



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD MORELIA**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE MICROEUCARIONTES
EDÁFICOS EN EL BOSQUE MESÓFILO DE MONTAÑA DE
SANTIAGO COMALTEPEC, OAXACA, MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

ANDREA AURORA RIVERA ZIZUMBO

BAJO LA DIRECCIÓN DE

DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR

CO-DIRECTORA

DRA. YUNUEN TAPIA TORRES

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, MARZO 2023

**ESCUELA
NACIONAL
DE ESTUDIOS
SUPERIORES**

UNIDAD MORELIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



ESCUELA
NACIONAL
DE ESTUDIOS
SUPERIORES
UNIDAD MORELIA

10
años
(2011-2021)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA
SECRETARÍA GENERAL
SERVICIOS ESCOLARES

MTRA. IVONNE RAMÍREZ WENCE

DIRECTORA

DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

PRESENTE

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 01** del **Comité Académico** de la **Licenciatura en Ecología** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia celebrada el día **24 de enero de 2023**, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional de la alumna **Andrea Aurora Rivera Zizumbo** de la Licenciatura en **Ecología**, con número de cuenta **41701350-9**, con el trabajo titulado: "**Análisis de la diversidad de microeucariontes edáficos en el bosque mesófilo de montaña de Santiago Comaltepec, Oaxaca, México**", bajo la dirección como tutora de la **Dra. Patricia Vélez Aguilar** y como co-tutora la **Dra. Yunuen Tapia Torres**.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente:	Dra. Margarita Ojeda Carrasco
Vocal:	Dr. Luis Eduardo Servín Garcidueñas
Secretario:	Dra. Yunuen Tapia Torres
Suplente:	M. C. Ángel Herrera Mares
Suplente:	Dra. Rocío Hernández León

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Morelia, Michoacán a 07 de marzo de 2023.

DRA. YUNUEN TAPIA TORRES
SECRETARIA GENERAL

CAMPUS MORELIA

Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta
58190, Morelia, Michoacán, México. Tel: (443)689.3500 y (55)5623.7300. Extensión Red UNAM: 80614
www.enesmorelia.unam.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos Institucionales

A la Licenciatura en Ecología, por brindarme una formación completa en el área de la ecología e inspirarme a seguir aprendiendo a entender a la naturaleza.

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, por proporcionarme las mejores herramientas e instalaciones para llevar a cabo mis estudios de manera óptima.

A la Dra. Patricia Vélez, por recibirme en su laboratorio, confiar en mí para realizar este proyecto y motivarme continuamente para concluirlo.

A mis sinodales, Dra. Margarita Ojeda, Dr. Luis Servin, Dra. Yunuen Tapia, M.C. Ángel Herrera y la Dra. Rocío Hernández, por dar seguimiento y retroalimentar mi trabajo, aportando ideas acertadas para complementarlo.

Agradecimientos Personales

A mi madre, Soledad Zizumbo, porque gracias a ella descubrí la ENES Morelia y fue quien me acompañó a la Feria de las Ciencias y Humanidades, donde tomé la decisión de estudiar Ecología; por procurarme con su amor cada día de mi vida y apoyar incondicionalmente todos mis proyectos.

A mi padre, José Rivera, por creer siempre en mis capacidades y hacer hasta lo imposible por brindarme lo necesario para ir construyendo mi camino.

A mis profesores de la Licenciatura en Ecología, por transmitirnos, en cada una de sus clases, la pasión por la ciencia y motivarnos día con día a seguir formándonos.

A mis compañeros, Leonardo, Admin y Luz que, por 4 años, fueron mi red de apoyo personal y académico, y aún cuando hoy estemos distanciados, reconozco sinceramente que sin ellos la carrera no habría sido tan amena.

A mis amigos más cercanos, Sergio Nicasio, Diego Meléndez y Mariana Raso que, durante el proceso de mi tesis, estuvieron apoyándome y regresándome la confianza y la motivación para continuar, cuando ni yo la encontraba.

A las amistades que sumé en el IB-UNAM, porque sus palabras y consejos me dieron ese último empujoncito que necesitaba para terminar este proyecto.

A Gala, que me acompañó horas acostada a mi lado mientras tecleaba cada letra de esta tesis.

Dedicatoria

A mi abuelo Eleazar Zizumbo Herrera.

“Tito, me habría encantado que presenciaras la culminación de este proyecto. Hoy tal vez no estés aquí físicamente, pero no me cabe duda de que tu alma se sentirá muy orgullosa de ver un logro más de tu nieta consentida.”

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Diversidad microbiana en el suelo, función e importancia	7
1.2 Ensamblaje de las comunidades de microeucariontes en el suelo	9
1.3 Bosque Mesófilo de Montaña	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Técnicas de secuenciación masiva de amplicones para estudiar a los microeucariontes: metabarcoding del ITS1 como marcador genético	12
2.2 Microeucariontes edáficos de los bosques mesófilos de montaña en México	16
2.2.1 Protistas	16
2.2.2 Microfauna	17
2.2.3 Algas	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo General	20
4.2 Objetivos Específicos	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Sitio de estudio	20
5.2 Muestreo	20
5.3 Extracción de ADN ambiental	21
5.4 Análisis bioinformáticos	22
5.5 Diversidad alfa (α) y beta (β)	23
5.6 Relación de la diversidad con variables ambientales	24
6. RESULTADOS	24
6.1 Diversidad y composición taxonómica	24
6.1.1 Animalia	25
6.1.2 Protista	27
6.1.3 Plantae	30
6.2 Diversidad alfa (α) y beta (β)	31
6.2.1 Animalia	31
6.2.2 Protista	34
6.2.3 Plantae	36
6.3 Relación entre variables ambientales y la diversidad	38
6.3.1 Animalia	38
6.3.2 Protista	39
6.3.3 Plantae	40

7. DISCUSIÓN	41
7.1 Utilidad de amplicones de la región ITS1 en estudios de ecología microbiana	41
7.2 Patrones de diversidad en el reino Animalia	43
7.4 Patrones de diversidad en el reino Plantae	47
8. CONCLUSIONES	48
9. PERSPECTIVAS	50
10. REFERENCIAS	51

RESUMEN

En un ecosistema altamente diverso y prioritario para la conservación, como el Bosque Mesófilo de Montaña, el análisis de la diversidad de microeucariontes edáficos (ej. algas, protistas, nemátodos y microartrópodos), nos brinda información sobre la estabilidad y productividad del sitio, ya que la estructura de la comunidad afecta directa e indirectamente los flujos de materia y energía en el sistema. En este trabajo empleamos la técnica de *metabarcoding* para la identificación simultánea de múltiples taxones de microeucariontes a partir de una muestra de ADN ambiental, utilizando la región ITS1 como código de barras. Calculamos la diversidad alfa (α) (Índices de Simpson y Shannon) y beta (β) (Índice de Jaccard y Bray-Curtis), y a partir de un CCA (Análisis de Correspondencias Canónicas) identificamos la relación entre variables abióticas del suelo y la diversidad comparando diferentes microhábitats naturales. Identificamos 87 ISVs (variantes de secuencia inferida) de protistas, 35 de microfauna y 16 de algas. Dentro de los animales, los nemátodos fueron el grupo dominante, dentro de las algas dominaron las Chlorophytas y en Protista no se observó dominancia de ningún grupo dada la alta diversidad. El carbono orgánico disuelto, la actividad de enzimas degradadoras de carbono y el pH fueron los factores abióticos más importantes para determinar la estructura de la comunidad. Comparando los diferentes microhábitats, encontramos una diversidad beta alta, ya que son pocas las especies cosmopolitas y observamos especies exclusivas de cada uno. Nuestros resultados, además de aportar información al repositorio de secuencias y listados de diversidad edáfica, pretenden incentivar futuros estudios dirigidos a cada uno de los taxones aquí descritos.

ABSTRACT

In a highly diverse and priority ecosystem for conservation, such as the Cloudy Mountain Forest, the analysis of the diversity of edaphic microeukaryotes (eg algae, protists, nematodes and microarthropods), provides us with information on the stability and productivity of the site, since that the structure of the community directly and indirectly affects the flows of matter and energy in the system. In this work we use the metabarcoding technique for the simultaneous identification of multiple microeukaryotic taxa from an environmental DNA sample, using the ITS1 region as barcode. We calculated the alpha (α) (Simpson and Shannon indices) and beta (β) (Jaccard and Bray-Curtis index) diversity, and from a CCA (Canonical Correspondence Analysis) we identified the relationship between abiotic variables of the soil and the diversity by comparing different natural microhabitats. We identified 87 ISVs (inferred sequence variants) from protists, 35 from microfauna, and 16 from algae. Within the animals, the nematodes were the dominant group, within the algae the Chlorophytas dominated and in Protista, no group dominance was achieved given the high diversity. The available carbon, the activity of carbon degrading enzymes and the pH were the most important abiotic factors to determine the community structure. Comparing the different microhabitats, we found a high beta diversity, since there are few cosmopolitan species and we observed exclusive species of each one. Our results, in addition to providing information to the repository of sequences and diversity lists, are intended to encourage future studies directed at each of the taxa described here.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diversidad microbiana en el suelo, función e importancia

Los suelos son sistemas complejos, compuestos por materiales minerales erosionados, materia orgánica derivada de tejidos animales y vegetales, y una comunidad biótica diversa conformada por bacterias, algas, actinomicetos, hongos, protozoarios e invertebrados terrestres (Coleman et al., 2004; Wall et al., 2012). Cada uno de los elementos de esta comunidad, lleva a cabo procesos importantes que no solo afectan la estructura física y química del suelo, sino también determinan el establecimiento y desarrollo de la productividad primaria en ecosistemas terrestres (Dighton, 1997).

Los hongos y las bacterias son los grupos dominantes, en cuanto a biomasa (~95 %) (Condon et al., 2010), número de especies y actividad metabólica en la mayoría de los suelos, y son reconocidos como los mayores descomponedores de materia orgánica (Bardgett, 2005; Hättenschwiler et al., 2005; Meidute et al., 2008). Por ello, gran parte de los estudios sobre descomposición y diversidad del suelo se enfocan en estos grupos microbianos (Bardgett, 2005; Geisen et al., 2019).

No obstante, otros miembros de la comunidad edáfica como lo son algas, protistas, nemátodos, rotíferos y microartrópodos, denominados como microeucariontes (Jacquiod et al., 2016), también participan en los procesos del suelo, tales como la degradación de materia orgánica y el ciclo de nutrientes, de manera directa e indirecta (Hättenschwiler et al., 2005, Jacquiod et al., 2016). Por ejemplo, nemátodos, rotíferos y protistas, regulan las poblaciones de hongos y bacterias al depredarlas, ocasionando cambios en la composición y actividad de estos microorganismos, afectando de manera indirecta el proceso de descomposición, el recambio de nutrientes y las interacciones planta-microbiota (Bonkowski, 2004; Thakur & Geisen, 2019). Por otro lado, alrededor del 60% de los nutrientes ingeridos por estos microeucariontes son excretados en el suelo, teniendo un efecto directo en el ciclo de nutrientes (Bardgett & Griffiths 1997, Hättenschwiler et al., 2005; Bardgett, 2005).

Los microartrópodos consumen, fragmentan y procesan la materia orgánica que entra el sistema, facilitando su futura descomposición. Además, al desplazarse no solo modifican la estructura física del microhábitat, alterando las condiciones microambientales y creando nichos para los microorganismos, también, transportan de manera pasiva a bacterias, hongos y sus propágulos, favoreciendo la colonización en nuevos sitios (Hättenschwiler, 2005; Scheu et al., 2005). Este grupo incluye a los ácaros y colémbolos como elementos dominantes, ya que representan el 95% del total de microartrópodos del suelo. Los principales órdenes de ácaros que se han reportado dentro de la fauna edáfica son Oribatida, Mesostigmata, Prostigmata y Astigmata (Bardgett, 2005) y, al igual que los colémbolos, tienen diferentes adaptaciones para vivir en una amplia variedad de estratos del suelo (Bardgett & Griffiths, 1997; Coleman & Wall, 2007).

El rol principal de los protistas es como depredadores, aproximadamente consumen un 60% de la biomasa microbiana en suelos. A través de la depredación, los protistas controlan el tamaño y la composición de las comunidades microbianas y liberan nutrientes al suelo (Bardgett & Griffiths, 1997). Los grupos de protistas más abundantes en suelos son Amoebozoa, Alveolata y Rhizaria (Stefan et al., 2014; Geisen et al., 2015; Dupont et al., 2016; Wu et al., 2022).

En cuanto a las algas, además de su importante rol en la productividad primaria del sistema, participan en la incorporación de carbono y nitrógeno en las primeras etapas de formación del suelo y sirven como alimento para otros microeucariontes (Thorn & Lynch, 2007). En sistemas edáficos es común encontrar algas del grupo Archaeplastida (glaucofitas, rodofitas, clorofitas y estreptofitas) y protistas fotosintéticos de los grupos Excavata, Rhizaria, Chromista y Alveolata (Friedl & Rybalka, 2012; Jacquiod et al., 2016).

El análisis de la diversidad de microeucariontes edáficos, nos brinda información sobre la estabilidad y productividad del sitio, ya que la estructura de la comunidad afecta directa e indirectamente los flujos de materia y energía en el sistema (Hättenschwiler et al., 2005; Srivastava et al., 2009; Upadhyayula et al., 2019). Adicionalmente, estudiar las diferencias funcionales entre las especies de la comunidad es útil para inferir la presencia de interacciones positivas (ej. facilitación), negativas (ej. depredación) o neutras (ej. partición de recursos) y si existe sinergia

entre las especies para promover el ciclo de nutrientes (Heemsbergen et al., 2004; Gessner et al., 2010).

Como ejemplo de una interacción sinérgica en la comunidad edáfica, a través de la liberación de amonio al suelo y la depredación de grupos competidores, la presencia de la amoeba bacteriofaga *Acanthamoeba castellanii* favorece el aumento en abundancia y actividad de bacterias nitrificantes (ie. especies del género *Nitrospira*), lo que a su vez, favorece la concentración de nitrógeno en el suelo que es aprovechado por las plantas (Rosenberg et al., 2009). Por otro lado, a través del transporte de microorganismos, los nemátodos bacteriofagos promueven el ingreso de bacterias a la rizósfera que favorecen el crecimiento de las plantas (Kimpinski & Sturz, 1996). Finalmente, a través de la depredación selectiva de hongos (ej. hongos saprobios, patógenos o micorrizas), ácaros y colémbolos, influyen de manera indirecta en los procesos de descomposición de materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes en el suelo y afectan la interacción planta-hongo (Thakur & Geisen, 2019).

1.2 Ensamblaje de las comunidades de microeucariontes en el suelo

Una de las características principales del suelo es su alta heterogeneidad en diferentes escalas (Bardgett, 2005). Comparando la abundancia y riqueza de ácaros oribátidos, colémbolos y nemátodos, esta resultó mayor en suelos heterogéneos en su estructura física (escala de centímetros) que en suelos homogéneos (Nielsen et al., 2010; Wehner et al., 2016). En ácaros mesostigmados no se observó diferencia, probablemente porque a esa escala la heterogeneidad no es significativa (Nielsen et al., 2010). Esto sugiere que el impacto de la heterogeneidad depende del organismo y la escala en la que se desenvuelve.

A escalas mayores, la heterogeneidad en suelos forestales está determinada por la hojarasca, y parches de microhábitats como musgos, líquenes, troncos, entre otros. Cada microhábitat tiene condiciones abióticas y bióticas particulares que moldean la composición de las especies de microeucariontes (Bardgett, 2005; Wehner et al., 2016). Wehner y colaboradores (2016) analizaron la especialización de ácaros oribátidos a diferentes sustratos. Encontraron que existe mayor riqueza en parches

de musgo que en parches de corteza de árbol y hojarasca. Describen también, que las especies de los subórdenes Enarthronota y Mixonomata son generalistas y se comparten entre los diferentes sustratos (ej. musgo, liquen, césped, hojarasca), mientras que, la comunidad en la corteza de árbol es muy específica y se conforma por especies del suborden Brachypylina.

El efecto de la heterogeneidad deriva en el cambio de las condiciones abióticas del suelo que determinan la presencia y abundancia de las especies. Por ejemplo, la actividad de los protistas y nemátodos se limita a los espacios porosos del suelo donde se almacena el agua, ya que dependen de este elemento para la locomoción y alimentación. Otras variables como el pH también influyen en la composición y abundancia de especies, Šalamún et al. (2014) encontraron que diferentes grupos tróficos de nemátodos presentan diferentes grados de tolerancia a pH alcalinos. Así mismo, Hågvar y Abrahamsen (1990) reportan que el pH influye significativamente en el éxito de colonización de colémbolos y ácaros, describiendo que existen especies acidófilas y calciófilas en ambos grupos. Dado que el pH está correlacionado con otros factores como el contenido de nitrógeno y otros nutrientes, la tasa de descomposición y el perfil del suelo, es importante describir estas variables a la par (Hågvar & Abrahamsen, 1980).

Así como la comunidad de microeucariontes afecta directa e indirectamente el desarrollo de las plantas, la composición vegetal influye en las interacciones de los microeucariontes a través de la liberación de exudados que atraen bacterias y hongos a la rizósfera, generando *hotspots* de recursos para la microfauna edáfica; la producción de materia orgánica de distintas calidades (ie. composición química y estructura física asociada con los rasgos foliares de cada especie) que sirve como alimento para la microfauna saprobia y la modificación de las condiciones microclimáticas de bajo del dosel y la hojarasca (Bonkowski, 2004; Hättenschwiler et al., 2005; Van der Wal et al., 2012). Dado que estos efectos varían según la especie vegetal, varios estudios han concluido que comunidades diversas de flora sustentan comunidades de microeucariontes filogenéticamente diversas (Salamon et al., 2004; St. John et al., 2006).

1.3 Bosque Mesófilo de Montaña

El Bosque Mesófilo de Montaña (BMM) es un ecosistema que, a pesar de su extensión restringida (1% del territorio mexicano) y distribución fragmentada (aislada en montañas a altitudes de entre 600 y 3,500 msnm), alberga una inmensa riqueza de especies. Tan sólo hablando de plantas, en el BMM se encuentra un 10% de la riqueza florística de México, y aproximadamente el 30% de estas especies son endémicas del ecosistema (Rzedowski, 1996; Bubb et al., 2004). En cuanto a la diversidad edáfica, en el BMM se han registrado 594 especies de macromicetos, 107 ascomicetos y 29 hongos conidiales microscópicos (Chacón & Medel, 1993; Heredia et al., 2004; Medel, 2013), mientras que de bacterias se destaca la presencia de los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Reverchon et al., 2019; Cruz-Narváez et al., 2021; Álvarez-López, 2021). La mayoría de hongos y bacterias son especies saprobias que son favorecidas por la acumulación de materia orgánica y la alta humedad típica de estos ecosistemas (Fierros et al., 2000; Heredia et al., 2004; Medel, 2013; Cruz-Narváez et al., 2021).

