



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DIVERSIDAD FUNCIONAL DE MICROMICETES EN
EL SUELO DEL BOSQUE MESÓFILO DE MONTAÑA
EN SANTIAGO COMALTEPEC, OAXACA, MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CINTHYA GABRIELA LEOCADIO ZARCO



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR

CO-TUTORA:

DRA. YUNUEN TAPIA TORRES

Ciudad de México, Enero, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de la biblioteca (pendiente)

<p>1.- Datos del alumno (a)</p> <p>Apellido paterno Apellido materno Nombre (s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>Leocadio Zarco Cinthya Gabriela 044 55 3157 6888 Biología 311245464</p>
<p>2.- Datos de tutora</p> <p>Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra. Patricia Vélez Aguilar</p>
<p>3.- Datos del sinodal 1</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor</p>
<p>4.- Datos del sinodal 2</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra. Irene Sánchez Gallén</p>
<p>5.- Datos del sinodal 3</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dr. Felipe García Oliva</p>
<p>6.- Datos del sinodal 4</p> <p>Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra. Yunuen Tapia Torres</p>
<p>7.- Datos del trabajo escrito</p> <p>Título Número de páginas Año</p>	<p>Diversidad funcional de micromicetes en el suelo del bosque mesófilo de montaña en Santiago Comaltepec, Oaxaca, México 59 2021</p>

Esta investigación se realizó en los laboratorios C-121 del Instituto de Biología, Laboratorio de Microbiómica de la ENES Unidad Morelia y el Laboratorio de Biogeoquímica de Suelos del IIES; y formó parte de los proyectos “PAPIIT-UNAM-DGAPA (IA201319) “Patrones de diversidad de los hongos microscópicos que habitan en ecosistemas amenazados de México: bosques de niebla”, y (IA206219) “Uso sostenible de los fertilizantes fosfatados como mecanismo para el mantenimiento a largo plazo de la fertilidad de suelos”

AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por brindarme el espacio y la oportunidad de crecer académicamente.
- Al **Instituto de Biología**, por ser una institución comprometida con la investigación científica.
- A la **Facultad de Ciencias** por permitirme crecer profesional y personalmente, por brindarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas.
- A la **Dra. Patricia Vélez**, Instituto de Biología, UNAM, por ser una gran guía en mi quehacer académico, y un gran ser humano, ejemplo de maestra, asesora y científica.
- A la **Dra. Yunuen Tapia Torres**, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Morelia (ENES- UNAM) por el interés y el conocimiento compartido para que esta tesis se llevara a cabo y se concluyera. También, por las facilidades brindadas durante mi estancia en la ENES-UNAM, Morelia.
- Al **Dr. Felipe García Oliva** del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM, Morelia, por las facilidades brindadas para hacer uso del Laboratorio de Biogeoquímica de Suelos.
- A todos los **Miembros del Jurado**, por revisar con esmero y paciencia mi trabajo, y por todas sus aportaciones.
- A la **Dra. Lidia I. Cabrera Martínez**, por las facilidades brindadas para hacer uso del Laboratorio de Sistemática Molecular del Departamento de Botánica.
- A las **Dras. Laura M. Márquez Valdelamar y Nelly M. López Ortiz**, por el trabajo técnico de secuenciación en el Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud.
- Al **M. en C. Gabriel Merino**, por el apoyo en la recolecta de campo y por la aportación de su conocimiento en la localidad de Santiago Comaltepec, Oaxaca.
- Al **Dr. Jaime Gasca Pineda**, por la asesoría y guía en temas de estadística y el uso de R, por la paciencia y su constante buena disposición.
- A **Nohely G. Álvarez**, por el apoyo en el proceso de la realización de esta tesis.
- A la **comunidad de Santiago Comaltepec, Oaxaca**, por el gran trabajo y compromiso al conservar y cuidar uno de los ecosistemas más amenazados en México, como lo es el Bosque mesófilo de Montaña. Sin ellos, no sería posible este y otros trabajos en este bosque.

RESUMEN

Los micromicetes son descomponedores primarios abundantes en las comunidades del suelo. Sin embargo, su diversidad y la estructura de sus comunidades permanecen desconocidas en localidades de bosque mesófilo de montaña en México. Este ecosistema es clave en la regulación de ciclos hidrológicos y biogeoquímicos a nivel de paisaje, y alberga una gran riqueza de especies por unidad de área. En el presente trabajo, evaluamos la diversidad taxonómica de micromicetes cultivables en el suelo de un bosque mesófilo de montaña en Oaxaca, México, e inferimos su rol en la regulación de los ciclos de carbono, nitrógeno y fósforo. Para ello, colectamos muestras de suelo en Santiago Comaltepec, Oaxaca, México. Esta comunidad forma parte de un programa de servicios ambientales, lo que nos indica que es un área, un parámetro para la considerarlo como un bosque con buena conservación. Las muestras se procesaron en el laboratorio con dos diferentes aproximaciones: 1) se aislaron los microorganismos, y 2) se evaluaron las propiedades biogeoquímicas del suelo (actividad enzimática, pH, porcentajes de carbono, nitrógeno y fósforo). Se obtuvieron 101 aislados fúngicos, agrupados en 32 OTUs los cuales se identificaron usando la región ITS1-5.8S-ITS2 ADNr. En la parte biogeoquímica, se obtuvo un valor promedio para el pH de 4.7. Obtuvimos valores estequiométricos C:N:P de 255:18:1, con un promedio de 130.48 de carbono orgánico disponible, que indica que es un bosque con altos niveles de este nutriente en el suelo. La actividad enzimática reveló una gran diversidad de estrategias en el uso de recursos de carbono. Se observaron los siguientes valores de actividad enzimática relacionada con el uso de carbono: 0.16 (β -glucosidasa), 5.93 (peroxidasas), 0.24 (celobiohirolasa), 0.16 (β -n-acetylglucosamidasa); así como 2.83 (fosfodiesterasa) y 0.20 (fosfomonoestersasa) en enzimas asociadas a la mineralización de fósforo orgánico. Los valores de peroxidasas y los cocientes de C:N:P en biomasa microbiana, nos indican que los hongos potencialmente podrían participar en la obtención de nutrientes en el suelo, así como la inmovilización de los nutrientes a través del papel que cumplen en la descomposición de la materia orgánica, y el uso de nutrientes recalcitrantes. Concluimos que a pesar de que la diversidad taxonómica fúngica cultivable podría ser considerada como baja en relación a otros trabajos (particularmente aquellos que utilizan un enfoque independiente de cultivo), la gran variedad de gremios funcionales detectados en este trabajo sugieren que estos microorganismos son un componente relevante la funcionalidad de los bosques mesófilos de montaña, contribuyendo al funcionamiento de los ciclos de nutrientes del suelo.

ABSTRACT

Micromicetes are abundant primary decomposers in soil communities. However, their diversity and the structure of their communities remain unknown in localities of mountain cloud forests in Mexico. This ecosystem is key in the regulation of hydrological and biogeochemical cycles at the landscape level and is home to a great richness of species per unit area. In the present work, we evaluated the taxonomic diversity of culturable micromicetes in soil samples of a mountain cloud forest in Oaxaca, Mexico; and inferred their role in the regulation of the carbon, nitrogen and phosphorus cycles. We collected soil samples in Santiago Comaltepec, Oaxaca, Mexico. This community is part of an environmental services program, which indicates that it is an area, a parameter for considering it as a forest with good conservation. The samples were processed in the laboratory with two different approaches: 1) the microorganisms were isolated, and 2) the biogeochemical properties of the soil were evaluated (enzymatic activity, pH, and percentages of carbon, nitrogen and phosphorus). We obtained 101 fungal isolates that grouped into 32 OTUs, which were identified using the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region. Soil biogeochemistry revealed an average value for pH of 4.7, C:N:P stoichiometric ratios of 255:18:1, and 130.48 average available organic carbon. This indicates that it is a forest has high levels of organic carbon that is available for edaphic organisms. The enzymatic activity data suggested a great diversity of ecological strategies in the use of carbon resources, with carbon-related enzymatic values of: 0.16 (β -glucosidase), 5.93 (peroxidases), 0.24 (cellobiohydrolase), 0.16 (β -n-acetylglucosamidase), as well as in enzymes related to organic phosphorus mineralization such as 2.83 (phosphodiesterase) and 0.20 (phosphomonoestersase). The peroxidase values and the C:N:P ratios in microbial biomass indicated that fungi play an active role in obtaining nutrients from the soil, as well as in the immobilization of nutrients. We conclude that, although the cultivable fungal diversity may be considered low compared to other studies (particularly those using culture-independent approaches), the co-occurrence of several functional guilds indicated microfungi are a key component of cloud forests, contributing to nutrients cycling.

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	<i>vi</i>
<i>Resumen</i>	<i>vii</i>
<i>Abstract</i>	<i>viii</i>
1. Introducción	1
1.1. Microorganismos del suelo	1
1.1.1 Diversidad y estructura	1
1.1.2 Importancia ecológica de los hongos microscópicos	2
1.2. Bosque mesófilo de montaña	6
1.2.1 Características	6
2. Antecedentes	8
3. Justificación	9
4. Objetivos	10
4.1 General	10
4.2 Particulares	10
5. Materiales y métodos	10
5.1 Área de estudio	10
5.2 Toma de muestra	11
5.3. Cultivo, aislamiento e identificación de los microorganismos	13
5.4. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN	13
5.5. Análisis bioinformáticos	14
5.6. Análisis físicos y químicos del suelo	14
5.6.1. Actividad enzimática	14
5.6.2. pH del suelo	15
5.6.3. Análisis de nutrientes en el suelo	15
5.7. Análisis Estadísticos	18
6. Resultados	19
6.1 Diversidad fúngica	19
6.2 Actividad enzimática y pH	21
6.3 Cocientes estequiométricos	22
6.4 Análisis estadísticos de variables ambientales	22
7. Discusión	27
8. Conclusiones	36
9. Bibliografía	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microorganismos del suelo

1.1.1 Diversidad y estructura

La diversidad microbiana (taxonómica, funcional y genética) edáfica es una pieza fundamental que confiere funcionalidad a los ecosistemas (Andrén y Balandreau 1999; Andrén et al 1999; Finlay et al 1997; Griffiths et al 2004). Particularmente, la diversidad funcional integra procesos ecológicos y evolutivos, que van desde el flujo de genes a los intercambios de materia y energía entre la biota y el medio físico (Pérez 2015). También comprende el conjunto de capacidades metabólicas presentes en un ambiente (Zamora et al 2012). En su conjunto, esta diversidad se caracteriza por regular numerosos procesos físicos y químicos en el suelo, modela la abundancia y la diversidad de especies vegetales, y regula la disponibilidad de nutrientes y los elementos inorgánicos del suelo (Grayston et al 1998; Hartmann et al 2015; Schnitzer et al 2011; Zak et al 2003). En general, un incremento en la diversidad microbioma influye en el equilibrio del suelo, confiriéndole mayor resiliencia ante disturbios, e incrementando la producción primaria del sistema; esto, asociado con la facilitación de nutrientes que realizan estos organismos a otros niveles tróficos. Por ejemplo, se ha demostrado que la diversidad de hongos micorrízicos (Griffiths et al 2004; Van Der Heijden et al 1998), así como de especies entomopatógenas (Behie et al 2012), influyen positivamente en la biodiversidad vegetal y la productividad de los ecosistemas.

El microbioma del suelo representa un gran reservorio de biodiversidad en la Tierra, e incluye a una gran cantidad de microorganismos dentro de los reinos Bacteria, Fungi, Protozoa, así como Animalia (algunos artrópodos e invertebrados; Wagg et al 2018). Si bien el suelo alberga una comunidad microbiana con amplia diversidad, las bacterias y los hongos comprenden más del 90% de su biomasa, siendo los principales agentes de descomposición de la materia orgánica (Rinnan y Bååth 2009). Esta biomasa representa del 1-4% del carbono total del suelo (Orgiazzi et al 2016).

El Reino Fungi es uno de los grupos más diversos de organismos; en la actualidad se conocen 148,000 especies (Cheek et al 2020). La mayoría de estas especies, se concentra en los phyla *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Sin embargo, se estima que más del 90% de las especies de

hongos permanecen desconocidas, y se estima que el número total oscila entre los 2.2 y 3.8 millones (Hawksworth y Lücking 2017) y para México entre 90 000 y 110 000 especies (Aguirre-Acosta et al 2014; Guzmán 1998).

Este reino se caracteriza por tener un modo de nutrición quimioorganoheterotrófica, con un mecanismo de nutrición osmótrofo (Tabla 1), es decir, que se lleva a cabo a través de la secreción de enzimas al medio para degradar compuestos orgánicos complejos, los cuales se transforman en moléculas más sencillas, las cuales se internalizan a través de la pared celular. Los hongos, se distinguen también por el tipo de pared celular la cual está compuesta por quitina (de composición variable entre grupos) y polímeros de n-acetilglucosamida (Taylor y Sinsabaugh 2015).

Los micromicetes, u hongos microscópicos, son eucariontes microscópicos cuyas estructuras distintivas (e.g. esporocarpos y otras formas multicelulares sobre las que se forman estructuras especializadas productoras de esporas) miden alrededor de menos de 2 cm. No conforman un grupo natural, ya que está integrado por varios grupos taxonómicos dentro del Reino Fungi (Cannon y Sutton 2004; Kirk et al 2008). Estos organismos constituyen aproximadamente 80% de la diversidad descrita del Reino Fungi (Schmit y Mueller 2007). Generalmente dominan la biomasa microbiana (teniendo una gran riqueza en especies) y la actividad en los horizontes orgánicos del suelo, particularmente en los bosques (Joergensen y Wichern 2008). Por ejemplo, se han reportado aproximadamente 250 OTUs en 25 g de suelo, detectando una alta heterogeneidad, donde la diversidad de taxones dominantes en el primer núcleo de la muestra de suelo era significativamente distinta a la del segundo núcleo (Taylor y Sinsabaugh 2015). Algunos de los factores abióticos como el pH del suelo, la cantidad de humedad, la disponibilidad de nutrientes, así como la cantidad de carbono orgánico (Dar 2009) están muy correlacionados con la composición de la comunidad de micromicetes en el suelo (Cox et al 2010; Taylor et al 2000; Taylor y Sinsabaugh 2015; Toljander et al 2006).

1.1.2 Importancia ecológica de los hongos microscópicos

La relación entre la microfauna, la microflora y la mesofauna, juega un papel importante en el desarrollo del suelo y la estabilidad del ecosistema. Los microorganismos, participan en el flujo

de nutrientes en el suelo dentro la cadena trófica del suelo; sin la presencia de estos se vería afectada la abundancia de depósito de residuos de plantas y restos de animales sin degradar. Ya que, sin la posibilidad de reciclar los nutrientes vitales para el crecimiento de las plantas, todos los ciclos biogeoquímicos en la naturaleza se verían afectados (Dar 2009).

Los microorganismos edáficos rigen las actividades bioquímicas a través de enzimas intracelulares y extracelulares, e interactúan de tal manera que los ciclos biogeoquímicos en la tierra continúan de forma ininterrumpida. Los hongos microscópicos en conjunto con las bacterias controlan la translocación y la mineralización de los sustratos orgánicos, provocando reacciones redox que regulan los ciclos biogeoquímicos de muchos elementos. Crean una reserva de carbono orgánico que supera con creces, el carbono en la atmósfera y la biosfera (Adhya et al 2018).

