 2025**

## **Datos Generales**

### **Título el proyecto**

“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A LA RIZOSFERA DE VEGETACIÓN HERBÁCEA DE PÁRAMO EN EL PARQUE NACIONAL LLANGANATES MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO”

### **Autor**

Carlos Rolando Rosero Erazoi  
0603141797

### **Director**

PhD. Francisco Flores

### **Datos de la organización o institución**

Pontificia Universidad Católica Del Ecuador

## **Declaración de Derechos de Autor**

© [2025] [CARLOS ROLANDO ROSERO ERAZO]. Todos los derechos reservados.

Ninguna parte de este trabajo puede ser reproducida, almacenada en un sistema de recuperación, o transmitida en cualquier forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia, grabación, o de otro tipo, sin el permiso previo por escrito del autor.

## **1. Aspectos preliminares e introductorios**

### **1.a) Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi familia, cuyo apoyo incondicional ha sido el pilar fundamental en cada paso de mi formación académica y personal. De manera especial, a mi madre, quien, con sabiduría, constancia y profundo amor por el conocimiento, ha sembrado en mí la pasión por la investigación y la búsqueda constante de respuestas. Este logro también es suyo.

### **1.b) Agradecimientos**

Agradezco profundamente a mi familia, por su compañía, comprensión y fortaleza a lo largo de este camino académico.

A mi madre, por ser guía, ejemplo y fuente de inspiración inquebrantable; su confianza en mis capacidades ha sido motor esencial en este proceso.

Extiendo mi gratitud a la **Universidad Pontificia Católica del Ecuador**, por brindarme las herramientas científicas y humanas necesarias para desarrollarme como investigador.

Asimismo, reconozco el respaldo continuo de la **Escuela Superior Politécnica de Chimborazo**, institución que ha sido clave en mi crecimiento profesional, al impulsarme en mi labor docente y abrirme espacios valiosos para el desarrollo de la investigación.

Agradezco especialmente al **Ministerio del Ambiente del Ecuador**, por autorizar la recolección de muestras de suelo en el **Parque Nacional Llanganates**, lo cual fue fundamental para la caracterización genética realizada en el marco de mi tesis.

A todos quienes han sido parte de este trayecto, mi más sincero agradecimiento.

## Índice general

<b>Datos Generales</b> .....	2
<b>Título el proyecto</b> .....	2
<b>Autor</b> .....	2
<b>Director</b> .....	2
<b>Datos de la organización o institución</b> .....	2
<b>Declaración de Derechos de Autor</b> .....	3
<b>1. Aspectos preliminares e introductorios</b> .....	4
<b>1.a) Dedicatoria</b> .....	4
<b>1.b) Agradecimientos</b> .....	4
<b>1.c) Índice de Figuras</b> .....	6
<b>1.d) Índice de tablas</b> .....	7
<b>2. Cuerpo del trabajo</b> .....	8
<b>2.a) Resumen</b> .....	8
<b>2.b) Abstract</b> .....	9
<b>2.c) Introducción</b> .....	10
<b>2.d) Revisión de Literatura</b> .....	15
2.d.1 Microbiota de la Rizosfera .....	15
2.d.2 Ecosistemas de Páramo y Vegetación Herbácea .....	16
2.d.3 Metagenómica y caracterización funcional. ....	16
2.d.4 Importancia ecológica y conservación .....	17
<b>2.e) Objetivos</b> .....	17
2.e.1 Objetivo general.....	17
2.e.2 Objetivos específicos .....	17
<b>2.f) Desarrollo del trabajo</b> .....	18
<b>2.f.1 Metodología</b> .....	18
2.f.1.a Diseño del muestreo y recolección de muestras .....	19
2.f.1.b Recolección y codificación de Muestras .....	22
2.f.1.c Muestreo No Rizosférico .....	23
2.f.1.d Extracción de ADN Illumina Shotgun .....	23
2.f.1.e Limpieza y Procesamiento de Datos.....	24
2.f.1.f Identificación Taxonómica con Kraken 2 .....	24
2.f.1.g Análisis Metagenómico Funcional con Phyloseq .....	25
2.f.1.h Análisis Estadísticos y Evaluación de Datos .....	26
<b>2.f.2 Resultados</b> .....	27

<b>2.f.2.a Identificación de la microbiota específica asociada a la rizosfera de vegetación herbácea.</b> .....	27
2.f.2.a.1 Familias más abundantes por muestra .....	28
2.f.2.a.2 Géneros más abundantes.....	30
<b>2.f.2.b Diversidad y abundancia relativa de la microbiota asociada a la rizosfera</b> .....	31
2.f.2.b.1 Comparación entre riqueza y diversidad Alfa entre tipos de muestra.....	32
2.f.2.b.2 Índices de diversidad funcional: Simpson y Berger-Parker.....	35
2.f.2.b.3 Comparación de diversidad alfa entre puntos geográficos .....	36
2.f.2.b.4 Diversidad beta por zonas de muestreo .....	38
<b>2.f.2.c Composición funcional del microbioma</b> .....	40
2.f.2.c.1 Rutas funcionales por ubicación y muestra.....	42
2.f.2.c.2 Rutas metabólicas mas influyentes en la PCA por Ubicación y Muestra.....	44
2.f.2.c.3 Patrones funcionales microbianos asociados a coberturas de herbazal de páramo: una aproximación basada en abundancia media.....	47
2.f.2.c.4 Correlación entre Funciones metabólicas con variables ambientales .....	48
<b>2.f.3 Discusión</b> .....	50
<b>2.g) Conclusiones</b> .....	51
<b>2.h) Propuesta</b> .....	53
<b>2.i) Recomendaciones</b> .....	54
<b>3. Bibliografía</b> .....	55

### **1.c) Índice de Figuras**

Figura 1. Proceso Metodológico.....	19
Figura 2 Distribución del Nicho Ecológico (Riqueza basada en nichos Ecológicos de 5 especies de Azorella) .....	20
Figura 3. Ubicación de los sitios de muestreo .....	21
Figura 4. Familias más relevantes por cada muestra .....	29
Figura 5. Géneros más abundantes .....	30
Figura 6 Diversidad alfa por muestra .....	32
Figura 7. Índice de Shannon por tipo de muestra,.....	33

Figura 8. Riqueza observada por tipos de muestra .....	34
Figura 9 Diferencias de Riqueza por tipo de muestra .....	34
Figura 10. Índice de Simpson.....	36
Figura 11 Diversidad Alfa por punto de muestreo.....	37
Figura 12 PCA (Hellinger) Géneros por Tipo de Muestra .....	38
Figura 13. Composición funcional del microbioma en distintas muestras sin regiones sin clasificar, agrupadas por ubicación (Location), basada en rutas metabólicas predichas (por HUMAnN3). .....	40
Figura 14. Composición funcional del microbioma en distintas muestras sin regiones sin clasificar, agrupadas por ubicación (Location), basada en rutas metabólicas predichas (por HUMAnN3, excluyendo la muestra 2410211-006). .....	41
Figura 16 Abundancia de Funciones metabólicas por Ubicación y por tipo de muestra. ....	43
Figura 17. PCA Contribución porcentual de Funciones metabólicas.....	44
Figura 18. PCA, Análisis de Componentes Principales por Ubicación .....	46
Figura 19 PCA Rutas Metabólicas por tipo de muestra.....	46
Figura 20. Mapa de Calor de abundancias medias por zona de estudio.....	48
Figura 21 Correlación de Funciones Metabólicas con variables ambientales. .	49

#### **1.d) Índice de tablas**

Tabla 1. Correspondencia de códigos de muestreo .....	23
Tabla 2. Análisis de varianza permutacional (PERMANOVA).....	38

## 2. Cuerpo del trabajo

### 2.a) Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar funcionalmente la microbiota asociada a la rizosfera de vegetación herbácea del páramo, en el Parque Nacional Llanganates mediante análisis metagenómico tipo *shotgun*. Se recolectaron muestras de suelo rizosférico, no rizosférico y endofítico en tres puntos estratégicos definidos a partir de un modelado de nicho ecológico. Posteriormente, se realizó la secuenciación metagenómica y el análisis bioinformático a través de la plataforma HUMAnN3 y herramientas estadísticas en R. Los resultados revelan una alta diversidad funcional, con predominancia de rutas biosintéticas (como biosíntesis de aminoácidos, lípidos y carbohidratos) y rutas catabólicas relacionadas con la degradación de compuestos orgánicos. Además, se identificaron rutas asociadas a mecanismos de resistencia, metabolismo del nitrógeno y adaptación al estrés ambiental. Se observó una correlación significativa entre las funciones microbianas y variables ambientales como la temperatura, radiación y pH del suelo. Estos hallazgos destacan el rol ecológico clave de la microbiota rizosférica en la dinámica de los suelos altoandinos y su potencial aplicación en estrategias de restauración y monitoreo ambiental.

**Palabras clave:** Microbiota rizosférica, análisis metagenómico, diversidad funcional microbiana; ecosistemas altoandinos.

## **2.b) Abstract**

This study aimed to functionally characterize the microbiota associated with the rhizosphere of herbaceous páramo vegetation in the Llanganates National Park using *shotgun* metagenomic analysis. Soil samples—rhizospheric, non-rhizospheric, and endophytic—were collected from three strategic sites selected through ecological niche modeling. Sequencing and bioinformatic analysis were performed using the HUMAnN3 pipeline and statistical tools in R. Results revealed high functional diversity, with a predominance of biosynthetic pathways (including amino acid, lipid, and carbohydrate biosynthesis) and catabolic routes related to organic matter degradation. Additional pathways related to antibiotic resistance, nitrogen metabolism, and environmental stress adaptation were also identified. Significant correlations were found between microbial functions and environmental variables such as temperature, radiation, and soil pH. These findings underscore the ecological importance of rhizospheric microbiota in high-Andean soil dynamics and suggest their potential role in ecological restoration and environmental monitoring strategies.

**Keywords:** Rhizospheric microbiota, metagenomic analysis, microbial functional diversity, high Andean ecosystems.

## **2.c) Introducción**

La vegetación herbácea en ecosistemas de alta montaña está estrechamente vinculada con comunidades microbianas que influyen en su adaptación y productividad. Este trabajo propone documentar el rol funcional de dichas comunidades en un entorno poco explorado como es el Parque Nacional Llanganates, comprender estas asociaciones desde una perspectiva funcional permitirá fundamentar acciones orientadas a la conservación del suelo y la biodiversidad microbiana, así como generar conocimiento aplicable al diseño de bioinsumos ajustados a las condiciones del medio andino. La caracterización funcional del microbiota en vegetación herbácea altoandina localizada en el Parque Nacional Llanganates resulta fundamental para comprender los mecanismos que sustentan la adaptación de las plantas a ambientes extremos como los páramos andinos. Al analizar la diversidad y función de la microbiota asociada a suelos rizosféricos y suelos no rizosféricos, se espera a futuro identificar nuevas especies microbianas y genes involucrados en procesos como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo y la producción de compuestos bioactivos y potenciales patógenos. Estos hallazgos no solo ampliarán nuestro conocimiento sobre la biodiversidad microbiana en ecosistemas de alta montaña, sino que también permitirán desarrollar estrategias de conservación y restauración para estos ambientes frágiles. Además, los resultados de esta investigación podrían tener aplicaciones prácticas en el campo de la agricultura sostenible, al proporcionar información valiosa para el desarrollo de biofertilizantes y bioestimulantes basados en microorganismos nativos. Por último, esta investigación contribuirá a una mejor comprensión de las interacciones planta-microbio y de su importancia para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres.

La relación entre plantas y la microbiota es un fenómeno antiguo y fundamental para la vida en la Tierra, esta asociación ha evolucionado a lo largo de millones de años, dando lugar a una gran diversidad de interacciones beneficiosas para estos organismos. Un estudio sobre endófitos bacterianos y sus interacciones con el hospedador ha revelado una notable diversidad de especies con funciones

beneficiosas para las plantas. Estas bacterias pueden promover el crecimiento y el rendimiento vegetal, suprimir patógenos, contribuir a la eliminación de contaminantes, solubilizar fosfatos o suministrar nitrógeno asimilable. Además, se ha observado que algunas especies endófitas pueden transmitirse a través de las semillas, lo que sugiere un mecanismo de herencia vertical en sus asociaciones simbióticas (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Se ha documentado de igual manera la importancia de los hongos ectomicorrízicos, los cuales movilizan otros nutrientes esenciales para las plantas directamente de los minerales a través de la excreción de ácidos orgánicos, esto permite a las plantas ectomicorrízicas utilizar nutrientes esenciales de fuentes minerales insolubles (Kuyper et al., 2001).

La biogeografía microbiana ha sido un tema de debate dentro de la ecología microbiana, especialmente relacionado a los factores que determinan la distribución de los microorganismos. Baas Becking (1934) propuso la hipótesis “Everything is everywhere, but the environment selects”, esto sugiere que los microorganismos tienen distribución global y que su presencia en un ecosistema depende de condiciones ambientales.

La mitigación y adaptación de los organismos al cambio climático son fundamentales por lo que se sabe que el estrés provocado por los efectos del clima en los cultivos tiene un impacto importante en la seguridad alimentaria (FAO et al., 2023). El microbioma de las raíces en las plantas, conocido como rizobioma, puede alojar microbios beneficiosos que pueden ayudar a aliviar dicho estrés, sin embargo, los factores que influyen en su reclutamiento aún no están completamente claros (Bandopadhyay et al., 2024).

Las bacterias desempeñan un papel fundamental en el apoyo o el aumento de la salud y crecimiento de las plantas, por lo tanto, se pueden aplicar en la producción agrícola o para la fitorremediación de contaminantes, la mayoría de las bacterias asociadas a las plantas derivan del entorno del suelo, por lo que, pueden migrar a la rizosfera y posteriormente al rizoplasma de sus huéspedes antes de poder mostrar efectos beneficiosos. Los procesos de colonización son fundamentales para comprender y predecir cómo interactúan las bacterias con las plantas, así como para evaluar la probabilidad de que estas se establezcan

de manera eficaz en el entorno vegetal tras su aplicación como biofertilizantes o agentes de control biológico (Compant et al., 2010).

Un estudio de 2006 sobre la diversidad y biogeografía de las comunidades bacterianas de suelos en América del Sur y Norte, utilizando un método de huella de ADN ribosómico, concluyó que la diversidad bacteriana no estaba relacionada con variables como la temperatura, la latitud o la distancia geográfica, que generalmente predicen la diversidad de organismos vegetales y animales, sino que la composición de la comunidad bacteriana dependía principalmente del tipo de ecosistema y, en particular, del pH del suelo, sugiriendo que la biogeografía microbiana está controlada principalmente por variables edáficas y difiere de la biogeografía de los organismos "macro" (Fierer & Jackson, 2006).

La secuenciación ambiental del ADN ha revelado la amplia diversidad de los microorganismos y anclado la relación entre las comunidades microbianas asociadas al hospedador y el fenotipo del hospedador, la secuenciación metagenómica Illumina shotgun es un enfoque de secuenciación ambiental relativamente nuevo que puede brindar información de la biodiversidad y la función de la comunidad (Sharpton, 2014).