El BMM se caracteriza por neblinas frecuentes, que mantienen una humedad atmosférica constante; relieves accidentados en laderas pronunciadas y cañadas en donde se retiene la humedad proveniente del mar (barlovento); un clima templado húmedo con lluvias todo el año; baja luminosidad y la convergencia de especies boreales y neotropicales. La temperatura media anual va de 0 a 35 °C con una precipitación media anual de entre 1,000 y 6,000 mm. Estos bosques crecen en suelos ácidos y ricos en materia orgánica, del tipo andosol, litosol, regosol, acrisol y cambisol (Gual-Dfáz & Rendón-Correa, 2014).

Por sus características abióticas y su gran biodiversidad, el BMM ofrece diversos servicios ecosistémicos como son el aprovisionamiento de recursos forestales (leña, maderas), alimentos, fibras naturales y remedios medicinales; regulación de la calidad del aire y el clima, captura y filtración del agua; mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos y el suelo, conservación de la biodiversidad y acervos genéticos, y finalmente, ofrece atractivos de belleza paisajística y espacios recreativos (CONABIO, 2010).

Es un ecosistema vulnerable al cambio climático ya que se rige por la humedad y baja insolación, y sus principales amenazas son la tala clandestina, incendios y el cambio de uso de suelo para agricultura, ganadería y desarrollo urbano. Por la continua perturbación y destrucción, aunado a su lenta regeneración natural, estos bosques han sido reconocidos a nivel mundial como prioritarios para la conservación ya que cumplen un papel muy importante en los ciclos hidrológicos y son *hotspots* de biodiversidad (Bubb et al., 2004; FAO, 2006; CONABIO, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 Técnicas de secuenciación masiva de amplicones para estudiar a los microeucariontes: *metabarcoding* del ITS1 como marcador genético

Metabarcoding es la técnica de identificación simultánea de múltiples taxones a partir de una muestra de ADN ambiental. El uso de esta técnica presenta varias ventajas, por ejemplo, la identificación taxonómica de los organismos es mucho más eficiente a diferencia de las metodologías tradicionales (ej. colecta de ejemplares o crecimiento en medios de cultivo), ya que no se necesita un conocimiento previo sobre el grupo ni involucra la extracción, manipulación y descripción de los organismos, además de que logra detectar especies no cultivables. Así mismo, a través del *metabarcoding*, se puede determinar la abundancia relativa de los organismos, se incrementa la velocidad y precisión en la identificación de especies con una alta resolución taxonómica y aumenta la posibilidad de detectar especies crípticas y especies raras (Hamilton et al., 2009; Drummond et al. 2015; Ruppert et al., 2019; Lin et al., 2020).

Para realizar *metabarcoding*, una vez que se extrae el ADN de la muestra ambiental, se amplifica un gen o una región conocida del ADN que servirá como "código de barras" para la identificación de los organismos. Esta secuencia debe ser corta, variable entre especies, especie-específica y universal en el grupo o grupos de interés (Ruppert et al., 2019; Padilla-García et al., 2021).

En los organismos eucariotas, el principal locus ribosómico se compone de tres genes codificantes altamente conservados, el 18S, 5.8S y 28S, y dos fragmentos espaciadores no codificantes de rápida evolución, el ITS1 (entre 18S y 5.8S) y el

ITS2 (entre 5.8S y 28S) (Fig. 1) (Navajas & Fenton, 2000; Noge et al., 2005; Satyanarayana et al., 2019). Particularmente, las secuencias de la región ITS cuentan con múltiples copias dentro del genoma nuclear y, al ser no codificantes, no se encuentran sujetas a la presión de selección, por lo que pueden rápidamente acumular mutaciones generando variación entre genomas de organismos de la misma especie y entre especies distintas (Cruickshank, 2002; Coleman, 2007; Litaker et al., 2007; Lear et al., 2018).

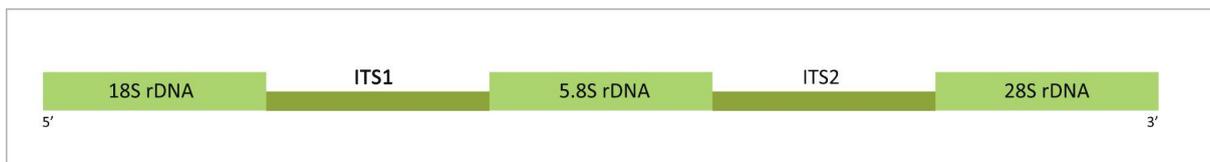


Fig. 1. Esquema del grupo de genes ribosómicos eucarióticos.

La región ITS completa (ITS1, 5.8S e ITS2) resulta demasiado larga (ej. 450-700 pb para hongos) para su secuenciación en plataformas de pirosecuenciación o Illumina. Además, tomando en cuenta que, en muestras de ADN ambiental se pueden amplificar miles de secuencias de diferentes grupos, resulta más eficiente trabajar con regiones cortas de fácil manejo por lo que muchos autores eligen analizar solamente la subregión ITS1 o la ITS2 (Bellemain et al., 2010; Monard et al., 2013; Yang et al., 2018, van Elsas et al., 2019). Así mismo, para búsquedas de secuencias similares en BLAST, es recomendable utilizar sólo uno de los espaciadores en lugar de la región completa, ya que, el algoritmo de BLAST da preferencia a la búsqueda de secuencias similares al componente conservado (5.8S) más que a las regiones variables, por lo que puede provocar asignaciones erróneas (Bengtsson-Palme et al., 2013).

En los últimos años, la región ITS1 ha sido propuesta como marcador genético para identificar y clasificar especies eucariotas, así como para la reconstrucción filogenética de éstas (Noge et al., 2005; Gou et al., 2012; Bengtsson-Palme et al., 2013; Wang et al., 2014; Tendersoo & Anslan, 2019). Esto debido a que es una región corta, con múltiples copias en el genoma, (lo que facilita su detección y amplificación por PCR y especialmente en muestras ambientales donde la cantidad de ADN presente es baja), y con genes colindantes altamente conservados, (lo que permite el uso de cebadores universales (Navajas & Fenton, 2000; Coleman, 2003;

Yao et al., 2010; Bellemain et al., 2010; Monard et al., 2013; Anslan & Tedersoo, 2015). Se ha observado, que el ITS1 presenta una tasa de mutación ligeramente más rápida que ITS2, por lo que posee una variación mayor en longitud, contenido de GC y presencia de polimorfismos (Monard et al., 2013; Yang et al., 2018). Esta variación puede ser muy conveniente para distinguir entre especies eucariotas muy cercanas o crípticas e incluso entre poblaciones de la misma especie (Köhler et al., 2006; Créach et al., 2006; Li et al., 2011). Es por ello, que diversos estudios de *metabarcoding* han probado la eficacia del ITS1 para identificar especies de animales, plantas, hongos y protistas (ej. oomicetos, clorarcionófitos, algas, dinoflagelados y diatomeas) (Coleman & Mai, 1997; Litaker et al., 2007; Gou et al. 2012; Sapkota & Nicolaisen, 2015).

En un estudio multi-taxa, Wang y colaboradores (2014) compararon las características y eficiencia tanto del ITS1 como del ITS2 para identificar especies, utilizando secuencias de hongos, plantas y animales. Concluyen que el ITS1 tiene un poder de discriminación entre especies mayor que el ITS2; con el ITS1 se identificaron entre el 70.2 y 100% de las secuencias evaluadas mientras que, con el ITS2, solo el 68.8-96.5% de las secuencias fueron asignadas correctamente. Adicionalmente, sus resultados muestran que la variación interespecífica supera a la variación intraespecífica y que el ITS1 presenta un contenido de GC (guanina y citosina) menor al ITS2, lo que representa un efecto positivo para la amplificación de esta región (Wang et al., 2014).

De igual forma, Gou y colaboradores (2012) compararon la eficiencia de ocho marcadores moleculares para determinar especies del orden Piroplasma (Apicomplexa, Protista). El marcador ITS1, mostró una eficiencia del 100% para la identificación a nivel género y un promedio de 84% a nivel especie. Así mismo, junto con el marcador ITS2, mostraron los valores más altos de variación entre especies.

En cuanto a la utilidad del ITS1 para identificar especies de Oomycetes, Sapkota y Nicolaisen (2015) realizaron su secuenciación a partir de muestras de suelo agrícola. Como resultado, muestran que el 95% de las secuencias fueron asignadas a Oomycetes de los géneros *Pythium*, *Aphanomyces*, *Peronospora*, *Saprolegnia* y *Phytophthora*, demostrando que ITS1 es un código de barras potencialmente útil para este grupo de protistas.

También ha sido demostrada la utilidad de ITS1 para identificar especies de dinoflagelados (Moniz & Kaczmarek, 2010; Stern et al., 2012). Un ejemplo es el trabajo de Litaker y colaboradores (2007), donde se determinaron las distancias intra e interespecíficas en 81 especies. Cabe destacar que los autores reportan que las distancias entre especies van de 0.0303 a 0.734 (donde las distancias mayores a 0.04 indican especies diferentes y 0-0.0206 indica individuos de la misma especie) (Litaker et al., 2007).

A diferencia de las regiones de ADN mitocondrial y plástido (ej. *matK*, *rbcl*, *trnL*), comúnmente utilizados como identificadores para *barcoding* en plantas, el ITS tiene una tasa de sustitución rápida, generando variación potencial para mejorar la resolución de los taxones en estudios filogenéticos (Lear et al., 2018). Dentro del grupo de algas Chlorophytas, Coleman y Mai (1997) secuenciaron ITS1 y 2 de 40 algas para resolver las relaciones filogenéticas del género *Chlamydomonas*, no obstante, con ese análisis lograron, además, identificar secuencias no nombradas o asignadas equivocadamente dentro del genBank y construir las relaciones filogenéticas del orden Volvocales.

En ácaros del orden Mesostigmata, el ITS1 se ha empleado para identificar nuevas especies y establecer sus relaciones filogenéticas con especies similares (Niogret et al., 2007) y comparar especies cercanas e incluso descubrir especies crípticas (Navajas et al., 1999).

A pesar de que el ITS1 ha sido probado en varios grupos eucariotas, su uso se ha enfocado particularmente en hongos, por lo que el cuerpo de secuencias de referencia para microeucariontes edáficos disponibles en los repositorios, necesarias para la asignación taxonómica, es limitado y representa un área que vale la pena ampliar (Tedersoo et al., 2016; Geisen et al., 2019; Ruppert et al., 2019).

2.2 Microeucariontes edáficos de los bosques mesófilos de montaña en México

2.2.1 Protistas

Los estudios en México sobre protistas son, en su mayoría, de carácter taxonómico-descriptivo, basados en la observación a través de microscopía (óptica,

fotónica y electrónica) e identificación morfológica con ayuda de claves, así mismo, la mayoría se enfocan en protistas colectados en sistemas acuáticos (ej. lagos salobres, ecosistemas marinos y dulceacuícolas, estanques de agua en las urbes). De las 146 especies de protistas flagelados heterótrofos (Rhizaria, Stramenopiles y Excavata) descritas para México, 54 son de vida libre y solo cuatro han sido aisladas en suelos y tres en hojarasca (Mayén-Estrada et al., 2014b); en cuanto a protistas ciliados, 959 han sido descritas, 266 de vida libre y 25 encontradas en el suelo (Mayén-Estrada et al., 2014a). Finalmente, para los grupos de protistas amébidos (Amebozoa, Rhizaria y Excavata) están reportadas 315 especies de vida libre (Gallegos-Neyra et al., 2014).

Aún cuando los protistas son organismos cosmopolitas, altamente diversos y desempeñan un papel muy importante en las redes tróficas del suelo; por su tamaño, la falta de bibliografía sistemática y la poca cantidad de trabajos genéticos/moleculares, la escasez de registros de especies edáficas en México continúa vigente (Gallegos-Neyra et al., 2014).

Específicamente, para el estado de Oaxaca se han reportado únicamente seis especies de flagelados heterótrofos, 28 amébidos y no se cuenta con ningún registro de ciliados, a pesar de que se identifican ambientes potencialmente favorables para el establecimiento de diversos taxa. Cabe mencionar que la mayoría de las especies descritas han sido aisladas de ambientes acuáticos o han sido reportadas como patógenos, la diversidad en el suelo no ha sido caracterizada aún (Gallegos-Neyra et al., 2014; Mayén-Estrada et al., 2014a; Mayén-Estrada et al., 2014b).

2.2.2 Microfauna

En México se han realizado diversos estudios sobre la microfauna edáfica, haciendo énfasis en la influencia de ésta en las propiedades del suelo, su papel en el proceso de descomposición de la materia orgánica y la promoción de la fertilidad del suelo, distribución de taxa particulares en diferentes ecosistemas, así como la comparación de comunidades entre ecosistemas, estaciones, tipos de manejo y estados sucesionales. No obstante, todos estos trabajos utilizan una metodología de extracción directa de organismos, que posteriormente son preservados,

identificados y cuantificados en laboratorio con ayuda de microscopio y estereoscopio, claves taxonómicas basadas en rasgos morfológicos y el apoyo de taxónomos calificados.

Entre los estudios de caracterización de las comunidades de microfauna edáfica en Bosque Mesófilo de Montaña en México, destacan los siguientes.

Parada-Barrera (1987) describió la diversidad de entomofauna del suelo en el BMM de la Sierra de Manantlán, Jalisco. Identificó a los organismos a nivel familia, determinó su abundancia y calculó las proporciones tróficas de la comunidad. Los órdenes que logró caracterizar fueron Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Collembola, Diptera, Orthoptera, Blattodea, Homoptera y Dermaptera (ordenados de mayor a menor abundancia), siendo Coleoptera, Diptera y Hemiptera los más diversos. Así mismo, encontró que los depredadores (47.1%) y degradadores (47.7%) se encuentran casi en la misma proporción, mientras que los fitófagos son el grupo menos representado (5.2 %).

Morón-Ríos y Huerta-Lwanga (2006) compararon la comunidad de la macrofauna del suelo entre un BMM con uso forestal y un BMM prístino en el cerro Huitepec, Chiapas. Encontraron que los órdenes más abundantes fueron Chilopoda, y Diplopoda, y la subclase Oligochaeta; en ambos bosques y lograron caracterizar órdenes como Coleoptera, Hymenoptera, Orthoptera, Chilopoda, Diploda, Isopoda, Dermaptera, Diptera y Oligochaeta, así como miembros de la clase Arachnida. Además, reportan que los depredadores y descomponedores son los grupos tróficos más abundantes.

De la Rosa y Negrete-Yankelevich (2012) analizaron la diversidad de invertebrados del suelo comparando pastizales, bosque secundario y BMM maduro en la reserva La Cortadura, Coatepec, Veracruz. Para el BMM maduro se identificaron organismos pertenecientes a los grupos de Acari, Aranea, Chilopoda, Coleoptera, Collembola, Diplura, Diplopoda, Hemiptera, Hymenoptera y Enchytraeida, siendo los coleópteros (adultos y larvas), quilópodos, diplópodos e himenópteros aquellos con mayor densidad.

Por medio de muestreo directos (aspirador, tamices y pinzas) e indirectos (trampas con cebo, embudo Berlesse), Beltrán-Villanueva y colaboradores (2016) realizaron

un listado de artrópodos edáficos del BMM en Xicotepec de Juárez, Puebla. El orden más diverso que encontraron fue Coleoptera, seguido de Hemiptera y Orthoptera.

En el estado de Oaxaca, Bernal Rojas y colaboradores (2009) describen cambios en la comunidad de colémbolos y ácaros oribátidos entre el BMM, una plantación de café y un acahual. Identificaron 26 especies de ácaros y 27 de colémbolos en el BMM.

2.2.3 Algas

Para México se tienen reportadas 2,702 especies de algas, 1,600 de ecosistemas marinos y 1,102 de agua dulce (Pedroche et al., 1993). Cabe mencionar que las algas son un grupo polifilético que comprende bacterias (ej. Cianobacterias), protistas (ej. Pyrrophyta, Chromophyta y Euglenophyta) y plantas (ej. Chlorophyta, Rhodophyta y Glaucophyta) (González, 1987; van Elsas et al., 2019). Para fines de este trabajo, bajo el término alga, se hace referencia a las algas pertenecientes únicamente a Plantae.

A nivel estatal, en Oaxaca la mayoría de especies de algas reportadas son de hábitats marinos, bentónicos, dulceacuícolas o forman parte del fitoplancton.

Pedroche y colaboradores (1993), con base en la revisión de la literatura, reportan una riqueza de 10 especies de clorofitas y 23 rodofitas marinas, así como 38 especies de clorofitas de agua dulce en Oaxaca. En otro estudio sobre macroalgas marinas de la costa, León-Tejera y González-González (1993) reportan 41 especies de clorofitas, destacando especies de los géneros *Enteromorpha*, *Ulva* y *Chaetomorpha* como los de mayor rango de distribución, y 99 rodofitas con miembros de los géneros *Jania*, *Hypnea*, *Tayloriella* y *Gelidium*. Finalmente, en el listado de fitoplancton y microbentos del Pacífico, Oaxaca cuenta con 6 especies de clorofitas planctónicas descritas (Torres-Ariño et al., 2019).

Hasta el momento, para Oaxaca, los únicos registros de algas terrestres que se tienen provienen del listado de Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Novelo, 2012) en donde se describen ejemplares de los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Cladophora* y *Rhizoclonium* (Chlorophyta) colectados en muestras de suelo

húmedo. Así pues, no existe ningún estudio descriptivo de algas edáficas para el BMM en esta región.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la importancia de los microeucariontes dentro de los ciclos de nutrientes, el desarrollo de las especies vegetales y las interacciones de la comunidad edáfica, el estudio de su diversidad y los factores que la determinan es crucial para generar una visión integral de los procesos que propician el funcionamiento del ecosistema. Con este conocimiento, será posible generar planes de conservación y restauración más eficientes para el Bosque Mesófilo de Montaña, un ecosistema altamente diverso y amenazado en nuestro país.

A la fecha no existe un estudio multi-taxa que analice la diversidad de microeucariontes del suelo en el BMM de Oaxaca. Con este trabajo se pretende contribuir, a través del análisis genético de ADN ambiental, al conocimiento de la diversidad de microeucariontes que aún no se han registrado dentro de la fauna edáfica del estado, así mismo podemos comparar nuestro resultados de diversidad con los resultados reportados con metodología de extracción directa.

Además de aportar información al repositorio de secuencias de diversidad edáfica, pretendemos evaluar la eficacia de este método en la caracterización de la comunidad de microeucariontes del suelo en México, particularmente para el BMM. Los resultados serán preliminares y pretenden incentivar futuros estudios dirigidos de manera particular a cada uno de los taxones que logremos describir.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Describir la diversidad y estructura de las comunidades de microeucariontes del suelo en un Bosque Mesófilo de Montaña mediante el análisis del ADN ambiental acoplado al análisis de la región ITS1 del ADN ribosomal.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la composición taxonómica de la comunidad de microeucariontes, a través del análisis de la región ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) de las secuencias obtenidas a partir de una muestra de ADN ambiental.
- Determinar la diversidad alfa (α) y beta (β).
- Identificar la relación entre algunas variables ambientales (pH, carbono y fósforo disueltos, amonio, actividad enzimática de polifenol oxidasa, β -glucosidasa y fosfomonoesterasa) y la diversidad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sitio de estudio

El muestreo se realizó en el Bosque Mesófilo de Montaña ubicado en el cerro El Relámpago (17° 35' 30.4" N, 96° 23' 57.1" O), municipio de Santiago Comaltepec, en la Sierra Norte de Oaxaca, México (Fig. 2). Clima templado húmedo con un rango de temperatura que va de 10 a 26°C con precipitaciones de 800 hasta 4,000 mm. Suelo del tipo Cambisol (INEGI, 2005). El sitio de estudio pertenece al parche más grande y continuo de BMM en México, en esta región el BMM se encuentra altamente preservado por las comunidades locales y se encuentra clasificado como prioridad crítica para la conservación de la biodiversidad (Toledo-Aceves et al., 2011; del Mar Delgado-Serrano et al., 2015).