Particularmente, los hongos microscópicos juegan un rol ecológico fundamental en estos procesos, contribuyendo a la dinámica de los nutrientes en suelos de los bosques, ya que son mediadores en la obtención de nutrientes para las plantas, y mitigan la limitación de nutrientes para otros organismos del suelo. Su actividad enzimática es crucial para llevar a cabo procesos de degradación de la materia orgánica, especialmente en los ciclos de elementos como nitrógeno, fósforo, carbono y azufre. Se les puede agrupar según su función en el ecosistema: simbioses (por ejemplo, hongos endófitos y micorrízicos), patógenos (estrictos u oportunistas) y los saprobios (Eldridge y Delgado 2018; Rillig y Mummey 2006; Treseder y Lennon 2015).

Los hongos simbioses suelen formar asociaciones con las plantas tales como las micorrizas. Esto conduciendo a una mayor adquisición de P y aumento en la productividad primaria neta de las plantas (Eldridge y Delgado 2018; Treseder y Lennon 2015). Por otro lado, los hongos parásitos actúan como mediadores de la relación de diversidad-productividad en el suelo, debido a su especificidad por determinados hospederos (Maron et al 2011). Los descomponedores o saprobios, contribuyen a la mineralización del fósforo y nitrógeno orgánico, así como a la liberación de CO₂ (Eldridge y Delgado 2018; Joergensen y Emmerling 2006). Se les asocia como partícipes de la translocación y mineralización de los sustratos orgánicos y reguladores de los ciclos biogeoquímicos. Por ello, son generalmente considerados como los motores principales de los procesos de descomposición (Francioli et al 2020).

Tabla 1. Metabolismos microbianos, modificada de Dar 2009.

Grupo		Obtención de nutrientes	Microorganismos
Autótrofos	Foto-autótrofos	Radiación solar	Algas, cianobacterias, bacterias fotosintéticas, bacterias especializadas (en oxidar N, S y Fe)
	Quimio-autótrofos	Moléculas orgánicas e inorgánicas	
Heterótrofos	Foto-heterótrofos	Radiación solar	Bacterias
	Quimio-heterótrofos	Moléculas orgánicas	Algunas bacterias, hongos, protozoarios

Actividad enzimática de los hongos

La descomposición de la materia orgánica involucra dos procesos secuenciales: 1) la degradación de los sustratos, donde polímeros orgánicos son transformados en monómeros u oligómeros a través de enzimas extracelulares (Atkinson et al 2010; Looby y Treseder 2018); y 2) el metabolismo de los componentes pequeños y la liberación de CO₂ como resultado (Talbot et al 2008). Cabe destacar en este proceso el pH desempeña un rol importante para el funcionamiento óptimo de las enzimas. Por ejemplo, la actividad de enzimas como la glucosidasa se ha reportado como óptimo en pHs de 5 ± 1 .

La actividad enzimática fúngica es de gran importancia desde el punto de vista ecológico, ya que se involucra directamente con procesos de degradación de la materia orgánica. Esta descomposición, se realiza mediante un amplio grupo de enzimas extracelulares, entre las que se encuentran: glucosil hidrolasas, oxidasas y peroxidasa (asociadas al ciclo del C); proteasas, peptidasas, ureasas y quitinasas (asociadas al ciclo del N); fosfatasas y arilsulfatasas (asociadas al ciclo del P y S; Baldrian 2009; Baldrian 2014). Estas enzimas reducen las macromoléculas a componentes de bajo peso molecular, los cuales quedan disponibles para los microorganismos. Las enzimas fúngicas más estudiadas se describen a continuación:

- **β -glucosidasa (BG).** Es una enzima hidrolítica que actúa sobre los enlaces glucosídicos β (1-4) de oligosacáridos. Es una exocelulasa con especificidad para varios sustratos de β -D-glucósidos, originando como producto final

monómeros de glucosa. La afinidad de esta enzima disminuye al aumentar el grado de polimerización de los oligosacáridos, siendo inactivos sobre los polímeros. Las β -glucosidasas también disponen de actividad transferasa o transglucosidasa por lo que pueden generar productos de mayor tamaño que los oligosacáridos iniciales, lo cual determina su utilización en la biosíntesis de estos (Ljungdahl y Eriksson 1985; Sinsabaugh et al 2008).

- **n-acetil-glucosaminidasa (NAG).** Enzima encargada de degradar principalmente n-acetil glucosamina. Este monosacárido de seis carbonos (aldohexosa) suele encontrarse polimerizado, y formando parte moléculas tales como la quitina (presente en el exoesqueleto de los artrópodos y de la pared celular de los hongos), peptidoglucano (componente de la pared bacteriana), glucosaminoglucanos (contenido en tejido conjuntivo), y algunos glucoesfingolípidos.
- **Celobiohidrolasa (CBH).** Enzima que es producida por las células bacterianas y fúngicas para satisfacer sus necesidades de glucosa, producto enzimático que también ejerce una regulación de intercambio o retrocontrol sobre su enzima generadora (Ljungdahl y Eriksson 1985; Sinsabaugh et al 2008).
- **Lacasa (polifenol oxidasa; POX).** Pertenece al grupo azul cobre oxidasa que usa oxígeno como aceptor de electrones para eliminar el hidrógeno de los grupos hidroxilo fenólicos (Criquet 1999). Y se trata de una de las principales enzimas implicadas en la deslignificación; catalizan la oxidación monoelectrónica de difenoles y aminas aromáticas, eliminando un electrón y un protón del grupo hidroxilo o amino para dar lugar a radical fenoxilo o amino, respectivamente (Camacho 2017; Leonowicz et al 2001).
- **Fosfodiesterasa (PAD).** Es una enzima del grupo de las esterases que cataliza

la eliminación de grupos fosfatos de algunos sustratos, dando lugar a la liberación de una molécula de ion fosfato y la aparición de un grupo hidroxilo en el lugar en el que se encontraba esterificado el grupo fosfato y la fosfodiesterasa o nucleasas son enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster, como por ejemplo los que se establecen en los ácidos nucleicos entre la pentosa de un nucleótido y el grupo fosfato de otro. Su acción regula la concentración dentro de las células del AMP cíclico y del GMP cíclico (nucleótido cíclico fosfodiesterasas; Caldwell 2005; Margalef 2017).

El suelo y el mantillo, las enzimas anteriormente mencionadas, regulan la liberación de componentes orgánicos al suelo (provenientes de restos vegetales y exudados de raíces) como resultado de la catálisis de sacáridos solubles, ácidos orgánicos, aminoácidos, o almidón, derivados de la pared celular como biopolímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina (Baldrian y Šnajdr 2011; Magnani et al 2007); así como quitina y peptidoglucanos que provienen de la biomasa microbiana y la microfauna edáfica (Gessner et al 2010).

Se sabe, que diversos factores pueden afectar la actividad enzimática del suelo, entre éstos se encuentran: el manejo agrícola, intentos de remediación y biorremediación, cambios en la conformación de la comunidad vegetal, y algunos efectos asociados al cambio climático (Acosta y Tabatabai 2000; Ahmad et al 2001; Avellaneda et al 2012; Burns 1982; Dar 2009; Xiao 2018).

1.2 Bosque Mesófilo de Montaña

1.2.1 Características y distribución

El término bosque mesófilo de montaña (BMM) se refiere a todos los tipos de bosque húmedo de montaña (Villaseñor 2010), incluyendo bosques que pueden no ser altamente lluviosos o donde la niebla puede ser rara durante gran parte del año (Williams 2015). Equivale a lo que algunos autores de habla inglesa denominan como “cloud forest”, término que se ha traducido también al español como bosque nublado, selva nublada, bosque de neblina o bosque nebuloso (Rzedowski 1996). Se encuentra entre dos ecosistemas: las selvas tropicales de menor altitud y los bosques

templados de mayor altitud, de tal manera que está constituido por especies que penetran desde ambas regiones. Ello, forma un ecosistema de transición, con la particularidad de contener especies restringidas a este ambiente, tanto de fauna (Espinoza y Sánchez 2010) como de flora (Gual-Díaz y Rendón-Correa 2017; Rzedowski 1996; Valdez-Tamez et al 2003; Villaseñor 2010).

El BMM apenas ocupa alrededor del 0.26% de superficie terrestre y 2.5% de los bosques tropicales del mundo (Sánchez y Dirzo 2014; Ochoa-Ochoa et al 2017), en México se acerca al 1%, considerando vegetación secundaria derivada de esta formación; o bien cerca de 0.4%, si se considera solo vegetación primaria, de acuerdo con el INEGI (serie IV, Uso de suelo y vegetación, 2007; Díaz y Correa 2014). Registrado en 20 entidades federativas de México (Villaseñor 2010). La distribución de estos tipos de bosques abarca regiones discontinuas de las zonas montañosas de la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, Sierra Norte de Oaxaca, Faja Volcánica Transmexicana y Sierra Madre de Chiapas (Challenger 1998; Luna-Vega et al 2001; Rzedowski 1996). Posee suelos Luvisoles y Cambisol y pHs ácidos (4 a 6; Rzedowski 2006), temperaturas de entre 12° y 23°C, con una precipitación que va de los 1000 mm a los 5000 mm (Ochoa-Ochoa et al 2017; Rzedowski 1978; Rzedowski y Palacios 1977). Se encuentra más comúnmente en el intervalo altitudinal de entre 1,000 y 2,500 m.s.n.m. (Villaseñor 2010). Su estructura florística está compuesta por entre 2500 y 2700 especies de plantas, lo que representa entre 10 y 12% de todas las especies vegetales estimadas para México (González et al 2012; Rzedowski, 1978; Villaseñor, 2010); así como alrededor de 755 especies de vertebrados terrestres (Toledo 2009). Brinda servicios ecosistémicos importantes, tales como altas entradas de precipitación, aportes de agua adicionales por la interceptación de niebla y bajas pérdidas por evapotranspiración (Bruijnzeel 2004); así como captura y filtración de agua a través de precipitación horizontal (Bruijnzeel y Proctor 1995).

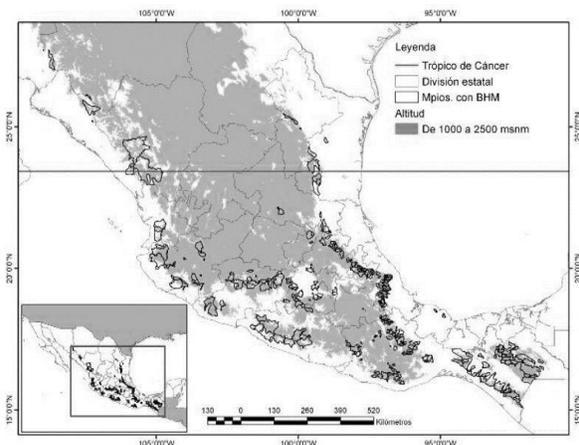


Figura 1. Mapa señalando los municipios donde está presente el Bosque Mesófilo en México, imagen tomada y modificada de Villaseñor (2010).

2. ANTECEDENTES

A nivel mundial, en el BMM los hongos micorrízicos han sido ampliamente estudiados, reportando una fuerte especificidad por el hospedero (e.g. Rains et al 2003; Morris et al 2008; Arias et al 2012; Haug et al 2021). Asimismo, se han investigado especies parásitas de animales (Walker et al 2018). Cabe destacar la falta de trabajos en torno al estudio de la microbiota edáfica (particularmente especies de saprobios microscópicos), ya que en su mayoría los trabajos se centran en especies asociadas a hospederos específicos.

En cuanto a su rol funcional se ha descrito con base a experimentos en campo, que la abundancia y diversidad de hongos aumenta con condiciones más cálidas y secas. Específicamente, se ha visto que bajo estas condiciones (que emulan escenarios de cambio climático), la riqueza de hongos formadores de líquenes, patógenos, saprobios y levaduras aumenta. Esto, va de la mano con un aumento en la actividad enzimática en condiciones más cálidas y secas. Cabe destacar que los autores de este trabajo advierten que con el cambio climático, las comunidades animales y vegetales de los BMM, podrían estar expuestos a una mayor riqueza de hongos patógenos como resultado del cambio climático (Looby y Treseder 2018).

Para el territorio nacional, las investigaciones que dan a conocer, en forma detallada, la diversidad de micromicetes en el BMM, proliferaron a finales de la década de los 80s y los 90s (Heredia-Abarca 1989). En estos trabajos, se registran, describen, e ilustran algunas especies que prosperan en el BMM (Heredia-Abarca 1994; Mercado-Sierra y Heredia-Abarca 1994) de localidades distribuidas en Veracruz y Tamaulipas, y mediante la colecta de muestras de hojarasca y restos vegetales (ramas, troncos y hojas; Tabla 2).

Los géneros fúngicos mejor representados para México, de acuerdo con la literatura disponible a la fecha son: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Chalara*, *Dictyochaeta*, *Gyrothrix*, *Monodictys*, *Periconia*, *Sporidesmium* y *Stachybotrys* (Heredia-Abarca et al 2011). Recientemente, se realizó una revisión por del Olmo et al (2017) para BMM en la franja Neotropical. Los autores incluyeron registros de hongos macro y microscópicos, así como líquenes, reportando 1274 de especies para México. Si consideramos que el número de especies estimadas de hongos para México es de 2135 (Aguirre-Acosta et al 2014), con base al estado del

conocimiento actual podemos afirmar que el BMM alberga un 58% de las especies de hongos. Cabe destacar, que esto es considerando 31 registros para el Estado de Oaxaca (del Olmo et al 2017).

El trabajo que generó la mayoría de los registros para el estado de Oaxaca es el de Bautista-Cruz et al (2014), obteniendo el registro de 13 especies de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares que se encontró en un BMM en Oaxaca, otros resultados relevantes fueron los parámetros fisicoquímicos (pH de 6.3, humedad 43.8 y MO de 9.4). Además, en el 2012 para Oaxaca Álvarez-Aquino et al realizan un trabajo donde se registra la composición de Carbono Orgánico en el Suelo (SOC) en un gradiente altitudinal, con valores de 227 C x hc y 143 C x hc para los 1500 m.s.n.m. y 25000 m.s.n.m. respectivamente. En este trabajo se concluyó que el SOC decrece en una relación inversa con la altitud y que el 40 al 60% del SOC corresponde al horizonte superficial.

3. JUSTIFICACIÓN

Se estima que alrededor del 80% de la diversidad fúngica corresponde a especies microscópicas, que habitualmente habitan en el suelo. Sin embargo, el estudio de estos organismos suele estar rezagado con relación a especies macroscópicas o de interés, tales como los patógenos y micorrizas. Según Aguirre-Acosta et al, en México (hasta el 2014) se han registrado 2135 especies de hongos, de las cuales tan solo 806 corresponden a especies microscópicas edáficas. Asimismo, cabe destacar que los estados más estudiados son Veracruz con 1517 registros, Jalisco con 1040 registros, Estado de México con 726 y Sonora con 658. Particularmente, el Estado de Oaxaca, a pesar de albergar parches en buen estado de conservación de BBM, y encontrarse entre los estados más diversos (Ordóñez y Rodríguez 2008) por unidad de área, carece de esfuerzos importantes en el estudio de la micobiota edáfica. Asimismo, se desconoce el rol funcional de la micobiota en los procesos biogeoquímicos del suelo, al no existir estudios al respecto para el territorio nacional.

Es por esto, que la generación de información de línea base sobre la diversidad de micromicetes edáficos, las propiedades biogeoquímicas del suelo, y la relación entre estos dos elementos, es crucial para contribuir al manejo y conservación del BMM mexicano.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar la diversidad taxonómica de micromicetes cultivables, así como la dinámica de C, N y P y la actividad microbiana del suelo en el bosque mesófilo de montaña en Santiago Comaltepec, Oaxaca, México.