El *complejo Llanganati* ubicado en el Parque Nacional Llanganates es uno de los principales humedales e incluido en el convenio RAMSAR (Bodero, 1997), una de las zonas que presenta un estado de conservación relativamente alto es Yurac Patu, en comparación con el sector de Piscacocha, donde convergen múltiples amenazas que comprometen seriamente la integridad ecológica del ecosistema de humedales altoandinos. Entre las principales presiones antrópicas identificadas se encuentra el drenaje de lagunas para la generación hidroeléctrica, especialmente en el embalse de Pisayambo, lo cual ha alterado los regímenes hidrológicos naturales, afectando la conectividad ecológica de los cuerpos de agua del sector occidental del complejo lacustre (Buytaert, Celleri, et al., 2006; Crespo et al., 2011).

Una amenaza creciente es la contaminación por actividades mineras, que introduce metales pesados y sedimentos en los cuerpos de agua, deteriorando la calidad del hábitat para especies acuáticas y aves migratorias. A esto se suma

el impacto de obras de transvase, que redirigen caudales con fines energéticos, reduciendo el volumen hídrico disponible para el ecosistema.

Otro factor crítico es el sobrepastoreo, resultado de la introducción de ganado vacuno y ovino, el cual ha contribuido significativamente a la pérdida de pastizales nativos y a la compactación del suelo, lo que limita su capacidad de retención hídrica (R. Hofstede, 2001). Esta presión se ve agravada por la práctica del “champeado”, que consiste en la extracción de turba como combustible doméstico, provocando la pérdida irreversible de materia orgánica acumulada durante siglos y degradando severamente la estructura de los humedales.

Asimismo, la caza de aves silvestres, particularmente durante sus periodos reproductivos, ha reducido la abundancia de especies clave para el equilibrio ecológico del ecosistema. Esta pérdida de biodiversidad no solo obedece a presiones directas, sino también a factores estructurales más profundos como la pobreza extrema, la marginación histórica de las comunidades locales, y la erosión de saberes ancestrales sobre el uso sostenible y el manejo tradicional de los humedales (Rist et al., 2007).

La combinación de estas amenazas subraya la necesidad urgente de implementar enfoques integrales de conservación, que reconozcan la importancia ecológica, cultural y social de estos territorios andinos.

Es necesario identificar variables ambientales primordiales para la identificación de los impactos generados por tales presiones socio-ambientales y poder establecer procesos de evaluación y monitoreo de los ecosistemas presentes en la zona. Por otro lado es importantes señalar que los factores más importantes de los medios para explicar la variabilidad en la estructura y composición de la comunidad vegetal son la temperatura y la altitud, por esta razón, las bajas temperaturas, junto con la alta incidencia de neblina e irradiación solar, generan un clima extremo que representa un desafío para la supervivencia de los seres vivos presentes en el ecosistema (R. G. M. Hofstede et al., 2018; Vásconez & Hofstede, 2006a). El Páramo es un ecosistema de clima frío y es muy frágil a los cambios en el uso de la tierra, por lo que su potencial para el uso productivo es, en términos generales, muy limitado. Sin embargo, mucha gente de una gran

riqueza cultural, pero pobreza económica, está aprovechando los recursos de este paisaje (Vásconez & Hofstede, 2006b).

El Parque Nacional Llanganates ocupa la Cordillera de Llanganates, que está dominada por afloramientos metamórficos paleozoicos que consisten en gneis y cuarcita (R. G. M. Hofstede et al., 2014). Como tal, la geología del parque contrasta con la de las áreas circundantes. Entre los datos botánicos relevantes se cuenta el descubrimiento de dos especies nuevas para la ciencia, *Libertia sp.* y *Allophylus sp.* También está el hallazgo de especies no observadas hace mucho tiempo, como *Zapoteca aculeata*, que se creyó extinta hasta 1997, cuando pocos individuos fueron encontrados en el volcán Tungurahua, y *Espeletia pycnophylla subsp. llanganatensis* (frailejón), del cual se tenían apenas unas pocas muestras de herbario. Es interesante anotar, desde el punto de vista científico y de conservación, que en un área relativamente pequeña y sobre estratos de rocas metamórficas se encuentren géneros de especies disjuntas, es decir, especies provenientes de regiones opuestas: por un lado, estaría *Espeletia*, que proviene del norte del continente y por otro *Libertia*, una planta típica del sur (Vargas et al., 2000). A pesar de que varias expediciones botánicas han sido llevadas a cabo tanto por investigadores ecuatorianos (Andrade, 1976; Sandoval & Salazar, 1995) como por extranjeros (Kennerley & Bromley, 1971), hasta la fecha la información botánica de esta zona es escasa (Vargas et al., 2000).

La zona de estudio se ve inmersa en tres formaciones geológicas importantes: una es una formación de rocas metamórficas de la era Paleozoica, la segunda unidad está conformada por rocas sedimentarias calcáreas originadas durante el período Cretácico. Dentro de esta unidad, destaca desde el punto de vista geológico una formación considerada una anomalía en el contexto andino ecuatoriano: el Cerro Hermoso, una elevación compuesta por rocas sedimentarias de origen marino, en lugar de las típicas rocas volcánicas que predominan en los Andes, y la tercera es de rocas volcánicas de formación terciaria donde se ubica la Laguna de Pisayambo y la vía Salcedo-Tena. En el estudio de “Vegetación y Flora de los Llanganates” menciona que los suelos derivados de las rocas evidentemente han influido en la vegetación y en la composición florística de la zona, no obstante, son necesarios estudios más detallados de la geología del Parque Nacional, de los suelos derivados y de la

vegetación para revelar las relaciones y condiciones que determinan la distribución restringida de ciertas plantas en determinados hábitats (Vargas et al., 2000). Por último, uno de los problemas ambientales es la pérdida de la biodiversidad como consecuencia de actividades humanas ya sea directa o indirecta, por lo que es fundamental realizar un análisis y monitoreo de especies endémicas (Moreno, 2001).

## **2.d) Revisión de Literatura**

El Parque Nacional Llanganates constituye uno de los espacios de mayor riqueza biológica en la región andina. Su diversidad vegetal ha sido ampliamente documentada, pero la estructura y funcionalidad de su microbiota asociada permanece escasamente caracterizada. La aplicación de metodologías metagenómicas representa una oportunidad para llenar este vacío, particularmente en relación con especies herbáceas que cumplen funciones clave en el ciclo de nutrientes. Mediante análisis metagenómico, una herramienta moderna que permite el estudio masivo de comunidades microbianas a nivel genético, es posible identificar y caracterizar las funciones específicas de la microbiota en la rizosfera de la vegetación herbácea alto andina, así como las rutas metabólicas involucradas en la promoción del crecimiento vegetal, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo, sanidad y la protección contra estrés abiótico.

Este estudio no solo aportará al conocimiento fundamental de las interacciones planta-microorganismo en un contexto ecológico extremo, sino que también proporcionará información valiosa para estrategias de conservación y restauración en el Parque Nacional Llanganates, contribuyendo a la preservación de la biodiversidad microbiana y vegetal en los Andes ecuatorianos.

### **2.d.1 Microbiota de la Rizosfera**

La región cercana a la raíz constituye un microambiente especializado que ayuda a la acumulación de microorganismos con roles clave en la salud vegetal, en los páramos altoandinos, la composición de la microbiota está armonizada por condiciones extremas que exigen adaptaciones funcionales particulares,

además la selección natural de taxones beneficiosos, promovida por las secreciones radiculares, permite el establecimiento de relaciones simbióticas especializadas que afectan la nutrición y resiliencia vegetal (Philippot et al., 2013a).

La planta no actúa de forma aislada sino como un *holobionte*, donde la salud y funcionalidad de la planta depende en gran medida de su microbioma asociado (Vandenkoornhuyse et al., 2015), dentro de este contexto, la microbiota de la rizosfera participan en funciones ecológicas clave como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas y la protección contra algunos patógenos (Berendsen et al., 2012).

#### 2.d.2 Ecosistemas de Páramo y Vegetación Herbácea

Los páramos son ecosistemas andinos singulares, ubicados entre los 3.000 y 4.800 m s.n.m., caracterizados por bajas temperaturas, alta radiación UV y suelos ácidos con baja disponibilidad de nutrientes (Buytaert, Céleri, et al., 2006). Los páramos albergan numerosas especies pertenecientes a familias como Poaceae, Asteraceae (incluyendo géneros como *Espeletia*) y Ericaceae, adaptadas a altitudes extremas con bajas temperaturas y alta radiación. Sin embargo, su composición florística y funcionalidad aún están escasamente estudiadas en zonas altoandinas como el Parque Nacional Llanganates, el cual es reconocido por su alta diversidad biológica y elevado nivel de endemismo. Romoleroux et al. (2023) reportan que entre las familias más diversas de los páramos ecuatorianos aparecen Asteraceae, Poaceae y Ericaceae, y señalan también los vacíos de estudio en regiones remotas o poco accesibles. (Romoleroux et al., 2023).

#### 2.d.3 Metagenómica y caracterización funcional.

El análisis metagenómico, basado en secuenciación masiva del ADN ambiental, permite una caracterización absoluta de comunidades microbianas sin necesidad de cultivarlas (Quince et al., 2017). La implementación de herramientas de metagenómica funcional en la rizosfera de plantas altoandinas permite inferir rutas metabólicas involucradas en procesos edáficos clave, como

la transformación de nitrógeno, fósforo y carbono. En este contexto, el uso de plataformas analíticas como HUMAnN3 y bases de datos como **MetaCyc** refuerza la capacidad exploratoria para comprender las funciones microbianas que sustentan la dinámica del suelo en ecosistemas de alta montaña (Fierer, 2017).

#### 2.d.4 Importancia ecológica y conservación

Comprender la funcionalidad de la microbiota de la rizosfera en plantas herbáceas de páramo es esencial para valorar su papel en la sostenibilidad del ecosistema, especialmente en lo relacionado con el ciclo de nutrientes, la resistencia a perturbaciones climáticas y la regulación hídrica (Van Der Heijden et al., 2008). Además, este conocimiento puede servir como base científica para diseñar estrategias de conservación integradas, enfocadas no solo en la flora y fauna macro, sino también en la diversidad microbiana (Bardgett & Van Der Putten, 2014).

### 2.e) Objetivos

#### 2.e.1 Objetivo general

Caracterizar la composición y función de la microbiota asociada a la rizosfera de *vegetación herbácea* en el Parque Nacional Llanganates, con el fin de comprender su rol en la adaptación de esta especie a las condiciones ambientales del ecosistema y su contribución a los procesos ecosistémicos.

#### 2.e.2 Objetivos específicos

- Identificar la microbiota específica asociada a la rizosfera de vegetación herbácea mediante análisis metagenómico en relación a las comunidades presentes en el suelo rizosférico y no rizosférico.
- Determinar la diversidad y abundancia relativa de la microbiota asociada a la rizosfera de vegetación herbácea con 2 zonas de páramo de los Llanganates.
- Caracterizar el papel que juegan las comunidades microbianas a nivel de hábitat y en qué medida las comunidades microbianas determinan la funcionalidad del hábitat de vegetación herbácea.

## **2.f) Desarrollo del trabajo**

### **2.f.1 Metodología**

La secuencia metodológica general implementada en esta investigación se resume en la Figura 1. Para el estudio, se recolectaron muestras de suelo correspondientes a tres compartimentos: rizosférico, no rizosférico y endofítico, en sitios del Parque Nacional Llanganates seleccionados con base en análisis de modelamiento de nicho ecológico.

Las muestras fueron preservadas bajo condiciones de refrigeración y posteriormente remitidas a un laboratorio especializado para el análisis metagenómico, el cual se llevó a cabo utilizando tecnología de secuenciación masiva tipo *shotgun*, específicamente la plataforma Illumina NovaSeq. Esta técnica permitió obtener secuencias representativas del ADN total presente en el suelo, abarcando genes tanto taxonómicos como funcionales, sin necesidad de cultivo previo.

Los archivos generados (.fastq) fueron procesados mediante un flujo de trabajo bioinformático que incluye control de calidad con FastQC (v0.11.9), remoción de secuencias de baja calidad con Trimmomatic (v0.39), y análisis funcional mediante el pipeline HUMAnN3. Este último permitirá identificar los perfiles de abundancia génica y reconstruir rutas metabólicas usando bases de datos como MetaCyc y UniRef90.

Para el perfilado taxonómico, se empleó MetaPhlAn3, herramienta que asigna lecturas a niveles específicos de clasificación a partir de marcadores filogenéticos. Esto permitió estimar la abundancia relativa de los principales taxones microbianos presentes en las diferentes condiciones de suelo.

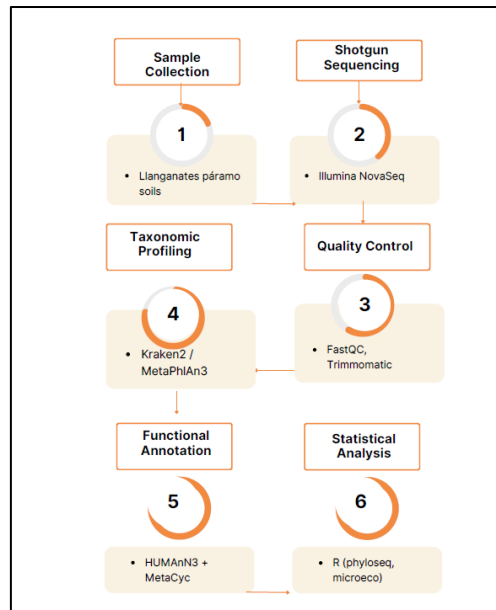


Figura 1. Proceso Metodológico

Los resultados fueron organizados en matrices funcionales y taxonómicas, que posteriormente se analizaron con herramientas estadísticas en R (e.g., phyloseq, microeco) para evaluar patrones de diversidad y funcionalidad microbiana entre las muestras.

#### 2.f.1.a Diseño del muestreo y recolección de muestras

La selección de los puntos de muestreo (P1, P2 y P3) se basó en los resultados del modelado de nicho ecológico desarrollado para cinco especies del género *Azorella* en los Andes tropicales. Según lo reportado por Rosero-Eraza et al. (2024), este análisis permitió identificar áreas con alta riqueza potencial del género, lo que sirvió como criterio clave para priorizar zonas de muestreo. Aunque el estudio se centra en herbazales de páramo, la coincidencia entre estas áreas de alta riqueza y la presencia de cobertura herbácea típica del ecosistema andino alto justifica plenamente su elección (Figura 2). Esta estrategia busca vincular la diversidad funcional de la microbiota del suelo con zonas ecológicamente relevantes para la conservación y el manejo de especies clave como *Azorella*.