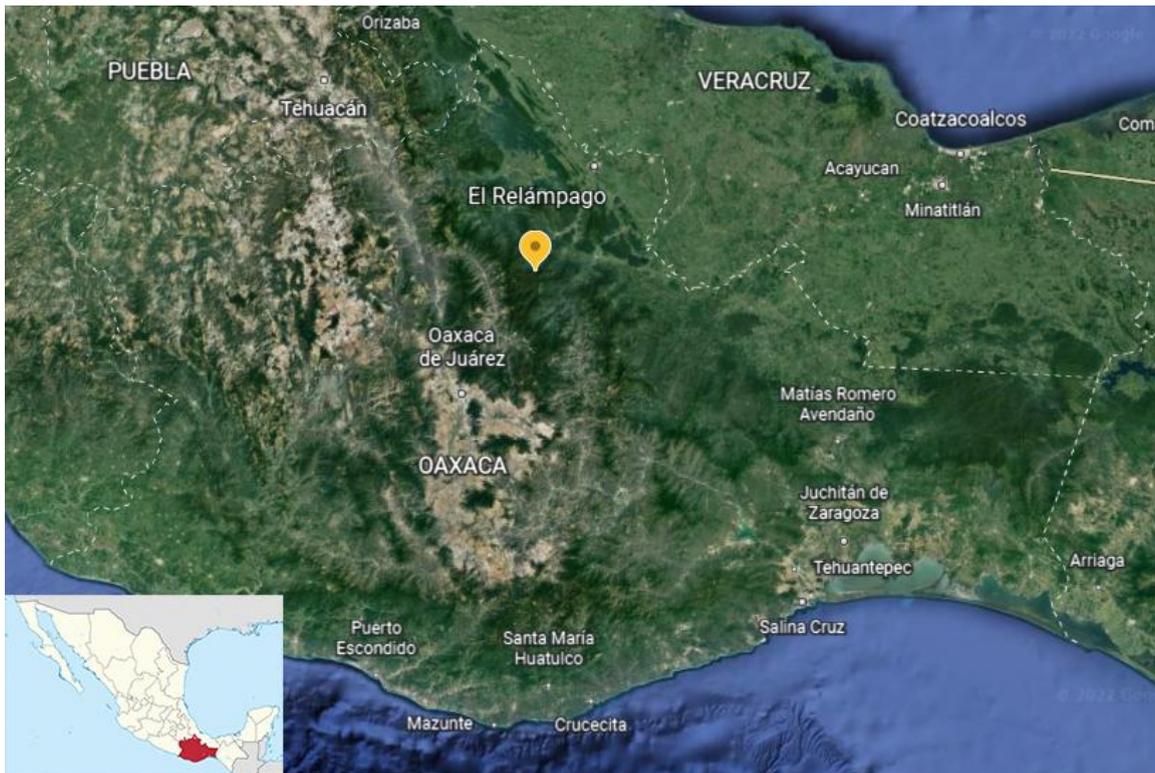


Fig. 2. Mapa del cerro El Relámpago, en Santiago Comaltepec, Oaxaca, México.

5.2 Muestreo

En la zona de estudio se marcaron tres puntos formando un triángulo equilátero de 10 m cada lado a 2,219 msnm. En cada uno de los puntos, se delimitó una sub-parcela triangular de 1m x 1m x 1m y se recogieron tres muestras de suelo (una por cada vértice), a 25 centímetros de profundidad (excluyendo la hojarasca) utilizando un descorazonador de 10 cm de diámetro. Las tres submuestras se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético, se mantuvieron en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 4 °C para su análisis en el laboratorio. Se eligió este tipo de muestreo para representar mejor la heterogeneidad del sitio; el primer vértice del triángulo principal se encuentra adyacente a la base de un árbol de la especie *Oreomunnea mexicana* (Juglandaceae) (17° 35' 0.36" N, 96° 23' 36.6" O), el segundo punto se ubica junto a un helecho de la especie *Alsophila salvinii* (Cyatheaceae) (17° 35' 18.4" N, 96° 23' 57.7" O) y en el tercer punto destaca la presencia de un tronco caído en descomposición (17° 34' 51.83" N, 96° 24' 5.17" O). Se eligieron estos puntos clave ya que, además de ser las especies vegetales que predominan en este bosque, *O. mexicana* y *A. salvinii* actualmente se encuentran amenazadas y son prioritarias para la conservación.

5.3 Extracción de ADN ambiental

Se utilizaron 0.25 g de muestra de suelo para realizar la extracción directa de ADN con el kit de extracción DNeasy PowerSoil (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN fue cuantificado a través del Fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen by Life Technologies) y posteriormente, secuenciado por medio del formato de extremo emparejado Illumina MiSeq (2 × 300) en el Laboratorio de Servicios Genómicos (LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato, México). Se amplificó la región ITS (ADNr) utilizando el conjunto de cebadores ITS1-F e ITS2 (Gardes & Bruns, 1993), con un rendimiento de alrededor de 25,000 lecturas por muestra.

5.4 Análisis bioinformáticos

Las lecturas de ITS se procesaron con el paquete dada2 v1.13.1 (Callahan et al., 2016) de R v3.5.1 (R Development Core Team, 2018). Primeramente, se eliminaron los primers y adaptadores, para luego hacer la determinación de ISVs (variantes de secuencia inferida). Se filtraron las secuencias excluyendo las lecturas con bases distintas a G, C, T y A (maxN = 0) y manteniendo aquellas que presentaron <1 errores esperados, tomando en cuenta sus puntajes de calidad (maxEE = c(1,1), truncQ = 3).

Para cada submuestra, se hizo la inferencia de ISV para las lecturas en ambas direcciones (5' 3' -3' 5'), considerando las tasas de error específicas de cada corrida. Posteriormente se ensamblaron las secuencias emparejadas que presentaran un mínimo de 50 pb de superposición y eliminando aquellas que no coincidieron completamente en la región de solapamiento. Finalmente se eliminaron las quimeras con la función “removeBimeraDenovo” de dada2 y se excluyeron los singletons (secuencia única entre las lecturas).

Para filtrar las secuencias de microeucariontes se utilizó la plataforma *ITS2: internal transcribed spacer 2 Ribosomal RNA Database*. En esta plataforma se ingresaron las secuencias obtenidas y se realizó un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para identificar similitudes significativas con las secuencias registradas. Las

secuencias cuyos primeros 10 hits corresponden a organismos no identificados, especies fúngicas o plantas, fueron descartadas y sólo se conservaron las secuencias emparejadas con protistas, algas, nemátodos y microartrópodos.

Una vez clasificadas las secuencias dentro de los grandes grupos de microeucariontes, se realizaron análisis filogenéticos para identificar a los organismos a niveles más específicos (filo, orden). Para ello, se descargaron del genBank secuencias de organismos identificados para realizar los alineamientos (MUSCLE alignment) con nuestras secuencias y posteriormente construir los árboles filogenéticos utilizando el programa MESQUITE versión 3.61 (Madisson & Madisson, 2019). Los árboles filogenéticos se construyeron bajo el principio de parsimonia a partir de las matrices de caracteres (bases nitrogenadas).

5.5 Diversidad alfa (α) y beta (β)

La diversidad alfa (α) se calculó a partir de los índices de Shannon-Wiener ($H' = - \sum p_i * \ln(p_i)$, donde p_i es la abundancia relativa de la especie) e Índice de Simpson ($D = 1 - \sum p_i^2$). La diversidad beta (β) se calculó por medio del Índice de Jaccard ($I_j: c / (a+b-c)$, donde c es el número de especies compartidas, a es el total de especies en la comunidad A y b el total de especies en la comunidad B) y la distancia Bray-Curtis ($D_{bc} = 1 - ((\sum (x_{ij} - x_{ik})) / (\sum (x_{ij} + x_{ik})))$), donde x número de individuos de la especie i en la muestra j y la muestra k). Estos análisis de diversidad se realizaron mediante el paquete “vegan” (Oksanen et al., 2020) en el programa R v3.5.1 (R Development Core Team, 2018).

Adicionalmente, se realizó un análisis Olmsted-Tukey para visualizar la estructura de la comunidad reconociendo a las especies dominantes, constantes, ocasionales y raras. Se calculó y graficó en Excel utilizando el logaritmo natural de las abundancias y la frecuencias de aparición de cada ISV.

5.6 Relación de la diversidad con variables ambientales

Se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA) para describir la relación entre la abundancia de las especies y las variables ambientales mediante el paquete “vegan” (Oksanen et al., 2020) en el programa R v3.5.1 (R *Development Core Team*, 2018). Las variables ambientales que se utilizaron fueron pH, Carbono disuelto, Fósforo disuelto, amonio y actividad enzimática de polifenol oxidasa, β -glucosidasa y fosfomonoesterasa; estos datos fueron obtenidos de trabajos previos en el sitio de estudio (Álvarez-López, 2021).

6. RESULTADOS

En este trabajo, la identificación taxonómica no alcanzó una resolución a nivel especie ni género. La mayoría de las identificaciones se quedaron a nivel clase, orden, filo o subfilo. La riqueza total muestreada fue de 138 ISVs; los protistas representaron un 63% de la riqueza total, seguido por la microfauna con un 25% y el grupo con menor riqueza fue el de las algas del reino Plantae, representando solo el 12% (Fig. 3). Este patrón de proporciones en la riqueza, se conservó en los tres sitios muestreados. A continuación, se muestran los resultados de composición taxonómica y diversidad, para cada grupo biológico.

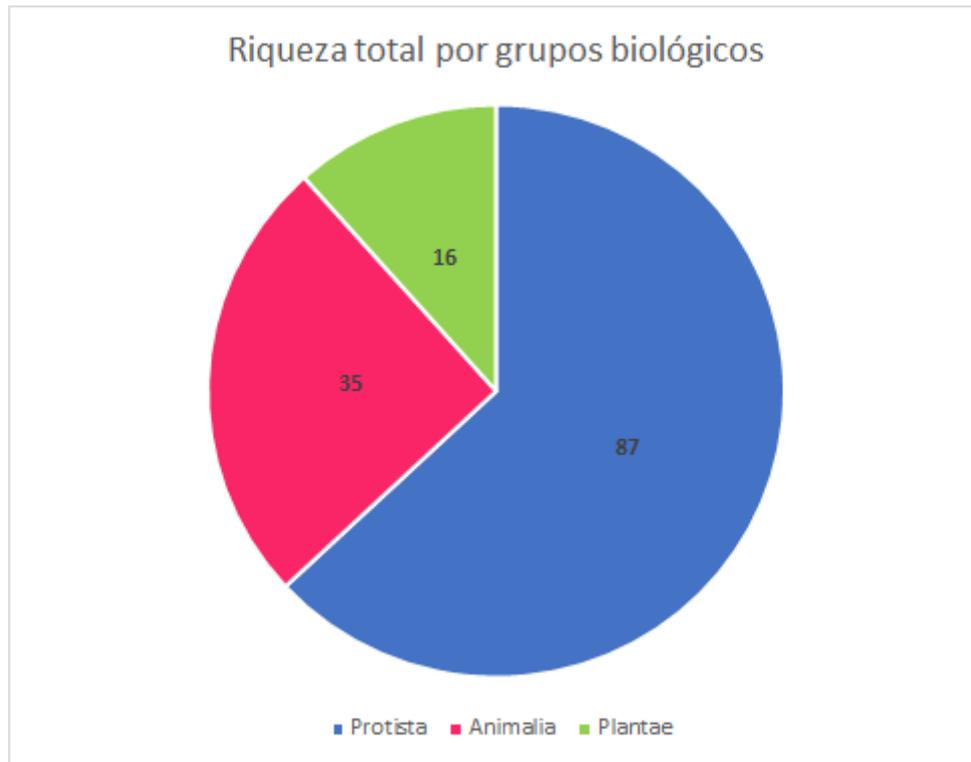


Fig. 3. Número total de ISVs identificados por cada reino: Protista, Animalia (microfauna) y Plantae (algas).

6.1 Diversidad y composición taxonómica

6.1.1 Animalia

La composición taxonómica entre muestras fue variada. Sin embargo, tanto las muestras del sitio 1 (*Oreomunnea mexicana*) como del sitio 3 (tronco), presentaron la dominancia del ISV *Nematoda* 1; siendo más evidente en el sitio 1. Por otro lado, la estructura de la comunidad de ISVs en el sitio 2 (*Alsophila salvinii*) se mostró más heterogénea, es decir, tenemos la presencia de ISVs de diferentes grupos con abundancias relativas en proporciones más uniformes, sobre todo en las submuestras 5 y 6. En el sitio 2 hubo una representación mayor de ISVs correspondientes a artrópodos y hexápodos (Fig. 4).

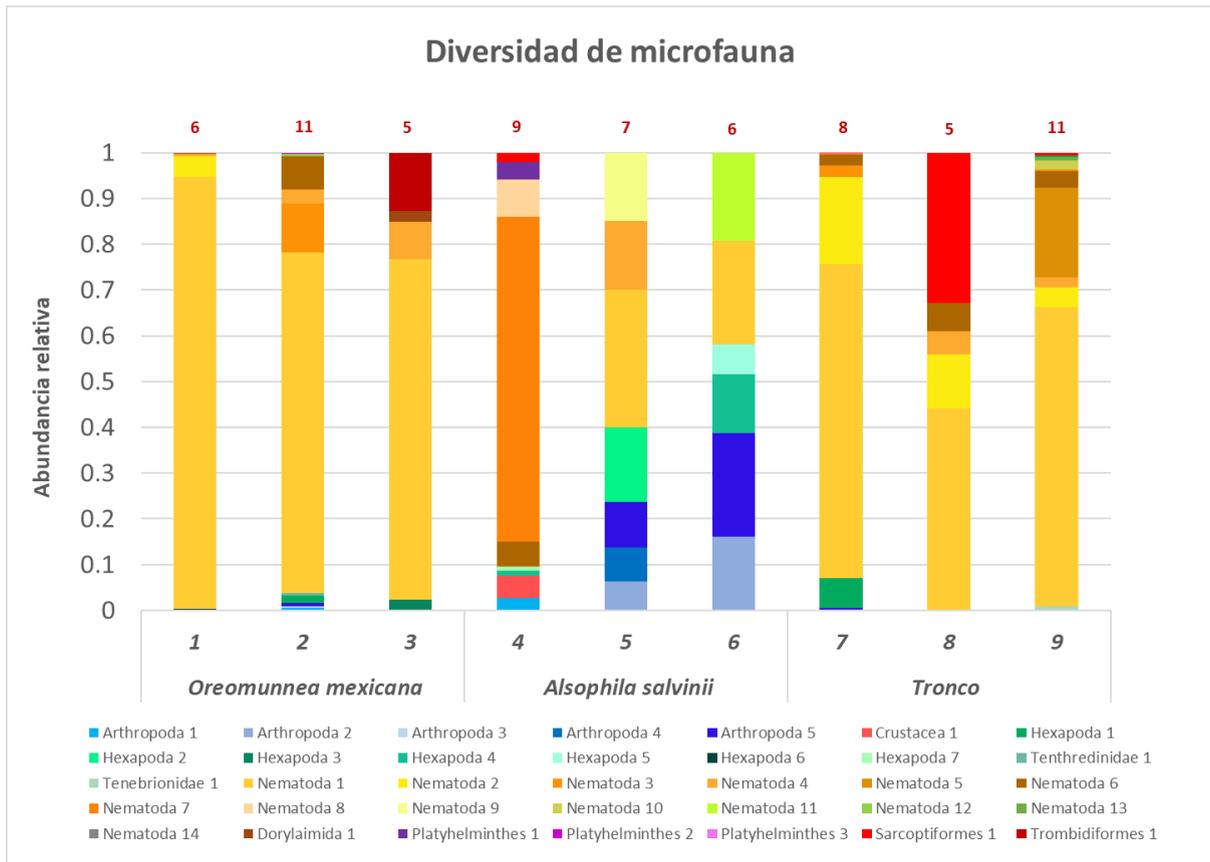


Fig. 4. Diversidad de ISVs correspondiente al reino Animalia (microfauna). En el eje x se muestran los tres sitios con sus respectivas submuestras y el eje y indica la abundancia relativa de los ISVs. Los números rojos encima de la barras indican el número total de ISVs identificados en la submuestra.

Analizando la riqueza de microfauna por sitio, encontramos que en el sitio 1 se identificaron en total 17 ISVs diferentes de los cuales ocho fueron exclusivos (Arthropoda 3, Dorylaimida 1, Hexapoda 3, Hexapoda 6, Nematoda 12, Platyhelminthes 2, Tenthredinidae 1 y Trombidiformes 1); una riqueza total de 18 ISVs para el sitio 2 con diez exclusivos (Arthropoda 2, Arthropoda 4, Crustacea 1, Hexapoda 4, Hexapoda 5, Hexapoda 7, Nematoda 8, Nematoda 9, Nematoda 11 y Platyhelminthes 1), y una riqueza total de 15 ISVs para el sitio 3 con sólo seis ISVs exclusivos (Nematoda 5, Nematoda 10, Nematoda 13, Nematoda 14, Platyhelminthes 3 y Tenebrionidae 1). Solo cuatro ISVs fueron compartidos entre los 3 sitios (Nematoda 1, Nematoda 4, Nematoda 6 y Arthropoda 5). Esto lo podemos ver gráficamente en la Fig. 16 como una acumulación de ISVs por sitios, representando los ISVs exclusivos, y aquellos que se observan dispersos en el plano son los ISVs compartidos por 2 o más sitios.

Además de las diferencias de riqueza entre los sitios, la abundancia también mostró grandes disparidades. Tanto el sitio 1 como el sitio 3 albergaron abundancias muy altas, 3,758 y 2,839 lecturas, respectivamente, mientras que el sitio 2 sólo alcanzó los 297 (Fig. 5A). Cuando analizamos cómo se distribuía esta abundancia entre los ISVs, observamos que el 75% estaba representado por Nematoda 1 (Fig. 5B).

