



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Efecto de cambios en la cobertura vegetal en la diversidad
microbiana en suelos de la Sierra Juárez, Oaxaca”**

Tesis que presenta:

M. en C. Viviana Rodríguez Rivera

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de tesis:

Dr. Luc Julien Jerome Dendooven

Ciudad de México

Noviembre, 2022

AGRADECIMIENTOS

- CONACyT: por la beca otorgada para obtener el grado de doctora en ciencias en la especialidad en biotecnología, con número de becario 455080 y CVU 344862.
- CINVESTAV-Zacatenco: por permitir realizar este trabajo en el Laboratorio de Ecología de Suelos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, bajo la dirección del Dr. Luc Dendooven, Dra. Yendi E. Navarro Noya por todo su apoyo y paciencia para lograr este trabajo.
- Dr. Frédéric Thalasso Siret, Dr. Rodolfo Marsch Moreno y el Dr. Cesar Valenzuela Encinas por forma parte de este comité.
- Dr. Marco luna y la Tecnico Blanquita E. Ramírez por todo su apoyo y consejo durante estos años.
- A mis compañeros de laboratorio, de cada uno se aprende algo.
- Erick Solís, Erick Álvarez, Anahí Butron, gracias por su trabajo.

DEDICATORIA

A mi hija por todo su amor y paciencia

A mi familia por su apoyo incondicional

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ÍNDICE	III
INDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia de cambio de uso de suelo y cobertura vegetal de bosques templados	1
1.2. Cobertura vegetal y su degradación por cambio de uso de suelo	4
1.3. Suelo y su relación con el microbiota en ecosistemas forestales	5
1.4. Historia agrícola, uso local y manejo forestal comunitario en el área de estudio	7
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos particulares	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1. Descripción del área de estudio	12
4.2. Muestreo de suelo	14
4.3. Caracterización fisicoquímica de los suelos	17
4.4. Activación biológica de los suelos colectados	18
4.5. Extracción de DNA metagenómico	19
4.6. Amplificación del gen 16S rRNA	20
4.7. Amplificación del gen 18S rRNA Eucariota	21

4.8.	Construcción de librería para secuenciación	22
4.9.	Análisis de secuencias para genes 16S rRNA bacteria y 18S rRNA eucariota	22
4.10.	Análisis estadístico del gen 16S bacteria y 18S eucariotas	24
4.11.	Diversidad de especies	25
5.	RESULTADOS	27
5.1.	Características fisicoquímicas del suelo en los sitios de estudio	27
5.2.	Obtención de secuencias y diversidad alfa en bacterias	27
5.3.	Estructura de la comunidad bacteriana	31
5.4.	Asignación taxonómica y abundancia del gen 18s rRNA eucariota ..	36
5.5.	Estructura de la comunidad eucariota	36
5.6.	Diversidad alfa y beta en gen 18 eucariota.....	44
5.7.	Efecto de variables ambientales en abundancia y riqueza.	47
6.	DISCUSIÓN	52
6.1.	Características del suelo en los sitios de estudio	52
6.2.	Diversidad Alfa y beta de la comunidad de bacterias y eucariotas ...	54
6.3.	Estructura de la comunidad bacteriana y eucariota	55
7.	CONCLUSIONES	61
8.	REFERENCIAS	62
9.	ANEXOS.....	71
9.1.	Soluciones para extracción de DNA.....	71
9.2.	Portada del Artículo.....	74

1. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de área de estudio y sitios de muestreo.....	14
Figura 2. Esquema de muestreo de suelo para análisis fisicoquímico y molecular de cada tratamiento.	16
Figura 3. Sitios de muestreo en cada tratamiento.	17
Figura 4. Microcosmos para la activación de suelo.	18
Figura 5. Curvas de rarefacción con número de secuencias versus número de OTUs en cada uno de los tratamientos y su altitud.	29
Figura 6. Diversidad β total en cada tratamiento para 16S la sección gris (β repl) de cada barra indica el remplazo de especies, mientras que la sección blanca (β rich) indica las diferencias en riqueza, donde Ag: agricultura, Cc: matarrasa, UL: uso local, Vg vegetación natural.....	30
Figura 7. Análisis de la cobertura de la muestra a partir del número de OTUs encontradas en cuatro tratamientos. Las bandas corresponden al intervalo de confianza del 95%. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, UI uso local y Vg vegetación natural.	30
Figura 8. Mapa de calor con la abundancia relativa (a) de los filos bacterianos y (b) de los 50 géneros más abundantes en los tratamientos de agricultura (Arable), matarrasa (Cleared), uso local (Sustainable), vegetación natural (Natural) y altitud.	32
Figura 9. Diagrama de volcán donde cada punto representa un grupo taxonómico de bacterias a nivel de (a) filo) y (b) género con tamaño de efecto en el eje X, muestra el logaritmo base 2 (\log_2) de la relación entre los diversos tratamientos respecto a la significancia estadística (\log_2 del valor de p corregido por Benjamini-Hochberg). Línea de color continua señala la significancia $p < 0.05$, mientras las líneas discontinuas grises horizontales y verticales el límite para el efecto del tamaño.	34
Figura 10. Análisis de componentes principales (a) con filos bacterianos, (b) géneros bacterianos asignados a suelo agrícola parte alta (□), parte media (□) parte baja (□), matarrasa parte alta (■), matarrasa parte media (●) y matarrasa parte baja (▲), vegetación parte alta(■) vegetación parte media (●) vegetación parte baja(▲)..	35