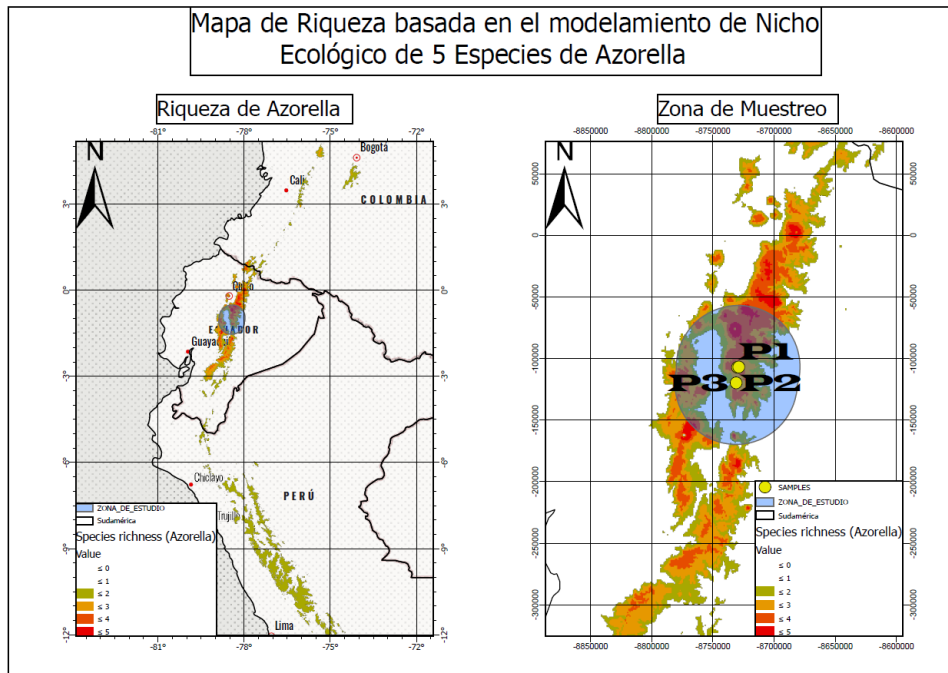


Figura 2 Distribución del Nicho Ecológico (Riqueza basada en nichos Ecológicos de 5 especies de Azorella)  
Fuente: (Rosero et al., 2023)

En la Figura 2 se observan los puntos de muestreo P1, P2 y P3, que en la base de datos corresponden a Herbazal Altoandino Norte (P1 y P2) y Herbazal Altoandino Sur (P3). Estas dos unidades presentan diferencias ecológicas relevantes: el Herbazal Altoandino Norte se caracteriza por el predominio de herbazal de páramo, mientras que el Herbazal Altoandino Sur está dominado por herbazal inundable de páramo.

Entre ambas zonas existe un patrón de fragmentación dentro del Parque Nacional Llanganates, como se aprecia en las figuras, lo que podría influir en la composición de especies y la conectividad ecológica. De acuerdo con los modelos de distribución de especies (SDMs) aplicados, la zona norte —donde se ubican P1 y P2— muestra una mayor probabilidad de ocurrencia del género *Azorella*, conformando un *hotspot* de diversidad (valores  $\geq 4$  en la escala de riqueza específica por píxel).

Estos puntos fueron seleccionados mediante un enfoque de consenso entre varios algoritmos calibrados con variables climáticas, topográficas y de vegetación, alcanzando un desempeño predictivo elevado (AUC > 0.9) y alta

congruencia espacial, lo que asegura su ubicación estratégica en áreas ecológicamente relevantes y representativas para el estudio. Adicionalmente, al superponer el mapa de riqueza con la zona de estudio, se evidencia que la ubicación de las muestras corresponde a un núcleo de distribución continuo de *Azorella*, lo que permite inferir la existencia de condiciones ecológicas favorables no solo para la planta sino también para sus asociaciones microbianas en distintos compartimentos edáficos (rizosférico, no rizosférico y endofítico).

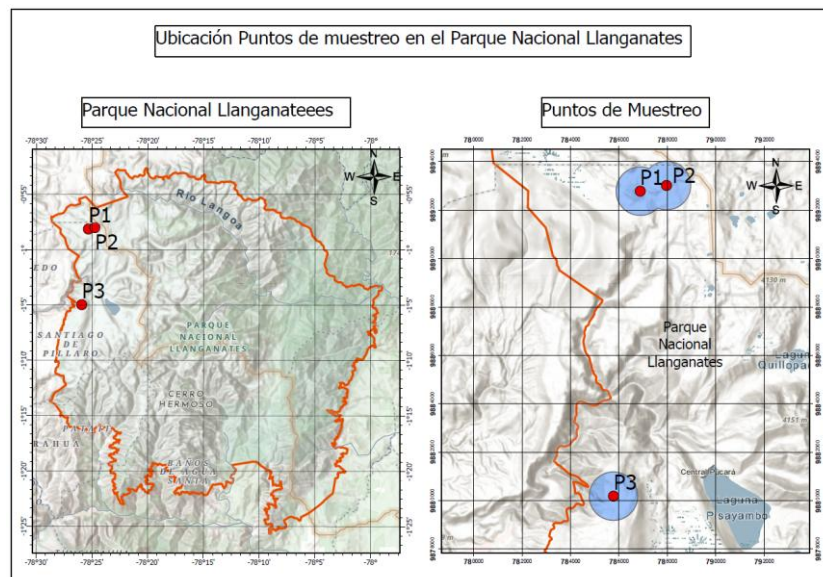


Figura 3. Ubicación de los sitios de muestreo

En este sentido, la estrategia de muestreo respondió a dos criterios clave:

1. **Representatividad ecológica**, al ubicarse en zonas óptimas según el modelado de nicho.
2. **Gradiente ambiental significativo**, necesario para evaluar cómo la funcionalidad microbiana varía ante cambios en la riqueza vegetal y el ambiente local.

Este enfoque basado en evidencia garantiza que los datos obtenidos sean ecológicamente relevantes y estén contextualizados dentro de un marco biogeográfico robusto.

## 2.f.1.b Recolección y codificación de Muestras

La recolección de muestras se realizó utilizando técnicas manuales con herramientas apropiadas, tales como palas, espátulas, tubos de muestreo y fundas, procurando evitar en todo momento la contaminación cruzada entre las unidades de muestreo. Se extrajo una muestra representativa del suelo a una profundidad estándar de 5 a 20 cm, asegurando la inclusión tanto de la rizosfera como del suelo circundante. Las muestras fueron almacenadas y transportadas en condiciones óptimas para minimizar alteraciones que pudieran afectar los resultados del análisis metagenómico. Aproximadamente 150 gramos de suelo compuesto fueron recolectados por muestra, todos procedentes de coberturas de herbazal de páramo, y fueron transportados en bolsas estériles a una temperatura de 4 °C utilizando un cooler.

Para el análisis genético y bioinformático, las muestras fueron identificadas con un código interno asignado por el laboratorio, registrado en la columna “**Sequence name**” del metadato. Paralelamente, para los análisis y representaciones gráficas en este estudio se utilizó un código simplificado consignado en la columna “**Sample name**”, que combina información sobre la ubicación, tipo de muestra y réplica.

- **Ubicaciones:**
  - LZP1 = Punto de muestreo 1
  - LZP2 = Punto de muestreo 2
  - LZP3 = Punto de muestreo 3
- **Tipo de muestra:**
  - R = Suelo rizosférico
  - N = Suelo no rizosférico
  - E = Comunidades endofíticas aisladas de tejidos vegetales
- **Número de réplica:** 1, 2 o 3

**Ejemplos de correspondencia entre códigos:**

Tabla 1. Correspondencia de códigos de muestreo

<b>Sequence name</b>	<b>Sample name</b>	<b>Descripción</b>
CI374-001R0001	LZP1R1	Ubicación 1, suelo rizosférico, réplica 1
CI374-001R0010	LZP1N1	Ubicación 1, suelo no rizosférico, réplica 1
2409112-001	LZP1E1	Ubicación 1, comunidad endofítica, réplica 1
2410211-004	LZP3N1	Ubicación 3, suelo no rizosférico, réplica 1

Esta doble codificación permitió mantener la trazabilidad de las muestras desde su procesamiento en laboratorio hasta su análisis estadístico y visualización de resultados.

#### 2.f.1.c Muestreo No Rizosférico

Simultáneamente, se realizó el muestreo del suelo no rizosférico en cada uno de los puntos establecidos, seleccionando áreas alejadas de la influencia directa de las raíces. Este tipo de muestra proporcionará información sobre la microbiota del suelo que no está directamente influenciada por la actividad de las raíces. Al igual que en el muestreo rizosférico, se tomaron tres repeticiones por punto, lo que permitirá comparar la diversidad y las funciones metabólicas entre suelos rizosféricos y no rizosféricos mediante un análisis metagenómico funcional.

#### 2.f.1.d Extracción de ADN Illumina Shotgun

El ADN total se extrajo de muestras de suelo y raíces empleando el FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), siguiendo rigurosamente las instrucciones del fabricante. Este kit permite la rápida extracción de ADN apto para PCR en menos de 30 minutos, mediante homogeneización con matriz de impacto y purificación basada en filtros de sílice, asegurando una alta eficiencia y mínima contaminación.

Para la extracción de ADN vegetal, se siguieron los reconocidos protocolos de Doyle & Doyle (1987) y Cullings (1992), utilizando una combinación de buffer CTAB enriquecido con  $\beta$ -mercaptoetanol y PVP para eliminar metabolitos secundarios. Se incluyeron pasos de homogeneización mecánica, extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, precipitación con etanol frío y limpieza detallada del pellet, culminando con resuspensión en buffer TE (o agua DEPC), tratamiento con RNasa y verificación de calidad por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa

#### 2.f.1.e Limpieza y procesamiento de datos

Una vez obtenidas las secuencias crudas, se realizó el preprocesamiento de los datos siguiendo un flujo de control de calidad y filtrado para garantizar la integridad de las lecturas utilizadas en el análisis metagenómico funcional.

En primer lugar, se evaluó la calidad de las secuencias mediante FastQC (Andrews, 2010), lo que permitió identificar posibles problemas como bases de baja calidad, presencia de adaptadores o contenido GC atípico. Posteriormente, se aplicó un filtrado y recorte de secuencias utilizando Fastp (Chen et al., 2018) o, en casos alternativos, Trimmomatic (Bolger et al., 2014), eliminando adaptadores y descartando lecturas con valores de calidad por debajo del umbral definido (Q30) o longitudes insuficientes para un alineamiento confiable.

Este procedimiento aseguró que los datos sometidos a análisis posteriores presentaran una alta calidad y representatividad, minimizando errores en la anotación funcional y permitiendo una interpretación más robusta de los resultados.

#### 2.f.1.f Identificación Taxonómica con Kraken 2

La identificación taxonómica se realizó utilizando Kraken2 (Wood et al., 2019), un clasificador taxonómico basado en la asignación rápida de secuencias mediante k-mers, empleando la base de datos PlusPF provista por los desarrolladores de Kraken2, la cual incluye referencias de bacterias, arqueas, virus, protozoos, hongos, plásmidos y contaminantes. Esta base de datos se

encuentra disponible en línea y se actualiza periódicamente para mantener la cobertura taxonómica.

A partir de los reportes generados por Kraken2, se ejecutó Bracken (Lu et al., 2017) con el fin de refinar las estimaciones de abundancia a nivel de especie, corrigiendo posibles sesgos derivados de la longitud de lectura y la estructura de la base de datos. Posteriormente, se utilizó la herramienta kraken-biom (v1.0.1) para consolidar los reportes de Bracken de todas las muestras y generar una tabla en formato BIOM (Biological Observation Matrix), optimizada para su uso en análisis posteriores de diversidad y composición microbiana.

Este flujo de trabajo permitió obtener una asignación taxonómica robusta y detallada, abarcando la detección e identificación de bacterias, arqueas, hongos, virus y otros componentes del microbioma presente en las muestras.

#### 2.f.1.g Análisis Metagenómico Funcional con Phyloseq

Se realizó un filtrado taxonómico inicial para eliminar posibles contaminantes de origen humano, descartando todas las unidades taxonómicas clasificadas dentro del género *Homo*, identificadas como secuencias no deseadas derivadas de material genético humano. Este paso permitió aumentar la precisión ecológica del análisis microbiano y reducir sesgos en la interpretación de los resultados.

Para el análisis funcional, se utilizó HUMAnN3 (Beghini et al., 2021), herramienta que permitió la identificación y cuantificación de rutas metabólicas y funciones microbianas a partir de las secuencias filtradas, integrando anotaciones contra bases de datos como UniRef y MetaCyc. Posteriormente, los resultados funcionales y taxonómicos se importaron a R para su análisis comparativo.

En este entorno, se empleó el paquete Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) para integrar los datos taxonómicos obtenidos con Kraken2/Bracken y las tablas funcionales generadas por HUMAnN3, posibilitando la evaluación conjunta de la diversidad microbiana (alfa y beta) y su perfil funcional. Asimismo, se utilizó el paquete **microeco** (Liu et al., 2021) para explorar asociaciones entre funciones metabólicas y composición taxonómica, generar gráficos de abundancia relativa, mapas de calor y análisis multivariados, con el objetivo de identificar patrones

diferenciales entre suelos rizosféricos y no rizosféricos del Parque Nacional Llanganates.

Este flujo de trabajo permitió una caracterización integral, combinando la estructura taxonómica y la funcionalidad metabólica de las comunidades microbianas, aportando una visión más completa de su papel ecológico en el ecosistema evaluado.

#### 2.f.1.h Análisis Estadísticos y Evaluación de Datos

El análisis estadístico de los datos metagenómicos funcionales se realizó en R, empleando los paquetes `file2meco` y `microeco` para importar, organizar y procesar las tablas de abundancia generadas por HUMAnN3 y asociarlas con la metadata de las muestras.

En primer lugar, se generaron matrices de abundancia absoluta a nivel de `Superclass2` de `MetaCyc`, filtrando previamente las funciones no clasificadas. Se construyeron gráficos de barras apiladas para las 20 funciones más abundantes, agrupadas por ubicación (`Location`) y tipo de muestra (`Rizosférico`, `No rizosférico`), lo que permitió una visualización comparativa de perfiles funcionales.

Se realizó una agrupación de réplicas biológicas por sitio y tipo de muestra para obtener abundancias compuestas, representadas en gráficos de barras apiladas y diagramas de las rutas funcionales más frecuentes por ubicación. Asimismo, se identificaron las principales rutas metabólicas por sitio calculando la abundancia media y seleccionando las diez más representativas para cada ubicación.

Con el fin de explorar la relación entre el funcionamiento microbiano y el entorno, se llevó a cabo una correlación cruzada entre las funciones metabólicas y variables ambientales, incluyendo: `MED_GENO` (Modelo de Elevación Digital derivado de datos `GENO`), `EVI2_GENO` (índice de vegetación mejorado de dos bandas), `NDWI_GENO` (índice de agua derivado de diferencia normalizada), `SW_DWN` (radiación solar de onda corta descendente), `UV_INDEX` (índice de

radiación ultravioleta), SW\_DIFF (componente difusa de la radiación de onda corta), ALSK\_SFC\_UVA (irradiancia superficial UVA medida por ALSK), PAR\_TOT (radiación fotosintéticamente activa total), LW\_DWN (radiación de onda larga descendente) y pH (potencial de hidrógeno del suelo).

Las correlaciones de Pearson se visualizaron mediante mapas de calor generados con el paquete *ggcorrplot*, lo que permitió detectar patrones funcionales asociados a gradientes ambientales y posibles relaciones entre variables microbianas y condiciones ecológicas específicas.

Para identificar patrones multivariados, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el paquete *FactoMineR* y la visualización con *factoextra*, evaluando la agrupación de muestras por ubicación y las funciones metabólicas con mayor contribución a la varianza total. Se identificaron las 20 funciones más influyentes y se representaron tanto en biplots como en gráficos de barras de contribución acumulada.

Finalmente, se calcularon estadísticas descriptivas (media, desviación estándar, valor mínimo y máximo) para cada función metabólica en todo el conjunto de datos, generando representaciones gráficas mediante diagramas de barras con error estándar, gráficos de cajas y mapas de calor de abundancias promedio por grupo de muestra. Estos resultados se exportaron en formato Excel para su documentación y análisis complementario.