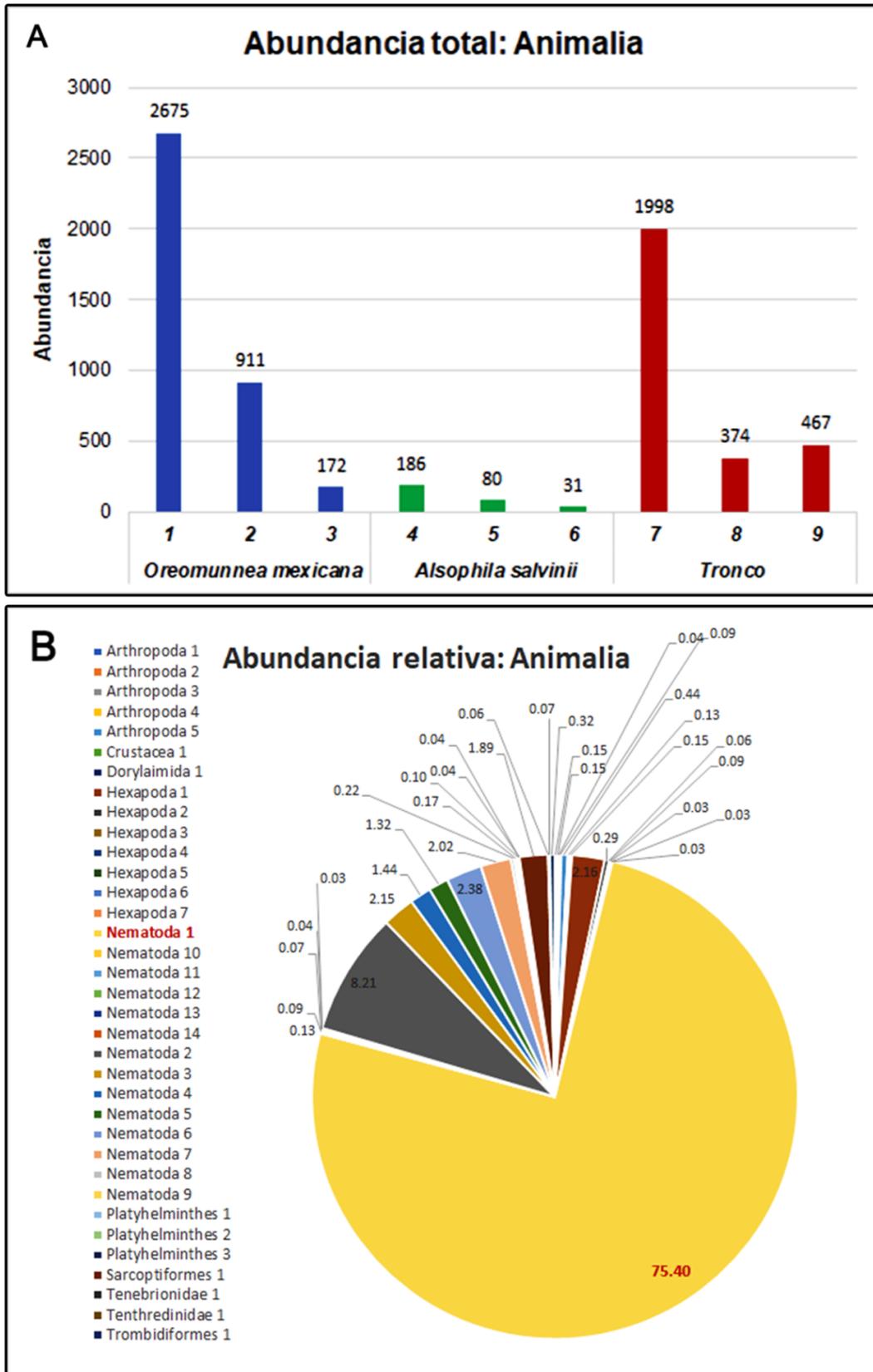


Fig. 5. A) Abundancia total: Animalia. En el eje x se muestran los tres sitios con sus respectivas submuestras y el eje y indica la abundancia total de los ISVs. B) Abundancia relativa: Animalia, proporción de la abundancia representada por cada ISV.

6.1.2 Protista

Dada la amplia riqueza de Protistas, se observó una alta heterogeneidad en la composición de las comunidades por submuestra (Fig. 6). Se registraron 20 ISVs para el superfilo Alveolata, cinco del superfilo Heterokonta, 17 para Rhizaria, así como 16 ISVs para el filo Amoebozoa. En total 28 ISVs no lograron asignarse a ningún filo o superfilo por lo que se clasificaron como parte del supergrupo SAR o únicamente como Protista.

La riqueza total para el sitio 1 fue de 52 ISVs de los cuales 13 fueron exclusivos para este sitio (i.e. Dictyostelia 2, Radiozoa 1, Rhizaria 9, entre otros); para el sitio 2, 63 ISVs con 18 exclusivos (destacando Ciliophora 2), y el sitio 3 fue el que presentó el menor número de ISVs con sólo 41 y siete exclusivos (i.e. Heterokonta 5). De los 87 ISVs de protistas que se lograron identificar, 20 estuvieron presentes en todos los sitios y corresponden principalmente al super filo Rhizaria (10 ISVs) y Alveolata (5 ISVs), el resto se identificaron como parte del super grupo SAR.

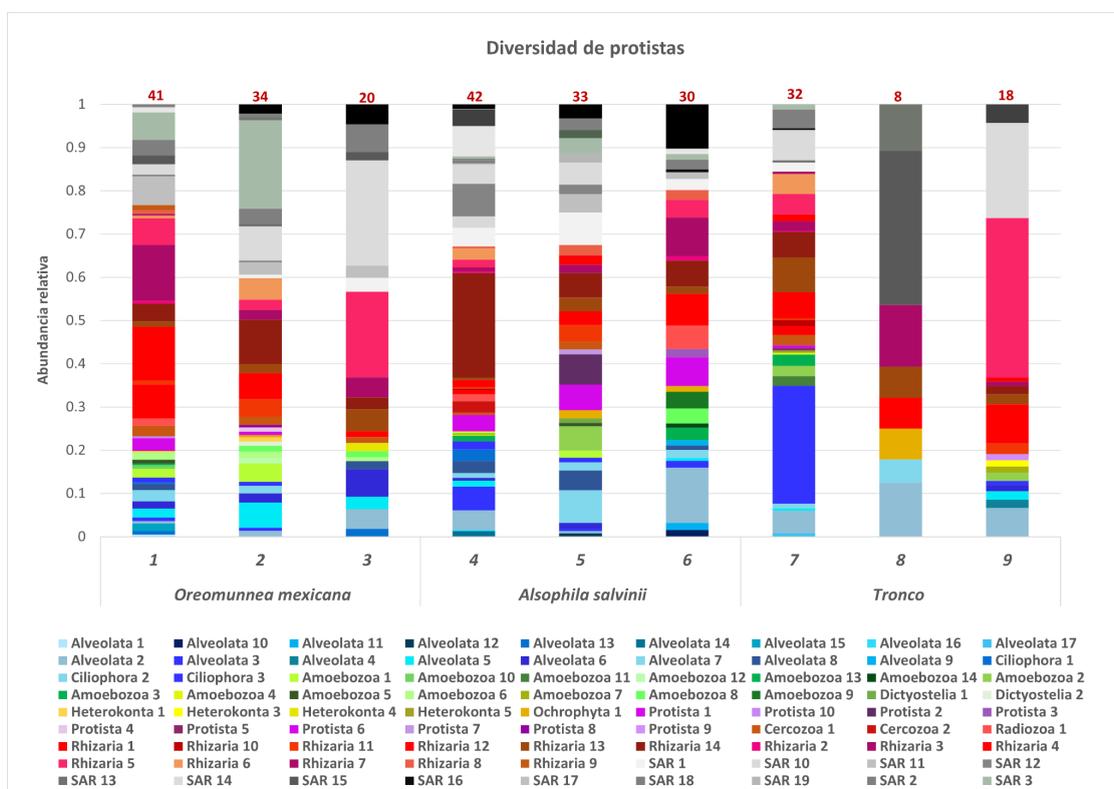


Fig. 6. Diversidad de ISVs correspondiente al reino Protista. En el eje x se muestran los tres sitios con sus respectivas submuestras y el eje y indica la abundancia relativa de los ISVs. Los números rojos encima de la barras indican el número total de ISVs identificados en la submuestra.

A pesar de la heterogeneidad en la composición taxonómica, las abundancias por sitio no fueron tan distintas entre sí; la abundancia total para el sitio 1 fue de 1319 lecturas, para el sitio 2 de 1601 y para el sitio 3 fue 1075 (Fig. 7).

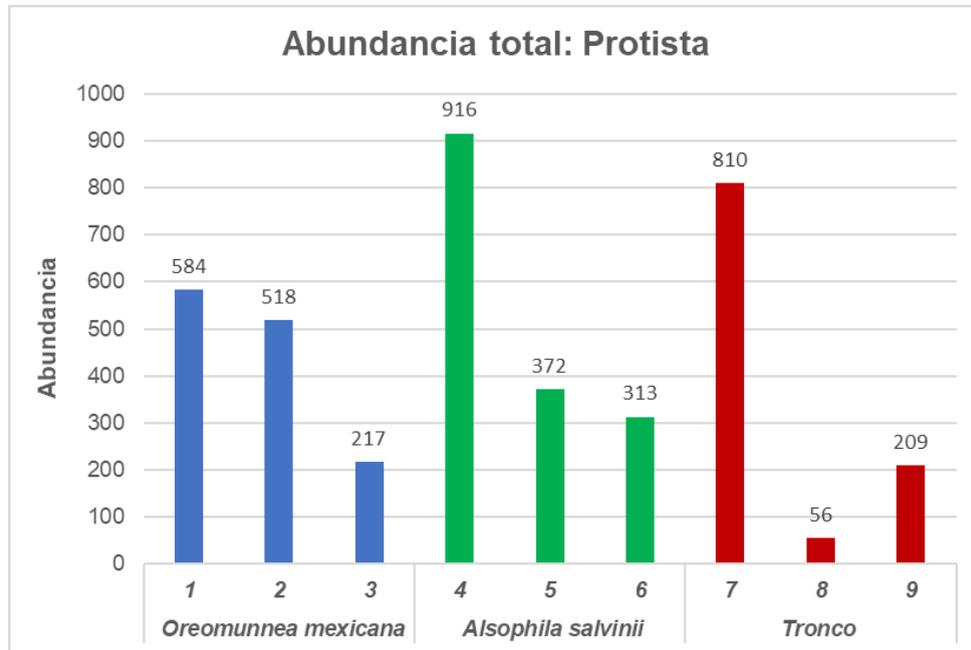


Fig. 7. Abundancia total: Protista. En el eje x se muestran los tres sitios con sus respectivas submuestras y el eje y indica la abundancia total de los ISVs.

6.1.3 Plantae

La riqueza total de algas estuvo representada en un 69% por algas Rhodophytas, 25% por Chlorophytas y un 6% de Glaucophytas. En general, las comunidades de algas por submuestra estuvieron dominadas por las Chlorophytas, a excepción de la submuestra 3 del sitio 1 y la submuestra 8 del sitio 3 donde dominan la Rhodophytas (Fig. 8).

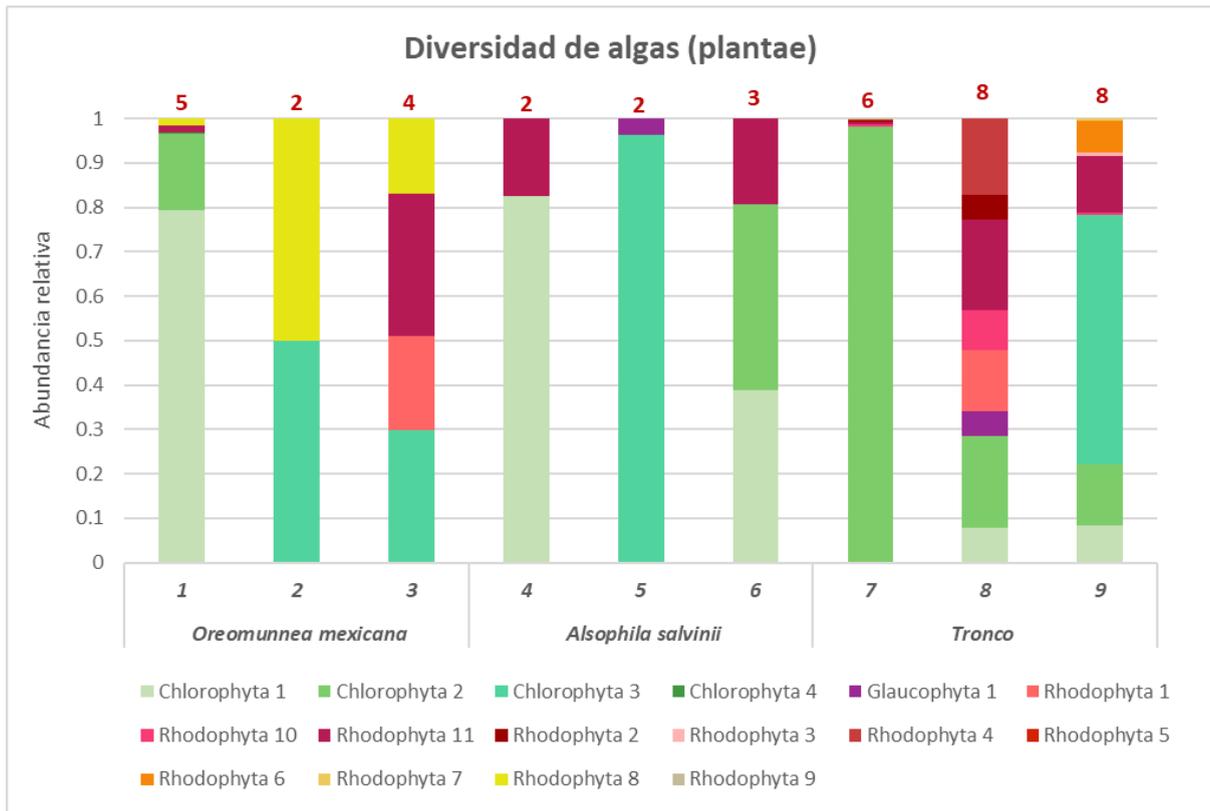


Fig. 8. Diversidad de ISVs correspondiente al algas del reino Plantae. En el eje x se muestran los tres sitios con sus respectivas submuestras y el eje y indica la abundancia relativa de los ISVs. Los números rojos encima de la barras indican el número total de ISVs identificados en la submuestra.

La riqueza por sitio fue de siete ISVs para el sitio 1, cinco ISVs en el sitio 2 y 14 ISVs en el sitio 3. Además de ser el sitio con mayor riqueza total, el sitio 3 presentó el mayor número de ISVs exclusivos (ocho ISVs) y todos correspondientes a algas Rhodophytas, en contraste, el sitio 2 no presentó ningún ISV exclusivo y el sitio 1 solo contó con dos ISVs exclusivos (i.e. Chlorophyta 4 y Rhodophyta 8). Los ISVs que se presentaron en todos los sitios fueron Chlorophyta 1, 2 y 3 y el alga Rhodophyta 11.

Así como el sitio 3 destacó en los valores de riqueza, también presentó el valor más alto de abundancia con un total de 3,804 lecturas, seguido por el sitio 1 con 1,071 y el sitio 2 fue el menos abundante reportando sólo 218 secuencias (Fig. 9).

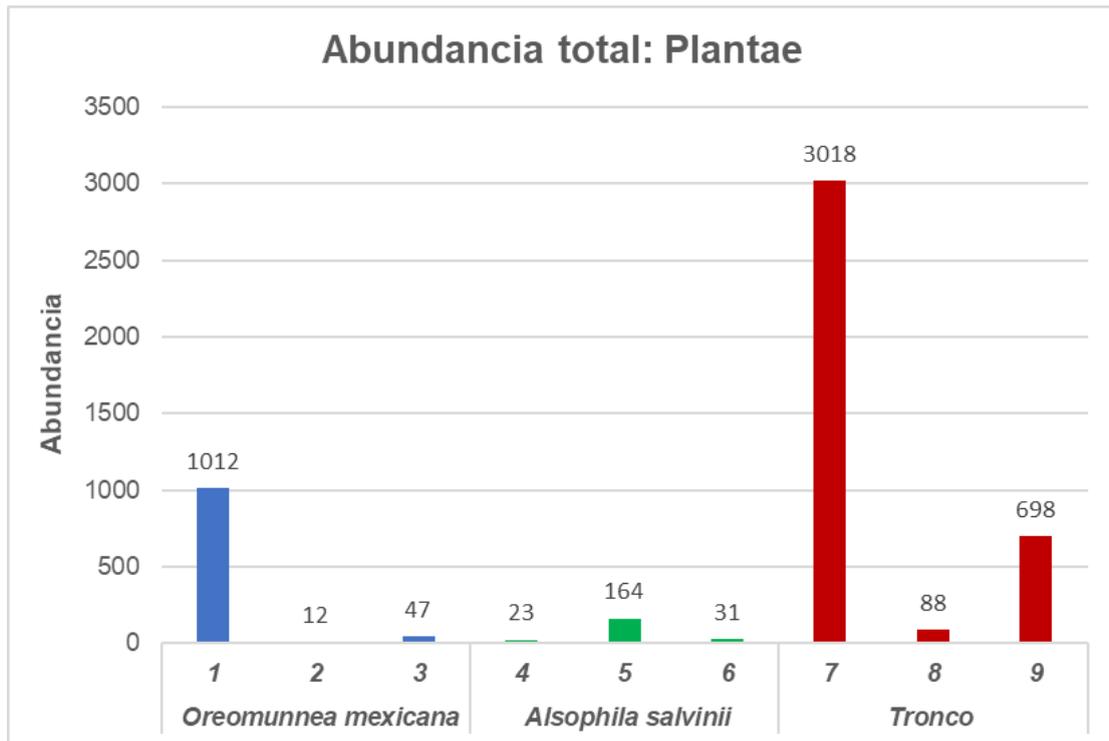


Fig. 9. Abundancia total: Plantae. En el eje x se muestran los tres sitios con sus respectivas submuestras y el eje y indica la abundancia total de los ISVs.

6.2 Diversidad alfa (α) y beta (β)

6.2.1 Animalia

La diversidad α entre submuestras fue muy variable. Sin embargo, se lograron identificar patrones particulares por sitios. El sitio 1 (submuestras 1-3) reflejó comunidades con alta dominancia, sobre todo en la submuestra 1. Por el contrario, para las submuestras 5 y 6 del sitio 2, la dominancia de Simpson fue muy baja y presentó los valores más alto de diversidad en el Inverso de Simpson e Índice de Shannon. Finalmente, las submuestras del sitio 3 no se vieron tan afectadas por la dominancia como en el sitio 1, pero no alcanzaron los valores de diversidad del sitio 2 (Tabla 1).

Tabla. 1. Resumen de los resultados arrojados por los índices de diversidad (Índice de Simpson, Inverso de Simpson e Índice de Shannon) para cada submuestra (sitio 1, 1-3; sitio 2, 4-6 y sitio 3, 7-9) para Animalia. En rojo se muestran los valores más altos de dominancia y en verde los indicadores de la mayor diversidad.

Índices de Diversidad por muestra: Animalia			
Muestra	Simp	Inv_Simp	Shan
1	0.8911	1.1223	0.2636
2	0.5692	1.7569	0.995
3	0.5586	1.7904	0.9339
4	0.4971	2.0118	1.2286
5	0.1638	6.1073	1.9398
6	0.1571	6.3674	1.8886
7	0.5072	1.9718	1.0087
8	0.3101	3.2252	1.3758
9	0.4517	2.2139	1.2394

Al analizar la diversidad β , se observó una alta heterogeneidad en el suelo, en varios casos, las submuestras de un sitio compartieron más especies con submuestras de otros sitios que con las más próximas. Tal es el caso de la submuestra 2 del sitio 1 y la 7 del sitio 3 que tienen comunidades con composiciones similares (Fig. 10A). La muestra 4 fue la más diferente del resto tal como se observó en la Fig. 4. En cuanto a la distancia Bray-Curtis basada en abundancias, se encontró un patrón de agrupación entre las submuestras del sitio 1 y 3, y la segregación del sitio 2 (Fig. 10B).