4.2 Particulares

- Aislar los micromicetes a partir de muestras de suelo.
- Identificar los aislados con base a la región ITS1-5.8S-ITS2 ADNr.
- Preservar *ex situ* la diversidad aislada, así como su ADN genómico en una colección.
- Caracterizar variables biogeoquímicas del suelo: pH, concentración de nutrientes totales, disueltos y en biomasa microbiana.
- Medir la actividad de las siguientes enzimas: fosfomonoesterasa, β -glucosidasa, β -n-acetil-glucosaminidasa, celobiohidrolasa, polifenol oxidasa y fosfodiesterasa.
- Explorar la relación entre la diversidad de los hongos y parámetros biogeoquímicos del suelo.
- Inferir el rol funcional de grupos fúngicos con base en la literatura.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El presente estudio se realizó entre los paralelos 17°32' y 17°44' N; 96°16' y 96°36' O; en la localidad de “El Relámpago” en Santiago Comaltepec, Oaxaca, México. Este cerro se encuentra a una altitud de 2177 m.s.n.m. (Jiménez et al 2020; Figura 2). Santiago Comaltepec es una comunidad Chinanteca localizada en lo alto de Chinantla, que es parte de una región biocultural de Mesoamérica. Este territorio es reconocido internacionalmente por el buen estado de conservación de bosques templados, selvas y BMM. La precipitación media anual está entre los 4

000 mm, y el gradiente altitudinal que va de los 0 a los 3200 msnm. Es una de las regiones más diversas en México. Desde 1994 se comenzó con el manejo forestal de la comunidad y cuenta con Planes de Uso de Suelo y Programas de Manejo Forestal, siendo aprobados cada diez años por las autoridades ambientales de México (del Mar Delgado et al 2015).

5.2 Toma de muestra de suelo

Se establecieron tres puntos de muestreo: el primero (de ahora en adelante “*Om*”) se encontraba bajo una de la especie más representativas del BMM en México, *Oreomunnea mexicana* (Standl.) J.-F. Leroy, que es una especie relictica de la era Arcto-terciario, y está incluida en la Lista Roja como especie en peligro de extinción del BMM (Alfonso et al 2017); el segundo sitio (de ahora en adelante “*He*”) se estableció debajo de un helecho arborescente endémico de bosque mesófilos de México (*Alsophila salvini*) de aproximadamente 1 metro y medio; y el tercer sitio (de ahora en adelante “*Ac*”) correspondió al área debajo de un tronco en descomposición (Figura 3).

Para realizar el muestreo, se trazó un transecto triangular de 10 × 10 × 10 m. En cada uno de los vértices, se trazó un subtransecto de 1 × 1 × 1 m (Figura 4). Se colectaron muestras de suelo en los vértices de cada uno de estos subtransectos. Las muestras se recolectaron en los primeros 10 cm del suelo para cultivo microbiano (en tubos estériles de polietileno). Además, con ayuda de un nucleador, se tomaron los primeros 50 cm de suelo para los análisis biogeoquímicos (en bolsas estériles de polietileno con cierre hermético). En ambos casos para tomar la muestra se retiró el mantillo. En total sumaron 18 unidades de muestra de suelo, las cuales fueron transportadas en completa obscuridad y en una hielera al laboratorio para su procesamiento en las 48 h siguientes.

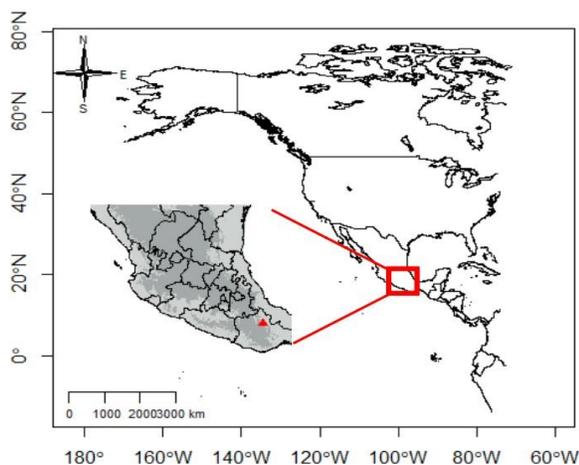


Figura 2. Ubicación del área de estudio en Santiago Comaltepec, Oaxaca, México.



Figura 3. Sitios de muestreo y recolección de las muestras de suelo. 1 Oreo = sitio 1, al pie de *O. mexicana*; 2 Helecho = sitio 2, al pie de *A. salvini*; y 3 Caído = sitio 3, suelo debajo de un tronco en descomposición.

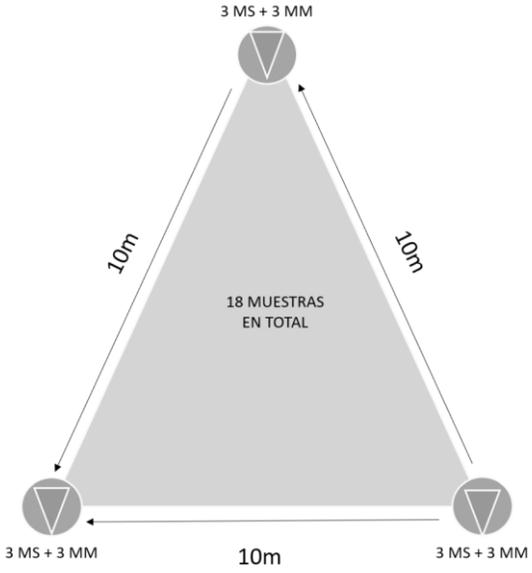


Figura 4. Diseño de muestreo triangular donde se colectaron las muestras de suelo.

5.3 Cultivo, aislamiento e identificación de los micromicetes

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suelo 10^{-1} - 10^{-6} , siguiendo el método de dilución en placa (Warcup 1960; Figura 5). Posteriormente, se inoculó 1 ml de cada una de las diluciones correspondiente a cada muestra, por triplicado en cuatro medios de cultivo: Luria Bertani (LB), LB empobrecido, harina de maíz agar (CMA) y papa dextrosa agar (PDA). Estos dos últimos se adicionaron con penicilina para evitar el crecimiento de bacterias. Las cajas se incubaron bajo condiciones de laboratorio. Después de 24, 48 y 72 horas se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se aislaron los micromicetes. Los aislamientos axénicos se depositaron en la colección de cultivos del laboratorio C-121 y están disponibles para investigación.

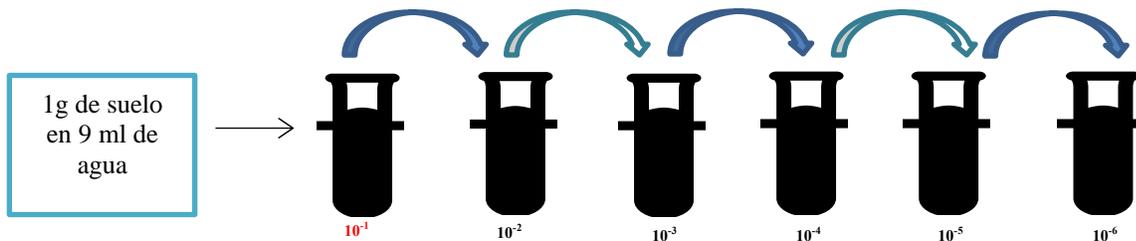


Figura 5. Esquema ilustrando la metodología de diluciones seriadas en placa para el aislamiento de los micromicetes.

5.4 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación de la región ITS

Los micromicetes aislados fueron transferidos a cajas con medio PDA, para su identificación. Se agruparon por morfotipos con base a las características macroscópicas del aislado tales como color, textura, producción de exudados/pigmentos, tasa de crecimiento, etc. Posteriormente, se seleccionó un aislado representativo de cada morfo-tipo para su genotipificación. Se realizaron extracciones del ADN total siguiendo el protocolo tomado de Doyle y Doyle (1987).

La asignación taxonómica se realizó mediante la evaluación la región ITS1-5.8S-ITS2, la cual fue amplificada y secuenciada usando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, de acuerdo con las condiciones reportadas por White et al (1990). El ADN genómico de cada uno de los aislados se incorporó a la colección de cultivos del laboratorio C-121 y está disponible para investigación.

Las secuencias se depositaron en la base de datos de NCBI (MT108978- MT109012).

5.5 Análisis bioinformáticos

La evaluación de la calidad de las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2, así como el ensamble del *forward* y el *reverse* se realizaron usando la herramienta de refinamiento Consed versión 29.0 (Ewing y Green 1998; Gordon et al 2001). La asignación taxonómica se realizó por medio de la comparación del porcentaje de homología con base a bases de datos de referencia (UNITE y NCBI) utilizando el algoritmo de BLAST (Altschul et al 1990). Únicamente se consideraron para los análisis aquellas secuencias con un mínimo de cobertura de 90% para el largo de las secuencias, no se seleccionaron las secuencias provenientes de datos ambientales, seleccionando así solo secuencias ligadas a aislados.

Para cada definir a cada Unidad Operacional Taxonómica (OTU por sus siglas en inglés), se eligieron las primeras 10 secuencias que cumplieran con estas características, dando preferencia a los trabajos que estuvieran publicados. El criterio para definir las OTUs se estableció según lo propuesto por Millberg et al (2015), considerando porcentaje de homología del: 98–100% para las especies presuntas, 94–97% para el nivel de género y 80–93% para nivel de orden. Para resultados contradictorios, se utilizó el rango taxonómico común (Peršoh et al 2010; Velez 2016).

5.6 Análisis físicos y químicos del suelo

5.6.1 Actividad enzimática

Se midió la actividad para las siguientes enzimas del suelo: fosfomonoesterasa (PA), beta-glucosidasa (BG), β -n-acetil-glucosaminidasa (NAG), celobiohidrolasa (CHB), polifenol oxidasa, y fosfodiesterasa. Para ello, se pesaron 2 g de suelo de cada muestra y se colocaron en tubos Falcon™ de 50 ml, posteriormente se adicionaron 30 ml de MUB 1X a pH de la muestra y se agitó a 15 min en posición horizontal a 250 rpm. Después se tomaron 670 μ l del extracto y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5ml (hacer tres réplicas por muestra). Para las muestras control se tomó 670 μ l del extracto y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5ml y se adiciona 670 μ l del MUB 1X al tubo Eppendorf (un control por cada muestra). En el caso del control de

sustrato se agregó 670µl del sustrato adecuado y se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5ml, más 670µl de MUB 1x al tubo Eppendorf (tres tubos por cada enzima).

Las muestras se incubaron a 28 °C durante 2hr. Al concluir este lapso, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 min. La lectura se realizó en un espectrofotómetro. Se tomaron 750µl de la muestra centrifugada y se colocó en tubos Falcon de 15ml. Se adiciono 75µl de NaOH 1N para detener la reacción y 3ml de agua desionizada, se agitó de forma manual. Las muestras se leyeron en un fotoespectrómetro a 410nm (excepto para la lacasa que se lee a 700nm), calibrando a 0 con agua desionizada.

Este método se basa en una determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado por gramo de suelo por unidad de tiempo, cuando el suelo es incubado con un sustrato (N, P-fosfato) en una solución buffer (Hernández 2014).

5.6.2 pH del suelo

El porcentaje de humedad se determinó utilizando el análisis gravimétrico, para el cual se pesó una sub-muestra de suelo fresco y se secó en el horno a 105 °C, durante 24 horas y finalmente se registró el peso seco. Posteriormente, el pH se determinó utilizando una solución 1:10 p/v de suelo en agua desionizada y se leyó utilizando un potenciómetro digital previamente calculados.

5.6.3 Análisis de nutrientes del suelo

Las formas de carbono contenidas en el suelo se determinaron utilizando un Analizador de Carbono Total (UIC-COLULOMETRICS mod. 50120; Chicago, E.U.A.), mientras que para la determinación de todas las formas de nitrógeno (N) y fosforo (P), se utilizó un Autoanalizador Bran-Lubbe III. El P contenido en la biomasa microbiana se evaluó con un fotoespectrómetro de UV-Visible (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 2011).

Nutrientes totales

Para la cuantificación de N y P totales (NT y PT), se realizó una digestión ácida a 360°C con H₂SO₄ y H₂O₂ (20:1) y una mezcla pre-digestora de K₂SO₄ y CUSO₄ (10:1) como catalizador. El NT se determinó por el método macro-Kjeldahl (Bremmer 1996) y se leyó por colorimetría en un autoanalizador. El PT se determinó por el método colorimétrico de molibdato de amonio y

reducción con ácido ascórbico (Murphy y Riley 1962) y se leyó en un autoanalizador.

Nutrientes disueltos

Para la extracción de las formas de C, N y P inorgánicos disueltos (CID, NID, y PID) es decir las formas de estos nutrientes que pueden estar disueltos en agua; se pesaron 20 g de suelo fresco homogéneo y se le adicionaron 80 ml de agua desionizada y se agitó por 30 min a 250 rpm. La mezcla se filtró en Wathman No.42 y después utilizando membranas milipore #42 (Jones y Willett 2006). Del filtrado se leyó el CID y el carbono total disuelto (CTD) en analizador total de carbono.

Nitrógeno y fósforo. Se tomó una alícuota de 25 ml y se agregó a un tubo digestor de 250ml se agregó 1 ml de H₂SO₄ (Ácido sulfúrico) y se digirió a 200 °C durante dos horas. Se adicionó 1 ml de H₂O₂ (peróxido de hidrogeno) al 30%, y se dejó calentar hasta terminar la digestión (aproximadamente 5 min o hasta que la muestra quede transparente). Se dejó enfriar, alrededor de 20 h, después se vertió a un tubo. Luego se tituló con NaOH al 20% hasta que la muestra viró a color rosa e inmediatamente se agregaron unas gotas de H₂SO₄ (5N), hasta que la muestra regresó a tener un color transparente. Al terminar se filtró por Whatman No.42. Las formas disueltas de C(COD), N(NOD) y P(POD) se determinaron por la diferencia entre el total disuelto y el inorgánico de cada nutriente (NH₄ y PTD, como H₃PO₄).

Nutrientes disponibles

Se pesaron 10g de suelo fresco homogéneo, sin raíces ni piedras. Se adicionó 50ml de KCL 2N y se agitó por 30 min a 250 rpm, para su posterior filtrado en Whatman # 1. Se leyó NH₄, NO₃. Para los valores de carbono disponible se colocó 1g de suelo fresco homogéneo, se adicionó 30 ml de bicarbonato (0.5 M), se dejaron agitando alrededor de 16 h se midieron en el analizador total de carbono.

Nutrientes contenidos en la biomasa microbiana del suelo

La estimación de la biomasa microbiana del suelo se realizó por el método de extracción-fumigación con cloroformo (Vance et al 1987). Este método presenta varias ventajas en

comparación con otros métodos. La EF es un método que puede ser aplicado inmediatamente después de adicionar un sustrato (material sólido distinto del suelo *in situ*, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico) al suelo. El principio del método es que los microorganismos mueren al ser atacadas sus membranas celulares por el cloroformo, y parte de sus constituyentes microbianos, especialmente en el citoplasma son degradados por auto lisis enzimática y transformados en componentes extraíbles. Todas las muestras se incubaron durante 24 horas a 25°C y humedad constante.

Carbono y Nitrógeno. Se realizó una extracción con 80 ml de K_2SO_4 que se agregó a las muestras, tanto fumigadas, como no fumigadas. La solución se agitó, filtró, y vació a través de membranas millipore de $0.45\mu m$. Se tomó una alícuota de los extractos obtenidos para determinar las fracciones de C, y el resto se sometió a una digestión ácida para obtener el N microbiano. Para obtener el C inorgánico microbiano (CIM) se utilizó el analizador de carbono total, y el C orgánico microbiano se calculó con la diferencia de CTM menos CIM. Para obtener la concentración de N se realizó una digestión de los extractos con H_2SO_4 y $CuSO_4$ como catalizadores a 300 °C. Posteriormente, se pasó a través de un filtro en Whatman #1. Finalmente, se determinó el N microbiano por el método colorimétrico en el autoanalizado.