## **2.f.2 Resultados.**

### **2.f.2.a Identificación de la microbiota específica asociada a la rizosfera de vegetación herbácea.**

Se identificó un total de 699 familias bacterianas únicas en las 27 muestras analizadas, tras aplicar procedimientos de filtrado y normalización de abundancias. Este valor refleja una elevada diversidad taxonómica a nivel de familia, coherente con la riqueza microbiana que suele encontrarse en ambientes edáficos complejos como el suelo rizosférico y en los tejidos endofíticos (Sun et al., 2022). Esta diversidad sugiere la presencia y coexistencia de múltiples grupos funcionales y ecológicos dentro de los nichos evaluados, lo que

potencialmente influye en procesos clave para el funcionamiento y estabilidad del ecosistema vegetal-hospedero.

En la construcción inicial del objeto phyloseq, se integraron tres elementos principales: una tabla de abundancias de amplicones (OTU table) con un total de 11.963 taxones distribuidos en 27 muestras, una tabla taxonómica con siete niveles jerárquicos (desde reino hasta especies), y una tabla de metadatos con 18 variables asociadas a cada muestra.

Se obtuvieron un total de 11.641 taxones distribuidos en 27 muestras correspondientes a dos tipos de suelo (rizosférico y no rizosférico) y a comunidades endofíticas aisladas de tejidos vegetales. Tras aplicar procesos de control de calidad —incluyendo filtrado por profundidad mínima y abundancia—, así como rarefacción para normalizar la cobertura de secuenciación, se conservó la mayor parte de la diversidad microbiana, lo que garantiza la comparabilidad entre muestras. Se observó un mayor número de OTUs únicos en las muestras de suelo rizosférico en comparación con el suelo no rizosférico y los tejidos endofíticos. Esta mayor riqueza sugiere que el suelo rizosférico alberga una microbiota más diversa, lo cual es coherente con el efecto estimulador que las raíces ejercen sobre las comunidades microbianas a través de la liberación de exudados y la creación de microambientes especializados.

#### 2.f.2.a.1 Familias más abundantes por muestra

La Figura 4 muestra la composición relativa de las 20 familias microbianas más abundantes en cada una de las muestras analizadas, organizadas por código de

muestra. Cada barra representa una muestra individual y está compuesta por segmentos que reflejan el porcentaje de abundancia relativa de cada familia.

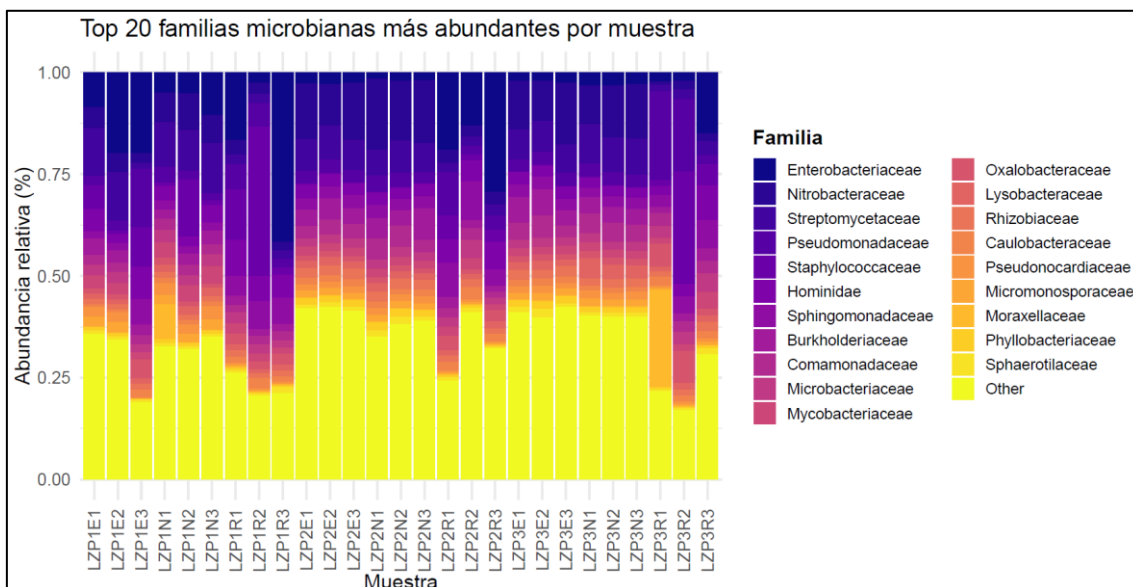


Figura 4. Familias más relevantes por cada muestra

Un elemento destacable es la categoría "Other", que agrupa a todas aquellas familias no incluidas en el top 20 y que, en la mayoría de las muestras, representa un porcentaje considerable de la comunidad microbiana. Esto sugiere que, aunque existen familias dominantes, una parte significativa de la diversidad está conformada por taxones de menor abundancia individual, pero colectivamente importantes en términos ecológicos.

Dentro del top 20 de familias bacterianas más abundantes, se observan grupos recurrentes como Sphaerotilaceae, Phyllobacteriaceae, Microbacteriaceae, Streptomycesaceae, Burkholderiaceae y Pseudomonadaceae, presentes en la mayoría de las muestras con niveles variables de abundancia. Estas familias han sido asociadas en la literatura con funciones clave para el ecosistema, incluyendo la degradación de compuestos orgánicos, la tolerancia al estrés abiótico y las interacciones beneficiosas con plantas (Compant et al., 2010b; Gaete et al., 2022; Mendes et al., 2013). La familia Staphylococcaceae también aparece con relativa frecuencia; su presencia podría estar relacionada con condiciones particulares del microambiente, dado que incluye especies oportunistas o comensales en contextos ambientales y clínicos (Otto, 2009).

En conjunto, la gráfica evidencia una comunidad microbiana estructurada en torno a un pequeño grupo de familias dominantes y una fracción diversa pero menos abundante de taxones raros. Este patrón es característico de ecosistemas complejos como los suelos de páramo, donde coexisten procesos de especialización funcional y de resiliencia comunitaria frente a condiciones ambientales variables.

#### 2.f.2.a.2 Géneros más abundantes

La Figura 5 muestra el Top 10 de géneros microbianos más abundantes identificados en el conjunto de muestras analizadas, expresados en términos de abundancia total.

Se observa que *Bradyrhizobium* es el género dominante, con una abundancia notablemente superior al resto, lo que sugiere su papel protagónico en las funciones microbianas del ecosistema estudiado, posiblemente vinculado a procesos de fijación biológica de nitrógeno (Itakura et al., 2013; Kaneko et al., 2002). Le siguen *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, géneros ampliamente reconocidos por su versatilidad metabólica, su capacidad para degradar diversos compuestos orgánicos, y la producción de metabolitos bioactivos con funciones antimicrobianas y de comunicación microbiana (Barka et al., 2016; Haas & Défago, 2005; Otto, 2009).

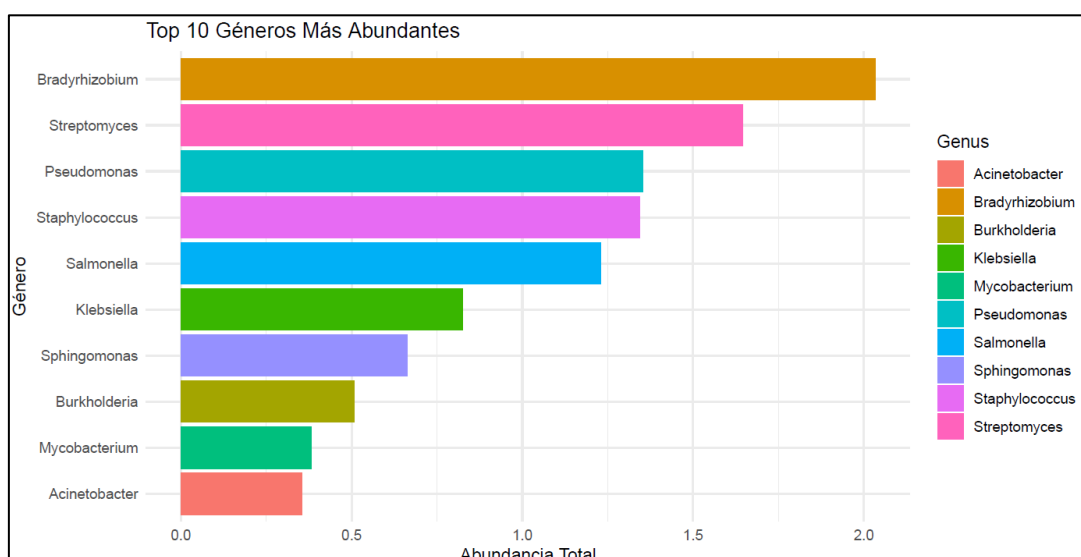


Figura 5. Géneros más abundantes

Otros géneros relevantes como *Salmonella*, *Klebsiella* y *Burkholderia* presentan abundancias intermedias, lo que podría indicar su participación en procesos específicos dentro de la comunidad microbiana, aunque en algunos casos podrían incluir especies potencialmente patógenas. Finalmente, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* y *Acinetobacter* aparecen con menores abundancias, pero su presencia es consistente, lo que sugiere un rol estable en la red ecológica microbiana.

En conjunto, la distribución observada refleja una comunidad microbiana diversa, caracterizada por el predominio de géneros asociados a funciones ecológicas esenciales como el ciclo del nitrógeno, la degradación de materia orgánica y la producción de metabolitos secundarios. Estos procesos son fundamentales para el funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas edáficos, y han sido ampliamente documentados en comunidades rizosféricas y endofíticas (Barka et al., 2016; Mendes et al., 2013; Philippot et al., 2013).

### **2.f.2.b Diversidad y abundancia relativa de la microbiota asociada a la rizosfera**

La rizosfera, como zona de interacción directa entre las raíces y el suelo, alberga una microbiota altamente especializada que influye en la nutrición vegetal, el reciclaje de nutrientes y la resistencia al estrés ambiental. El análisis de la diversidad alfa (riqueza y equitatividad de especies) y beta (diferencias en composición entre comunidades) permite comprender la estructura y el equilibrio del microbioma del suelo en distintos nichos ecológicos.

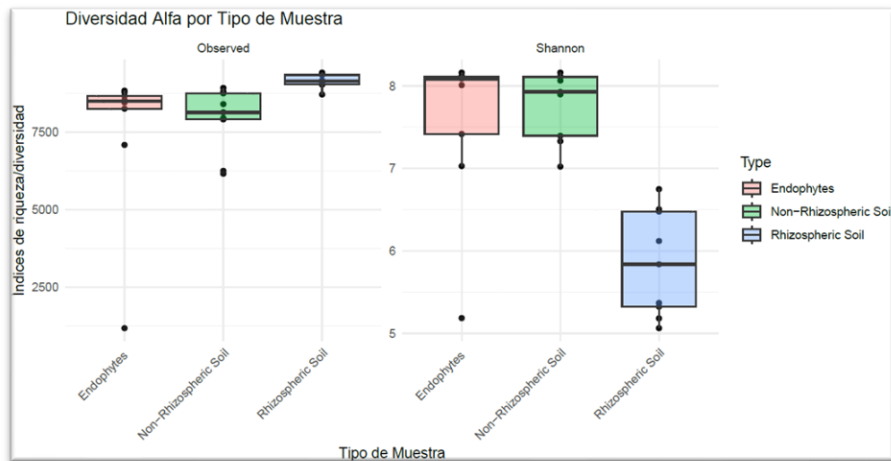


Figura 6 Diversidad alfa por muestra

Los resultados de diversidad alfa indican que las muestras endofíticas y las de suelo no rizosférico presentan las mayores medianas tanto en riqueza observada (cercanas a 8000 OTUs) como en el índice de Shannon (valores superiores a 8), lo que evidencia comunidades microbianas ricas en especies y con una distribución relativamente equitativa de abundancias.

En contraste, las muestras de suelo rizosférico muestran valores de Shannon considerablemente más bajos (mediana ~5,5), a pesar de tener una riqueza observada comparable a los otros tipos de muestra. Esto sugiere que, aunque se detecta un número similar de taxones, la comunidad está dominada por unos pocos grupos abundantes, posiblemente debido a la influencia de la raíz, que a través de la exudación de compuestos orgánicos genera un ambiente más selectivo.

En conjunto, el patrón observado refleja que la diversidad y equitatividad microbiana varían según el nicho ecológico, influenciadas por factores como la disponibilidad y el tipo de nutrientes, la oxigenación y la proximidad a la raíz.

#### 2.f.2.b.1 Comparación entre riqueza y diversidad Alfa entre tipos de muestra

Se calcularon estadísticas descriptivas para los índices de diversidad alfa (Shannon) y riqueza observada (número de taxones únicos) agrupados por tipo de muestra: endofíticas, suelo no rizosférico y suelo rizosférico (Tabla 2).

En la Figura 7 y la Tabla 2 se observa que las muestras endofíticas ( $7.46 \pm 0.98$ ) y de suelo no rizosférico ( $7.68 \pm 0.42$ ) presentan valores más altos en el índice de Shannon que las muestras rizosféricas ( $5.72 \pm 0.58$ ), lo que sugiere comunidades microbianas con mayor equidad en la distribución de abundancias relativas.

**Tabla 2.** Comparación entre riqueza y diversidad alfa.

Tipo de muestra	Diversidad de Shannon (Media $\pm$ DE)	Riqueza Observada (Media $\pm$ DE)
Endophytes	$7.46 \pm 0.98$	$7589 \pm 2461$
Non-Rhizospheric Soil	$7.68 \pm 0.42$	$7924 \pm 1041$
Rhizospheric Soil	$5.72 \pm 0.58$	$9147 \pm 221$

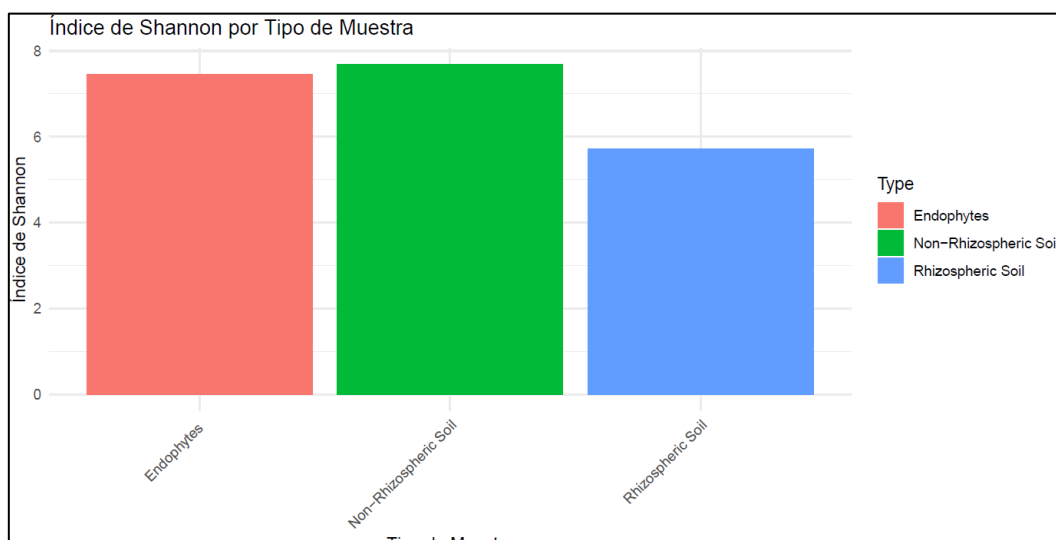


Figura 7. Índice de Shannon por tipo de muestra,

Por otro lado, la Figura 8 muestra que las muestras rizosféricas presentan la mayor riqueza observada, con un promedio superior a 9000 OTUs, seguidas por las muestras de suelo no rizosférico y las endofíticas. Este patrón sugiere que, si bien la rizosfera alberga un elevado número de taxones, la comunidad microbiana está fuertemente dominada por unos pocos grupos altamente abundantes, lo que se traduce en una menor equitatividad o uniformidad en la distribución de las abundancias relativas.