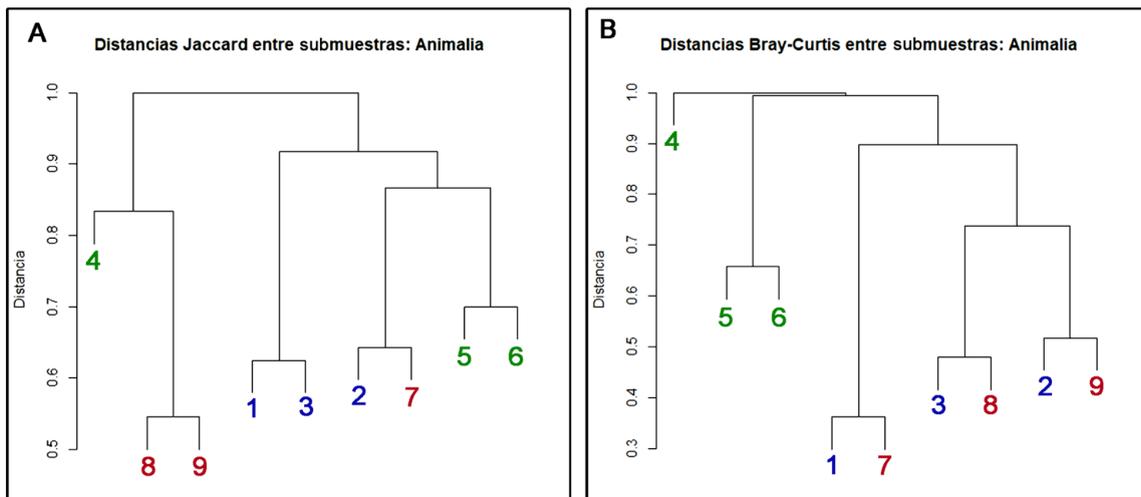


Fig. 10. A) Distancias Jaccard y B) Distancias Bray-Curtis entre submuestras. El eje y indica la distancia entre submuestras, cuando la distancia tiende a 0 las comunidades son más similares entre sí. Los números en color azul corresponden a las submuestras del sitio 1, los verdes al sitio 2 y los números rojos al sitio 3.

La estructura de la comunidad de microfauna estuvo mayormente representada por ISVs raros, 23 en total, seguido de ocho ISVs dominantes correspondientes a nemátodos, hexápodos, artrópodos y ácaros Sarcóptiformes, dos ISVs constantes y dos ocasionales (Fig. 11).

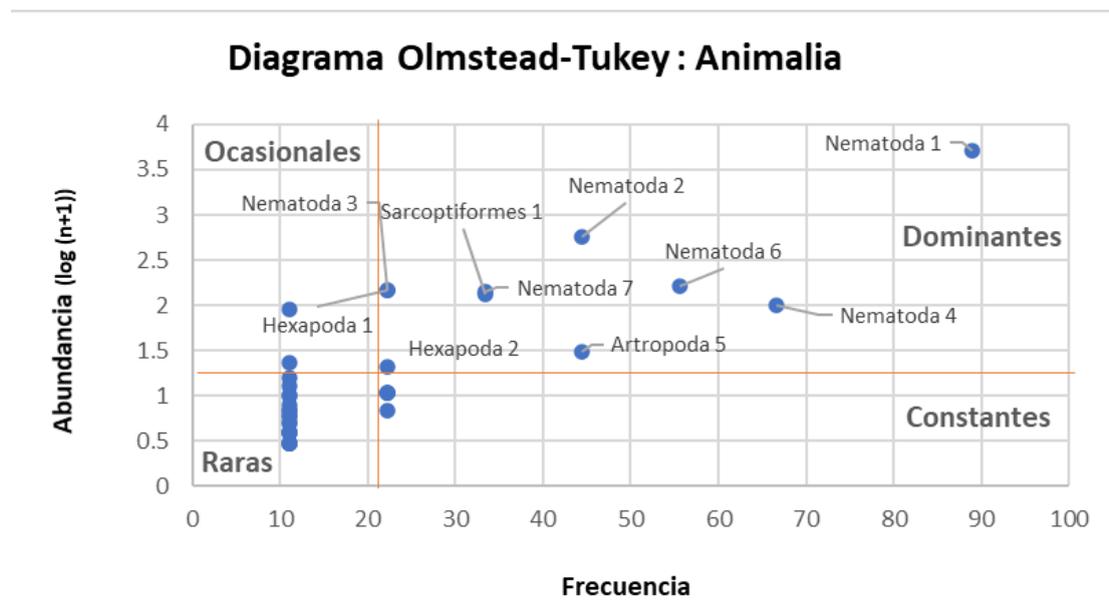


Fig. 11 Diagrama Olmstead-Tukey para Animalia. El eje x muestra la frecuencia de aparición de los ISVs y el eje y el logaritmo de la abundancia total de cada ISV más 1. Se muestran 4 cuadrantes ISVs Ocasionales, Dominantes, Raras y Constantes, delimitados por las medias de cada eje.

6.2.2 Protista

En general, la diversidad α de protistas en todas las submuestras fue alta, particularmente en la submuestra 5 del sitio 2. El sitio 3 fue el menos diverso de los 3, sin embargo, los valores de dominancia son muy bajos y el índice de Shannon indicó alta diversidad (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los resultados arrojados por los índices de diversidad (Índice de Simpson, Inverso de Simpson e Índice de Shannon) para cada submuestra (sitio 1, 1-3; sitio 2, 4-6 y sitio 3, 7-9) para Protista. En rojo se muestran los valores más altos de dominancia y en verde los indicadores de la mayor diversidad.

Índices de Diversidad por muestra: Protista			
Muestra	Simp	Inv_Simp	Shan
1	0.06	16.68	3.199
2	0.0778	12.8676	3.0123
3	0.1185	8.4438	2.5566
4	0.0863	11.5932	3.0463
5	0.0429	23.3342	3.3087
6	0.0594	16.8562	3.0929
7	0.1049	9.5356	2.8082
8	0.1636	6.1134	2.0106
9	0.1879	5.3242	2.1796

La composición de las comunidades fue similar entre las submuestras del sitio 1 y 2, quedando segregado el sitio 3 al compartir menos ISVs con los demás sitios (Fig. 12A). Por otro lado, basándonos en las abundancias por submuestra, no se aprecia ningún patrón de agrupación por sitio, si no que se agrupan intercaladamente (Fig. 12B).

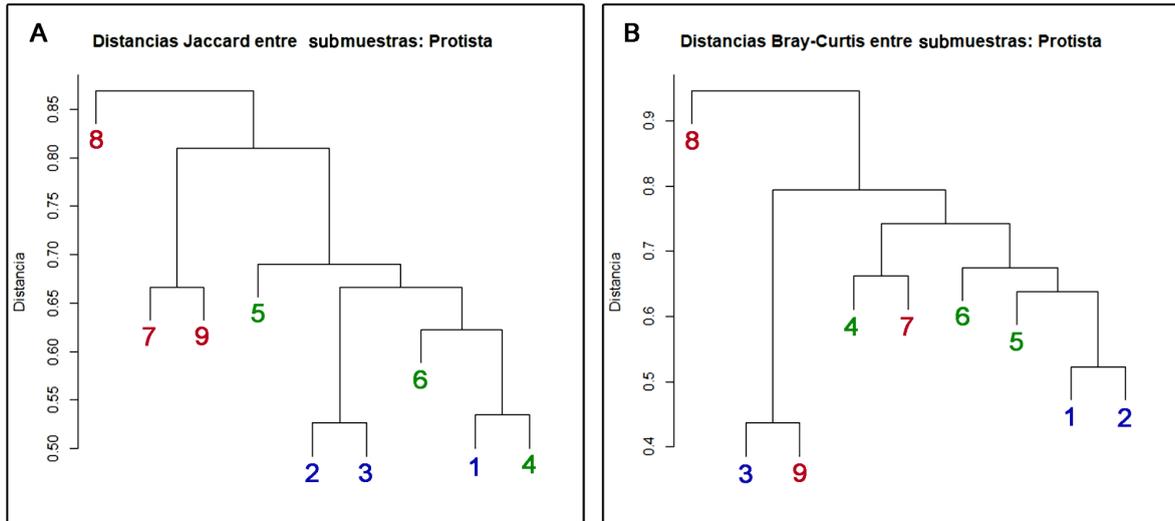


Fig. 12. A) Distancias Jaccard y B) Distancias Bray-Curtis entre submuestras.

El eje y indica la distancia entre submuestras, cuando la distancia tiende a 0 las comunidades son más similares entre sí. Los números en color azul corresponden a las submuestras del sitio 1, los verdes al sitio 2 y los números rojos al sitio 3.

En general, la comunidad presentó un equilibrio entre el número de ISVs dominantes y raros, 34 y 45 respectivamente; seis ISVs ocasionales y dos constantes. En los ISV dominantes destacan los correspondientes al superfilo Rhizaria mientras que en los raros el superfilo Alveolata (Fig. 13).

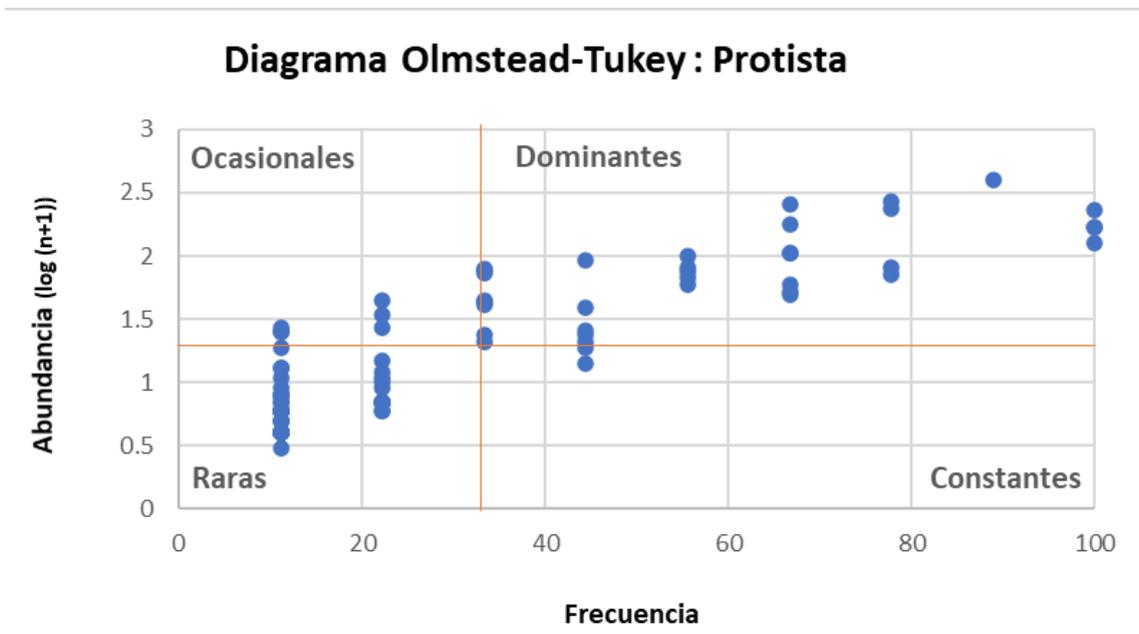


Fig. 13 Diagrama Olmstead-Tukey para Protista. El eje x muestra la frecuencia de aparición de los ISVs y el eje y el logaritmo de la abundancia total de cada ISV más 1. Se muestran 4 cuadrantes ISVs Ocasionales, Dominantes, Raras y Constantes, delimitados por las medias de cada eje.

6.2.3 Plantae

No se observaron patrones de diversidad por sitio ya que cada submuestra presentó particularidades independientemente del sitio al pertenece. La submuestra 8 del sitio 3 fue la más diversa, seguida por la submuestra 3 del sitio 1. Aun cuando en el sitio 3 albergó la submuestra más diversa, también incluye la submuestra con la mayor dominancia (submuestra 7). En el sitio 2 no destacan valores de diversidad altos y las submuestras 4 y 5 muestran alta dominancia (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los resultados arrojados por los índices de diversidad (Índice de Simpson, Inverso de Simpson e Índice de Shannon) para cada submuestra (sitio 1, 1-3; sitio 2, 4-6 y sitio 3, 7-9) para Plantae. En rojo se muestran los valores más altos de dominancia y en verde los indicadores de la mayor diversidad.

Índices de Diversidad por muestra: Plantae			
Muestra	Simp	Inv_Simp	Shan
1	0.6609	1.516	0.6403
2	0.5	2.5789	1.0042
3	0.2648	4.2087	1.5015
4	0.7126	1.8549	0.813
5	0.9295	1.1412	0.2855
6	0.3631	3.5558	1.3226
7	0.962	1.0442	0.1389
8	0.1523	7.4083	2.0906
9	0.362	2.8323	1.3945

Así como en los otros dos grupos analizados, la heterogeneidad de las comunidades de algas es muy alta. Las submuestras del sitio 3 se agrupan ya que comparten ISVs entre sí, por el contrario, las submuestras del sitio 1 comparten más ISVs con las del sitio 2, que con las aledañas. En cuanto a las distancias Bray-Curtis por abundancia no se observa ningún patrón de agrupamiento ya que la abundancias fueron muy variables (Fig. 14).

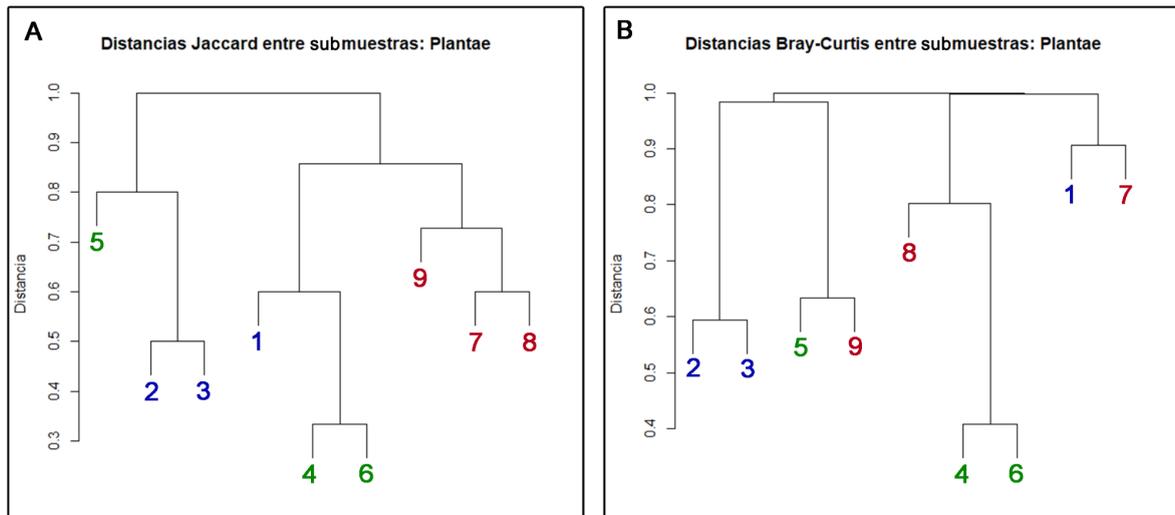


Fig. 14. A) Distancias Jaccard y B) Distancias Bray-Curtis entre submuestras. El eje y indica la distancia entre submuestras, cuando la distancia tiende a 0 las comunidades son más similares entre sí. Los números en color azul corresponden a las submuestras del sitio 1, los verdes al sitio 2 y los números rojos al sitio 3.

Dentro de la comunidad de algas, el 56% de los ISVs fueron raros y la mayoría de estos se identificaron como algas Rhodophytas y la única alga Glaucophyta reportada; el 25% fueron ISVs dominantes de Chlorophytas, y tanto los ISVs ocasionales (9%) como los constantes (9%), fueron Rhodophytas (Fig. 15).

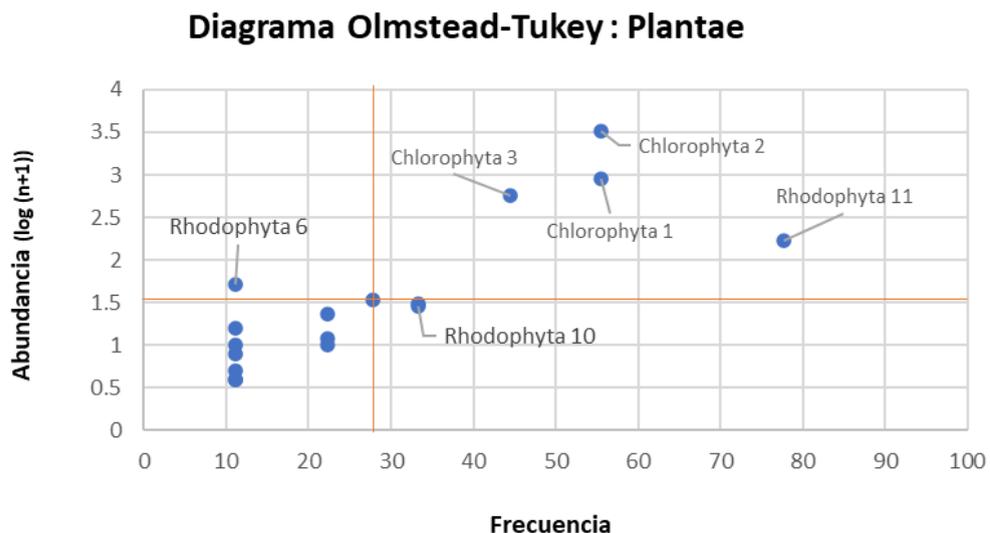


Fig. 15. Diagrama Olmstead-Tukey para Plantae. El eje x muestra la frecuencia de aparición de los ISVs y el eje y el logaritmo de la abundancia total de cada ISV más 1. Se muestran 4 cuadrantes ISVs Ocasionales, Dominantes, Raras y Constantes, delimitados por las medias de cada eje.

6.3 Relación entre variables ambientales y la diversidad

6.3.1 Animalia

A través del CCA se observó que las diferencias de riqueza y diversidad entre sitios pueden relacionarse con las condiciones ambientales particulares de cada uno. La comunidad del sitio 1, está relacionada con alta concentración de la enzima β -glucosidasa, baja concentración de amonio y fósforo orgánico disuelto. El sitio 2 se caracteriza por la alta concentración de enzima fosfomonoesterasa, polifenol oxidasa y carbono orgánico disuelto. Y finalmente, en el sitio 3 se presenta alta concentración de amonio y fósforo orgánico disuelto, y los valores más altos de pH (Fig. 16).