Fósforo. El P microbiano se obtuvo por medio de una extracción realizada a las muestras previamente sometidas a fumigación e incubación. El extractante utilizado fue $NaHCO_3$ 0.5 M a pH8.5, que se agregó a las muestras y a continuación la solución se agitó a baja velocidad por 16 horas. El sobrenadante se filtró por Whatman No. 42. Al extracto obtenido se le realizó una digestión con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 11M y persulfato de amonio ($(NH_4)_2S_2O_8$) al 50%, en una autoclave a 121 °C durante una hora. Finalmente, se neutralizó con NaOH y se aforó a 25 ml con agua desionizada. La determinación de la concentración de P microbiano se hizo por el método de colorimetría, el N microbiano leyó en el autoanalizado.

5.7 Análisis estadísticos

Diversidad

Entre los índices más usados para evaluar diferentes aspectos de la diversidad biológica se encuentra el Simpson (1-D). Este índice, describe la dominancia dentro de las comunidades, y representa la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar pertenezcan a la misma especie (Moreno 2001). Considerado como uno de los más robustos para obtener una estimación de la diversidad, especialmente cuando se tienen muestras relativamente pequeñas (Magurran 2004). Para estimar la diversidad alfa, considerando el sesgo metodológico asociado a la metodología de cultivo, se calculó el índice de Simpson mediante la función “diversity” del paquete Vegan versión 2.5-6 (Jari et al 2019) del programa R 3.6.0 (R Core Team, 2018), tal y como se detalla a continuación.

$$1 - D = 1 - \sum_i^n \ln p_i^2$$

Donde n= es el número de especies y p_i es la proporción de cada especie.

Análisis multivariados del contexto ambiental

Se exploró el comportamiento y la distribución de los datos ambientales. Para ello, se utilizó el programa R 3.6.0 (R Core Team, 2018). Se realizó una transformación Z de los datos. Con este procedimiento aritmético, se generó un nuevo conjunto de datos con una media de cero y desviación estándar el uno, permitiendo así su análisis y comparación. Se trabajó con tres bases de datos. La primera correspondió a los datos de la actividad de las siguientes enzimas del suelo: fosfomonoesterasa (PA), beta-glucosidasa (BG), β -n-acetil-glucosaminidasa (NAG), celobiohidrolasa (CHB), polifenol oxidasa (POX) y fosfodiesterasa (PAD). La segunda base de datos se construyó con los datos biogeoquímicos: pH, C, N y P totales, disueltos y contenidos en la biomasa microbiana. Finalmente, la tercer base de datos consistió en una matriz binaria de presencia y ausencia de las especies fúngicas en los nueve sitios de estudio.

Se realizó una exploración gráfica de los datos utilizando la función “boxplot”, para visualizar los patrones generales y tendencias. Posteriormente, se realizó una regresión lineal y

un análisis de correlación de Pearson, esto con la finalidad de explorar las relaciones entre variables. Este análisis permitió un primer acercamiento para la selección de variables para los modelos multivariados, al revelar valores de significancia y correlación entre pares de variables. Además, se construyeron árboles de distancia con las variables ambientales (enzimas, pH, y C, N y P totales, disueltos y microbianos) y los OTUs fúngicos para visualizar patrones de agrupamiento entre sitios.

Con la finalidad de seleccionar las variables que se incorporarían al modelo, se realizó un análisis de componentes principales PCA (por sus siglas en inglés). Este modelo estadístico, que considera la distribución de la varianza de los datos y que permite simplificar la complejidad de espacios muestrales con muchas dimensiones, realiza una condensación de las variables mejorando así su análisis. Con base a los procedimientos descritos con anterioridad, se seleccionaron las variables ambientales que se incorporaron al análisis de correlación canónica (CCA por sus siglas en inglés). Para ello, se utilizó la función “hclust” del paquete ade4 versión 1.7-13 (Dray y Dufour 2007). Para todos los análisis se usó el programa R (R Core Team, 2018) y los paquetes Vegan y FactoMineR versión 2.1 (Le et al 2008).

6. RESULTADOS

6.1 Diversidad fúngica

En total, se obtuvieron 101 aislados fúngicos agrupados en 32 OTUs identificados hasta: nivel de filo (2), nivel de orden (9), nivel de género (14) y nivel de especie (15). Éstos, estaban comprendidos dentro de los phyla: *Mortierellomycota* (*Mortierella turficola* y *M. verticillata*), y *Ascomycota* (30 taxones). El último, representó el filo más abundante y diverso en nuestras muestras; relacionándose con 3 clases diferentes: *Eurotiomycetes* (4 taxones), *Dothideomycetes* (8 taxones), *Sordariomycetes* (17 taxones). A nivel de género, los aislados de *Ascomycota* pertenecieron a los 18 géneros que a continuación se enlistan: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Bisifusarium*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Furcaterigmium*, *Metapochonia*, *Metarhizium*, *Parapyrenochaeta*, *Parengyodontium*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Setophaeosphaeria*, *Tolypocladium*, y *Trichoderma* (Tabla 3).

Por otro lado, se registraron valores altos de diversidad de Simpson y heterogeneidad (ausencia de patrones claros de diversidad con base al sistema de muestreo, es decir la especie vegetal asociada a las muestras de suelo). El sitio con mayor diversidad fue 2.1, seguido por 1.2,

2.3, y 3.1. El sitio con menor diversidad fue el 2.2 (Tabla 4).

Tabla 3. Asignación taxonómica de los OTUs identificados con base a la región ITS, mostrando parámetros de homología con relación a secuencias contenidas en la base de referencia de NCBI.

C= Cobertura, ID= porcentaje de identidad, S= abreviatura.

Referencia	C	ID	NCBI	OTU	S
1. <i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	97	99	KJ869161.1	<i>S. hemerocallidis</i>	Sh
2. <i>Acremonium furcatum</i>	100	98.69	MH859660.1	<i>Furcasterigmium furcatum</i>	Ff
3. <i>Mortierella turficola</i>	97	99.83	JX975952.1	<i>M. turficola</i>	Mt
4. <i>Paracamarosporium hawaiiense</i>	100	97.23	MG827189.1	<i>Montagnulaceae</i> sp.	Fmo
5. <i>Pleospora incompta</i>	100	100	KU973715.1	<i>Pleosporales</i> sp. 1	Pl1
6. <i>Gaeumannomyces californicus</i>	98	98	NR_155135.1	<i>Gaeumannomyces</i> sp.	Gsp
7. <i>Talaromyces variabilis</i>	100	100	MK020174.1	<i>Talaromyces</i> sp.	Tsp
8. <i>Wojnowiciella dactylidis</i>	99	99	LT990661.1	<i>Wojnowiciella dactylidis</i>	Wd
9. <i>Fusariella hughesii</i>	100	94	MH859784.1	<i>Fusariella</i> sp.	Fsp
10. <i>Aspergillus inflatus</i>	100	99	MH859900.1	<i>Aspergillus inflatus</i>	Ai
11. <i>Parapyrenochaeta acaciae</i>	99	100	NR_155674.1	<i>Parapyrenochaeta acaciae</i>	Paa
12. <i>Fusarium domesticum</i>	100	95	MH855596.1	<i>Bisifusarium</i> sp.	Bisp
13. <i>Didymella heteroderae</i>	100	99	LT592951.1	<i>Didymella heteroderae</i>	Dh
14. <i>Aureobasidium pullulans</i>	100	100	MH864403.1	<i>Aureobasidium</i> sp.	Asp
15. <i>Mortierella verticillata</i>	100	100	MH860122.1	<i>Mortierella verticillata</i>	Mv
16. <i>Beauveria caledonica</i>	100	100	KY471655.1	<i>Beauveria</i> sp.	Bsp
17. <i>Ilyonectria leucospermi</i>	100	100	NR_152889.1	<i>Ilyonectria</i> sp.	Isp
18. <i>Metarhizium carneum</i>	99	98	MK164228.1	<i>Metarhizium carneum</i>	Mc
19. <i>Penicillium expansum</i>	100	100	MK513505.2	<i>Penicillium</i> sp. 1	Psp1
20. <i>Diaporthe novem</i>	99	99	MH864503.1	<i>Diaporthe novem</i>	Dn
21. <i>Epicoccum huancayense</i>	99	100	MH861244.1	<i>Pleosporales</i> sp. 2	Pl2
22. <i>Metapochonia bulbilosa</i>	100	100	MH864652.1	<i>Metapochonia bulbilosa</i>	Mb
23. <i>Clonostachys rosea</i>	100	100	KX421414.1	<i>Clonostachys rosea</i>	Cr
24. <i>Trichoderma harzianum</i>	100	100	MH971264.1	<i>Trichoderma</i> sp.	Tisp
25. <i>Diaporthe acericola</i>	100	100	NR_152507.1	<i>Diaporthe</i> sp.	Dsp
26. <i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	100	MK936040.1	<i>Cladosporium</i> sp.	Csp
27. <i>Tolypocladium geodes</i>	100	100	MH859919.1	<i>Tolypocladium geodes</i>	Tg
28. <i>Metarhizium anisopliae</i>	100	100	MH864642.1	<i>Metarhizium</i> sp.	Msp
29. <i>Parengyodontium album</i>	100	100	MH984832.1	<i>Parengyodontium album</i>	Pa1
30. <i>Parengyodontium album</i>	100	100	MK719933.1	<i>Parengyodontium album</i>	Pa
31. <i>Trichoderma koningii</i>	100	100	MK911651.1	<i>Trichoderma koningii</i>	Tk
32. <i>Diaporthe phaseolorum</i>	100	96	EU272524.1	<i>Phomopsis</i> sp.	Phsp

Tabla 4. Índices de diversidad correspondiente a cada sitio de estudio, asociado con una especie vegetal. Om= *O. mexicana*, He= *A. salvini*, y Ac= tronco en descomposición.

Índice de Simpson								
Om			He			Ac		
1.1	1.2	1.2	2.1	2.2.	2.3	3.1	3.2	3.3
0.6	0.7	0.8	0.9	0.0	0.8	0.8	0.5	0.6

6.2 Actividad enzimática y pH

Se obtuvieron los valores de actividad de 6 enzimas en el suelo analizado. Como resultado, observamos que la enzima con mayor actividad fue la POX. Esta enzima que se distingue por ser uno de los indicadores de la presencia de hongos en diferentes ecosistemas. Por otro lado, la PA también mostró valores de actividad elevada comparada con las otras enzimas. Esta enzima está relacionada con la mineralización del fósforo. Los sitios del 3.1 al 3.3 registraron la menor actividad para la PA, y en comparación con los sitios del 1.1 al 2.3. Los sitios del 2.1 al 2.3 registraron la mayor actividad para BG, CBH, NAG comparados con los otros sitios. Los pH obtenidos oscilaron entre 4.4 y 5.2 obteniendo un promedio de 4.7 (Tabla 5). Los valores de pH entran en el rango para suelos que se determinan como ácidos.

Tabla 5. Valores de actividad enzimática del suelo en los sitios de estudio. Om= *O. mexicana*, He= *A. salvini*, Ac= tronco en descomposición.

Enzima ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g SOM}^{-1}$)	Om			He			Ac		
	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
B-Glucosidasa (BG)	0.19	0.19	0.20	0.16	0.25	0.29	0.04	0.11	0.08
Lacasa (POX)	6.59	8.85	4.33	6.53	4.48	2.00	2.96	10.82	6.89
Celobiohidrolasa (CBH)	0.03	0.06	0	0.18	0.28	1.49	0.01	0.091	0.05
Fosfomonoesterasa (PA)	2.31	2.13	2.49	4.24	4.53	2.39	1.01	3.92	2.46
β -n-acetyl-glucosaminidasa (NAG)	0.24	0.21	0.27	0.25	0.30	0	0.04	0.08	0.06
Fosfodiesterasa (PDA)	0.16	0	0.09	0.13	0.77	0.11	0.12	0.26	0.19
pH	4.39	4.6	4.52	4.69	4.67	5	5.22	4.44	4.42

6.3 Cocientes estequiométricos

Los cocientes difirieron entre: valores totales, disueltos y contenidos en masa microbiana (Tabla 6). Los cocientes de N asociados a la biomasa microbiana fueron mayores que en nutrientes disueltos. Además, se observó una reducción del 50% en los valores de C:N:P en los valores disueltos. Los cocientes de biomasa microbianas mostraron una mayor proporción de C:N y P que los cocientes disueltos. Esto particularmente para el sitio He, que en general es el que tenía mayor cantidad de C respecto al N y el P.

Tabla 6. Valores de los cocientes de C:N:P y cocientes de C:N, C:P y N:P.

Sitio	Totales ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)			Disueltos ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)			Microbianos ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)		
	Om	He	Ac	Om	He	Ac	Om	He	Ac
C:N: P	222:15:1	249:17:1	296:21:1	100:6:1	121:6:1	72:3:1	42:7:1	140:11:1	42:6:1
C:N	14.5	14.9	13.6	22	27	31	7	7	42
N:P	15.3	16.6	21.4	6	6	3	15	11	140
C:P	222	248	295	101	121	73	21	6	42

6.4 Análisis estadísticos de variables ambientales.

Análisis multivariados

Se realizó una exploración gráfica las tendencias en la varianza de cada una de las variables ambientales (Figura 6), indicó que los valores de la mayoría de nuestras variables ambientales están por debajo de la media, y las variables NH_4 disponible, C microbiano, PA, BG, CBH, POX y NAG están por encima de la media aún después de la estandarización.

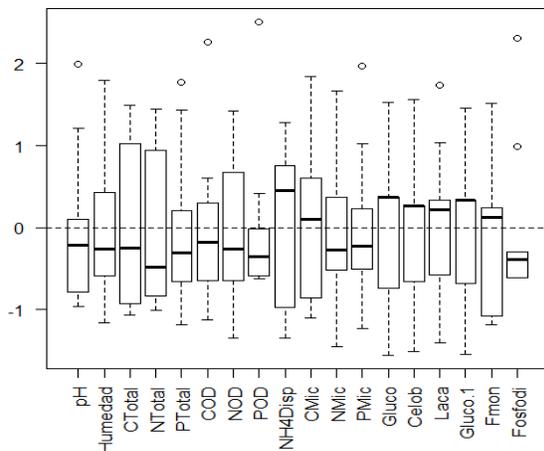


Figura 6. Boxplot mostrando la distribución de la varianza de los datos estandarizados de nutrientes, enzimas, y pH. Los bigotes indican son el error estándar.

Los resultados del análisis de correlación de Pearson (Tabla 7), mostraron correlaciones positivas (por ejemplo entre COD y PT, POD y Pmic) y negativas (por ejemplo entre el pH y POX) entre variables. Caben destacar las correlaciones positivas y estadísticamente significativas (con una $p < 0.5$) entre variables como la enzima BG con NAG y CBH; y NT con CT, Cmic y PT.

Tabla 7. Matriz de correlación de Pearson de datos ambientales. En rojo observamos las correlaciones significativas, * indica $p < 0.5$.