Figura 11. Número total de secuencias y promedio de OTUs obtenidas para 18S por muestra y tratamiento.....	36
Figura 12. Abundancia relativa de órdenes en eucariotas en cada punto de muestreo de los diversos tratamientos analizados.....	38
Figura 13. Abundancia relativa promedio de órdenes en eucariotas de los diversos tratamientos analizados. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local y Vg: vegetación natural.	39
Figura 14. Logaritmo de la abundancia relativa a nivel de filo de los diversos tratamientos analizados. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local, Vg: vegetación natural con un p nivel de significancia del análisis de Kruskal-Wallis.....	41
Figura 15. Mapa de calor basado en el valor relativo de la abundancia de órdenes de eucariota (en filas) de los tratamientos analizados (en columnas). Ag: agricultura, Cc: matarrada, Ul: uso local, Vg: vegetación natural). El color azul oscuro significa el valor mínimo y aumenta hacia el color rojo.	42
Figura 16. Análisis de componentes principales (ACP) a partir de abundancias a nivel de filo (a) y órdenes (B) en los tratamientos.	43
Figura 17. Número efectivo de OTUs entre tratamientos (grupos) basados en el número de Hill, incluidos los análisis post-hoc por pares.	44
Figura 18. Curvas de interpolación (rarefacción)/extrapolación de la diversidad de especies en los cuatro tratamientos, con base en los números de Hill: a) $q=0$: riqueza (número efectivo de especies), b) $q=1$: exponente de la diversidad Shannon, c) $q=2$: inverso del índice de diversidad de Simpson. Las bandas corresponden al intervalo de confianza al 95%. Donde: Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local y Vg: vegetación natural.	45
Figura 19. Análisis de la cobertura de la muestra a partir del número de OTUs encontradas en cuatro tratamientos. Las bandas corresponden al intervalo de confianza del 95%. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local y Vg: vegetación natural.	46
Figura 20. Diversidad β total de cada tratamiento para 18S la sección gris (β_{repl}) de cada barra indica el remplazo de especies, mientras que la sección blanca (β_{rich}) indica las diferencias en riqueza. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local y Vg: vegetación natural.	47

Figura 21. Mapa de calor de Kendall entre variables ambientales y la abundancia de los tratamientos a nivel de filo * y ** nivel de significancia a $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. 48

Figura 22. Correlaciones de Spearman entre las variables ambientales y la riqueza a nivel de órdenes de los tratamientos. *nivel de significancia $p < 0.05$ 50

Figura 23. Análisis de correspondencia canónica a nivel de filo para tratamientos y puntos de muestreo y su asociación con variables ambientales (flechas) que tienen efecto en la diversidad de filos (círculos negros). La longitud de las flechas describe la importancia relativa de cada variable analizada y la dirección de la flecha indica la correlación entre variables..... 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de la PCR para la amplificación del gen 16S rRNA de bacterias.....	20
Tabla 2. Condiciones de la PCR para amplificación del gen 18S rRNA eucariota.	21
Tabla 3. Características promedio del suelo analizado en los cuatro tratamientos de estudio.....	28
Tabla 4. Diversidad alfa con valores de $q=0$ riqueza de especies, $q=1$ exponencial de índice de Shannon, $q=2$ el inverso del índice de Simpson o especies dominantes en los suelos de estudio.....	29

RESUMEN

Los bosques templados de la Sierra Juárez en el estado de Oaxaca tienen un uso histórico de aprovechamiento local, construcción y en las últimas siete décadas para el aprovechamiento forestal. Estas actividades afectan las propiedades físicas y químicas de los suelos, inducidos por la intensidad de cambio de uso de suelo y cobertura vegetal, también generan cambios en las comunidades microbianas, creando una sinergia de cambios en las comunidades de especies asociadas.