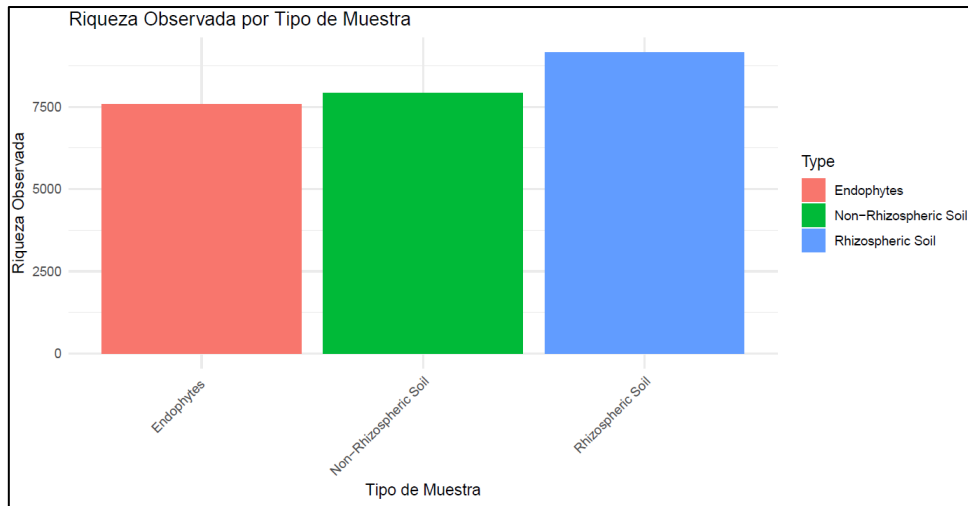


Figura 8. Riqueza observada por tipos de muestra

La Figura 9 ilustra la distribución de la riqueza observada para cada tipo de muestra. Se aprecia que el suelo rizosférico (letra *b*) presenta los valores más altos y con menor dispersión relativa, lo que indica una comunidad microbiana más diversa y homogénea. Por el contrario, los endófitos y el suelo no rizosférico (letra *a*) muestran niveles de riqueza similares y menores. Estos resultados sugieren que la rizosfera, por su contacto directo con las raíces y la disponibilidad de exudados y microhábitats, favorece el establecimiento de comunidades microbianas más diversas tanto en número de especies como en equitatividad de abundancias.

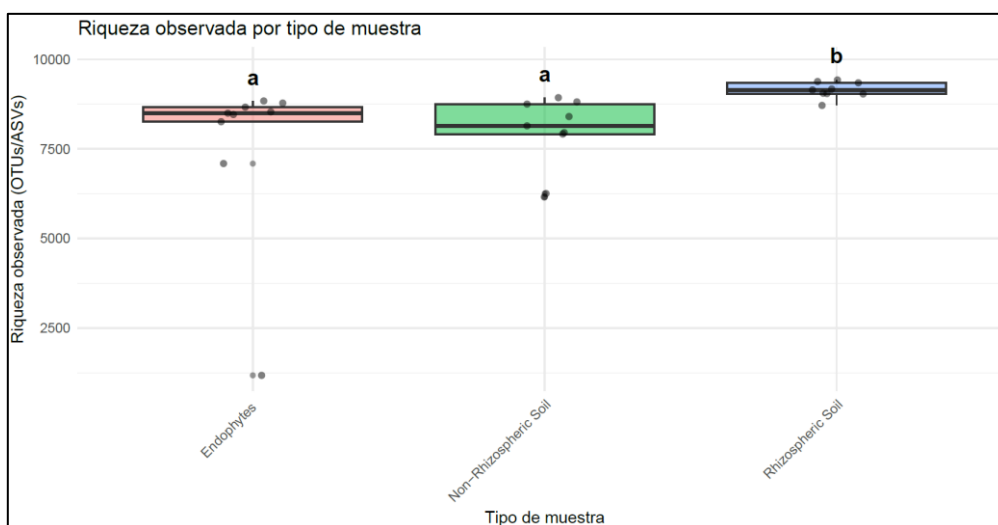


Figura 9 Diferencias de Riqueza por tipo de muestra

El análisis de diversidad alfa incluyó la **riqueza observada** (OTUs/ASVs) y el índice de **Shannon**, evaluando diferencias entre los tres tipos de muestra: endófitos, suelo no rizosférico y suelo rizosférico. En ambos casos, la prueba de Kruskal–Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

La prueba post-hoc de Dunn con corrección de Benjamini–Hochberg reveló que, tanto para la riqueza observada como para la diversidad de Shannon, el suelo rizosférico presentó valores significativamente más altos que los endófitos y el suelo no rizosférico ( $p$  ajustado  $< 0.01$ ), mientras que entre estos dos últimos no se observaron diferencias significativas.

#### 2.f.2.b.2 Índices de diversidad funcional: Simpson y Berger-Parker

Se calcularon los índices de diversidad funcional Simpson y Berger-Parker para las 27 muestras analizadas, a partir del conjunto de datos donde se excluye contaminantes como el género *Homo*. Estos índices permiten evaluar tanto la dominancia de taxones como la equidad en la distribución de abundancias dentro de cada comunidad microbiana.

- Índice de Simpson: Los valores del índice de Simpson oscilaron entre 0.8268 y 0.9992, con una media de 0.9704, indicando una alta diversidad en la mayoría de las muestras. La concentración de valores cercanos a 1 sugiere que, en general, la mayoría de las comunidades poseen una estructura con baja dominancia de un solo taxón y alta equitatividad entre los géneros presentes.

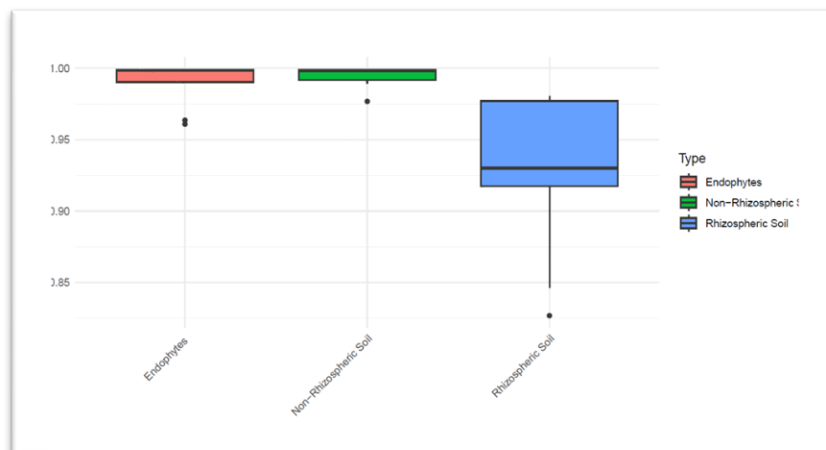


Figura 10. Índice de Simpson

- Índice de Berger-Parker: Este índice, calculado como el inverso del índice de Simpson, presentó valores entre 1.001 y 1.209, con una media de 1.033. Dado que este índice cuantifica la dominancia del taxón más abundante, valores cercanos a 1 reflejan comunidades con baja dominancia (es decir, sin géneros que monopolicen la comunidad). La dispersión baja del índice refuerza la idea de una estructura comunitaria balanceada en la mayoría de las muestras.

Estos resultados coinciden con los obtenidos a partir del índice de Shannon, y refuerzan la hipótesis de que las comunidades microbianas analizadas —en particular las asociadas al suelo— presentan una alta diversidad funcional y estructural, con baja dominancia y alta equitatividad.

#### 2.f.2.b.3 Comparación de diversidad alfa entre puntos geográficos

La Figura 11 ilustra la diversidad alfa en tres puntos de muestreo (LZP1, LZP2 y LZP3) utilizando dos métricas complementarias: la riqueza observada y el índice de Shannon. La riqueza observada (panel izquierdo) se refiere al número total de taxones detectados en cada punto, es decir, cuántos tipos distintos de microorganismos están presentes, sin considerar su abundancia relativa. En este caso, LZP1 muestra una gran dispersión de valores, lo que indica que la cantidad de taxones varía mucho entre réplicas; LZP2 exhibe valores más altos y homogéneos, reflejando una comunidad más estable en cuanto a número de

especies; mientras que LZP3 también mantiene una riqueza elevada y cercana a LZP2, aunque con una ligera variabilidad.

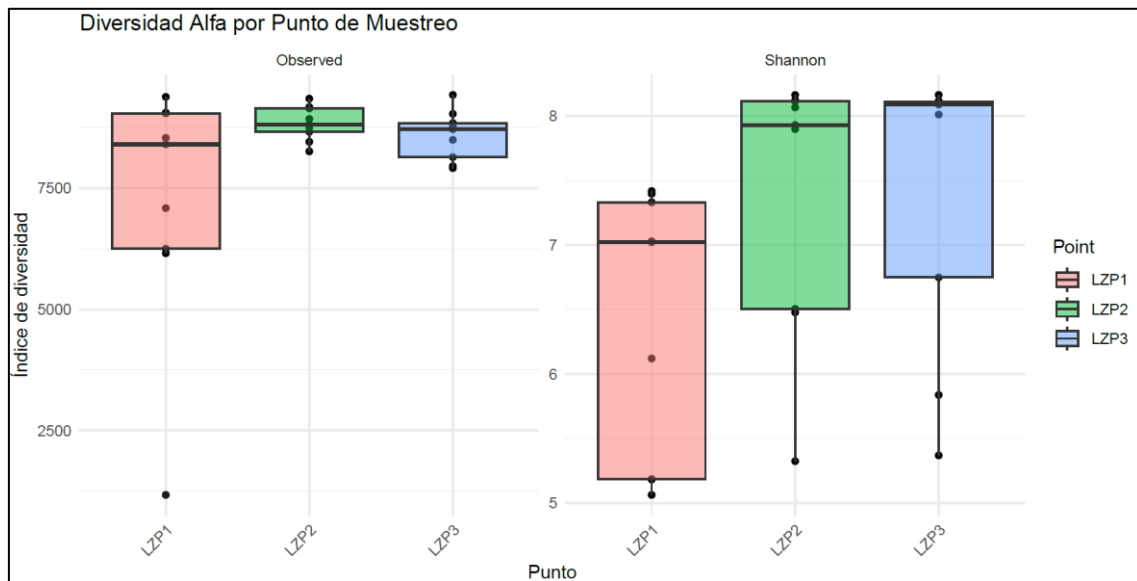


Figura 11 Diversidad Alfa por punto de muestreo

Por su parte, el índice de Shannon (panel derecho) no solo mide cuántos taxones hay, sino también qué tan equilibrada está su abundancia dentro de la comunidad. Es decir, combina riqueza (número de especies) y equitatividad (cómo se distribuyen sus abundancias). En este análisis, LZP2 y LZP3 presentan valores altos y consistentes, lo que sugiere comunidades microbianas diversas y con buena distribución de especies. En cambio, LZP1, aunque posee riqueza de taxones, muestra un índice de Shannon más bajo y con mayor dispersión, lo que indica que su comunidad es menos equitativa, posiblemente dominada por unas pocas especies más abundantes y con mayor variación entre réplicas.

Este patrón puede estar influenciado por diferencias microambientales entre puntos de muestreo, como contenido de nutrientes, estructura del suelo, humedad, pH o proximidad a raíces. En conjunto, la gráfica indica que LZP2 representa el ambiente más favorable para una comunidad microbiana diversa y equilibrada, mientras que LZP1 presenta condiciones más restrictivas o selectivas que podrían favorecer a un grupo reducido de microorganismos dominantes.

#### 2.f.2.b.4 Diversidad beta por zonas de muestreo

Para evaluar diferencias en la composición de las comunidades microbianas, se aplicó un análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) sobre distancias de Bray-Curtis (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de varianza permutacional (PERMANOVA)

Fuente	Df	Suma de cuadrados	R <sup>2</sup>	F	Pr(>F)
Type	2	1.3881	0.39435	7.8136	0.001
Residual	24	2.1319	0.60565		
Total	26	3.5200	1.00000		

Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre tipos de muestra ( $p = 0.001$ ), explicando un 39.4% de la variación total. Esto respalda la existencia de comunidades microbianas distintivas según el nicho ecológico: endofítico, suelo rizosférico y no rizosférico.

Sin embargo, al comparar únicamente entre puntos geográficos (LZP1, LZP2 y LZP3), no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.258$ ), lo que indica que las variaciones se deben más al tipo de muestra que a la ubicación.

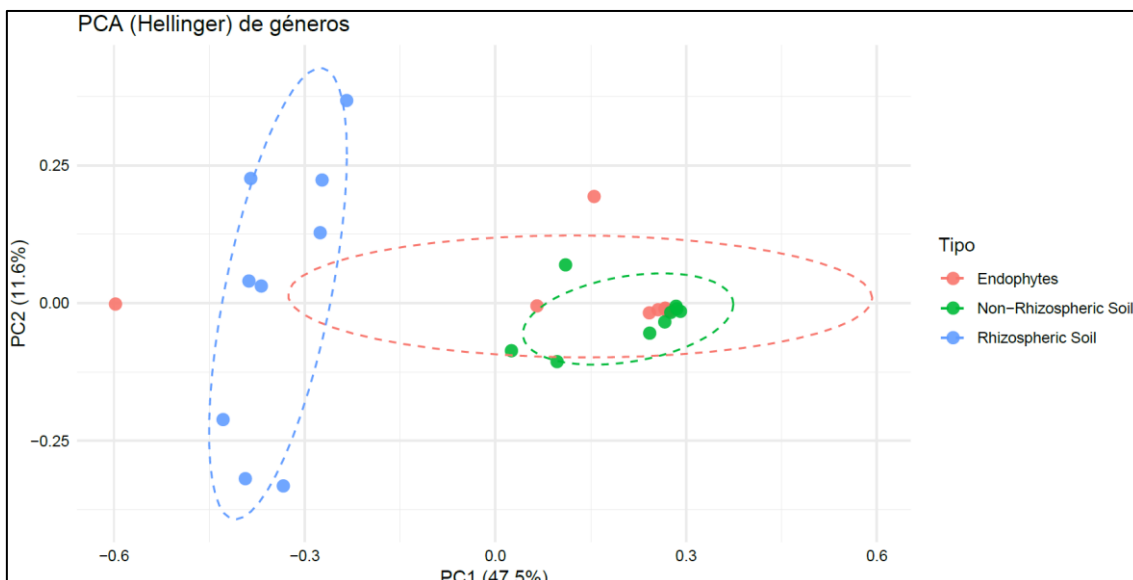


Figura 12 PCA (Hellinger) Géneros por Tipo de Muestra

El análisis PCA mostró una diferenciación marcada en la composición microbiana entre suelos rizosféricos y los otros dos tipos de muestra, explicando los dos primeros ejes el 59 % de la variabilidad total. El agrupamiento compacto de las muestras rizosféricas sugiere una comunidad microbiana más estable y especializada, posiblemente influenciada por los exudados radicales, mientras que endófitos y suelos no rizosféricos presentaron composiciones más heterogéneas y parcialmente solapadas.