Var	pH	COD	NOD	POD	Cmic	Nmic	Pmic	CT	NT	PT	CBH	BG	NAG	PDA	PA	POX	NH ₄
pH	1.0																
COD	-0.19	1.0															
NOD	0.04	-0.29	1.0														
POD	-0.40	-0.07	-0.41	1.0													
Cmic	-0.14	0.09	0.06	0.26	1.0												
Nmic	0.17	0.32	-0.39	0.5	0.26	1.0											
Pmic	-0.40	0.05	-0.54	0.77*	0.38	0.14	1.0										
CT	-0.40	0.07	-0.24	0.52	0.33	0.66*	0.37	1.0									
NT	-0.33	0.04	-0.1	0.45	0.89*	0.55	0.38	0.1*	1.0								
PT	-0.26	0.76*	0.06	0.12	0.83*	0.52	0.03	0.89*	0.91*	1.0							
CBH	-0.01	0.15	0.75	-0.29	0.15	0.05	-0.46	0.08	0.01	0.25	1.0						
BG	-0.04	-0.05	0.1*	-0.52	0.09	-0.04	-0.48	0.02	-0.05	0.25	0.1*	1.0					
NAG	-0.04	-0.02	1.0*	-0.25	0.12	0.01	-0.48	0.07	-0.01	0.24	1.0*	1.0*	1.0				
PDA	0.21	0.07	0.5	0.18	0.35	0.34	-0.47	0.35	0.35	0.54	0.70*	0.70*	0.73*	1.0			
PA	-0.06	0.03	0.40	0.45	0.49	0.17	-0.51	0.43	0.4	0.76*	0.76*	0.67*	0.71	0.66	1.0		
POX	-0.70*	0.12	-0.15	0.72*	0.18	0.20	0.48	0.37	0.34	0.12	-0.32	-0.31	-0.29	-	-	1.0	
NH ₄	-0.02	0.60*	-0.47	0.61*	0.64*	0.30	0.14	0.68*	0.55	0.36	-0.20	-0.23	-0.20	0.03	0.13	0.49	1.0

El PCA los resultados del PCA coincidieron con las relaciones significativas del análisis de correlación de Pearson (Tabla 7). Se detectaron los siguientes patrones de agrupación: 1) CBH, BG y NOD; 2) NAG, PDA y PA; 3) NT y CT; 4) POX, POD y NH₄⁺. Se detectó una contribución mayoritaria en el primer componente de CT, NT, PT, Cmic, con relación al resto de las variables (Figura 8A); mientras que en la segunda dimensión las variables CBH, BG, NAG, PDA, PA, Pmic mostraron una mayor contribución (Figura 8B). Los dos primeros componentes lograron explicar el 61.81% de la varianza; la primera dimensión con un valor de 43.14 y la segunda con un valor de 18.67%.

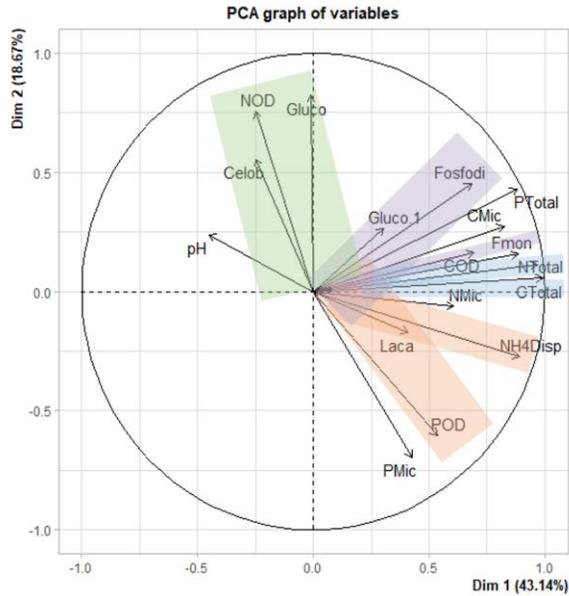
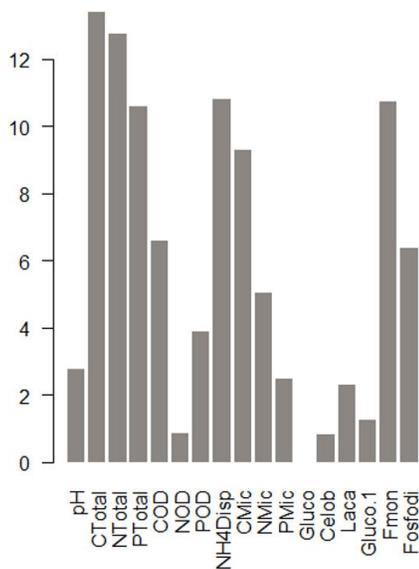


Figura 7. Análisis de componentes principales de variables biogeoquímicas.

A) Contribución de las variables(43.14%)



B) Contribución de las variables(18.67%)

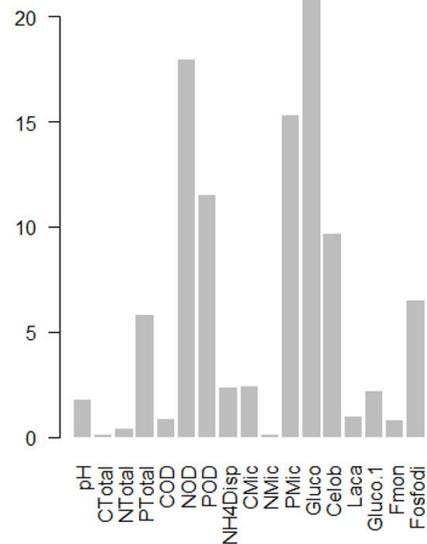


Figura 8. Contribución individual de las variables en los primeros dos componentes del PCA, el grafico A corresponde a la contribución de las variables en el primer componente y la B a la contribución en el segundo componente.

Se observó una estructura diferencial entre las comunidades correspondientes a cada sitio de muestreo. Este patrón fue muy evidente en los dendogramas de distancia, donde con base a los datos biogeoquímicos se logró recuperar una agrupación de los sitios asociados a *O. mexicana* (1.1, 1.2, y 1.3), mientras que en los sitios asociados con el helecho y el tronco en descomposición la agrupación fue menos marcada con los sitios 2.3 y 3.1 siendo diferentes. En cuanto los datos de diversidad fúngica, la heterogeneidad fue muy marcada y no se logró detectar patrones de agrupamiento con relación a los sitios (Figura 9).

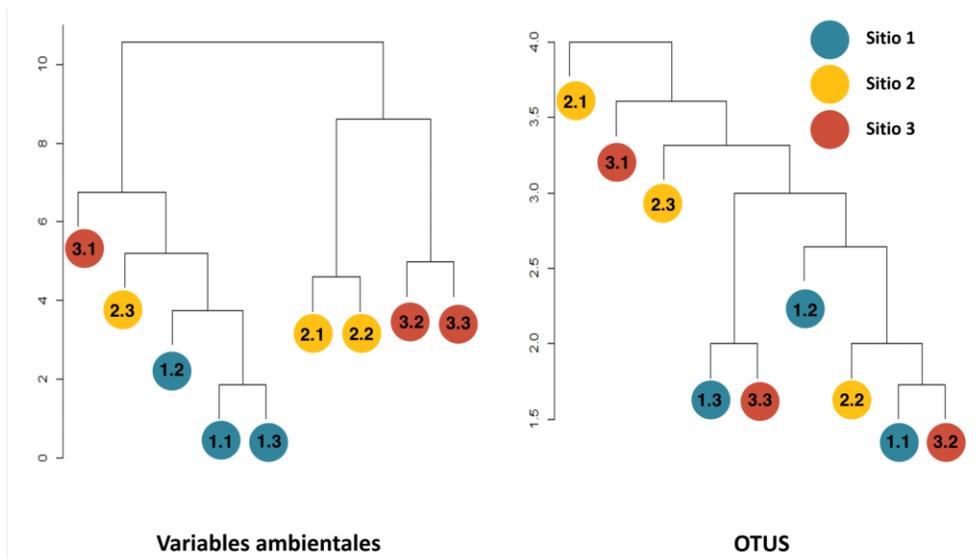


Figura 9. Dendogramas de distancias construido con variables ambientales (enzimas, pH, y C, N y P totales, disueltos y microbianos) y los OTUs.

De forma detallada, a partir de las muestras de suelo provenientes del sitio asociado a *O. mexicana* se aislaron los OTUs: *Pleosporales* sp. 1, *Talaromyces* sp., *Fusariella* sp., *Metapochonia bulbillosa*, *Mortierella verticillata*, *Cladosporium* sp., *Setophaeosphaeria hemerocallidis*, *Diaporthe* sp., *Tolypocladium geodes*, *Parapyrenochaeta acaciae* y *Aureobasidium* sp. En las submuestras colectadas en el sitio correspondiente al helecho, obtuvimos *Bisifusarium* sp., *Gaeumannomyces* sp., *Aspergillus inflatus*, *Metarhizium* sp., *Penicillium* sp. 1, *Beauveria* sp., *Diaporthe novem*, *Didymella heteroderae*, *Trichoderma koningii*, *Bisifusarium* sp., *T. geodes*, *Wojnowiciella dactylidis*, *Metarhizium carneum*, y *Mortierella turficola*. Mientras que en el sitio asociado con el tronco caído registramos *Trichoderma* sp.,

Ilyonectria sp., *Cladosporium* sp., *Phomopsis* sp., *M. turficola* y *Furcaterigmium furcatum*, *Clonostachys rosea*, *Pleosporales* sp. 2, *Metapochonia bulbillosa*, *T. geodes* y *Diaporthe* sp. (Figura 10). En términos generales, cada sitio mostró una comunidad fúngica diferente, aunque algunas especies se comparten entre algunos sitios, tal es el caso de *T. geodes*. También hay submuestras donde como la 2.2, en donde solo se registró una especie, *D. noven* (Figura 8).

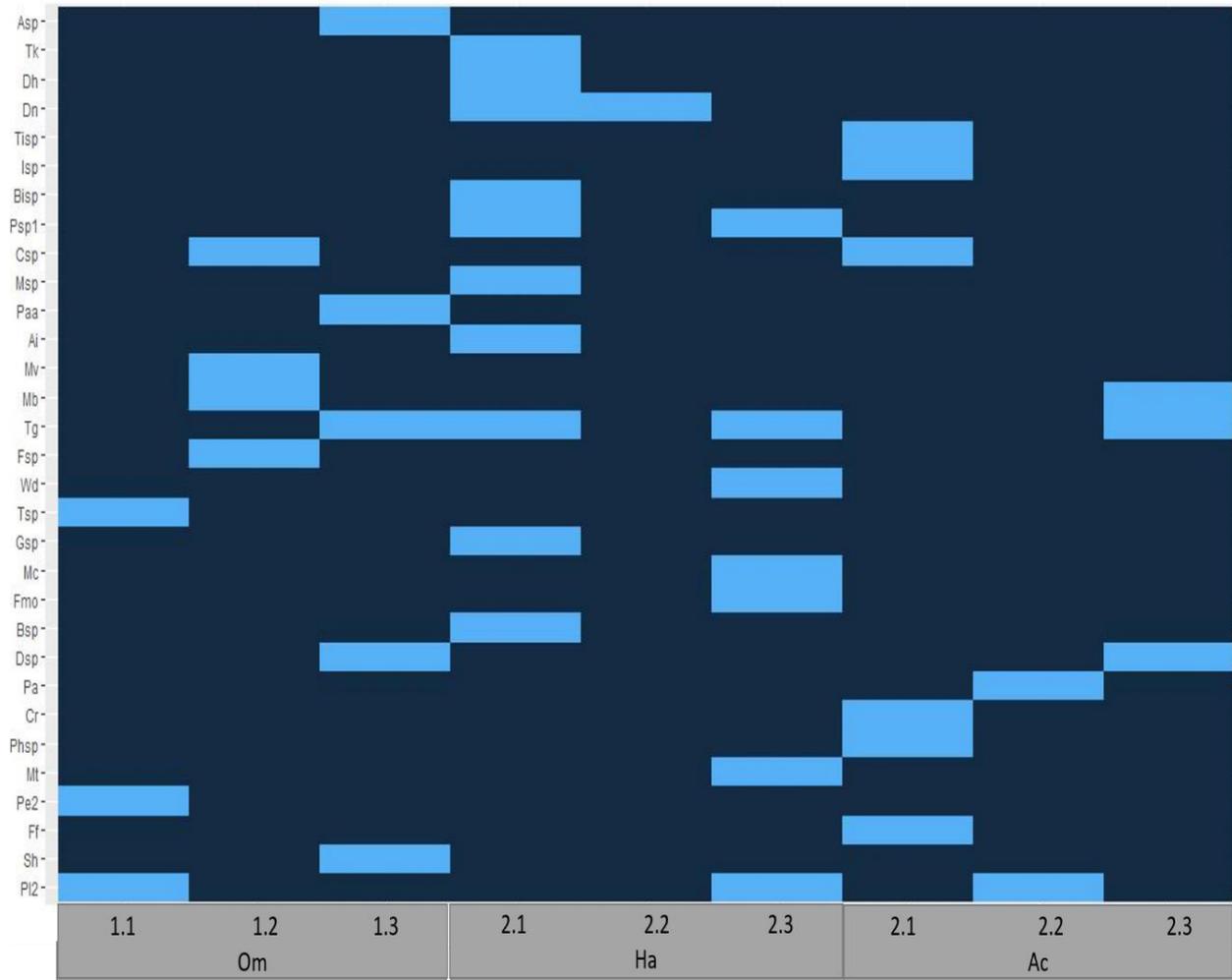


Figura 10 Estructura de las comunidades fúngicas en los sitios de muestreo, donde el color azul claro indica la presencia y el color azul obscuro la ausencia de OTUs. La nomenclatura corresponde a la utilizada en la Tabla 3.

En cuanto a la relación que existe entre los OTUs fúngicos y algunas variables ambientales,

detectamos que las submuestra 1.2 y 2.3 se encuentran fuertemente diferenciadas del resto por el pH, caracterizándose por la presencia de especies fúngicas tales como *M. bulbilosa* y *Fusariella* sp. Por otro lado, valores totales de C, N, y P tienen una fuerte influencia en los sitios 2.1 y 2.2, distinguiéndose por la presencia de *T. geodes* y *Penicillium* sp. 1. Por otro lado la actividad enzimática de la POX está fuertemente relacionada con los sitios 2.1 y 2.3. Asimismo, los datos sugieren que BG, CBH y NAG, están relacionadas con *T. geodes*; PA y la PDA estuvieron relacionadas con *Penicillium* sp. 1. Finalmente, los demás sitios y especies fúngicas no mostraron señales de ser directamente afectados por las variables que se midieron (Figura 11).