En este trabajo se evaluó el efecto del cambio en la estructura y cobertura vegetal en las propiedades del suelo y en la diversidad microbiana y eucariota para ello se seleccionaron cuatro tratamientos bajo condiciones de manejo diferentes (matarrasa en franja, uso local, agricultura y vegetación conservada). A las cuales se les analizaron propiedades fisicoquímicas como textura, capacidad de retención de agua (CRA), conductividad eléctrica (CE), nitrógeno total, carbono orgánico total (TOC). Adicionalmente, se analizó la abundancia y diversidad de bacterias y eucariotas utilizando secuencias de 16S y 18S ARN, respectivamente. La abundancia en 16S mostró un número promedio de OTUs únicos de 1268.3 ± 734.8 , además se encontró un total de 19 filos, 53 clases, 66 órdenes y 122 familias repartidas en 179 géneros, mientras que para 18S el número promedio de OTUs fue de 166.9 ± 119.2 , donde se encontraron 19 filos, 53 clases, 95 órdenes y 126 familias repartidas en 159 géneros. En 16S los tres órdenes con mayor abundancia relativa fueron Actinomycetales (16.5%), Oceanospirillales (9.5%) y Acidobacteriales (8.6%), mientras que a nivel de filo fueron Proteobacteria (38.5%), Actinobacteria (19.6%) y Acidobacteria (17.1%). En cambio, en 18S, se encontró que en la comunidad eucariota domino el reino Fungi (99%), en donde los filos Ascomycota (48.7%), Basidiomycota (48%) y Mucoromycota (1.5%) fueron los más abundantes. Tanto en 16S como 18S, el análisis multivariado agrupó y separó los grupos taxonómicos a nivel de los tratamientos de estudio, donde agricultura y matarrasa mostraron mayor asociación y una menor asociación a uso local. La riqueza efectiva de especies ($q=0$) de bacterias fue mayor en agricultura (362), seguida de matarrasa en franja (355) y vegetación natural (309), y la más baja fue uso local (286), con una completitud satisfactoria por arriba de 0.88 en todos los tratamientos. 18S mostró un patrón similar en diversidad, donde agricultura (391) mostró la mayor riqueza de especies ($q=0$), seguida de uso local (294) y matarrasa (245), y la más baja fue vegetación natural. La diversidad beta tanto en 16S y en 18S es explicada por el reemplazo de especies (β_{repl}) y por diferencias en riqueza (β_{rich}) varió en cada tratamiento. Se concluye que las actividades intensas como la agricultura y matarrasa en franja afectan directa e indirectamente a las propiedades físicas y químicas del suelo, y genera cambios en la abundancia y diversidad del microbiota. Se recomienda estrategias de retención de vegetación y mantillo para lograr una conservación no solo de las propiedades del suelo, sino también del microbiota asociada.

ABSTRACT

The temperate forest of the Sierra Juarez in the state of Oaxaca. It has a historical use for local harvesting, construction and in the last seven decades for forestry. These activities affect the physical and chemical properties of soils, induced by the intensity of land use and vegetation cover change, and also generate changes in microbial communities, creating a synergy of changes in the communities of associated species.

In this work, the effect of changes in vegetation structure and cover on soil properties and on microbial and eukaryotic diversity was evaluated in four treatments under different management conditions (strip-tillage, local use, agriculture and conserved vegetation). Physicochemical properties were analysed for texture, water holding capacity (WRC), electrical conductivity (EC), total nitrogen, total organic carbon (TOC). Additionally, the abundance and diversity of bacteria and eukaryotes were analysed using 16s and 18s RNA sequences.

The abundance in 16S showed an average number of unique OTUs of 1268.3 ± 734.8 , and a total of 19 phyla, 53 classes, 66 orders, and 122 families distributed in 179 genera, while for 18S the average number of OTUs was 166.9 ± 119.2 , where 19 phyla, 53 classes, 95 orders, and 126 families distributed in 159 genera were found. In 16S the three orders with the highest relative abundance were Actinomycetales (16.5%), Oceanospirillales (9.5%) and Acidobacteriales (8.6%), while at the phylum level they were Proteobacteria (38.5%), Actinobacteria (19.6%) and Acidobacteria (17.1%). In contrast, in 18S, the eukaryotic community was dominated by the Fungi kingdom (99%), where the phyla Ascomycota (48.7%), Basidiomycota (48%) and Mucoromycota (1.5%) were the most abundant. In both 16S and 18S, multivariate analysis grouped and separated the taxonomic groups at the level of the study treatments, where agriculture and land clearing showed a greater association and a lower association with local use. In diversity, the effective species richness ($q=0$) with 16S was highest in agriculture (362), followed by swidden (355) and natural vegetation (309), and the lowest was local use (286), with a satisfactory completeness above 0.88 in all treatments. 18S showed a similar pattern in diversity, where agriculture (391) showed the highest species richness ($q=0$), followed by local use (294) and strip-kill (245), and the lowest was natural vegetation. In beta diversity, both in 16S and in 18S the variation explained by species replacement (β_{repl}) and by differences in richness (β_{rich}) varied in each treatment. It is concluded that intense activities such as agriculture and strip logging directly and indirectly affect soil physical and chemical properties and generate changes in the abundance and diversity of the microbiota. Vegetation and mulch retention strategies are recommended to achieve conservation not only of soil properties, but also of the associated microbiota.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de cambio de uso de suelo y cobertura vegetal de bosques templados