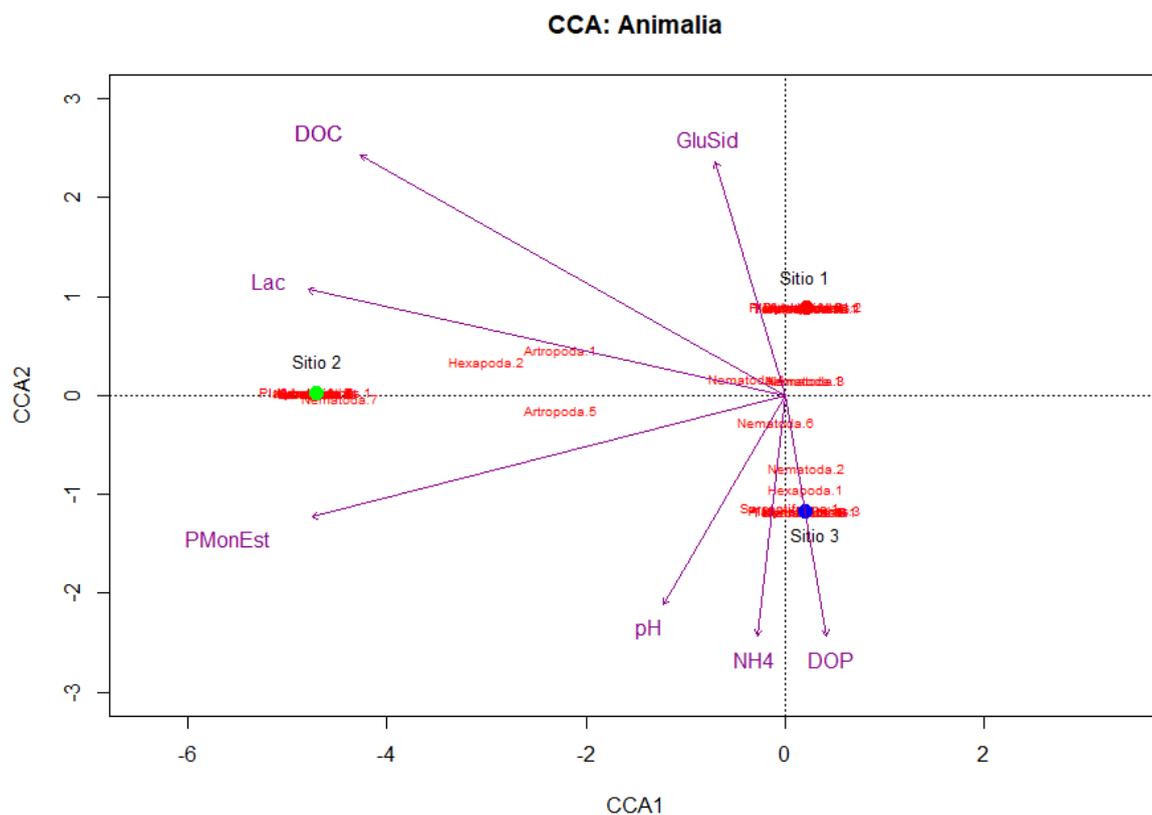


Fig. 16. Análisis de Correspondencia Canónica. El eje x representa el componente 1, el eje y el componente 2, las flechas azules corresponden a las variables ambientales (GluSid: enzima β -glucosidasa, DOP: fósforo orgánico disuelto, NH4: amonio, pH, PMonEst: enzima fosfomonoesterasa, DOC: carbono orgánico disuelto y Lac: enzima polifenol oxidasa), en rojo se muestran los ISVs y los puntos indican la posición de cada sitio. El CCA1 refleja un 84% de proporción explicada y el CCA2 un 15%.

6.3.2 Protista

Las condiciones ambientales en los tres sitios fueron muy distintas. Tanto el sitio 2 como el 3 presentaron altas concentraciones de nutrientes disueltos (Carbono, Fósforo y Amonio). Por otro lado, las comunidades del sitio 1 están sujetas a un ambiente con recursos limitados (Fig. 17).

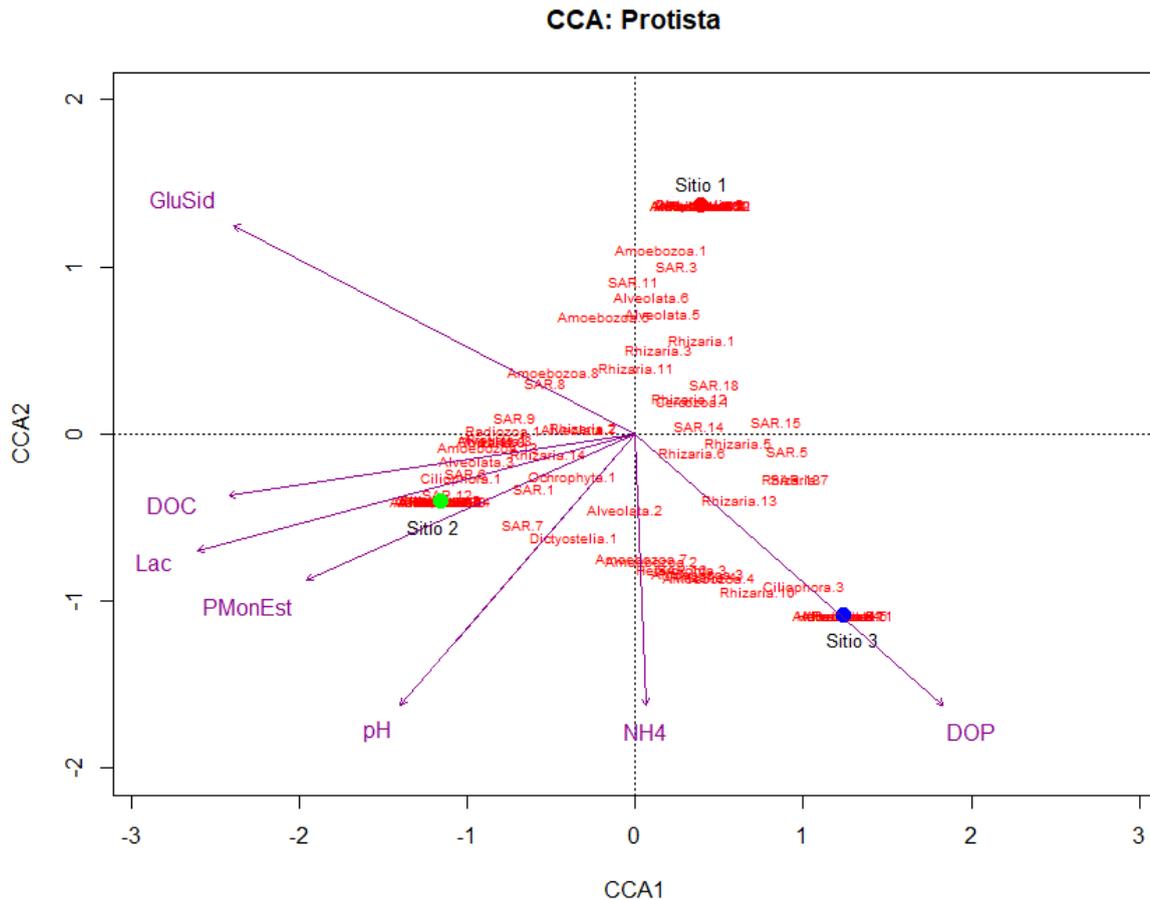


Fig. 17. Análisis de Correspondencia Canónica. El eje x representa el componente 1, el eje y el componente 2, las flechas azules corresponden a las variables ambientales (GluSid: enzima β -glucosidasa, DOP: fósforo orgánico disuelto, NH4: amonio, pH, PMonEst: enzima fosfomonoesterasa, DOC: carbono orgánico disuelto y Lac: enzima polifenol oxidasa), en rojo se muestran los ISVs y los puntos indican la posición de cada sitio. El CCA1 refleja un 57% de proporción explicada y el CCA2 un 42%.

6.3.3 Plantae

Se observaron diferencias en las comunidades de algas asociadas a las variables ambientales. El sitio 2 se correlacionó positivamente con las enzimas polifenol oxidasa y fosfomonoesterasa, y la concentración de carbono orgánico disuelto, y no

presenta ISVs exclusivos. Por otro lado, el sitio 3 se correlacionó positivamente con el fósforo orgánico disuelto y el amonio. Finalmente, el sitio 1 mostró una correlación negativa con el pH, es decir, fue el sitio más ácido (Fig. 18).

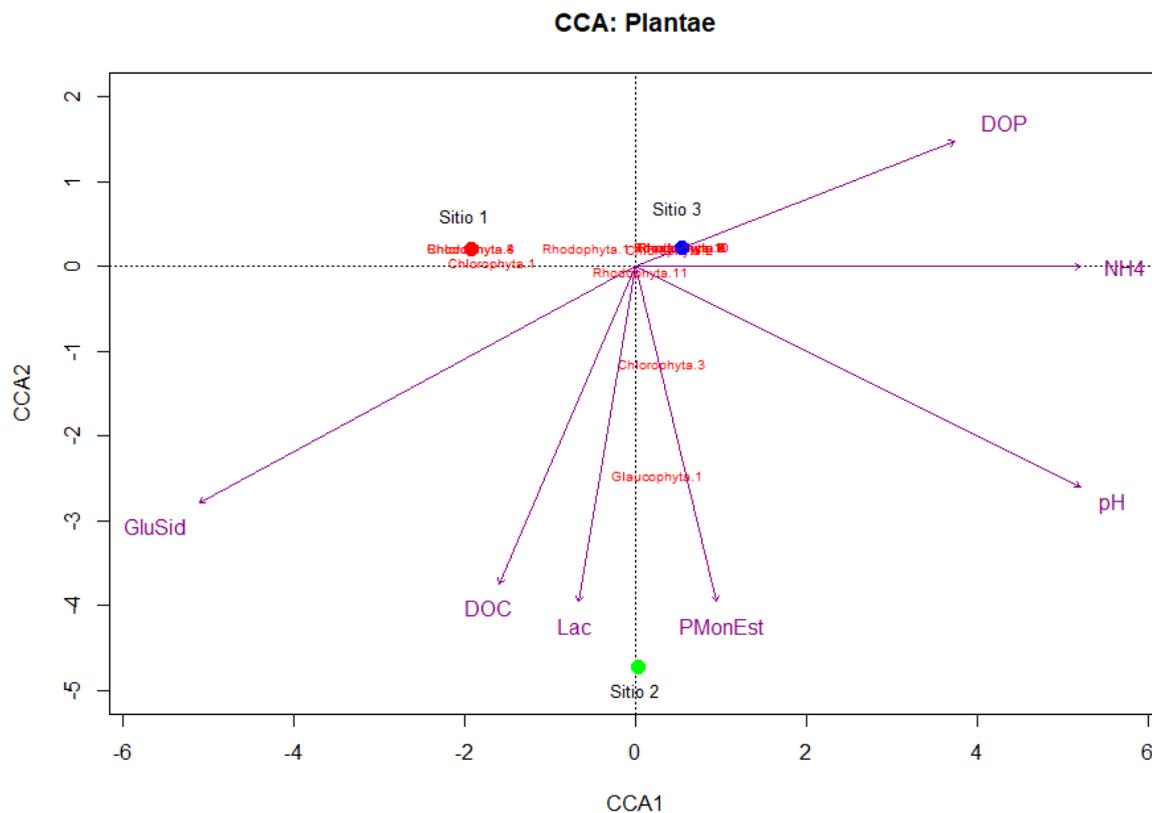


Fig. 18. Análisis de Correspondencia Canónica. El eje x representa el componente 1, el eje y el componente 2, las flechas azules corresponden a las variables ambientales (GluSid: enzima β -glucosidasa, DOP: fósforo orgánico disuelto, NH₄: amonio, pH, PMonEst: enzima fosfomonoesterasa, DOC: carbono orgánico disuelto y Lac: enzima polifenol oxidasa), en rojo se muestran los ISVs y los puntos indican la posición de cada sitio. El CCA1 refleja un 77% de proporción explicada y el CCA2 un 22%.

7. DISCUSIÓN

7.1 Utilidad de amplicones de la región ITS1 en estudios de ecología microbiana

Este es el primer trabajo que implementa la técnica de *metabarcoding* para caracterizar la comunidad de microeucariontes edáficos del BMM en México. Bajo este enfoque, se describe una comunidad diversa compuesta por nemátodos, microartrópodos, platelmintos, protistas y algas. A través de esta metodología

genética ampliamos los registros de microfauna que se tenían para el BMM de Oaxaca obtenidos previamente por métodos de colecta directa, y además reportamos la presencia de protistas y algas terrestres, pues al momento sólo se tenían registros de estos grupos para ecosistemas acuáticos.

Confirmamos la eficacia del método de *metabarcoding* utilizando la región ITS1 para describir la diversidad y estructura de las comunidades edáficas de microeucariontes, ya que nos permitió identificar simultáneamente a los múltiples taxones que habitan en el suelo del BMM, así como cuantificar la abundancia de los ISV caracterizados, reconociendo desde los ISVs dominantes hasta los raros.

No obstante, una de las limitaciones que enfrentamos con esta metodología fue que para la identificación taxonómica se utilizó el algoritmo BLAST, un método que está sujeto a la representatividad de los taxones y la presencia de secuencias identificadas incorrectamente o no identificadas en los repositorios (Jamy et al., 2020). A partir de esta búsqueda, encontramos que existe muy poca representación de microeucariontes edáficos en la base de datos consultada, por ejemplo, para los protistas y las algas la mayoría de secuencias reportadas corresponden a organismos marinos o dulceacuícolas, y en el caso de animales, están sobrerrepresentadas especies parásitas y de importancia agrícola o médica. Esto puede deberse a que muchos de los estudios sobre microeucariontes edáficos utilizan metodología de extracción y cultivo de los organismos, por lo que el acervo genético es limitado aún. Así mismo, a pesar de que el ITS1 ha sido propuesto como marcador universal para eucariontes y empleado en diversos estudios de carácter filogenético para grupos específicos (Coleman & Mai, 1997; Niogret et al., 2007; Stern et al., 2012; Wang et al. 2014), aún no se ha generalizado su uso. Por ejemplo, en animales es más común emplear el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) y para plantas regiones de ADN plástido (ej. *matK*, *rbcL*, *trnL*).

A pesar de estas limitaciones, alcanzamos los objetivos propuestos, haciendo énfasis en la necesidad de complementar estos estudios descriptivos con marcadores específicos de cada grupo caracterizado para maximizar la resolución en la identificación taxonómica. Así mismo, con este trabajo buscamos incentivar el estudio de microeucariontes edáficos incorporando técnicas moleculares ya que el conocimiento sobre estos grupos sigue siendo limitado, aun cuando se conoce su

importancia directa e indirecta en los ciclos biogeoquímicos e interacciones con otros microorganismos importantes como bacterias y hongos.

7.2 Patrones de diversidad en el reino Animalia

Con base en estudios previos, sabemos que los grupos más abundantes de microfauna en los suelos son colémbolos, ácaros y nemátodos (Coleman et al., 2004 ; Scheu et al., 2005; Beck et al., 2008). En este trabajo el grupo dominante en las comunidades fue Nematoda, no se identificaron colémbolos y solo se presentaron dos ISVs correspondientes a ácaros. La baja representación de estos grupos en nuestros resultados puede deberse a limitaciones metodológicas, ya que, aun cuando el ITS1 ha sido probado como código de barras eficiente en la identificación de especies de ácaros (Dabert, 2006; Lv et al., 2014) y colémbolos (Anslan & Tendersoo, 2015), aún no se ha generalizado su uso, por lo que existen muy pocas secuencias de referencia en las bases de datos. En la ITS2 Database, empleada en este estudio, solo están registradas 337 secuencias correspondientes a 32 especies identificadas de ácaros y cuatro secuencias de cuatro especies de colémbolos. Esto podría explicar la baja representación de estos grupos en el estudio, pues un gran número de ISVs solo se lograron asignar a nivel filo (ej. Arthropoda) y subfilo (ej. Hexapoda) sin distinguir especies particulares de colémbolos, mientras que de ácaros solo se determinaron dos ISVs de los órdenes Sarcoptiformes y Trombidiformes.

De acuerdo con los resultados, el sitio 2 fue el más diverso, reflejando una comunidad en donde las especies de microfauna presentan abundancias relativas similares. Por el contrario, la diversidad de las comunidades del sitio 1 y 3, se ve afectada negativamente por la alta dominancia del ISV Nematoda 1. Esta dominancia de Nematoda 1 puede explicarse por la actividad microbiana en el suelo. El sitio 1 está relacionado con una alta expresión de la enzima β -glucosidasa, la cual refleja la actividad de microorganismos, principalmente bacterias degradadoras de materia orgánica rica en carbono (Woodward & Wiseman, 1982; Baldrian, 2006, Sharma et al., 2007); mientras que, el sitio 3, correlaciona con altas cantidades de amonio, el cual es fijado al suelo por bacterias que mineralizan el N orgánico y posteriormente funge como recurso para las bacterias nitrificantes (Vitousek et al., 2002). Diversos autores han comprobado que los nemátodos

bacteriófagos migran hacia los pulsos de recursos, aumentando su abundancia hasta 30 veces (Griffiths, 1990; Bonkowski, 2004; Scheu et al., 2005; Van der Wal et al., 2012; Shaw et al., 2018). En un estudio realizado en el mismo sitio sobre la diversidad bacteriana del suelo, Álvarez-López (2021) registra la presencia de bacterias de los filos Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria (ej. B-proteobacterias y *Pseudomonas*) que son degradadoras de C, N y P, en el sitio 1 y 3. Estos resultados confirman que existe disponibilidad de recursos que puede favorecer a los nemátodos bacteriófagos oportunistas que dominan las comunidades en estos sitios.

En contraste, en el sitio 2 se observó una mayor riqueza de animales y se relaciona con la alta representación de la enzima polifenol oxidasa, producida principalmente por hongos para la degradación de lignina (Woodward & Wiseman, 1982; Baldrian, 2006, Sharma et al., 2007). Esto podría indicarnos que al haber hongos, existe una mayor diversidad de recursos por lo que tenemos igualmente una comunidad más diversa de microfauna en la que, por ejemplo, aumenta la representación de nemátodos fungívoros (Boag & Yeates, 1998; Coleman et al., 2004).

Los resultados de diversidad β , muestran una alta heterogeneidad en la composición de microfauna, ya que no existe un patrón de agrupamiento ni siquiera entre las muestras del mismo sitio (Fig. 10A), ya que, a pesar de que hay ISVs cosmopolitas, existen muchos ISVs exclusivos por muestra. Por el contrario, cuando hablamos de abundancias, existe un agrupamiento entre las muestras del sitio 1 y 3, determinado por las altas abundancias de Nematoda 1 para ambos sitios (Fig. 10B).

7.3 Patrones de diversidad en el reino Protista

Los protistas son el grupo de microeucariontes con mayor biomasa y diversidad en los suelos de bosques, se estima que en un gramo de suelo seco es posible encontrar de 10^4 – 10^7 individuos y entre 50 y 100 especies de protistas. (Adl & Gupta, 2006; Geisen et al., 2015; Dupont et al., 2016; Geisen & Bonkowski, 2018; Geisen et al., 2020). En la literatura se señala que los grupos de protistas más abundantes en los suelos son el filo Amoebozoa y los super filos Alveolata (ie.