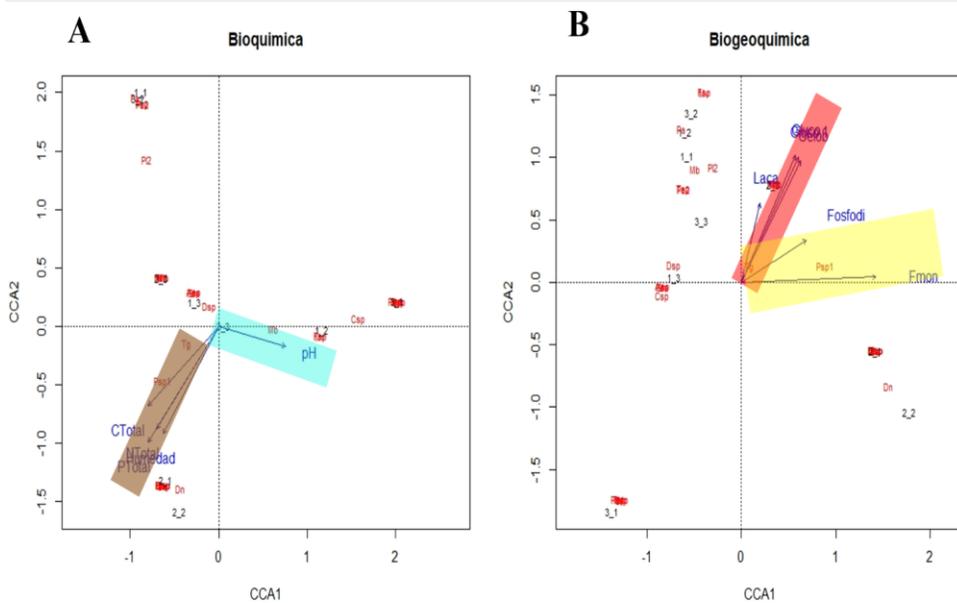


Figura 11. Análisis de canónico de correlación de la comunidad fúngica con relación a variables biogeoquímicas selectas.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo representa el primer esfuerzo exhaustivo y específico para estudiar la diversidad de micromicetes edáficos cultivables para un sistema de BMM prístino en México. Los resultados sugieren que el sistema analizado es un ecosistema heterogéneo, tanto en su composición abiótica (mostrado en el dendrograma de distancias ambientales) como biótica (en términos de las comunidades fúngicas). El aislamiento de 32 OTUs dentro de un transecto 10 × 10 × 10 m, refleja la alta diversidad fúngica edáfica de esta localidad prístina de BMM en

Oaxaca. En esta pequeña área, registramos el 2.51% de la totalidad de especies que se han reportado para el BMM mexicano (incluyendo especies macroscópicas, microscópicas y líquenes), de acuerdo con la revisión realizada por del Olmo et al (2017). Además, al comparar con otros estudios para BMM en México, donde se reportan 25 especies de hongos microscópicos en promedio por trabajo, se puede testificar que en el presente trabajo la diversidad de micromicetes cultivables es considerable.

Nuestros resultados son comparables con los 31 ejemplares de hongos descritos para Oaxaca (Álvarez-Aquino et al 2012), evidenciando la alta diversidad que albergan localidades prístinas de BMM en Oaxaca. Al comparar nuestros resultados con otros trabajos (donde se utiliza una metodología dependiente de cultivo para evaluar la diversidad), observamos resultados similares en cuanto a la riqueza fúngica a pesar de la microescala a la cual se realizó esta investigación. Por ejemplo, el trabajo realizado por Velez et al (2016) en Cuatro Ciénegas, México donde se colectaron muestras de suelo y agua para 5 sitios distribuidos en un gradiente ambiental de varios kilómetros, obteniendo un total de 37 OTUs. Otro ejemplo es el trabajo de Devi et al (2012), donde se obtuvieron 22 géneros de hongos, para un gradiente altitudinal en el Himalaya (al este de la India) entre los 24 msnm y 2,000 msnm, comparado con los 18 géneros para este trabajo.

Cabe destacar que se obtuvieron 14 nuevos registros para el BMM en México (Tabla 8), lo cual resalta la falta de conocimiento sobre la microbiota edáfica. *Trichoderma koningii* fue el único micromicete, que coincide con registros previos para el estado de Veracruz (Heredia-Abarca et al 2008). Se cree que este hongo tiene una distribución restringida a Europa y el este de América del Norte, asociada a plantas y actuando como agente fungicida (Samuels et al 2006). Lo que podría indicar que es uno de los hongos que puedan considerarse un organismo indicador de bosques en buen estado de conservación de los BMM de México.

Especies dominantes

Las especies que mostraron mayor abundancia fueron *Tolypocladium geodes* y *Cladosporium* sp. Por un lado, los miembros del género *Tolypocladium* incluyen una variedad de patógenos de insectos (entomopatógenos), parásitos de otros hongos (micoparásitos), endófitos de la madera

de árboles, y han sido aislados de talos de líquenes y del suelo. Particularmente, *T. geodes* es un entomopatógeno bien reconocido, que además se ha encontrado colonizando esponjas de mar (Blount 2018; Kebede et al 2017). Recientemente, se ha evidenciado que es posible utilizar a *T. geodes* como agente para la biorremediación del suelo contaminado con algunos pesticidas como el acetocloro que es un herbicida cloroacetanilido usado para controlar la mayoría de los pastos anuales y otras hierbas de hojas anchas (Erguven 2018).

Tabla 8. Listado de los registros nuevos de hongos para el BMM mexicano.

Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Didymella heteroderae</i>
		<i>Parapyrenochaeta acaciae</i>
		<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>
		<i>Wojnowiciella dactylidis</i>
	Sordariomycetes	<i>Clonostachys rosea</i>
		<i>Diaporthe novem</i>
		<i>Furcasterigmium furcatum</i>
		<i>Metapochonia bulbillosa</i>
		<i>Metarhizium carneum</i>
		<i>Parengyodontium album</i>
		<i>Tolypocladium geodes</i>
	Eurotiomycetes	<i>Aspergillus inflatus</i>
Mortierellomycota	Mortierellomycetes	<i>Mortierella turficola</i>
		<i>Mortierella verticillata</i>

Por otro lado, muchas de las especies del género *Cladosporium* están asociadas a plantas, como saprobios o patógenos (Farr y Rossman 2016), y únicamente pocas son conocidas para el suelo y muchas predominan en las regiones tropicales y subtropicales (Hamayun 2010; Hoog et al 2000). Las especies de *Cladosporium* tienen un amplio rango ecológico, apareciendo en todo tipo de sustratos, y colonizando un amplio rango de hospederos, ya sea biotroficamente o en tejidos muertos asociados con procesos de descomposición. Sólo un número limitado de especies son

plurívoras. Por lo que, muchas especies son saprobias, con un nicho ecológico limitado. Schubert et al (2007) describen, por ejemplo, algunos aislados de *Cladosporium herbarum* pertenecientes a un complejo de ambientes hipersalinos. Mientras que Zalar et al (2007) reportan varias especies parecidas a *Cladosporium sphaerospermum* en plantas halófilas y halotolerantes. Por otro lado, algunas especies de *Cladosporium* son fungícolas, es decir, usan a otros hongos como sustrato (Heuchert et al 2005). Finalmente, varias especies son biotróficas (mostrando especificidad por su hospedero), produciendo la enfermedad de mancha de hoja (Bensch et al 2012).

Nuestros resultados coinciden con un gran número de taxa fúngicos característicos del suelo, tales como los géneros *Acrostalagmus* (syn. *Verticillium*), *Alternaria*, *Cephalosporium* (syn. *Acremonium*), *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Verticillium*, *Zygorhynchus* (Watanabe 2002); además de *Mucor* y *Penicillium* quienes se encuentran comúnmente en suelos de áreas con climas de templados a fríos. Así como, *Aspergillus* que prolifera en suelos tropicales, y *Trichoderma* que se presenta frecuentemente en suelos húmedos y/o ácidos. Lo que puede implicar la confirmación de especies específicas para el área biogeográfica del BMM, y que proliferan bajo en condiciones específicas.

Cabe destacar la presencia de los miembros del phylum *Mortierellomycota*: *M. verticilata* y *M. truficola*, asociados al de especies vegetales clave analizadas en el presente estudio (*O. mexicana* y *A. salvini*). Ya que esto sugiere una posible asociación a nivel rizósfera con los hospederos vegetales, la cual les conferiría ventajas nutrimentales y de protección contra patógenos. Aspectos que deberá ser evaluado en experimentos de invernadero.

Con base a sus capacidades funcionales reportadas en la literatura, los 32 OTUs encontrados, se pueden agrupar en cuatro grandes gremios funcionales (Tabla 9). El primer grupo está conformado por hongos saprobios (ej. *Parengyodontium álbum*), el segundo por fitopatógenos (ej. *Clonostachys rosea*), el tercero por hongos con capacidades fungicidas (e.g. *Trichoderma koning*), y el último por los entomopatógenos (ej. *Metarhizium sp.*). Además, registramos varios ordenes de hongos que incluyen endófitos de raíces de plantas gramíneas, como Hypocreales, Pleosporales y Eurotiales. En conjunto estos resultados destacan la gran implicación de los hongos en los ciclos biogeoquímicos del BMM, ocupando diversos nichos ecológicos.

Es de destacar la presencia de gremios funcionales tales como los fitopatógenos, los

entomopatógenos, los endófitos, y los micopatógenos. Esto, debido a la alta posibilidad de que estos gremios, actúen como agentes reguladores de poblaciones vegetales, de invertebrados y fúngicas, mediante mecanismos de interacción tanto antagónicos como de sinergia. Por ejemplo, especies de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Tolypocladium* son ampliamente reconocidas por su uso en el control de plagas de invertebrados (Ownley et al 2004; Zimmermann 1993).

Tabla 9. Asignación aproximada de los OTUs a gremios funcionales con base en la literatura.

Gremios	OTUs
Fitopatógeno	<i>Clonostachys rosea</i> <i>Diaporthe novem</i> <i>Ilyonectria</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i> <i>Wojnowiciella dactylidis</i>
Endófito	<i>Metapochonia bulbillosa</i>
Micopatógeno	<i>Trichoderma koningii</i> <i>Trichoderma</i> sp.
Entomopatógeno	<i>Beauveria</i> sp. <i>Metarhizium carneum</i> <i>Metarhizium</i> sp. <i>Tolypocladium geodes</i>
Saprobio, patógeno oportunista	<i>Aspergillus inflatus</i> <i>Aureobasidium</i> sp. <i>Bisifusarium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp. <i>Didymella heteroderae</i> <i>Furcasterigmium furcatum</i> <i>Mortierella turficola</i> <i>Mortierella verticillata</i> <i>Parengyodontium album</i> <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Pyrenochaeta acaciae</i>

Actividad coenzimática

Se sabe, que la disponibilidad de los nutrientes en el suelo es resultado de la actividad de especies microbianas, entre las que se encuentran los micromicetes. Por lo tanto, la liberación de nutrientes (moléculas orgánicas), depende de la producción de coenzimas así como de la mineralización biológica. Nuestros resultados confirmaron los altos niveles de actividad en enzimas cuyas actividades se ven favorecidas a pH ácidos en suelo, tales como la: celobiohidrolasa, la β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. Por otro lado, en el caso de la fosfomonoesterasa y la fosfodiesterasa, su pH óptimo se encuentra en un intervalo que comprende tanto ácido como alcalino (fosfomonoesterasa ácida y alcalina; Turner 2010), por su actividad en el suelo del BMM no es de sorprender. Cabe mencionar que las variaciones que detectamos en los valores de pH entre los sitios de muestreo, potencialmente podrían conferir una alta heterogeneidad al BMM en término de parámetros coenzimáticos.

Los valores altos que registramos para la actividad de la POX (6.18), coinciden con los reportados para bosques de encinos (valores máximos de $4 \pm .5$). Cabe destacar, que el pico de actividad para esta enzima está reportado para la temporada lluviosa, y se correlaciona de forma positiva con la diversidad fúngica (Criquet et al 2000). Recordemos que en los BMM las lluvias y la entrada de agua por vía horizontal (neblina) son constates, en especial en la temporada de lluvias, lo cual coincide con el momento en que fue realizado el muestreo, lo que podría explicar los altos valores de actividad para la POX. Además, estos resultados sugieren que los miembros de la comunidad fúngica son catalizadores involucrados en la descomposición de la lignina, actuando también son agentes en la de desintoxicación, polimerizando fenoles solubles y, por lo tanto, contribuyendo a la humificación (Hilgers et al 2018; Huber et al 2016; Kim et al 2018; Theuerl y Buscot 2010).

Los valores que obtuvimos para la fosfomonoesterasa (2.34) están por debajo de la media con relación a otros trabajos realizados en el suelo de diversos ecosistemas terrestres en los siete continentes (11.6), con base a la revisión realizada por Margalef et al (2017). Si consideramos que los niveles de fosfatasa del suelo controlan fuertemente las vías bióticas del fósforo (P), podemos asumir que este elemento esencial para la vida, es limitante en el suelo del BMM. Esto, en conjunto con los valores de P en biomasa microbiana, nos sugiere la capacidad de los microorganismos del suelo para retener y resguardar nutrientes para así superar las limitaciones

locales de nutrientes (Boberg et al 2014; Kyaschenko et al 2017; Kyaschenko et al 2019).

La dinámica y la función de la comunidad microbiana, así como su rol en la dinámica de nutrientes está determinada por la heterogeneidad metabólica intraespecífica. A nivel comunidad, las correlaciones positivas de Pearson observadas entre las enzimas NAG, BG y CBH, podrían indicar que a pesar de la alta heterogeneidad ambiental que caracteriza al BMM, la comunidad microbiana presenta cierto grado de reciprocidad metabólica, reflejada en su capacidad enzimática para la obtención de fuentes de energía de carbono.

Específicamente en hongos, se han hecho varios esfuerzos por investigar su implicación en procesos ecosistémicos. Como resultado se ha reconocido el rol funcional de especies endófitas de raíces con la capacidad para obtener carbono de 27 fuentes diferentes (Knapp et al 2016), identificando taxa con mayor capacidad como *Fusarium* sp. (que demostró la capacidad para obtener carbono de 85 fuentes diferentes). En el mismo trabajo, los autores documentaron que cada sustrato, podría ser degradado por al menos cuatro especies fúngicas diferentes, sugiriendo una complementariedad metabólica, exponiendo la actividad de 19 enzimas fúngicas incluyendo fosfatasa y glucosidasa. Estos datos, coinciden con nuestros resultados de diversidad taxonómica (al reportar taxones tales como *Fusarium* sp., y la presencia de representantes dentro de los órdenes Hypocreales, Pleosporales y Eurotiales), y de actividad coenzimática evidenciando que la microbiota edáfica representa una pieza clave en el reciclaje de nutrientes, y funcionamiento general del ecosistema. Por lo que el siguiente paso sería realizar un estudio más detallado sobre las capacidades enzimáticas individuales de estos organismos, para así identificar especies clave.

Cocientes de C:N:P

La comparación de las cocientes C:N:P totales, disueltos y en biomasa microbiana sugiere el movimiento de los nutrientes por eluviación (Kappelle y Uffelen 2006). En un contexto global, nuestros cocientes de C:N:P totales (256:18:1) del suelo proveniente del BMM de Oaxaca, se aproximaron a los reportados en la literatura (287:17:1). Sin embargo, los valores observados en biomasa microbiana (85:5:1) difieren significativamente (42:6:2; Xu et al 2013; Xu et al 2017). Esto coincide con la presencia de hongos especializados en la degradación y utilización de compuestos ricos en carbono como la celulosa y la lignina, sugiriendo su capacidad para retener

nutrientes tales como el C dentro de su biomasa.

Particularmente, los hongos saprobios tienen una mayor capacidad para obtener el C de sustratos orgánicos, en comparación con los patógenos o simbiótros (Dai et al 2018). Esto es relevante para nuestro sistema, ya que en ambientes como el BMM, donde las tasas de descomposición y los ciclos de nutrientes son lentos debido a la altitud, que a su vez conlleva a temperaturas bajas (Looby y Treseder 2018; Vitousek et al 1994); estos organismos cumplen con roles funcionales irremplazables para la comunidad vegetal y animal facilitándoles el acceso a nutrientes que se encuentran en formas recalcitrantes.

En el caso del fósforo, y los cocientes observados de C:P (278.3), nos indican que podría tratarse de un factor limitante con base a los criterios de Sinsabaughe et al (2009). Conjuntamente, se observó una actividad considerable de la fosfomonoesterasa, sugiriendo que la obtención de P de los habitantes del suelo en este bosque depende de aquellos con capacidades metabólicas para acceder a este elemento.