El aprovechamiento para uso local y manejo forestal no son consideradas actividades de cambio de uso suelo ni deforestación de acuerdo con la FAO (2004). Sin embargo, ambas actividades afectan la estructura y cobertura vegetal de los bosques. A nivel mundial las actividades humanas han presentado transformaciones en los bosques templados, por lo que los cambios han sido significativos en su cobertura, estructura y diversidad (Richardson et al., 2007). En México los bosques tienen una larga historia de uso y aprovechamiento debido a cambio de uso de suelo (e.g. agricultura, ganadería, asentamientos humanos) y cambio en la estructura y cobertura vegetal debido a actividades productivas (e.g. manejo forestal, plantaciones y uso local) que han generado cambios significativos en los factores bióticos y condiciones abióticas en los ecosistemas, particularmente en el bosque templado (Challerger, 1998; Clark-Tapia et al., 2018, Aquino-Vázquez et al., 2021).

De manera particular, en la Sierra Juárez, distrito de Ixtlán localizada al sur de México en el estado de Oaxaca, los bosques templados de esa región han sido utilizados por los pueblos originarios durante siglos para uso local, agricultura, y en las últimas siete décadas para actividades de aprovechamiento forestal (Clark-Tapia, 2018, Aquino-Vázquez et al., 2021). Durante los últimos 50 años en la comunidad de la Sierra Juárez cambio la organización social y la política forestal a partir de la transición de un manejo forestal de propiedad privada a un manejo forestal comunitario (Bray et al., 2007; Ramos-Morales y Clark-Tapia, 2018; Aquino-Vázquez et al., 2020). Este cambio, inició en los años 80 con la cancelación de la concesión de aprovechamiento forestal otorgado a la empresa Fábricas de Papel Tuxtepec (FAPATUX). Estos acontecimientos favorecieron a que en la región se presentara un abandono de la actividad agrícola con un consecuente cambio en la estructura y composición vegetal de los bosques (Aquino-Vázquez et al., 2021).

Se ha reportado que las actividades de uso local, ganadería y aprovechamiento forestal no solo afectan la abundancia y presencia de las especies, sino que también generan

cambios en la estructura y función de los ecosistemas (Child 2004, Ríos-Altamirano et al., 2018; Clark-Tapia et al., 2018). Recientemente, se reportó para la Sierra Juárez que el uso local, la agricultura o la conversión de un área de bosque por manejo forestal generan cambios en la abundancia y diversidad de especies vegetales (Jiménez et al., 2016; Clark-Tapia et al., 2018), vertebrados (Luna-Krauletz et al., 2018), insectos (Rodríguez-Rivera et al., 2017; Aguirre-Hidalgo et al., 2018), y afecta la variación y estructura genética de especies forestales (e.g. Gorgonio-Ramírez et al., 2018). Otros trabajos realizados en bosque de pino-encino han reportado una reducción en la diversidad en bacterias debido al cambio de uso de suelo (e.g. Muñoz-Arenas et al., 2020). Además, tiene efectos en las propiedades físicas y químicas de los suelos (Saynes et al., 2012;), creando una sinergia de cambios en las comunidades de especies asociadas.

El uso de los recursos del bosque por el hombre es una práctica de explotación antigua, y su intensidad de uso está vinculada con el desarrollo de las sociedades y necesidades de mercado local, regional o internacional los bosques pueden ser vistos como fuentes de energía y madera siendo en este caso necesario degradar o destruir las áreas forestales debido a esto las sociedades, independientemente de la época y lugar, han ido generando criterios para el uso de los recursos naturales (Richardson et al., 2007).