Ciliophora) y Rhizaria (ie. Cercozoa), destacando a Rhizaria como el grupo más numeroso en bosques (Stefan et al., 2014; Geisen et al., 2015; Dupont et al., 2016; Wu et al., 2022). Nuestros resultados coinciden con estos reportes ya que muestran a Rhizaria como el grupo con mayor abundancia y alta representación de ISVs dominantes, mientras que, Alveolata y Amoebozoa fueron menos abundantes y se caracterizaron por albergar un alto número de ISVs raros (Fig. 6). La dominancia de Rhizaria en bosques se asocia principalmente a la concentración de carbono en el suelo y la actividad enzimática, ya que son protistas consumidores (ej. bacteriófagos y fungívoros) que se dispersan activamente en busca de alimento (Stefan et al., 2014; Oliverio et al., 2020; Wu et al., 2022).

Anteriormente, se tenían descritas 34 especies de protistas para el estado de Oaxaca (Gallegos-Neyra et al., 2014; Mayén-Estrada et al., 2014b). Sin embargo, en este trabajo reportamos más de 80 ISVs, de los cuales 20 ISVs corresponden al grupo Alveolata, 17 a Rhizaria y 16 a Amoebozoa (Fig. 6). Estos resultados evidencian la alta diversidad de este grupo de organismos en el suelo del BMM, por lo que es indispensable realizar estudios taxonómicos detallados en este campo.

De acuerdo con el análisis de las variables ambientales, los patrones de diversidad observados en protistas podrían estar relacionados con la concentración de carbono y la actividad microbiana. El sitio 2, que relacionó positivamente con la presencia de las enzimas β -glucosidasa, polifenol oxidasa, y carbono orgánico disuelto, fue el más diverso y con los valores más altos de riqueza y abundancia de protistas, en contraste con el sitio 3, cuya relación con estas variables fue negativa y presentó los valores más bajos de riqueza, diversidad y abundancia. Este patrón puede explicarse por el efecto de la rizósfera, ya que las raíces del helecho *Alsophila salvinii* (sitio 2) emiten compuestos de carbono al suelo, que son un recurso importante para microorganismos como bacterias y hongos, que a su vez, atraen a diversos protistas consumidores (Samad et al., 2019). Por el contrario, en el sitio 3 se ubica un tronco derribado, que no libera activamente este tipo de compuestos y por lo tanto no representa un *hotspot* de alimento que pueda sustentar comunidades diversas de protistas.

La β -glucosidasa y polifenol oxidasa son producidas principalmente por bacterias y hongos saprobios para la degradación de materia orgánica rica en carbono

(Woodward & Wiseman, 1982; Baldrian, 2006, Sharma et al., 2007). Por lo que, la presencia de estas enzimas puede indicarnos la existencia de una comunidad activa de bacterias y hongos degradadores. Tomando en cuenta que una parte importante de los protistas terrestres son depredadores de bacterias y hongos (Acosta-Mercado & Lynn, 2004; Seppey et al., 2017; Geisen et al., 2020), su abundancia y diversidad se relaciona directamente con la de sus presas. Diversos estudios han demostrado que el aumento en la densidad de protistas se correlaciona positivamente con la biomasa y actividad microbiana (Acosta-Mercado & Lynn, 2004; Adl & Coleman, 2005; Geisen et al., 2018). Para corroborar este patrón, se revisaron los estudios previamente realizados en el sitio sobre la diversidad de bacterias (Álvarez López, 2021) y hongos (Velez et al., 2021). Como resultado, detectamos que tanto la riqueza de bacterias cultivables como la de hongos fue mayor en el sitio 2 y menor en el sitio 3, confirmando el patrón de relación entre la diversidad de protistas y sus presas.

En el análisis de la diversidad β , observamos que el sitio 1 y 2 comparten muchos ISVs, mientras que el sitio 3 difiere en composición ya que presenta una riqueza mucho menor (Fig. 12A). Las abundancias no varían abruptamente entre muestras, por lo que no existe un patrón de agrupamiento (Fig. 12B). Como mencionamos anteriormente, en el sitio 1 y 2, la presencia de especies vegetales (*O. mexicana* y *Alsophila salvinii* respectivamente) ejerce un efecto directo en las comunidades edáficas por efecto de la rizósfera, contrario al sitio 3 que carece de vegetación, por ello, las comunidades de protistas del sitio 1 y 2, son más similares entre sí y difieren con el sitio 3.

7.4 Patrones de diversidad en el reino Plantae

Las algas verdes o clorofitas, son el mayor componente en las comunidades de algas eucariotas en el suelo de bosques (Bakieva et al., 2012; Maltseva et al., 2022; Novakovskaya et al., 2022; Zhang & Lv, 2022). Este patrón de dominancia fue observado en la mayoría de las muestras analizadas en este trabajo. Parte de esta dominancia se relaciona con el pH del suelo ya que se ha reportado en la literatura que las clorofitas son tolerantes a un amplio rango de condiciones de pH, por lo que dominan las comunidades de algas en suelos ácidos (Hoffmann, 1989;

Novakovskaya et al., 2022). En el sitio de estudio, los valores de pH van de 4.5 a 4.8, condiciones favorables para la proliferación de este grupo.

Por otra parte, las algas rojas o rodofitas fueron el grupo con mayor riqueza (9 ISVs). Sin embargo, no es un patrón comúnmente reportado, ya que la mayoría de especies de rodofitas corresponden a hábitats marinos y dulceacuícolas, solo un número reducido de especies se reconocen como terrestres y es poco frecuente extraerlas de los suelos (Deluqui & Lopez-Bautista, 2007; Thorn & Lynch, 2007). No obstante, con la implementación de las herramientas moleculares, las rodofitas comienzan a detectarse como parte de la microflora edáfica, principalmente los órdenes Bangiales, Porphyridiales y Cyanidiales (Thorn & Lynch, 2007, Yuan et al., 2015, Mayanglambam & Sahoo, 2015; Santos et al., 2020), por lo que sería conveniente profundizar en la identificación de estos ISVs, pues podrían tratarse de nuevos registros.

En cuanto a la relación con las variables abióticas, observamos que el sitio 3 presentó los valores más altos de riqueza y abundancia de algas y está asociado a valores altos de amonio y fósforo orgánico disuelto, nutrientes esenciales para los organismos autótrofos. Varios estudios han concluido que tanto el P como el N son factores determinantes que afectan de manera positiva en la abundancia, biomasa y riqueza de las algas (Lin & Wu, 2014; Yuan et al., 2015; Glaser et al., 2017; Novakovskaya et al., 2022). Adicionalmente, en el sitio 3 se presentó la mayor riqueza de rodofitas y de acuerdo con Thorn y Lynch (2007), las rodofitas del género *Porphyridium* crecen en suelos húmedos ricos en amonio.

Además de las condiciones abióticas, las interacciones bióticas también podrían estar moldeando la estructura de las comunidades de algas. Tanto los protistas como la microfauna presentaron la mayor riqueza en el sitio 2, y en el caso de los protistas, la mayor abundancia también. Por el contrario, para las algas, el sitio 2 fue el menos diverso y abundante. Este patrón podría ser un reflejo de la depredación de algas por protistas, nemátodos y microartrópodos algívoros que ha sido bien documentada (Büdel, 2005; Thorn & Lynch, 2007; Seppey et al., 2017). De igual modo, esto puede ser reflejo de la competencia con las especies vegetales presentes en el sitio 1 y 2, pues sabemos que las algas proliferan en suelos

desprovistos de vegetación y disminuyen cuando la vegetación comienza a establecerse (Thorn & Lynch, 2007). El sitio 3 al no tener grandes especies vegetales está libre de competencia favoreciendo el establecimiento de más especies de algas.

Con el análisis de la diversidad β observamos que existe mucha heterogeneidad ya que las algas clorofitas se distribuyen en todas las muestras. Solo existe un patrón de agrupación entre las muestras del sitio 3, explicado por la presencia de algunas rodofitas que no se comparten con los otros sitios (Fig. 14A). Respecto a la abundancia, igualmente vemos mucha heterogeneidad entre muestras y sitios (Fig. 14B), aunque en general el sitio 3 fue el más abundante, probablemente por la ausencia de presiones como competencia y depredación mencionadas anteriormente.

8. CONCLUSIONES

A través del *metabarcoding*, utilizando la región ITS1 como marcador universal para evaluar la diversidad de microeucariontes, logramos describir una comunidad diversa compuesta por nemátodos, microartrópodos, platelmintos, protistas y algas.

Este resultado es importante, ya que nos da idea de que, así como el BMM es un ecosistema diverso en cuanto a plantas y animales macroscópicos, también lo es a nivel del suelo en organismos microeucariontes. Así mismo, confirma la utilidad de esta metodología para hacer estudios descriptivos multi taxa de las comunidades edáficas.

La comunidad de microfauna para los sitios 1 y 3, se caracterizó por la dominancia del ISV Nematoda 1. El sitio 1 reflejó una alta expresión de la enzima β -glucosidasa mientras que el sitio 3 se correlacionó con altas cantidades de amonio, dos variables que podrían estar indicando la alta densidad de bacterias, que son un recurso importante para la proliferación de nemátodos bacterófagos oportunistas.

En el caso de protistas, la mayor riqueza y abundancia se presentó en el sitio 2, caracterizado por una alta concentración de carbono y actividad enzimática. Estas variables indican la presencia de una comunidad activa de bacterias y hongos

degradadores de carbono, por lo que podemos inferir que la abundancia y diversidad de protistas se relaciona directamente con la de sus presas. Para complementar estas inferencias se consultó la información sobre las comunidades de hongos y bacterias de estudios previos en el sitio y concluimos que los patrones de diversidad y abundancia de los tres grupos coinciden y podrían estar relacionados.

En cuanto a las algas, la mayor abundancia y riqueza se observó en el sitio 3 y se relaciona con altos contenidos de amonio y fósforo orgánico disuelto, nutrientes esenciales para el desarrollo de estos organismos autótrofos. Por el contrario, la menor diversidad y abundancia se observó en el sitio 2, que fue el más diverso para animales y protistas, lo que podría indicar que existe una presión por depredación de microeucariontes algívoros.

En general, se observó una alta heterogeneidad entre las comunidades, ya que, a pesar de que hubo especies compartidas entre muestras y sitios, detectamos la presencia de muchos ISVs exclusivos de cada muestra y sitio, lo que nos habla de que aún a una escala de centímetros tanto las variables abióticas como las interacciones bióticas cambian y moldean de manera diferencial las comunidades de microeucariontes.

Finalmente, concluimos que integrar el enfoque genético para caracterizar la comunidad de microeucariontes con el análisis de la relación de la diversidad con las variables ambientales, resulta muy enriquecedor para identificar patrones ecológicos y generar modelos predictivos de la distribución y cambios en la diversidad, herramientas que pueden emplearse en planes de conservación para este ecosistema amenazado.

9. PERSPECTIVAS

A pesar de que probamos la eficacia del *metabarcoding* empleando la región ITS1 para describir la comunidad de microeucariontes edáficos, en este estudio el nivel taxonómico que presentamos sólo alcanzaron una resolución a niveles superiores phylum, Clase u Orden, esto debido a que sólo empleamos un primer universal para

ITS1. Con el fin de lograr identificaciones más precisas a nivel especie o género es conveniente complementar la metodología con un set de primers específicos para cada grupo de interés, aumentando así la detección de secuencias por grupo y la resolución de identificación (Jacquiod et al., 2016).

Los resultados de este trabajo presentan un panorama general de la diversidad de microeucariontes del suelo en el BMM y pretenden incentivar futuras investigaciones para ampliar nuestro conocimiento sobre su papel en las interacciones con otros microorganismos del suelo, así como analizar su impacto en los procesos biogeoquímicos particulares de este ecosistema amenazado.

De igual modo, con esta investigación buscamos incrementar el interés en uso de herramientas moleculares, ya que hasta el momento, el conocimiento de la diversidad edáfica de microeucariontes en el BMM se ha construido a base de métodos de extracción y cultivo de organismos, así como la identificación taxonómica basada en la morfología, métodos que pueden no estar reflejando toda la diversidad del sitio. Las herramientas moleculares nos ayudan a ampliar la visión de la diversidad pues no se limitan a especies cultivables y no requieren la experiencia previa en taxonomía de los grupos, además detecta especies tanto raras como abundantes y nos proporciona información no solo de la presencia, sino también de la abundancia de cada taxón secuenciado.

10. REFERENCIAS

Acosta-Mercado, D., & Lynn, D. (2004). *Soil Ciliate Species Richness and Abundance Associated with the Rhizosphere of Different Subtropical Plant Species*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51(5): 582-588.

Adl, M., & Gupta, V. (2006). *Protists in soil ecology and forest nutrient cycling*. *Canadian Journal of Forest Research*, 1805-1817.

Adl, S., & Coleman, D. (2005). *Dynamics of soil protozoa using a direct count method*. *Biol Fertil Soils*, 42: 168-171.

Álvarez-López, G. N. (2021). Relación entre la diversidad bacteriana cultivable y los ciclos biogeoquímicos del suelo en el Bosque Mesófilo de Montaña de Santiago Comaltepec, Oaxaca.

Anslan, S., & Tendersoo, L. (2015). *Performance of cytochrome c oxidase subunit I (COI), ribosomal DNA Large Subunit (LSU) and Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in DNA barcoding of Collembola*. *European Journal of Soil Biology*, 69: 1-7.

Bakieva G. R., Khaibullina, L. S., Gaisina, L. A. & Kabirov, R. R. (2012). *Ecological Floristic Analysis of Soil Algae and Cyanobacteria on the TraTau and YurakTau Mounts, Bashkiria*. *Eurasian Soil Science*, 45(9): 873-881.

Baldrian, P., 2006. *Fungal laccases - occurrence and properties*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215-242.

Bardgett R.D. & Griffiths, B. (1997). *Ecology and biology of soil protozoa, nematodes and microarthropods*. En *Modern Soil Microbiology* (págs. 129-163). New York: CRC Press.

Bardgett, R. D. (2005). *The diversity of life in soil*. En *The Biology of Soil: A community and Ecosystem Approach* (págs. 24-55). Oxford: Oxford University Press.

Beck, E., Bendix, J., Kottke, I., Makeschin, F., & Mosandl, R. (2008). *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador*. Berlin: Springer.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). *ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biase*. *BMC Microbiology*, 10: 189.

Beltrán-Villanueva, M. Á., Tamez-Hernández, L., Cruz-Miranda, S., & Páez-Gerardo, L. (2016). *Listado Taxonómico de algunos Artrópodos Edáficas en dos localidades de Xicotepec de Juárez, Puebla*. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Entomología*, 39-44.

Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., Sánchez-García, M. et al. (2013). *Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data*. *Methods in Ecology and Evolution*, 4: 914-919.

Bernal Rojas, A., Castaño-Meneses, G., Palacios-Vargas, J. G., & García-Calderón, N. E. (2009). *Oribatid mites and springtails from a coffee plantation in Sierra Sur, Oaxaca, Mexico*. *Pesq. agropec. bras.*, 44(8): 988-995.

Boag, B. & Yeates G. W. (1998) *Soil nematode biodiversity in terrestrial ecosystems*. *Biodiversity and Conservation*, 7: 617-630.

- Bonkowski, M. (2004). *Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited*. *New Phytologist*, 617-631.
- Bubb, P., May, I., Miles, L., & Sayer, J. (2004). *Cloud Forest Agenda*. UK: UNEP-WCMC.
- Buchheim MA, Keller A, Koetschan C, Förster F, Merget B, et al. (2011) *Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life*. *PLoS ONE*, 6(2): e16931.
- Büdel, B. (2005). *Microorganisms of Biological Crusts on Soil Surfaces*. En *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (págs. 253-275). Alemania: Springer.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. & Holmes S. P. (2016) *DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data*. *Nature Methods*, 13(7): 581-583.
- Chacón, S. & Medel, R. (1993) Los hongos (principalmente macromicetos) registrados en el bosque mesófilo de montaña de México. En *Contribuciones micológicas en homenaje al Biólogo José Castillo Tovar por su labor en pro de la micología mexicana*. Reporte Científico No. especial 13. (págs. 61-110). México: Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares.
- Coleman, A. W. & Mai, J. C. (1997) *Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness*. *Journal of Molecular Evolution*, 45:168-177.
- Coleman, A. W. (2003). *ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons*. *TRENDS in Genetics*, 19(7): 370-375.
- Coleman, D. C., Crossley, D. A. & Hendrix P. (2004). *Fundamentals of Soil Ecology*, 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Coleman, D. C. & Wall, D. H. (2007). *Fauna: The engine for microbial activity and Transport*. En *Soil Microbiology and Biochemistry* (págs. 163-191). Estados Unidos: Elsevier.
- Coleman, A. (2007). *Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure*. *Nucleic Acids Research*, 35(10): 3322-3329.
- CONABIO. (2010). *El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible*. México: CONABIO.
- Condrón, L., Stark, C., O' Callaghan, M., Clinton, P. & Huang, Z. (2010) *The Role of Microbial Communities in the Formation and Decomposition of Soil Organic Matter*.

En *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production* (págs. 81-118). Inglaterra: Springer.

Créach, V., Ernst, A., Sabbe, K., Vanellander, B., Vyverman, W., & Stal, L. (2006). *Using quantitative PCR to determine the distribution of a semicryptic benthic diatom, Navicula phyllepta (Bacillariophyceae)*. *J. Phycol.* 42: 1142-1154.

Cruickshank, R. (2002). *Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks*. *Systematic and Applied Acarology*, 7(1): 3-14.

Cruz-Narváez, Y., Rico-Arzate, E., Castro-Arellano, J. J., Noriega-Altamirano, G., Piña-Escobedo, A., Murugesan, S. & García-Mena, J. (2021) *Obtaining microorganisms in cloud forest soils for the degradation of aromatic hydrocarbons*. *Rev. Chapingo ser. cienc. for. ambient*, 25.

Dabert, M. (2006). *DNA markers in the phylogenetics of the Acari*. *Biological Lett.*, 43(2): 97-107.

De la Rosa, I. N., & Negrete-Yankelevich, S. (2012). Distribución espacial de la macrofauna edáfica en bosque mesófilo, bosque secundario y pastizal en la reserva La Cortadura, Coatepec, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 201-215.

del Mar Delgado-Serrano, M., Escalante, R. & Basurto, S. (2015) Is the community-based management of natural resources inherently linked to resilience? An analysis of the Santiago Comaltepec community (Mexico). *Revista de Estudios sobre Despoblación y Desarrollo Rural.*, 18: 91-114.

Deluqui, C. F. & Lopez-Bautista, J.(2007). *Red Algae*. *Encyclopedia of life sciences*.

Dighton, J. (1997) *Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats*. En *The Mycota, vol 4* (págs. 287-300). Berlin: Springer Verlag.

Drummond, A. J., Newcomb, R. D., Buckley, T. R., Xie, D., Dopheide, A., Potter, B. C., Heled, J., Ross, H. A., Tooman, L., Grosser, S., Park, D., Demetras, N. J., Stevens, M. I., Russell, J. C., Anderson, S. H., Carter, A. & Nelson, N. (2015) *Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment*. *GigaScience*. 4(46).

Dupont, A., Griffiths, R., Bell, T., & Bass, D. (2016). *Differences in soil micro-eukaryotic communities over soil pH gradients are strongly driven by parasites and saprotrophs*. *Environmental Microbiology*. 2010-2024.

FAO. (2006). Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales.

Fierros, M. L., Navarrete-Heredia, J. L. & Guzmán-Dávalos, L. (2000) Hongos macroscópicos de la Sierra de Quila, Jalisco, México: diversidad y similitud fungística. *Rev. biol. trop.* 48.