Los suelos rizosféricos (azul) se agruparon de forma compacta en el extremo negativo del eje PC1, lo que indica que su comunidad microbiana es muy similar entre réplicas y distinta de los otros grupos. Esta separación, coherente con los resultados del análisis PERMANOVA aplicado a los tipos de muestra ( $p = 0.001$ ), sugiere una comunidad más estable y especializada, probablemente influenciada por los exudados de las raíces y las condiciones químicas y físicas que estas generan.

En cambio, los endófitos (rojo) y los suelos no rizosféricos (verde) se ubicaron cerca uno del otro sobre el eje PC1, pero con mayor dispersión. Esto significa que comparten algunos géneros microbianos dominantes, aunque presentan variaciones en sus abundancias relativas. La superposición parcial de sus elipses indica que no existe una separación tan marcada entre ellos como con el suelo rizosférico.

El tamaño de las elipses en la Figura 12 refleja la variabilidad interna: las más estrechas (rizosférico) representan mayor uniformidad en la comunidad, mientras que las más amplias (endófitos) evidencian mayor heterogeneidad, posiblemente por diferencias en el microhábitat o en las condiciones del tejido vegetal huésped.

En conjunto, los dos primeros ejes del PCA explicaron el 59 % de la variabilidad total, destacando que la rizosfera mantiene una comunidad microbiana más uniforme y distinta, mientras que los endófitos y suelos no rizosféricos son más variables y con composiciones parcialmente coincidentes.

### 2.f.2.c Composición funcional del microbioma

La Figura 13 presenta una gráfica de barras la cual representa la abundancia absoluta de las 20 funciones metabólicas más representativas (a nivel de la categoría Superclass2 de MetaCyc) en 27 muestras de suelo, agrupadas por ubicación (Location 1, Location 2 y Location 3). Cada barra corresponde a una muestra individual, y cada color en la barra representa una clase funcional distinta, lo que permite observar la diversidad y distribución funcional de la microbiota en cada sitio de muestreo.

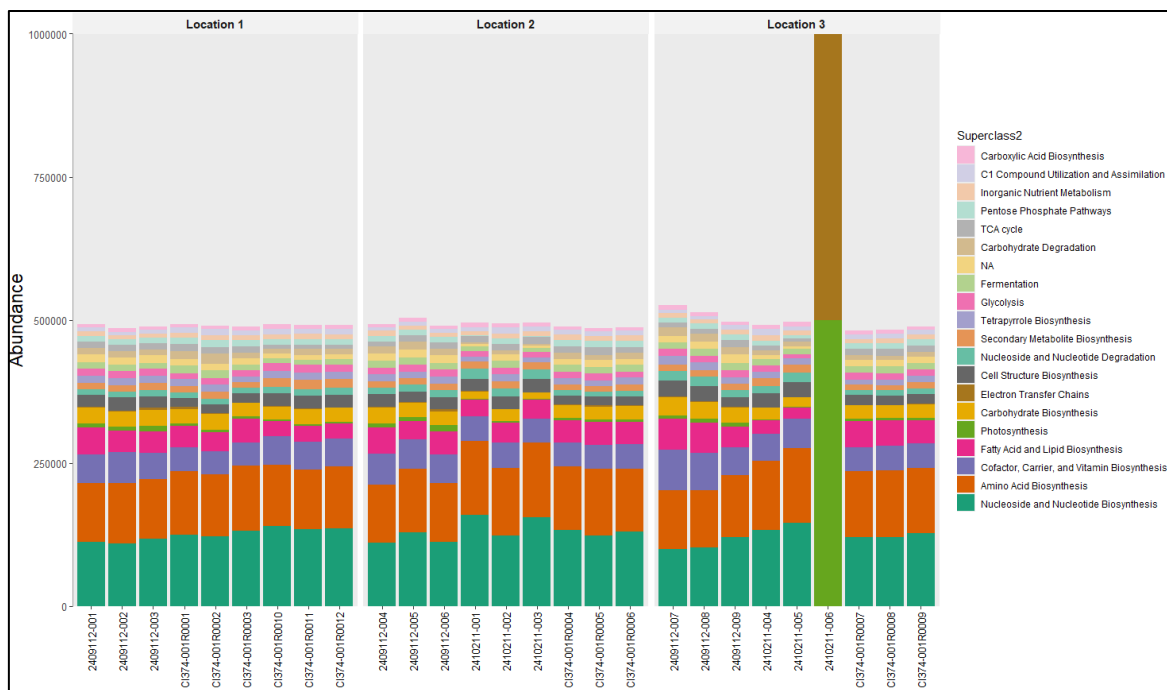


Figura 13. Composición funcional del microbioma en distintas muestras sin regiones sin clasificar, agrupadas por ubicación (Location), basada en rutas metabólicas predichas (por HUMAnN3).

En general, las muestras pertenecientes a Location 1 y Location 2 presentan perfiles funcionales relativamente homogéneos, caracterizados por una distribución equilibrada entre rutas biosintéticas y catabólicas. Se mantiene una presencia constante de funciones como la biosíntesis de aminoácidos, lípidos y carbohidratos, junto con rutas del ciclo TCA, degradación de compuestos orgánicos y cadenas de transferencia de electrones. Esta uniformidad sugiere

comunidades microbianas estables, posiblemente relacionadas con condiciones ambientales consistentes o un manejo uniforme del ecosistema en estas zonas.

En contraste, en **Location 3** se observa una anomalía funcional destacada en la muestra **2410211.006**, que exhibe una abundancia excepcionalmente alta en comparación con todas las demás. Esta muestra está fuertemente dominada por una única ruta metabólica (aparentemente relacionada con "NA" o una función no clasificada), lo que rompe con la tendencia general de diversidad funcional observada en el resto del conjunto. Tal disparidad podría deberse a una respuesta microbiana puntual frente a condiciones extremas, a una alteración ecológica localizada o a un posible error técnico como una sobreestimación en el análisis bioinformático. Dada la magnitud del desbalance, se recomienda revisar detalladamente esta muestra para discernir si representa un fenómeno biológico legítimo o un outlier técnico que podría sesgar las conclusiones del estudio.

En conjunto, el análisis funcional revela una microbiota del suelo activa y diversa, con funciones clave implicadas en la transformación de materia orgánica, reciclaje de nutrientes y procesos de biosíntesis esenciales. Esta información es relevante para comprender el rol ecológico de la microbiota en suelos de distintos orígenes y su potencial para responder a variaciones ambientales.

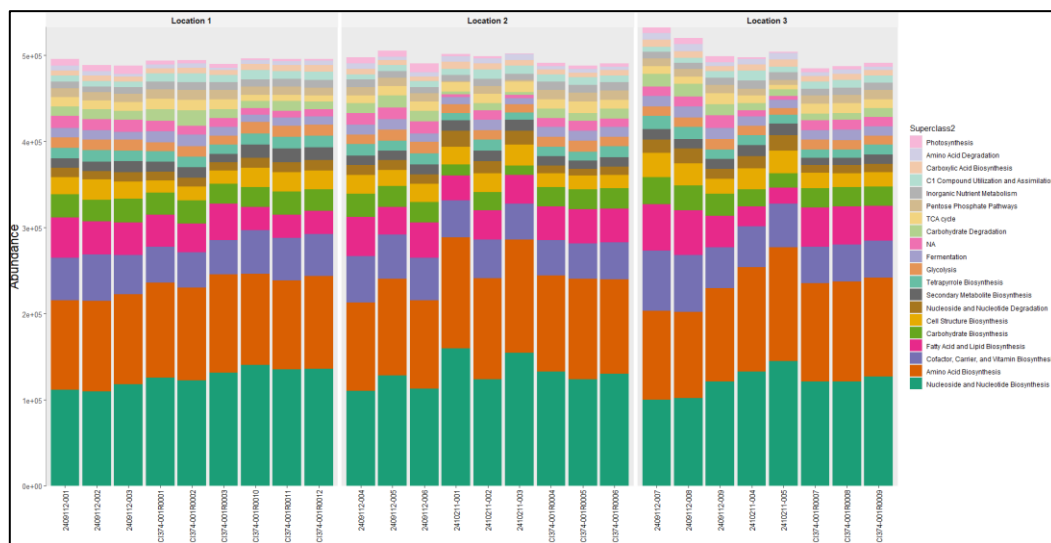


Figura 14. Composición funcional del microbioma en distintas muestras sin regiones sin clasificar, agrupadas por ubicación (Location), basada en rutas metabólicas predichas (por HUMAnN3, excluyendo la muestra 2410211-006).

La ausencia de valores extremos en la Figura 14 confirma la exclusión de la muestra previamente identificada como anómala (2410211-006), lo cual ha permitido una visualización más equilibrada y comparativa entre todas las muestras. Esta representación revela una distribución funcional relativamente homogénea entre los distintos sitios de muestreo (Locations 1, 2 y 3), con una composición metabólica coherente en la mayoría de las muestras.

Se mantiene una alta representación de rutas asociadas a la biosíntesis de nucleótidos, aminoácidos, lípidos y cofactores, así como de procesos catabólicos como la glucólisis, fermentación y degradación de carbohidratos. Esta consistencia funcional sugiere la presencia de comunidades microbianas resilientes, con una redundancia funcional que podría estar respaldada por condiciones ambientales similares entre los sitios evaluados.

En conjunto, la gráfica refleja una estructura funcional microbiana robusta, centrada en rutas metabólicas esenciales para el mantenimiento del ecosistema edáfico. Estos resultados respaldan el potencial de los suelos evaluados para proveer servicios ecosistémicos clave, como el reciclaje de nutrientes, la estabilización del carbono y la adaptación a cambios ambientales.

#### 2.f.2.c.1 Rutas funcionales por ubicación y muestra

La Figura 15 presenta la abundancia total de rutas funcionales microbianas considerando tanto la ubicación (Location 1, 2 y 3) como el tipo de muestra (endófitos, suelo rizosférico y no rizosférico). De manera general, las funciones más dominantes en todos los casos corresponden a la biosíntesis de nucleósidos y nucleótidos, seguidas de la biosíntesis de aminoácidos y de cofactores y vitaminas, lo que refleja la importancia de los procesos anabólicos esenciales para el mantenimiento y crecimiento de las comunidades microbianas.

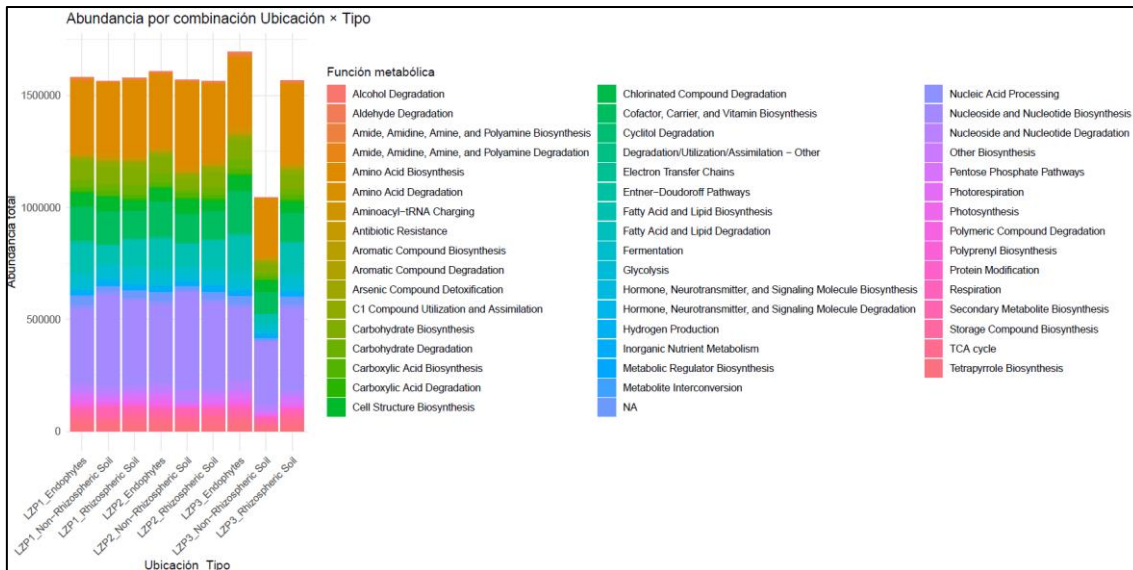


Figura 15 Abundancia de Funciones metabólicas por Ubicación y por tipo de muestra.

Al comparar entre ubicaciones, se observa que Location 2 concentra una ligera mayor abundancia en rutas biosintéticas clave, como la producción de aminoácidos y nucleótidos, lo cual sugiere una comunidad con mayor tasa de crecimiento o actividad metabólica más intensa. En contraste, Location 3 muestra un incremento relativo en rutas de fermentación, degradación de carbohidratos y biosíntesis secundaria, indicando una posible adaptación a condiciones más restrictivas o la presencia de una comunidad con mayor especialización funcional. Location 1 se mantiene en un punto intermedio, con perfiles equilibrados y sin predominancia marcada de rutas específicas, lo que podría reflejar condiciones ambientales más estables.

En cuanto al tipo de muestra, los endófitos presentan las mayores abundancias en rutas biosintéticas, incluyendo nucleótidos, aminoácidos, vitaminas y lípidos. Esto revela un ambiente enriquecido donde la microbiota despliega funciones adicionales ligadas a la simbiosis con la planta. El suelo rizosférico, por su parte, se caracteriza por un refuerzo en funciones de degradación de carbohidratos, fermentación y procesos asociados a la descomposición de materia orgánica, estimulados por los exudados radicales. Finalmente, el suelo no rizosférico mantiene valores más bajos y un perfil menos especializado, limitado a funciones esenciales que permiten la supervivencia, lo que refleja la ausencia de influencia directa de la planta.

En conjunto, los resultados evidencian un doble gradiente funcional: por un lado, las diferencias entre ubicaciones sugieren variaciones microambientales que modulan la actividad microbiana; y por otro, la proximidad a la planta (rizosfera y endófitos) impulsa una mayor complejidad y diversidad metabólica, mientras que el suelo no rizosférico se mantiene como una matriz más basal y menos dinámica.

### 2.f.2.c.2 Rutas metabólicas más influyentes en la PCA por Ubicación y Muestra

La Figura 17 muestra la contribución porcentual de las funciones metabólicas más influyentes en los dos primeros componentes principales (Dim 1 + Dim 2) del análisis de componentes principales (PCA), evidenciando cuáles rutas explican en mayor medida la variabilidad funcional entre las muestras microbianas analizadas. Las funciones con mayor peso son principalmente biosintéticas, destacando la “síntesis de estructuras celulares”, la “degradación de nucleósidos y nucleótidos”, y la “degradación de aminoácidos”, que juntas superan el 25% del total explicado. Esto sugiere que las diferencias funcionales entre los grupos de muestras están fuertemente determinadas por procesos relacionados con la construcción y renovación celular, así como la degradación de compuestos nitrogenados y ácidos nucleicos.