Los resultados del CCA mostraron la conexión entre enzimas asociadas con la obtención de P y organismos como *T. geodes*, y *Penicillium* sp. 1. Cabe mencionar que estos micromicetes han sido reconocidos por su alta producción de fosfatasa ácida y alcalina extracelular (Gómez-Guillán 2004; Jones et al 1991; Silva y Vido 2001), confiriéndoles la capacidad de explotar sustratos ricos en P en sistemas limitados por este elemento. Considerando que la enzima fosfomonoesterasa mostró la mayor actividad en el suelo analizado, y su fuerte asociación con *Penicillium* sp., es posible inferir que este micromicete contribuye a la disponibilidad de P en el ecosistema. Por lo que se sugiere realizar trabajos que investiguen experimentalmente estas capacidades metabólicas con los aislados obtenidos del suelo de Santiago Comaltepec, las cuales de comprobarse sería de utilidad para la biorremediación del sistema.

Heterogeneidad del sitio

Las comunidades microbianas a diferencia de los macroorganismos, tienen dinámicas que se han explorado como nichos discretos, donde en cada nicho se presentan diferencias ambientales marcadas. Por ello, existe una mayor posibilidad de especiación en relación con lugares donde las variables ambientales son continuas. Como hemos reportado, la mayoría de nuestros resultados, tanto como para los valores biogeoquímicos, de actividad enzimática y diversidad

fúngica mostraron patrones heterogéneos incluso a una pequeña escala geográfica. Lo que nos sugiere la existencia de estos nichos discretos, favoreciendo la prevalencia de organismos con adaptaciones a las diferentes condiciones locales. Esto resulta en una mejor resiliencia del sistema (Prosser 2007).

Es por esto, que estudios dirigidos a explorar la diversidad microbiana desde un enfoque funcional son relevantes. Ya que, si los estudios se limitan al componente macroscópico, tendríamos una historia discontinua de los procesos en los BMM, careciendo así de elementos para generar estrategias de conservación y de restauración robustas. Estos trabajos, proporcionarán información valiosa sobre organismos funcionalmente relevantes en los procesos de translocación de nutrientes. Como lo sugieren Kyaschenko et al (2017), al comparar bosques de pino jóvenes con bosques más viejos; concluyen que la diversidad funcional de la comunidad fúngica, así como del equilibrio competitivo que existen entre diferentes capas del bosque, perpetúa a los ciclos de nutrientes a largo plazo, esto asociado a procesos que suceden a una micro-escala. Ya que existe una relación entre la composición de la capa de humus y la edad de los bosques. Si bien, los sitios de muestreo dentro de la localidad de estudio tienen la misma edad, los eventos, y las condiciones microclimáticas que se producen a nivel vertical, hacen que no hablemos de el mismo bosque, ni de la misma conformación fúngica. Esto evidencia que, en microbiología, la escala espacial es diferente a aquella implementada en estudios macroecológicos.

En este aspecto, podemos concluir en la importancia del mantenimiento de condiciones microclimáticas tales como la temperatura y la humedad, para perpetuar las poblaciones de grupos funcionales de hongos tales como los endófitos, entomopatógenos y micopatógenos. La alteración de microclimas, por efecto por ejemplo del cambio climático, llevaría a un aumento en la abundancia de especies de hongos saprobios, líquenes y patógenos, lo que llevaría a alterar la diversidad de plantas y animales como lo señala Looby y Treseder (2018).

Comunidades fúngicas y variables ambientales

Se ha observado que con valores de pH ácidos (por debajo de 5.5) el crecimiento y presencia de bacterias en el suelo se puede ver afectado. Patrón opuesto a lo reportado para la comunidad fúngica, la cual por lo general tiene la capacidad de proliferar en amplios rangos de pH (Rousk et

al 2010a). Esta preferencia varía entre especies (Domsch et al 1980; Rousk et al 2010b), sin embargo se puede aseverar que representa una ventaja para la colonización del suelo del BMM. En este sentido, es posible que las interacciones competitivas entre hongos y bacterias puedan, en parte, estar impulsando los cambios observados en la comunidad fúngica a través de un fuerte gradiente de cambio en la comunidad bacteriana (Rousk et al 2008). Por lo que realizar estudios de interacción *in vitro*, podría contribuir al entendimiento de estos mecanismos.

Al realizar un análisis de CCA, exploramos las relaciones entre sitios y organismos, detectando la fuerte influencia del pH, como el sitio (1.3 y 1.2) sobre la estructura de las comunidades. Esto quizás está asociado con el favorecimiento de la actividad de enzimas oxidativas, por lo tanto, la proliferación potencial de gremios saprobios (Sinsabaugh et al 2008). Además, podemos predecir que en el sitio 2.3 la actividad de la lacasa está siendo determinante para el proceso de degradación de la materia orgánica. Esto coincide con la actividad que se ha registrado por en donde las condiciones óptimas para la lacasa comienzan a partir de pH 4.5, con un pico en 5.5 (Criquet et al 2000).

Dentro de un transecto de 10 m, recuperamos una riqueza taxonómica considerable, así como una diversidad funcional destacable. Identificamos la presencia de cuatro grupos funcionales, que mantienen el óptimo funcionamiento en términos ecológicos la localidad de BMM evaluada, siendo un componente clave en la regulación de los ciclos biogeoquímicos. Por lo tanto, este componente es una pieza irremplazable para asegurar la provisión a largo plazo de servicios ecosistémicos tales como reservas de carbono, la filtración y acumulación de agua, así como brindar de recursos naturales a las poblaciones tanto de plantas animales y humanos de estas zonas, así como a nivel mundial.

8. CONCLUSIONES

- Registramos una diversidad taxonómica considerable de micromicetes edáficos en la localidad prístina de BMM analizada. Esto, con base en la comparación con otros trabajos publicados para localidades mexicanas de BMM distribuidas a lo largo de la república mexicana.
- El presente trabajo, presenta evidencia a favor de la gran riqueza funcional

de los micromicetes edáficos en el BMM, representada por fitopatógenos, endófitos, micopatógenos, entomopatógenos, saprobios y patógenos oportunistas.

- El alto número de especies micopatógenas, entomopatógenas y fitopatógenas, sugiere procesos bióticos de autorregulación del sistema.
- Los datos biogeoquímicos evidenciaron una alta heterogeneidad ambiental, incluso a la microescala de $10 \times 10 \times 10$ m. Esta característica del suelo del BMM debe ser considerada en los planes de manejo y conservación, asegurando el mantenimiento de las capacidades funcionales del ecosistema.
- Se postula al ascomycete *T. geodes* como una especie clave en el suelo del bosque, debido a que: 1) presentó una alta abundancia, 2) se registró en los tres sitios de estudio, 3) mostró una correspondencia con enzimas para la obtención de C y N, y la concentración de nutrientes totales (C, N, P), por lo que podría desempeñar un rol funcional relevante en la biodisponibilidad de C y N, y 4) pertenece al gremio funcional de los entomopatógenos, actuando potencialmente como regulador de las poblaciones de invertebrados.
- Considerando que la enzima fosfomonoesterasa mostró la mayor actividad en el suelo analizado, y su fuerte asociación con *Penicillium* sp., se infiere que este micromicete podría contribuir a la disponibilidad de P en el ecosistema. Por lo que se sugiere realizar trabajos que investiguen experimentalmente estas capacidades metabólicas, las cuales de comprobarse sería de utilidad para la biorremediación del sistema.
- La presencia de miembros del phylum *Mortierellomycota* en el suelo asociado a especies vegetales clave analizadas en el presente estudio (*O. mexicana* y *A. salvini*) sugiere su asociación a nivel rizósfera, confiriendo a los hospederos ventajas nutrimentales y de protección contra patógenos. Aspectos que deberán ser evaluados en experimentos de invernadero.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta V, MA Tabatabai. 2000. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* 31: 85-91.
- Adhya TK, Lal B, Mohapatra B, Paul D, S Das. 2018. *Advances in soil microbiology: recent trends and future prospects*. Singapore, Springer.
- Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, R Valenzuela. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: S76- S81.
- Ahmad Z, Ateeq M, M Arshad. 2001. Soil enzymes research: a review. *OnLine Journal of Biological Sciences* 1: 299-307.
- Alfonso-Corrado C, Naranjo-Luna F, Clark-Tapia R, Campos JE, Rojas-Soto OR, Luna-Krauletz MD, ... N Pacheco-Cruz. 2017. Effects of environmental changes on the occurrence of *Oreomunnea mexicana* (*Juglandaceae*) in a biodiversity hotspot cloud forest. *Forests*, 8: 261.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Álvarez-Arteaga G, Krasilnikov P, NE García-Calderón. 2012. Vertical distribution and soil organic matter composition in a montane cloud forest, Oaxaca, Mexico. *European Journal of Forest Research* 131: 1643-1651.
- Álvarez-Aquino C, Williams-Linera G, AC Newton. 2004. Experimental native tree seedling establishment for the restoration of a Mexican cloud forest. *Restoration Ecology*, 12: 412-418.
- Andrén O, J Balandreau. 1999. Biodiversity and soil functioning—from black box to can of worms? *Applied Soil Ecology* 13: 105-108.
- Andrén O, Brussaard L, M Clarholm. 1999. Soil organism influence on ecosystem-level processes—bypassing the ecological hierarchy? *Applied Soil Ecology* 11: 177-188.
- Arias RM, Heredia-Abarca GA, Sosa VJ, LE Fuentes-Ramírez. 2012. Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores under different coffee production systems and in a tropical montane cloud forest patch in Veracruz, Mexico. *Agroforestry Systems* 85: 179-193.

- Atkinson CJ, Fitzgerald JD, NA Higgs. 2010. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant and Soil* 337: 1-18.
- Avellaneda-Torres LM, Muñoz LMM, Cuenca CEN, Nieves JS. 2012. Actividades enzimáticas en consorcios bacterianos de suelos bajo cultivo de papa con manejo convencional y bajo pastizal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín* 65: 6349-6360.
- Baldrian P. 2014. Distribution of extracellular enzymes in soils: spatial heterogeneity and determining factors at various scales. *Soil Science Society of America Journal* 78: 11-18.
- Baldrian P. 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil Environment* 55: 370– 378.
- Baldrian P, J Šnajdr. 2011. Lignocellulose-degrading enzymes in soils. En: G. Shukla, and A. Varma (eds), *Soil enzymology*. Springer-Verlag, Berlin. 167-186 pp.
- Bautista-Cruz AA, Montaña NM, Camargo-Ricalde SL, L Pacheco. 2014. Hongos micorrizógenos arbusculares y nutrimentos del suelo asociados a cuatro especies de helechos en dos ecosistemas de Oaxaca, México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20: 199-212.
- Behie SW, Zelisko PM, MJ Bidochka. 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336: 1576-1577.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, PW Crous. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72: 1-401.
- Blount RR. 2018. Secondary Metabolism in *Tolyocladium*: Characterization, Ecology, Evolution and Regulation. Tesis Doctoral, Universidad de Oregon.
- Boberg JB, Finlay RD, Stenlid J, Ekblad A, BD Lindahl BD. 2014. Nitrogen and carbon reallocation in fungal mycelia during decomposition of boreal forest litter. *PloS One*, 9: 3.
- Bremner JM. 1996. Nitrogen-Total. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods* 5: 1085-1121.
- Bruijnzeel, L. A. (2004). *Tropical montane cloud forest: a unique hydrological case*. Cambridge University Press.
- Bruijnzeel LA, J Proctor. 1995. Hydrology and biogeochemistry of tropical montane cloud

- forests: what do we really know? In Tropical montane cloud forests. Springer, New York.
- Burns RG. 1982. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 423-427.
- Caldwell BA. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* 49: 637-644.
- Camacho-Morales RL, Gerardo-Gerardo JL, Navarro KG, Sánchez JE. 2017. Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Revista Argentina de Microbiología* 49: 189-196.
- Cannon PF, Sutton BC. 2004. Microfungi on wood and plant debris. En: *Biodiversity of fungi*. Academic Press.
- Carrier M, Loppinet-Serani A, Denux D, Lasnier JM, Ham-Pichavant F, Cansell F, C Aymonier. 2011. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy* 35: 298-307.
- Challenger A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro. Conabio, Instituto de Biología, UNAM y Agrupación Sierra Madre, S.C., México.
- Cheek M, Nic Lughadha E, Kirk P, Lindon H, Carretero J, Looney B, ... T Niskanen. 2020. New scientific discoveries: Plants and fungi. *Plants, People, Planet*, 2: 371-388.
- Cox F, Barsoum N, Lilleskov EA, MI Bidartondo. 2010. Nitrogen availability is a primary determinant of conifer mycorrhizas across complex environmental gradients. *Ecology Letters* 13: 1103-1113.
- Criquet S, Farnet AM, Tagger S, J Le Petit. 2000. Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: influence of certain biotic and abiotic factors. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1505-1513.
- Criquet S, Tagger S, Vogt G, Iacazio G, J Le Petit. 1999. Laccase activity of forest litter. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1239-1244.
- Dai Z, Enders A, Rodrigues JL, Hanley KL, Brookes PC, Xu J, J Lehmann. 2018. Soil fungal taxonomic and functional community composition as affected by biochar properties. *Soil Biology and Biochemistry* 126: 159-167.
- Dar GH. 2009. *Soil microbiology and biochemistry*. New India Publishing.

- del Mar Delgado-Serrano M, Escalante R, S Basurto. 2015. Is the community-based management of natural resources inherently linked to resilience? An analysis of the Santiago Comaltepec community (Mexico). *Ager. Revista de Estudios sobre Despoblación y Desarrollo Rural* 18: 91-114.
- del Olmo-Ruiz M, García-Sandoval R, Alcántara-Ayala O, Véliz M, I Luna-Vega. 2017. Current knowledge of fungi from Neotropical montane cloud forests: distributional patterns and composition. *Biodiversity and Conservation* 26: 1919- 1942.
- Devi LS, Khaund P, Nongkhlaw FM, Joshi SR. 2012. Diversity of culturable soil micro-fungi along altitudinal gradients of Eastern Himalayas. *Mycobiology* 40: 151-158.
- Díaz G, R Correa. 2014. Bosques mesófilos de montaña de México: diversidad, ecología y manejo. CONABIO.
- Domsch KH, Gams W, TH Anderson TH. 1980. *Compendium of Soil Fungi Volume 1* Academic Press, London.
- Doyle JJ, JL Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.
- Dray S, A Dufour. 2007. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* 22: 1-20.
- Eldridge DJ, M Delgado-Baquerizo. 2018. Functional groups of soil fungi decline under grazing. *Plant and Soil* 426: 51-60.
- Erguven GO. 2018. Comparison of some soil fungi in bioremediation of herbicide acetochlor under agitated culture media. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100: 570-575.
- Espinoza ME, IV Sánchez. 2010. Mamíferos de los bosques mesófilos de montaña en Chiapas. En: Pérez, M.A.F., C.C. Tejeda y E.R. Silva (Eds.). *Los bosques mesófilos*.
- Ewing B, P Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Farr DF, AY Rossman. 2016. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture*.
- Finlay BJ, Maberly SC, JI Cooper. 1997. Microbial diversity and ecosystem function. *Oikos* 209-213.