Friedl, T. & Rybalka, N. (2012) *Systematics of Green Algae: A Brief Introduction to the Current Status*. En *Progress in Botany vol. 73* (págs. 259-280). Berlín: Springer.

Gallegos-Neyra, E. M., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M., & Mayén-Estrada, R. (2014). Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 10-25.

Gardes, M. & Bruns, D. (1993). *ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts*. *Molecular Ecology*. 2: 113-118.

Geisen, S., Tveit, A. T., Clark, I. M., Richter, A., Svenning, M. M., Bonkowski, M. & Urich, T. (2015). *Metatranscriptomic census of active protists in soils*. *The ISME Journal*. 9: 2178-2190.

Geisen, S. & Bonkowski, M. (2018). *Methodological advances to study the diversity of soil protists and their functioning in soil food webs*. *Applied Soil Ecology*. 123: 328-333.

Geisen, S., Mitchell, E., Adl, S., Bonkowski, M., Dunthorn, M., Ekelund, F., Lara, E. et al. (2018). *Soil protists: a fertile frontier in soil biology research*. *FEMS Microbiology Reviews*. 42: 293-323.

Geisen, S., Briones, M. J., Gan, H., Behan-Pelletier, V. M., Friman, V.-P., Arjen de Groot, G., Hannula, S. E., Lindo, Z., Philippot, L., Tiunov, A. L. & Wall, D. H. (2019). *A methodological framework to embrace soil biodiversity*. *Soil Biology and Biochemistry*. 136:107536.

Geisen, S., Lara, E., Mitchell, E. A., Völcker, E., & Krashevskaya, V. (2020). *Soil protist life matters! Soil Organisms*. 92(3): 189-196.

Gessner, M., Swan, C., Dang, C., McKie, B., Bardgett, R., Wall, D. & Hättenschwiler, S. (2010). *Diversity meets decomposition*. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 372-80.

Glaser, K., Baumann, K., Leinweber, P., Mikhailyuk, T. & Karsten, U. (2017). *Algal diversity of temperate biological soil crusts depends on land use intensity and affects phosphorus biogeochemical cycling*. *Biogeosciences Discuss*.

González, J. (1987). Las Algas de México. *Ciencias*. 16-25.

Gou, H., Guan, G., Liu, A., Ma, M., Xu, Z., Liu, Z., Ren, Q., Li, Y., Yang, J., Chen, Z., Yin, H. & Luo, J. (2012). *A DNA barcode for Piroplasma*. *Acta Tropica*, 124: 92-97.

- Griffiths, B. (1990). *A comparison of microbial-feeding nematodes and protozoa in the rhizosphere of different plants. Biology and Fertility of Soils.* 9: 83-88.
- Gual-Díaz, M., & Rendón-Correa, A. (2014). *Bosques Mesófilos de Montaña de México : diversidad, ecología y manejo.* México: CONABIO.
- Hågvar, S. & Abrahamsen, G. (1980). *Colonisation by Enchytraeidae, Collembola and Acari in sterile soil samples with adjusted pH levels. OIKOS.* 34: 245-258.
- Hågvar, S. (1990). *Reactions to soil acidification in microarthropods: Is competition a key factor?. Biol. Fertil. Soils.* 9: 178-181.
- Hamilton, H. C., Strickland, M. S., Wickings, K., Bradford, M. A. & Fierer, N. (2009) *Surveying soil faunal communities using a direct molecular approach. Soil Biology & Biochemistry.* 41: 1311-1314.
- Hättenschwiler, S., Tiunov, A. V. & Scheu, S. (2005) *Biodiversity and Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:191-218.
- Heemsbergen, D., Berg, M., Loreau, M., van Hal, J., Faber, J., & Verhoef, H. (2004). *Biodiversity Effects on Soil Processes Explained by Interspecific Functional Dissimilarity. Science.* 1019-1020.
- Heredia, G., Reyes, M. & Arias, R. M. (2004). Adiciones al conocimiento de la diversidad de los hongos conidiales del bosque mesófilo de montaña del estado de Veracruz. *Act. Bot. Mex.* 66: 1-22.
- Hoffmann, L. (1989). *Algae of Terrestrial Habitats. The Botanical Review.* 55(2): 77-97.
- INEGI. (2005). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Santiago Comaltepec, Oaxaca.*
- Jacquioud, S., Stenbæk, J., Santos, S., Winding, A., Sørensen, S. & Priemé, A. (2016). *Metagenomes provide valuable comparative information on soil microeukaryotes. Research in Microbiology.* 167:436-450.
- Jamy, M., Foster, R., Barbera, P., Czech, L., Kozlov, A., Stamatakis, A., Bending, G., Hilton, S., Bass, D. & Burki, F. (2020). *Long-read metabarcoding of the eukaryotic rDNA operon to phylogenetically and taxonomically resolve environmental diversity. Molecular Ecology Resources.* 20: 429-443.
- Kimpinski, J. & Sturtz, A. V. (1996). *Population growth of a Rhabditid nematode on plant growth promoting bacteria from potato tubers and rhizosphere soil. J. Nematol.* 28(4S): 682-686.

Köhler, M., Leitner, B., Blaschitz, M., Michel, R., Aspöck, H., & Walochnik, J. (2006). *ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus Acanthamoeba (Protozoa: Amoebozoa)*. *Parasitol. Res.* 98: 86-93.

Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S. & Buckley, H. (2018). Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology*, 42(1), 10.

León-Tejera, H. & González-González, J. (1993). Macroalgas de Oaxaca. En *Biodiversidad Marina y Costera de México* (págs. 486-498). México: CONABIO.

Li, D. Z., Gao, L. M., Li, H. T., Wnag, H., Ge, X. J., Liu, J. Q., Chen, S. L. et al. (2011). *Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants*. *PNAS*. 108(49): 19641-19646.

Lin, C. & Wu, J. (2014). *Environmental Factors Affecting the Diversity and Abundance of Soil Photomicrobes in Arid Lands of Subtropical Taiwan*. *Geomicrobiology Journal*. 31(4): 350-359.

Lin, M., Simons, A.L., Curd, E.E., Harrigan, R.J., Schneider, F.D., Ruiz-Ramos, D.V., Gold, Z., Osborne, M.G., Shirazi, S., Schweizer, T.M., Moore, T.N., Fox, E.A., Turba, R., Garcia-Vedrenne, A.E., Helman, S.K., Rutledge, K., Mejia, M.P., Munguia Ramos, M.N., Wetzler, R., Pentcheff, D., Mctavish, E.J., Dawson, M.N., Shapiro, B., Wayne, R.K. & Meyer, R.S. (2020). *A Biodiversity Composition Map of California Derived from Environmental DNA Metabarcoding and Earth Observation*. *Ecological Applications*.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Reece, K. S., Stokes, N. A., Lutzoni, F. M., Yonish, B. A., West, M. A., Black, M. N. D. & Tester, P. A. (2007). *Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences*. *J. Phycol.* 43: 344-355.

Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Chen, Y., Feng, C., Yuan, X., Lin, X. et al. (2014). *Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida)*. *Parasites & Vectors*. 7(93): 1-11.

Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2019). *Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis*. Version 3.61. <http://mesquiteproject.org>.

Maltseva, I., Shcherbyna, V., Yakoviichuk, O., & Pyurko, O. (2022). *Ecological determinants of algal communities of different types of ecosystems*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 1-8.

Mayanglambam, A., & Sahoo, D. (2015). *Red Algae*. En *The Algae World* (págs. 205-234). Israel : Springer.

- Mayén-Estrada, R., Reyes-Santos, M., & Aguilar-Aguilar, R. (2014)a. Biodiversidad de Ciliophora en México. *Revista Mexicana de la Biodiversidad*. 34-43.
- Mayén-Estrada, R., Reyes-Santos, M., & Vicencio-Aguilar, M. (2014)b. Biodiversidad de protistas (flagelados heterótrofos) en México. *Revista Mexicana de la Biodiversidad*. 26-33.
- Medel, R. (2013). Hongos ascomicetos del bosque mesófilo de montaña en México. *Act. Bot. Mex.* 105: 87-106.
- Meidute, S., Demoling, F. & Bååth, E. (2008). *Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. Soil Biology & Biochemistry*. 40: 2334-2343.
- Monard, C., Gantner, S., & Stenlid, J. (2013). *Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. FEMS Microbiol. Ecol.* 84: 165-175.
- Moniz, M. B. J. & Kaczmarska I. (2010) *Barcoding of Diatoms: Nuclear Encoded ITS Revisited. Protist*. 161: 7-34.
- Morón-Ríos, A., & Huerta-Lwanga, E. (2006). *Soil Macrofauna of two successional Evergreen Cloud Forest stages from The Cerro Huitepec Nature Reserve, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. Interciencia*. 31: 611-615.
- Navajas, M., Lagnel, J., Fauvel, G. & de Morales, G. (1999). *Sequence variation of ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. Experimental and Applied Acarology*. 23: 851-859.
- Navajas, M. & Fenton, B. (2000). *The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. Exp. Appl. Acarol.* 24: 751.
- Nielsen, U. N., Osler, G. H., Campbell, C. D., Neilson, R., & Burslem, D. F. (2010). *The Enigma of Soil Animal Species Diversity Revisited: The Role of Small-Scale Heterogeneity. PloS ONE*. e11567.
- Niogret, J., Nicot, A., de Stordeur, E. & Bertrand, M. (2007). *Combination of morphological characters and ITS-sequence to characterize a new species of Macrocheles (Acari: Macrochelidae). Zootaxa*. 1386: 19-29.
- Noge, K., Mori, N., Tanaka, C., Nishida, R., Tsuda, M., & Kuwahara, Y. (2005). *Identification of astigmatid mites using the second internal transcribed spacer (ITS2) region and its application for phylogenetic study. Experimental and Applied Acarology*. (35): 29-46.
- Novakovskaya, I. V., Patova, E. N., Dubrovskiy, Y. A., Novakovskiy, A. B. & Kulyugina, E. E. (2022). *Distribution of algae and cyanobacteria of biological soil*

crusts along the elevation gradient in mountain plant communities at the Northern Urals (Russian European Northeast). J. Mt. Sci. 19(3): 637-646.

Novelo , E. (2012). *Chlorophyta*. En *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (págs. 1-86). México: Instituto de Biología.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. & Wagner, H. (2020). *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Oliverio, A. M., Geisen, S., Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Turner, B. L. & Fierer, N. (2020) *The global-scale distributions of soil protists and their contributions to belowground systems. Science Advances.* 6(4).

Padilla-García, C. Y., Camacho-Sánchez, F. Y. & Reyes-López, M. A. (2021). *Metabarcoding de DNA ambiental: un enfoque para el seguimiento de la biodiversidad. Ciencia UAT.* 16(1): 136-149.

Parada-Barrera, G. (1987). Contribución al conocimiento sobre la entomofauna del suelo y la hojarasca, en un Bosque Mesófilo de Montaña en la Sierra de Manantlán, Jalisco, México. [Tesis de Licenciatura] Universidad de Guadalajara.

Pawlowski J, Audic S, Adl S, Bass D, Belbahri L, et al. (2012). *CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. PLoS Biol.* 10(11): e1001419.

Pedroche, F., Dreckmann, K., Sentíes, A. & Margain-Hernández, R. (1993). Diversidad Algal en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.* 69-92.

Reverchon, F., García-Quiroz, W., Guevara-Avenidaño, E., Solís-García, I. A., Ferrera-Rodríguez, O. & Lorea-Hernández, F. (2019). *Antifungal potential of Lauraceae rhizobacteria from a tropical montane cloud forest against Fusarium spp. Braz J Microbiol.* 50: 583-592.

Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S., & Bonkowski, M. (2009). *Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of Arabidopsis thaliana. The ISME Journal.* 1-10.

Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). *Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. Global Ecology and Conservation.* e00547.

Rzedowski, J. (1996) Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana*. 35: 25-44.

Salamon, J. A., M. Schaefer, J. Alphei, B. Schmid, & S. Scheu . (2004). *Effects of plant diversity on Collembola in an experimental grassland ecosystem*. *Oikos*. 106: 51-60.

Šalamún, P., Kucanová, E., Brázová, T., Miklisová, D., Renčo, M., & Hanzelová, V. (2014). *Diversity and food web structure of nematode communities under high soil salinity and alkaline pH*. *Ecotoxicology*. 23:1367-1376.

Samad, A., Brader, G., Pfaffenbichler, N. & Sessitsc, A. (2019) *Plant-Associated Bacteria and the Rhizosphere*. En *Modern Soil Microbiology* (págs. 163-175). Nueva York: CRC Press.

Santos, S.S., Schöler, A., Nielsen, T.K., Hansen, L.H., Schlöter, M. & Winding, A. (2020). *Land use as a driver for protist community structure in soils under agricultural use across Europe*. *Science of The Total Environment*. 717: 137228.

Sapkota, R., & Nicolaisen, M. (2015). *An improved high throughput sequencing method for studying oomycete communities*. *Journal of Microbiological Methods*. 110: 33-39.

Satyanarayana, T., Narain Johri, B., & Kumar Das, S. (2019). *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. Singapur: Springer.

Scheu, S., Ruess, L., & Bonkowski, M. (2005). *Interactions Between Microorganisms and Soil Micro- and Mesofauna*. En *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (págs. 253-275). Alemania: Springer.

Seppely, C., Singer, D., Dumack, K., Fournier, B., Belbahri, L., Mitchell, E., & Lara, E. (2017). *Distribution patterns of soil microbial eukaryotes suggests widespread algivory by phagotrophic protists as an alternative pathway for nutrient cycling*. *Soil Biology & Biochemistry*. 112: 68-76.

Sharma, P., Goel, R., & Capalash, N. (2007). *Bacterial laccases*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 823–832.

Shaw, E. A., Boot, C. M., Moore, J. C., Wall, D. H. & Baron, J. S. (2019). *Long-term nitrogen addition shifts the soil nematode community to bacterivore-dominated and reduces its ecological maturity in a subalpine forest*. *Soil Biology and Biochemistry*. 130: 177-184.

Srivastava, D., Cardinale, B. Downing, A., Duffy, J., Jouseau, C., Sankaran, M., & Wright, J. (2009). *Diversity has stronger top-down than bottom-up effects on decomposition*. *Ecology*. 90(4): 1073-1083.

St. John, M. G., Wall, D. H. & Behan-Pelletier, V. M. (2006). *Does plant species co-occurrence influence soil mite diversity?* *Ecology*. 87(3): 625-633.

Stefan, G., Cornelia, B., Jörg, R. & Bonkowski, M. (2014). *Soil water availability strongly alters the community composition of soil protists.* *Pedobiologia - Journal of Soil Ecology*. 57: 205-213.

Stern, R. F., Andersen, R. A., Jameson, I., Küpper, F. C., Coffroth, M. A., et al. (2012). *Evaluating the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) as a Candidate Dinoflagellate Barcode Marker.* *PLoS ONE*. 7(8): e42780.

Tedersoo, L., Bahram, M., Cajthaml, T., Polme, S., Hiiesalu, I., Anslan, S., Harend, H., Buegger, F., Pritsch, K., Koricheva, J. & Abarenkov, K. (2016). *Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent.* *The ISME Journal*. 10: 346-362.

Tendersoo, L., & Anslan, S. (2019). *Towards PacBio-based pan-eukaryote metabarcoding using full-length ITS sequences.* *Environmental Microbiology Reports*. 11(5): 659-668.

Thakur, M. P., & Geisen, S. (2019). *Trophic Regulations of the Soil Microbiome.* *Trends in Microbiology*. 771-780.

Thorn, R., & Lynch, M. (2007). *Fungi and Eukaryotic Algae.* En *Soil Microbiology and Biochemistry*. (págs. 145-158). Estados Unidos: Elsevier.

Toledo-Aceves, T., Meave, J. A., González-Espinosa, M. & Ramírez-Marcial, N. (2011). *Tropical montane cloud forests: Current threats and opportunities for their conservation and sustainable management in Mexico.* *Journal of Environmental Management*. 92: 974-981.

Torres-Ariño, A., Okolodkov, Y., Herrera-Herrera, N., Hernández-Barrera, B., González-Resendiz, L., León-Tejera, H. & Gárate-Lizárraga, I. (2019). *Un listado del fitoplancton y microfítobentos del sureste del Pacífico mexicano.* *Cymbella*. 3-97.

Trap, J., Bonkowski, M., Plassard, C., Villenave, C. & Blanchart, E. (2016). *Ecological importance of soil bacterivores for ecosystem functions.* *Plant Soil*. 398: 1-24.

Upadhyayula, R., Solanki, P., Suravajhala, P., & Medicherla, K. (2019). *Bioinformatic Tools for Microbial Diversity Analysis.* En *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications* (págs. 23-47). Singapur: Springer.

Van der Wal, A., Geydan, T. D., Kuyper, T. W., & de Boer, W. (2012). *A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes.* *FEMS Microbiol. Rev.* 477-494.

van Elsas, J., Trevors, J., Rosado, A., & Nannipieri, P. (2019). *Modern Soil Microbiology* (Tercera ed.). Nueva York: CRC Press.

Velez, P., Tapia-Torres, Y., García-Oliva, F., & Gasca-Pineda, J. (2021). *Small-scale variation in a pristine montane cloud forest: evidence on high soil fungal diversity and biogeochemical heterogeneity*. *PeerJ*. 1-29.

Vitousek, P. M., Cassman, K. E. N., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B., Sprent, J.I. et al. (2002). *Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation*. *Biogeochemistry*. 57/58: 1-45.

Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018). *Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing*. *PLoS ONE*. 13(10): e0206428.

Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P. & Chen, S. (2010). *Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals*. *PLoS ONE*: e13102.

Yuan, H., Ge, T., Chen, X., Liu, S., Zhu, Z., Wu, X., Wei, W., Whiteley, A. S. & Wu, J. (2015). *Abundance and Diversity of CO₂-Assimilating Bacteria and Algae Within Red Agricultural Soils Are Modulated by Changing Management Practice*. *Microb. Ecol.* 70: 971-980.

Wang, X. C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J. H., et al. (2014). *ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?* *Molecular Ecology Resources*. 15(3): 573-586.

Wall, D. H., Ritz, K., Six, J., Strong, D. R. & van der Putten, W. H. (2012). *Soil ecology and ecosystem services*. Oxford: University Press.

Wehner, K., Norton, R. A., Blüthgen, N. & Heethoff, M. (2016). *Specialization of oribatid mites to forest microhabitats-the enigmatic role of litter*. *Ecosphere*. 7(3):e01336.

Woodward, J., & Wiseman, A. (1982). *Fungal and other β -d-glucosidases — Their properties and applications*. *Enzyme and Microbial Technology*. 4(2): 73-79.

Wu, B., Zhou, L., Liu, S., Liu, F., Saleem, M., Han, X., Wang, C. et al. (2022). *Biogeography of soil protistan consumer and parasite is contrasting and linked to microbial nutrient mineralization in forest soils at a wide-scale*. *Soil Biology and Biochemistry*. 165: 108513.

Zhang, L. & Lv, J. (2022). *Linkages between soil respiration and soil eukaryotic microalgae following vegetation restoration in the Loess Plateau, China*. *Land Degradation & Development*. 33: 881-891.