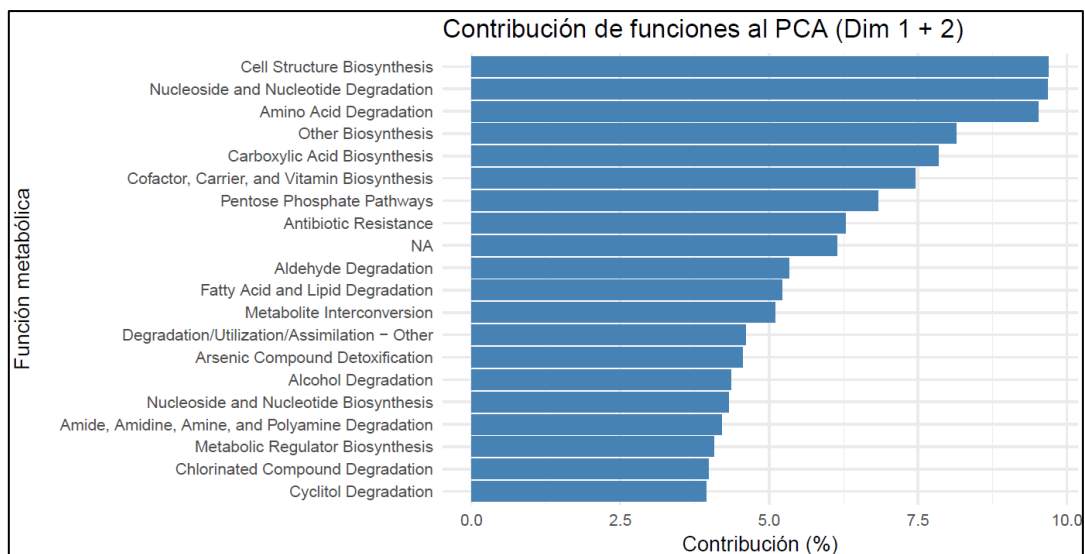


Figura 16. PCA Contribución porcentual de Funciones metabólicas

La presencia destacada de rutas como “biosíntesis de ácidos carboxílicos”, “síntesis de cofactores, portadores y vitaminas” y “vías de las pentosas fosfato” refuerza la idea de una comunidad microbiana con alta actividad anabólica, posiblemente adaptada a condiciones de crecimiento o recuperación estructural. Además, funciones como “resistencia a antibióticos”, “detoxificación de compuestos de arsénico”, “interconversión metabólica”, y varias rutas de degradación (aldehídos, alcoholes, lípidos) indican también la coexistencia de mecanismos de adaptación a condiciones de estrés ambiental o presencia de compuestos tóxicos.

En conjunto, la proyección funcional sugiere que la comunidad microbiana estudiada no solo está estructuralmente activa y en capacidad de mantener su metabolismo central, sino que también responde a condiciones variables del entorno a través de rutas degradativas y mecanismos de defensa. Esta diversidad funcional refleja una comunidad versátil, capaz de realizar tanto funciones biosintéticas esenciales como procesos de reciclaje y detoxificación, lo cual es característico de ecosistemas edáficos complejos como los suelos de páramo.

En la Figura 17 se presenta un análisis de Componentes Principales por Ubicaciones, el patrón sugiere que, aunque hay solapamiento funcional entre las localizaciones, Location 3 alberga comunidades con rutas metabólicas más distintas, posiblemente asociadas a variaciones en condiciones ambientales o disponibilidad de recursos. En cambio, Location 1 parece tener condiciones más estables que promueven perfiles funcionales similares entre muestras.

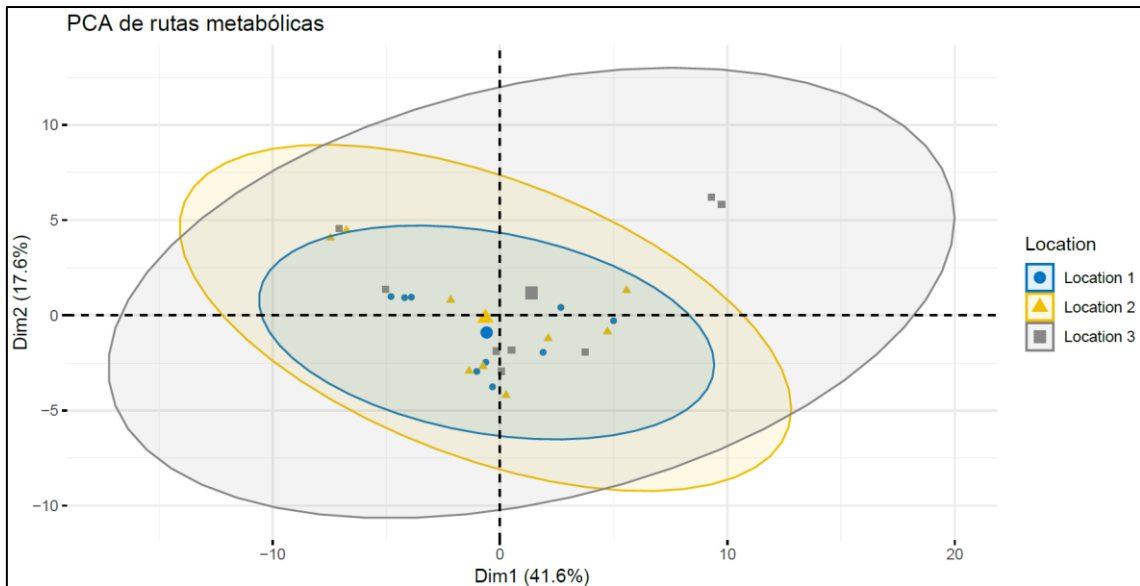


Figura 17. PCA, Análisis de Componentes Principales por Ubicación.

En la Figura 18 se observa el análisis de componentes principales (PCA) de las rutas metabólicas que reveló una clara diferenciación funcional entre los tres tipos de muestras analizadas: suelo rizosférico, suelo no rizosférico y endófitos. El primer eje principal (Dim1), que explica el 41,6% de la varianza, separa principalmente a las comunidades endofíticas de aquellas presentes en el suelo no rizosférico, mientras que el segundo eje (Dim2), que explica el 17,6% de la varianza, contribuye a discriminar adicionalmente la variabilidad interna entre grupos.

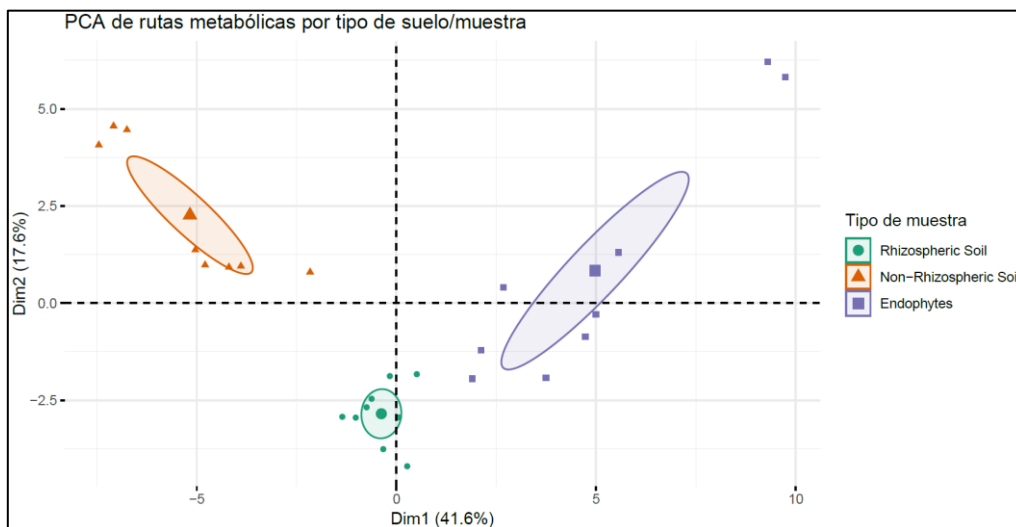


Figura 18 PCA Rutas Metabólicas por tipo de muestra.

Las muestras endofíticas se agruparon de forma compacta en el cuadrante derecho, indicando un repertorio metabólico especializado y consistente, probablemente asociado a funciones adaptativas ligadas a la interacción directa con los tejidos vegetales. En contraste, las muestras provenientes del suelo no rizosférico se localizaron hacia el extremo opuesto del eje Dim1, mostrando un perfil metabólico diferenciado y menos complejo, reflejo de comunidades microbianas con menor influencia de la planta.

Por su parte, las comunidades del suelo rizosférico se concentraron en la región central-inferior del gráfico, con una notable compactación entre réplicas. Esta distribución sugiere que el entorno rizosférico actúa como un microhábitat altamente estable, definido por la influencia de los exudados radicales, los cuales favorecen la homogeneidad funcional y la selección de rutas metabólicas específicas.

En conjunto, los resultados evidencian que la proximidad y el grado de interacción con la planta son determinantes en la estructuración funcional de las comunidades microbianas. Se observa un gradiente en el que los endófitos presentan la mayor especialización, el suelo rizosférico una alta consistencia funcional, y el suelo no rizosférico un repertorio metabólico más basal. Esta diferenciación confirma que cada ambiente representa un nicho ecológico único, modelando de manera distinta las capacidades metabólicas de la microbiota asociada.

#### 2.f.2.c.3 Patrones funcionales microbianos asociados a coberturas de herbazal de páramo: una aproximación basada en abundancia media

Los patrones funcionales de la microbiota pueden observarse en el mapa de calor de la Figura 19, el cual revela diferencias claras en la distribución funcional entre los distintos puntos de muestreo. Algunas funciones, como *Protein Modification*, *Carboxylic Acid Biosynthesis* y *Amino Acid Degradation*, aparecen consistentemente enriquecidas (zonas en rojo) en muestras específicas, como LZP3E2, lo que sugiere una actividad biosintética elevada en esos entornos particulares.

En contraste, funciones como *Hydrogen Production*, *Photosynthesis* y *Electron*

*Transfer Chains* muestran bajos o moderados niveles de abundancia relativa en la mayoría de los sitios, lo que indica una menor representación de rutas funcionales típicamente asociadas a condiciones energéticas especializadas o a organismos fototróficos.

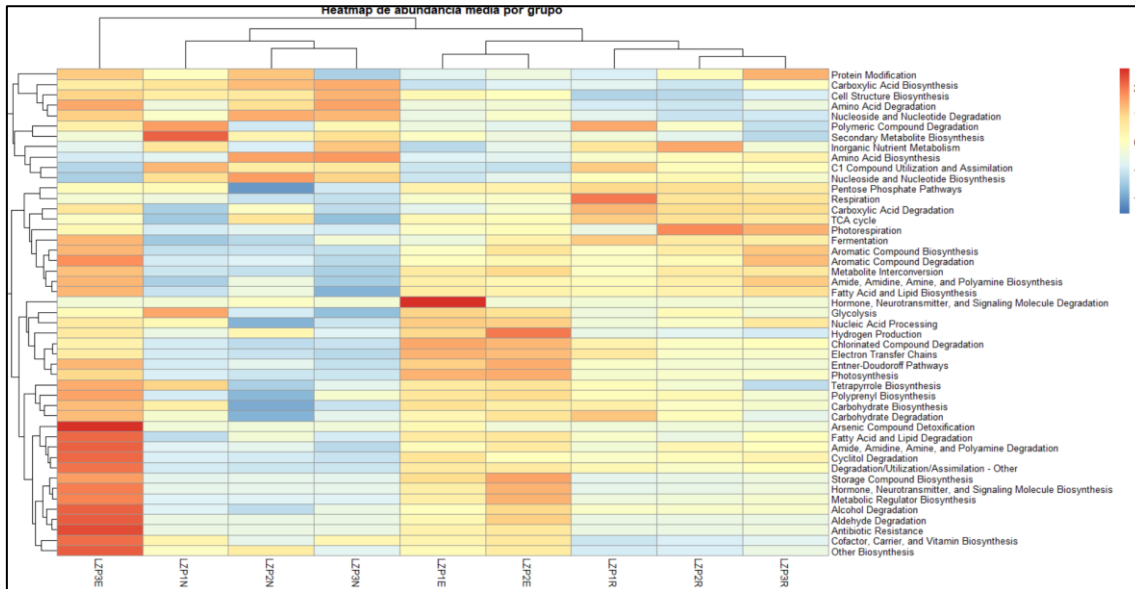


Figura 19. Mapa de Calor de abundancias medias por zona de estudio

El agrupamiento jerárquico sugiere cierta similitud funcional entre muestras de un mismo punto de muestreo o tipo (por ejemplo, muestras E1–E3 tienden a agruparse), lo que podría reflejar una influencia compartida de factores ambientales o condiciones del suelo en la estructura funcional de las comunidades microbianas.

Además, la diversidad funcional observada en este heatmap podría correlacionarse con las diferencias previamente observadas en índices de diversidad alfa y composición taxonómica (como la riqueza más baja en muestras rizosféricas), reforzando la idea de que la composición microbiana no solo difiere a nivel taxonómico, sino también a nivel funcional.

#### 2.f.2.c.4 Correlación entre Funciones metabólicas con variables ambientales

En la Figura 21 se representa los coeficientes de correlación de Pearson entre la abundancia relativa de funciones metabólicas microbianas y un conjunto de variables ambientales medidas en suelos del ecosistema de páramo altoandino. Cada celda refleja el grado y dirección de la relación entre una función



En el caso del pH, las correlaciones observadas fueron débiles y heterogéneas, lo cual sugiere que su influencia es limitada dentro del rango ácido característico del ecosistema de páramo evaluado.

En conjunto, los resultados refuerzan la hipótesis de que la radiación solar, más que la vegetación o la humedad superficial, actúa como principal modulador del perfil funcional de la microbiota edáfica en ambientes de alta montaña. Las rutas energéticas y de síntesis especializadas aparecen como biomarcadores sensibles al estrés abiótico asociado a estos gradientes.

### **2.f.3 Discusión**

Los resultados del análisis metagenómico revelan una alta diversidad funcional en la microbiota asociada a la rizosfera de vegetación herbácea del páramo altoandino del Parque Nacional Llanganates. Entre las funciones más abundantes se destacan rutas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos, lípidos y carbohidratos, así como con la degradación de compuestos orgánicos, metabolismo de nitrógeno y mecanismos de respuesta a condiciones abióticas extremas.

Esta dominancia de funciones biosintéticas sugiere una comunidad microbiana con un perfil anabólico activo, posiblemente vinculado al crecimiento celular, la regeneración estructural y la síntesis de metabolitos esenciales, lo cual es consistente con lo reportado en otros ecosistemas de alta montaña (Hou et al., 2024). La presencia significativa de rutas catabólicas, como la degradación de carbohidratos y aminoácidos, refuerza la hipótesis de un sistema funcionalmente versátil, adaptado a ciclos rápidos de materia orgánica en suelos fríos y con bajos aportes de nutrientes.

Asimismo, el análisis multivariado reveló patrones funcionales que se correlacionan significativamente con variables ambientales como temperatura media (T2M), humedad relativa (RH2M), radiación fotosintéticamente activa (PAR\_TOT), pH y cobertura vegetal (EVI2\_GENO). Estos resultados coinciden con estudios previos donde se ha demostrado que la actividad microbiana en ecosistemas alpinos responde de forma sensible a la variación climática y

edáfica, especialmente en relación con la disponibilidad de carbono y el régimen térmico (D'Alò et al., 2021).