- Francioli D, van Rijssel SQ, van Ruijven J, Termorshuizen AJ, Cotton TA, Dumbrell AJ, L Mommer. 2020. Plant functional group drives the community structure of saprophytic fungi in a grassland biodiversity experiment. *Plant and Soil* 1-15.
- Gessner MO, Swan CM, Dang CK, McKie BG, Bardgett RD, Wall DH, S Hättenschwiler. 2010. Diversity meets decomposition. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 372-380.
- Gómez-Guiñán Y. 2004. Actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizosfera de *Arachis hypogaea* (Papilionaceae). *Revista de Biología Tropical* 52: 287-295.
- González-Espinosa M, Meave JA, Ramírez-Marcial N, Toledo-Aceves T, Lorea- Hernández FG, G Ibarra-Manríquez. 2012. Los bosques de niebla de México: conservación y restauración de su componente arbóreo. *Revista Ecosistemas* 21: 1- 2.
- Gordon D, Desmarais C, P Green. 2001. Automated finishing with autofinish. *Genome Research* 11: 614-625.
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, AC Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 369-378.
- Griffiths BS, Kuan HL, Ritz K, Glover LA, McCaig AE, C Fenwick. 2004. The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microbial Ecology* 47: 104-113.
- Gual-Díaz M, Rendón-Correa A. 2017. Los bosques mesófilos de montaña de México. *Agroproductividad* 10: 3-9.
- Guzmán GN. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7: 369-384.
- Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Rehman G, Kim YH, Iqbal I, ... IJ Lee. 2010. Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Mycologia* 102: 989-995.
- Hartmann M, Frey B, Mayer J, Mäder P, F Widmer. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal* 9: 1177.
- Haug I, Setaro S, JP Suárez JP. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi and ectomycorrhizas in the andean cloud forest of south Ecuador. En: *The Andean Cloud Forest*, 111-129 pp, Springer.

- Hawksworth DL, R Lücking. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum* 5: FUNK-0052-2016.
- Heredia-Abarca GA, Arias-Mota RM, S Gallina S. 2008. Hongos saprobios y endomicorrizógenos en suelos. Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz: biodiversidad, manejo y conservación. Mexico: INECOL & INE-SEMARNAT 193- 212.
- Heredia-Abarca GA. 1989. Estudio de los hongos de la Reserva de la Biosfera El Cielo, Tamaulipas. Consideraciones sobre la distribución y ecología de algunas especies. *Acta Botanica Mexicana* 7: 1-18.
- Heredia-Abarca GA. 1994. Hifomicetes dematiáceos en bosque mesófilo de montaña. Registros nuevos para México. *Acta Botanica Mexicana* 27: 15-32.
- Heredia-Abarca GA, Arias RMM, Gomez SAC. 2011. Hongos microscópicos: especies en restos vegetales y del suelo. La biodiversidad en Veracruz estudio de estado 2: 41-49.
- Hernández Becerra N. 2014. Dinámica de C, N y P y composición de la comunidad bacteriana del suelo de un gradiente de manejo agrícola en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis de Licenciatura. ENES Morelia, UNAM.
- Heuchert B, Braun U, K Schubert. 2005. Morphotaxonomic of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). *Schlechtendalia* 13: 1-78.
- Hilgers R, Vincken JP, Gruppen H, Kabel MA. 2018. Laccase/mediator systems: their reactivity toward phenolic lignin structures. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6: 2037-2046.
- Hoog GD, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Angelis DA, HG Gerrits van den Ende A, ...N Richard-Yegres. 2000. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology* 38: 243-250.
- Huber D, Ortner A, Daxbacher A, Nyanhongo GS, Bauer W, GM Guebitz. 2016. Influence of oxygen and laccase-catalyzed polymerization of lignosulfonate. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4: 5303-5310.
- Jiménez-Hernández VS, Villegas-Guzmán GA, Casasola-González JA, CF Vargas-Mendoza. 2020. Altitudinal distribution of alpha, beta, and gamma diversity of pseudoscorpions (*Arachnida*) in Oaxaca, Mexico. *Acta Oecologica* 103: 103525.
- Joca TAC, de Oliveira DC, Zotz G, Cardoso JCF, ASFP Moreira. 2019. Chemical composition

- of cell walls in velamentous roots of epiphytic *Orchidaceae*. *Protoplasma*: 1-16.
- Joergensen RG, C Emmerling. 2006. Methods for evaluating human soil microorganisms their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169: 295-309.
- Joergensen RG, F Wichern F. 2008. Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2977-2991.
- Jones DL, Willett VB. 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 991-999.
- Jones D, Smith BFL, Wilson MJ, BA Goodman. 1991. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycological Research* 95: 1090-1093.
- Kappelle M, JG van Uffelen. 2006. Altitudinal zonation of montane oak forests along climate and soil gradients in Costa Rica. En: *Ecology and conservation of neotropical montane Oak forests*. Springer.
- Kebede B, Wrigley SK, Prashar A, Rahlff J, Wolf M, Reinshagen J, Gribbon P, Imhoff JF, Silber J, Labes A, et al. 2017. Establishing the secondary metabolite profile of the marine fungus: *Tolypocladium geodes* sp. MF458 and subsequent optimisation of bioactive secondary metabolite production. *Marine Drugs* 15: 84.
- Kim S, Kang J, Megonigal JP, Kang H, Seo J, W Ding. 2018. Impacts of *Phragmites australis* on soil enzyme activities and microbial abundance of tidal marshes. *Microbial Ecology* 76: 782-790.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter D, Stalpers JA. 2008. *Dictionary of the fungi*, 10th edn. CABI, Wallingford.
- Knapp DG, GM Kovács. 2016. Interspecific metabolic diversity of root-colonizing endophytic fungi revealed by enzyme activity tests. *FEMS Microbiology Ecology* 92: 12.
- Kyaschenko J, Clemmensen KE, Hagenbo A, Karlton E, BD Lindahl. 2017. Shift in fungal communities and associated enzyme activities along an age gradient of managed *Pinus sylvestris* stands. *The ISME Journal* 11: 863-874.
- Kyaschenko J, Ovaskainen O, Ekblad A, Hagenbo A, Karlton E, Clemmensen KE, BD Lindahl. 2019. Soil fertility in boreal forest relates to root-driven nitrogen retention and carbon

- sequestration in the mor layer. *New Phytologist* 221: 1492- 1502.
- Le S, Josse J, F Husson. 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25: 1-18.
- Leonowicz A, Cho N, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, ... J Rogalski. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 41: 185-227.
- Ljungdahl Lars G, KE Eriksson. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in microbial ecology*. Springer.
- Looby CI, KK Treseder. 2018. Shifts in soil fungi and extracellular enzyme activity with simulated climate change in a tropical montane cloud forest. *Soil Biology and Biochemistry* 117: 87-96.
- Luna-Vega I, Morrone JJ, Ayala OA, DE Organista. 2001. Biogeographical affinities among Neotropical cloud forests. *Plant Systematics and Evolution* 228: 229-239.
- Magnani F, Mencuccini M, Borghetti M, Berbigier P, Berninger F, S Delzon. 2007. The human footprint in the carbon cycle of temperate and boreal forests. *Nature* 447: 849-851.
- Magurran AE. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing.
- Margalef O, Sardans J, Fernández-Martínez M, Molowny-Horas R, Janssens IA, Ciais P, ... J Peñuelas. 2017. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Scientific Reports* 7: 1-13.
- Maron JL, Marler M, Klironomos JN, CC Cleveland. 2011. Soil fungal pathogens and the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters* 14: 36-41.
- Mercado-Sierra A, GA Heredia-Abarca. 1994. Hyphomycetes asociados a restos vegetales en el estado de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Micología* 10: 33-48.
- Millberg H, Boberg J, J Stenlid J. 2015. Changes in fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles along a latitudinal gradient in Sweden. *Fungal Ecology* 17: 126-139.
- Moreno CE. 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza, España. M&T-Manuales y Tesis SEA.
- Morris MH, Pérez-Pérez MA, Smith ME, CS Bledsoe. 2008. Multiple species of ectomycorrhizal fungi are frequently detected on individual oak root tips in a tropical cloud forest. *Mycorrhiza* 18: 375-383.

- Murphy J, JP Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- Ochoa-Ochoa LM, Mejía-Domínguez NR, J Bezaury-Creel J. 2017. Priorización para la Conservación de los Bosques de Niebla en México. *Revista Ecosistemas* 26: 27-37.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, H Wagner. 2019. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6.
- Ordóñez MJ, P Rodríguez-Hernández. 2008. Oaxaca, el estado con mayor diversidad biológica y cultura de México, y sus productores rurales. *Ciencias* 91: 54-64.
- Orgiazzi A, Bardgett RD, E Barrios E. 2016. *Global soil biodiversity atlas*. European Commission.
- Osburn ED, McBride SG, Aylward FO, Badgley BD, Strahm BD, Knoepp JD, JE Barrett. 2019. Soil bacterial and fungal communities exhibit distinct long-term responses to disturbance in temperate forests. *Frontiers in Microbiology* 10: 2872.
- Ownley BH, Pereira RM, Klingeman WE, Quigley NB, BM Leckie. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. *Emerging Concepts in Plant Health Management*. Research Signpost, India, 255-269.
- Pérez CB. 2015. *Ecología y conservación de la diversidad funcional de ecosistemas en la transición mediterráneo-desierto-tropical de la Península de Baja California*. Tesis de Maestría, Universidad de Granada.
- Peršoh D, Melcher M, Flessa F, G Rambold. 2010. First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus sylvestris*. *Fungal Biology* 114: 585-596.
- Prosser JI, Bohannan BJ, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP,... AM Osborn. 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 5: 384-392.
- R Core Team. 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rains KC, Nadkarni NM, CS Bledsoe. 2003. Epiphytic and terrestrial mycorrhizas in a lower montane Costa Rican cloud forest. *Mycorrhiza* 13: 257-264.

- Rillig MC, Mummey DL. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytology* 171: 41-53.
- Rinnan R, E Bååth E. 2009. Differential utilization of carbon substrates by bacteria and fungi in tundra soil. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3611-3620.
- Rousk J, Aldén Demoling L, Bahr A, Bååth E . 2008. Examining the fungal and bacterial niche overlap using selective inhibitors in soil. *FEMS Microbiology and Ecology* 63: 350-358.
- Rousk J, Brookes PC, Bååth E. 2010a. Investigating the mechanisms for the opposing pH-relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 926-934.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, ... N Fierer. 2010b. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4: 1340-1351.
- Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México*: México. Editorial Limusa.
- Rzedowski J. 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana* 35: 25-44.
- Rzedowski J. 2006. Bosque mesófilo de montaña. En: *Vegetación de México*. CONABIO.
- Rzedowski J, R Palacios-Chávez. 1977. El bosque de *Engelhardtia (Oreomunnea) mexicana* en la región de la Chinantla (Oaxaca, México). Una reliquia del Cenozoico. *Botanical Sciences* 36: 93-127.
- Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Petrini O, Schroers HJ, IS Druzhinina. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* 56: 67-133.
- Sánchez-Ramos G, R Dirzo. 2014. El bosque mesófilo de montaña: un ecosistema prioritario amenazado. En: Gual DM, CA Rendón CA. *Bosques mesófilos de montaña de México: diversidad, ecología y manejo*. CONABIO.
- Schmit JP, GM Mueller. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* 16: 99-111.
- Schnitzer SA, Klironomos JN, HilleRisLambers J, Kinkel LL, Reich PB, Xiao K, ... M Scheffer. 2011. Soil microbes drive the classic plant diversity–productivity pattern. *Ecology* 92: 296-303.
- Schubert K, Braun U, Groenewald JZ, PW Crous PW. 2007. *Cladosporium* leaf-blotch and stem rot of *Paeonia* spp. caused by *Dichocladosporium chlorocephalum* gen. nov. *Studies in*

- Mycology 58: 95-104.
- Silva Filho GN, C Vidor. 2001. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 1495-1508.
- Sinsabaugh RL, Hill BH, JF Shah. 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 462: 795-798.
- Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, ... TB Gartner TB. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* 11: 1252-1264.
- Talbot JM, Allison SD, KK Treseder. 2008. Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Functional Ecology* 22: 955-96.
- Taylor AFS, Martin F, DJ Read. 2000. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica* L.) along north-south transects in Europe. En: *Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems*. Springer.
- Taylor DL, RL Sinsabaugh. 2015. The soil fungi: occurrence, phylogeny, and ecology. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* 4: 77-109.
- Theuerl S, F Buscot. 2010. Laccases: toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling. *Biology and Fertility of Soils* 46: 215- 225.
- Toledo T. 2009. El bosque de niebla. *Biodiversitas* 83: 1-6.
- Toljander JF, Eberhardt U, Toljander YK, Paul LR, AF Taylor. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* 170: 873-884.
- Treseder KK, JT Lennon. 2015. Fungal traits that drive ecosystem dynamics. *Microbiological Molecular and Biological Reviews* 79: 243–262
- Turner BL. 2010. Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Applied Environmental Microbiology* 76: 6485-6493.
- Valdez-Tamez V, Foroughbakhch-Pournavab R, G Alanís-Flores. 2003. Distribución relictual del bosque mesófilo de montaña en el noreste de México. *Ciencia, Universidad*

- Autónoma de Nuevo León 6: 360-365.
- Van Der Heijden MG, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, ... IR Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- Vance E, Brookes P, D Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 703-707.
- Velez P, Gasca-Pineda J, Rosique-Gil E, Eguiarte LE, Espinosa-Asuar L, V Souza. 2016. Microfungal oasis in an oligotrophic desert: diversity patterns and community structure in three freshwater systems of Cuatro Ciénegas, Mexico. *PeerJ* 4: e2064.
- Villaseñor JL. 2010. El bosque húmedo de montaña en México y sus plantas vasculares. Catálogo florístico-taxonómico. CONABIO.
- Vitousek PM, Turner DR, Parton WJ, RL Sanford. 1994. Litter decomposition on the Mauna Loa environmental matrix, Hawaii: patterns, mechanisms, and models. *Ecology* 75: 418-429.
- Walker MJ, Dorrestein A, Camacho JJ, Meckler LA, Silas KA, Hiller T, D Haelewaters. 2018. A tripartite survey of hyperparasitic fungi associated with ectoparasitic flies on bats (*Mammalia: Chiroptera*) in a neotropical cloud forest in Panama. *Parasite* 25:1-12.
- Wagg C, Dudenhöffer JH, Widmer F, MG Van Der Heijden. 2018. Linking diversity, synchrony and stability in soil microbial communities. *Functional Ecology* 32: 1280-1292.
- Warcup JH. 1960. Methods for isolation and estimation of activity of fungi in soil. *The Ecology of Soil Fungi*. Liverpool University Press.
- Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, J Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* 18: 315-322.
- Williams-Linera G. 2015. El bosque mesófilo de montaña, veinte años de investigación ecológica ¿qué hemos hecho y hacia dónde vamos? *Madera y Bosques* 21: 51- 61.
- Xiao W, Chen X, Jing X, B Zhu. 2018. A meta-analysis of soil extracellular enzyme activities in response to global change. *Soil Biology and Biochemistry* 123: 21-32.
- Xu X, Thornton PE, WM Post. 2013. A global analysis of soil microbial biomass carbon,

- nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Ecology and Biogeography* 22: 737-749.
- Xu Z, Yu G, Zhang X, He N, Wang Q, Wang S, ... C Wang. 2017. Soil enzyme activity and stoichiometry in forest ecosystems along the North-South Transect in eastern China (NSTEC). *Soil Biology and Biochemistry* 104: 152-163.
- Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, D Tilman. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology* 84: 2042-2050.
- Zalar PD, de Hoog GS, Schroers HJ, Crous PW, Groenewald JZ, N Gunde-Cimerman. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology* 58: 157-183.
- Zamora A, Malaver N, J Ramos. 2012. Análisis funcional de microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria. *Acta Biológica de Venezuela* 32: 57-86.
- Zhao Y, Xiang W, Yan S, Huang Y, W Fan. 2019. Laccase activity in *Sphagnum*-dominated peatland: A study based on a novel measurement of delay dynamics (MDD) for determining laccase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 133: 108-115.
- Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science* 37: 375-379.