Otro hallazgo destacable fue la representación de rutas asociadas a resistencia a antibióticos, producción de compuestos secundarios y metabolismo del hidrógeno, lo cual sugiere una microbiota capaz de generar respuestas adaptativas frente a estrés ambiental, competencia microbiana o limitación energética. Estos perfiles coinciden con los observados en comunidades microbianas de ambientes extremos, como las zonas polares o altitudes elevadas, donde los microorganismos exhiben estrategias de resiliencia y plasticidad funcional (Cao et al., 2020).

Comparando los resultados funcionales con los obtenidos en el análisis taxonómico mediante phyloseq, se observa una tendencia coherente: las muestras rizosféricas presentan menor equitatividad funcional, posiblemente debido a la dominancia de ciertos taxones especializados en funciones particulares, en contraste con los suelos no rizosféricos y endofíticos, que presentan mayor equilibrio funcional. Esto refuerza la idea de que la rizosfera actúa como un filtro ecológico, seleccionando funciones microbianas específicas que favorecen la interacción planta–microorganismo en condiciones adversas.

En conjunto, estos resultados evidencian la relevancia ecológica y adaptativa de la microbiota rizosférica del páramo, así como su potencial uso en estrategias de restauración ecológica, biofertilización y monitoreo de cambio climático en ecosistemas altoandinos.

## **2.g) Conclusiones**

La presente investigación logró caracterizar de manera integral la composición y funcionalidad de la microbiota asociada a la rizosfera de vegetación herbácea en el Parque Nacional Llanganates, evidenciando que estas comunidades microbianas cumplen un papel esencial en los procesos de adaptación vegetal y funcionamiento ecosistémico en ambientes de alta montaña.

En primer lugar, se identificó una alta diversidad microbiana en los suelos rizosféricos, no rizosféricos y endofíticos, siendo el suelo rizosférico el que

presentó mayor riqueza de taxones, aunque con menor equitatividad, lo cual sugiere una fuerte influencia de los exudados radiculares sobre la estructura de la comunidad. Esta microbiota rizosférica mostró una dominancia de rutas metabólicas anabólicas, especialmente relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos, lípidos, nucleótidos y cofactores, reflejando un perfil metabólico orientado al crecimiento celular y la estabilidad estructural.

Los resultados de Phyloseq y HUMAnN se complementan: la baja diversidad de Shannon en la rizosfera concuerda con la presencia de funciones metabólicas dominantes detectadas en el PCA, y con patrones fuertes de correlación con variables ambientales. Esto indica que la dominancia taxonómica está reflejada también a nivel funcional, lo cual tiene sentido ecológico en ambientes como la rizosfera, donde las raíces modifican intensamente el entorno.

Los análisis realizados evidencian una relación coherente entre la estructura taxonómica de las comunidades microbianas y su perfil funcional. En particular, el índice de Shannon obtenido mediante Phyloseq mostró valores más bajos en las muestras rizosféricas, lo cual sugiere que, aunque poseen un elevado número de OTUs, estas están dominadas por pocos taxones altamente abundantes. Esta dominancia taxonómica parece reflejarse a nivel funcional en los resultados obtenidos con HUMAnN, donde las muestras rizosféricas exhiben un perfil funcional caracterizado por la sobreabundancia de rutas metabólicas específicas, principalmente relacionadas con procesos biosintéticos y degradativos.

El análisis de componentes principales (PCA) de funciones metabólicas reveló que un conjunto reducido de rutas explica la mayor parte de la variación funcional entre muestras, destacando funciones como la biosíntesis de estructuras celulares, la degradación de nucleótidos y aminoácidos, y la síntesis de cofactores. Además, el mapa de correlaciones funcionales-ambientales mostró que estas funciones dominantes están fuertemente influenciadas por variables ambientales asociadas al entorno edáfico y radicular, como el pH, la temperatura y la radiación incidente.

Por el contrario, las muestras endofíticas y no rizosféricas, que presentaron valores más altos y consistentes del índice de Shannon, reflejan una comunidad más equitativa, lo cual se traduce también en una distribución funcional más balanceada, con menor concentración de funciones dominantes y patrones funcionales más homogéneos.

Estos hallazgos sugieren que la estructura taxonómica influye directamente en el perfil funcional de las comunidades microbianas del suelo, y que la rizosfera representa un nicho ecológico con fuerte presión selectiva que favorece a taxones especializados funcionalmente, en contraste con ambientes más heterogéneos como los suelos no rizosféricos o los endófitos, donde predomina una funcionalidad más diversa y equitativa.

Las correlaciones estadísticas revelaron una relación significativa entre la abundancia de funciones metabólicas y variables ambientales como radiación, pH, temperatura y humedad. En general, se encontraron correlaciones negativas entre condiciones ambientales extremas y la expresión relativa de funciones microbianas, lo que sugiere una sensibilidad funcional frente a gradientes edafoclimáticos.

Un hallazgo importante fue la alta proporción de funciones no clasificadas, especialmente en muestras del sitio "Location 1", lo que evidencia la existencia de una fracción funcional microbiana aún desconocida, posiblemente representativa de linajes únicos adaptados al ecosistema de páramo.

Por tanto, los resultados permiten concluir que las comunidades microbianas de la rizosfera no solo son diversas y funcionalmente complejas, sino que también reflejan patrones específicos de adaptación a microambientes determinados por la interacción planta-suelo. Esta información constituye una base sólida para futuras estrategias de monitoreo, conservación y aprovechamiento biotecnológico de la microbiota nativa de páramo.

## **2.h) Propuesta**

A partir de los resultados en esta caracterización funcional de la microbiota rizosférica mediante análisis metagenómico, se propone enriquecer futuras

investigaciones incorporando un conjunto más amplio de variables edáficas dentro del metadato ambiental. Esto permitiría establecer relaciones más precisas entre la funcionalidad microbiana y las condiciones fisicoquímicas del suelo.

Se sugiere incluir parámetros clave tales como:

- **pH**, como indicador de acidez o alcalinidad del suelo;
- **COT (%)** (Carbono Orgánico Total), como medida de materia orgánica presente;
- **N<sub>total</sub>**, **P<sub>disp</sub>** y **K<sub>disp</sub>**, para representar la disponibilidad de los principales macronutrientes;
- **CE (dS/m)** y **CIC (cmol/kg)**, para evaluar salinidad y capacidad de retención de nutrientes;
- la **relación C/N**, como proxy de calidad del material orgánico;
- y concentraciones específicas de nutrientes como **NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**, **NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**, **Fe** y **Cu**, que influyen directamente sobre la dinámica microbológica.

La integración de estas variables fortalecerá la interpretación ecológica de los perfiles funcionales microbianos, permitiendo generar modelos predictivos más robustos y útiles en planes de restauración, manejo sostenible del suelo o monitoreo ambiental en ecosistemas de páramo.

## **2.i) Recomendaciones**

Ampliar el muestreo a otras zonas del Parque Nacional Llanganates y de ecosistemas de páramo con distinto grado de intervención, para validar si los patrones microbianos observados se mantienen en otros contextos geográficos y ambientales.

Actualizar las bases de datos funcionales utilizadas en el análisis bioinformático, a fin de reducir la proporción de rutas metabólicas no clasificadas. Asimismo, incorporar enfoques de metatranscriptómica o metaproteómica permitiría validar la expresión activa de las funciones identificadas.

Utilizar los microorganismos identificados con rutas de interés (biosíntesis de compuestos bioactivos, degradación de contaminantes, fijación de nitrógeno) como potenciales candidatos para el desarrollo de biofertilizantes, bioestimulantes o estrategias de fitorremediación, especialmente en agricultura sostenible de zonas altoandinas.

Diseñar programas de conservación microbiana, reconociendo la importancia de las comunidades del suelo como indicadores de salud ecosistémica. Esto puede incluir la incorporación de variables microbianas en planes de manejo del Parque Nacional.

### 3. Bibliografía

- Andrade, M. (1976). *Viaje a las montañas de Llanganati: Expedición italo-ecuatoriana* (S. Domingo, Ed.; Segunda Ed).
- Andrews, S. (2010). *A quality control tool for high throughput sequence data*. <https://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc/>.
- Bandopadhyay, S., Li, X., Bowsher, A. W., Last, R. L., & Shade, A. (2024). Disentangling plant- and environment-mediated drivers of active rhizosphere bacterial community dynamics during short-term drought. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50463-1>
- Bardgett, R. D., & Van Der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. In *Nature* (Vol. 515, Issue 7528, pp. 505–511). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature13855>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00019-15>
- Beghini, F., Mclver, L. J., Blanco-Míguez, A., Dubois, L., Asnicar, F., Maharjan, S., Mailyan, A., Manghi, P., Scholz, M., Thomas, A. M., Valles-Colomer, M., Weingart, G., Zhang, Y., Zolfo, M., Huttenhower, C., Franzosa, E. A., & Segata, N. (2021). Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with biobakery 3. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.65088>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. In *Trends in Plant Science* (Vol. 17, Issue 8, pp. 478–486). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bodero, A. (1997). *El bosque de manglar de ecuador*. 1–14.

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Buytaert, W., Céleri, R., De Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2006.06.002>
- Buytaert, W., Celleri, R., Willems, P., De Bievre, B., & Wyseure, G. (2006). Spatial and temporal rainfall variability in mountainous areas : A case study from the south Ecuadorian Andes. *Journal of Hydrology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2006.02.031>
- Cao, S., Zhang, W., Ding, W., Wang, M., Fan, S., Yang, B., McMinn, A., Wang, M., Xie, B. Bin, Qin, Q. L., Chen, X. L., He, J., & Zhang, Y. Z. (2020). Structure and function of the Arctic and Antarctic marine microbiota as revealed by metagenomics. *Microbiome*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00826-9>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, *34*(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010a). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 42, Issue 5, pp. 669–678). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010b). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 42, Issue 5, pp. 669–678). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Crespo, P. J., Feyen, J., Buytaert, W., Bücken, A., Breuer, L., Frede, H. G., & Ramírez, M. (2011). Identifying controls of the rainfall-runoff response of small catchments in the tropical Andes (Ecuador). *Journal of Hydrology*, *407*(1–4), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2011.07.021>
- D'Alò, F., Odriozola, I., Baldrian, P., Zucconi, L., Ripa, C., Cannone, N., Malfasi, F., Brancaleoni, L., & Onofri, S. (2021). Microbial activity in alpine soils under climate change. *Science of the Total Environment*, *783*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147012>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2023). *PANORAMA REGIONAL DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA Y LA NUTRICIÓN*. [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/59186/9789251383490\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/59186/9789251383490_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 579–590). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). *The diversity and biogeography of soil bacterial communities*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16407148/>
- Gaete, A., Andreani-Gerard, C., Maldonado, J. E., Muñoz-Torres, P. A., Sepúlveda-Chavera, G. F., & González, M. (2022). Bioprospecting of Plant Growth-Promoting Traits of *Pseudomonas* sp. Strain C3 Isolated from the Atacama Desert: Molecular and Culture-Based Analysis. *Diversity*, *14*(5). <https://doi.org/10.3390/d14050388>
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 307–319). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Hofstede, R. (2001). El impacto de las actividades humanas sobre el páramo. *Los Páramos Del Ecuador. Particularidades, Problemas y Perspectivas*.
- Hofstede, R. G. M., Dickinson, K. J. M., Mark, A. F., Hofstede, R. G. M., Dickinson, K. J. M., Mark, A. F., Mark, A. F., & Narváez, E. (2018). *A Broad Transition from Cloud Forest to Páramo Characterizes an Undisturbed Treeline in Parque A broad transition from cloud forest to páramo characterizes an undisturbed treeline in Parque Nacional Llanganates , Ecuador. 0430*. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-46.4.975>
- Hofstede, R. G. M., Dickinson, K. J. M., Mark, A. F., & Narváez, E. (2014). A broad transition from cloud forest to páramo characterizes an undisturbed treeline in Parque Nacional Llanganates, Ecuador. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, *46*(4), 975–986. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-46.4.975>
- Hou, M., Leng, C., Zhu, J., Yang, M., Yin, Y., Xing, Y., & Chen, J. (2024). Alpine and subalpine plant microbiome mediated plants adapt to the cold environment: A systematic review. In *Environmental Microbiome* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40793-024-00614-0>
- Itakura, M., Uchida, Y., Akiyama, H., Hoshino, Y. T., Shimomura, Y., Morimoto, S., Tago, K., Wang, Y., Hayakawa, C., Uetake, Y., Sánchez, C., Eda, S., Hayatsu, M., & Minamisawa, K. (2013). Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Nature Climate Change*, *3*(3), 208–212. <https://doi.org/10.1038/nclimate1734>
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpō, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., & Tabata, S. (2002). Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. In *DNA Research* (Vol. 9). <http://dnaresearch.oxfordjournals.org/>

- Kennerley, J. B., & Bromley, R. F. (1971). *Geology and geomorphology of the Llanganati mountains, Ecuador* (E. Minerva, Ed.).
- Kuyper, T. W., Hoffland, E., Van Breemen, N., & Finlay, R. D. (2001). *Renske Landeweert\**. <http://tree.trends.com>
- Liu, C., Cui, Y., Li, X., & Yao, M. (2021). Microeco: An R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa255>
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 2017(1). <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 5, pp. 634–663). <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Moreno, C. (2001). *Métodos para medir la Biodiversidad* (CYTED, Ed.; Primera Ed).
- Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis - The “accidental” pathogen. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 7, Issue 8, pp. 555–567). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013a). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 789–799). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013b). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 789–799). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. In *Nature Biotechnology* (Vol. 35, Issue 9, pp. 833–844). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Rist, S., Chidambaranathan, M., Escobar, C., Wiesmann, U., & Zimmermann, A. (2007). Moving from sustainable management to sustainable governance of natural resources: The role of social learning processes in rural India, Bolivia and Mali. *Journal of Rural Studies*, 23(1), 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2006.02.006>

- Romoleroux, K., Muriel, P., Sklenář, P., Carmen, |, Ulloa, U., Espinel, D., & Romoleroux, C. (2023). *CaPítulo 4 la flora de los Páramos eCuatorianos: orígenes, diversidad y endemismo* (pp. 107–125). <https://libros.usfq.edu.ec/index.php/usfqpress/catalog/view/32/71/195>
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. / 827 *MPMI*, 19(8), 827–837. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Rosero, C., Otero, X., Bravo, C., & Frey, C. (2023). Multitemporal Incidence of Landscape Fragmentation in a Protected Area of Central Andean Ecuador. *Land*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/land12020500>
- Sandoval, D., & Salazar, J. (1995). *Estudio de alternativas de manejo del área de los Llanganates* (INEFAN, Ed.).
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue JUN). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>
- Sun, N., Gu, Y., Jiang, G., Wang, Y., Wang, P., Song, W., Ma, P., Duan, Y., & Jiao, Z. (2022). Bacterial Communities in the Endophyte and Rhizosphere of White Radish (*Raphanus sativus*) in Different Compartments and Growth Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.900779>
- Van Der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. In *Ecology Letters* (Vol. 11, Issue 3, pp. 296–310). <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. In *New Phytologist* (Vol. 206, Issue 4, pp. 1196–1206). <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vargas, H., Neill, D., Asanza, M., & Freire-fierro, A. (2000). *Vegetación y flora del parque nacional llanganates*.
- Vásconez, P. M., & Hofstede, R. (2006a). *Los páramos ecuatorianos*.
- Vásconez, P. M., & Hofstede, R. (2006b). *Los páramos ecuatorianos*.
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>