Por ejemplo, el uso local de los bosques en Sierra Juárez tiene una larga historia de interacción humana para la obtención de bienes y servicios que ha sido documentada desde hace 400 años (Morales y Clark, 2018; Clark-Tapia et al., 2018; Aquino-Vázquez et al., 2021), destacando la obtención de leña para el hogar, construcción, producción de carbón o comercio, aspectos que han modificado la estructura y diversidad del bosque (Clark-Tapia et al., 2018; Gorgonio-Ramírez et al., 2018).

No obstante, que la actividad agrícola, es importante para la auto subsistencia de las comunidades en México, en las últimas décadas esta actividad ha tenido una serie de transformaciones, impulsada por el Estado. El impacto varía en función del ámbito territorial en el que influyen aspectos culturales, nivel de organización y actividades económicas (Aquino-Vázquez et al., 2021). De manera particular, en la Sierra Juárez se ha dado un decremento de la actividad agrícola en los últimos 40 años, debido al auge de la actividad el aprovechamiento forestal (Clark-Tapia et al., 2018). No obstante, se debe mencionar que debido a la actividad agrícola practicada desde el siglo XVII y hasta

la actualidad generó una fragmentación de los bosques, pérdida de la cubierta forestal y erosión del suelo. Actualmente, la práctica de saberes locales asociados a la agricultura que se realiza desde hace más de 500 años en la comunidad de Ixtlán de Juárez ha facilitado la permanencia de parcelas con cultivos mixtos que se usan para consumo familiar (Aquino- Vázquez et al., 2021).

Por otro lado, el aprovechamiento de los bosques en México a través del manejo forestal (MF) surgió como una necesidad de ordenar los bosques con la finalidad de disminuir los impactos antrópicos y buscar alternativas de sostener a las especies forestales de interés comercial de las cuales se obtiene materia prima. De este modo el MF comprende las acciones encaminadas al aprovechamiento de los recursos forestales de manera ordenada, sin comprometer la provisión de bienes y servicios para generaciones futuras, por lo que no es considerado un promotor de deforestación y cambio de uso de suelo. Hoy por hoy el reto del MF es la gestión y utilización de los bosques con una intensidad tal que se conserve su diversidad biológica, productividad y sistemas socio ecológicos (funciones ecológicas, económicas y sociales). No obstante, las prácticas silvícolas actuales, optan por sistemas de matarrasa en franja, árboles padres o cortas de protección encaminada a transformar secciones de bosque en rodales coetáneos, es decir monocultivos de pino, descartando especies asociadas, entre ellas encinos (PRONAFOR, 2013-2018; Clark-Tapia et al., 2018).

En cualquier ecosistema terrestre, el suelo es un recurso natural no renovable, que se describe como un sistema dinámico que ejerce diversas funciones como: “soporte biológico de ecosistemas terrestres”, siendo parte fundamental en los ciclos del carbono, azufre, nitrógeno, fósforo, además actúa como filtro y amortiguador reteniendo sustancias, con lo cual protege las aguas subterráneas y superficiales contra la penetración de agentes nocivos (CONAFOR, 2015).

No obstante, el suelo es altamente susceptible a sufrir degradación con las actividades de manejo forestal, de acuerdo con Gayoso y Alarcón (1999) y debe ser protegido para mantener sus propiedades, así como sus funciones a largo plazo y poder garantizar una silvicultura sustentable. De este modo es conocido que el funcionamiento, la estabilidad y la productividad de los ecosistemas terrestres dependen en gran medida de la riqueza, su diversidad y la estructura de las poblaciones vegetales. Además, el que algunas especies de plantas puedan o no desarrollar una cubierta adecuada depende de las

interacciones que se produzcan con el microbiota en el suelo, y disponibilidad de nutrientes (Thompson et al., 2015; Negrete-Yankelevich et al., 2020).

1.2. Cobertura vegetal y su degradación por cambio de uso de suelo

El suelo, al igual que el clima, es un sistema dinámico que desempeña un rol importante en el desarrollo del ecosistema forestal, no sólo provee soporte físico, sino que es un medio para el desarrollo de fauna y flora que influye en la calidad de un sitio, en la tasa del crecimiento del bosque, la calidad de la madera y un recurso ambiental vital del ciclo del agua, energía y nutrientes (Gayoso y Alarcón, 1999; Binkley y Fisher, 2012). El suelo está conformado por diferentes materiales de origen orgánico y mineral, por lo que es un componente ambiental de carácter no renovable en términos de la escala temporal humana (CONAFOR, 2009) y puede experimentar cambios temporales o permanentes inducidos por la intensidad de cambio de uso de suelo y cobertura vegetal.

Diversos estudios han documentado que las actividades de cambio de uso de suelo y la cobertura vegetal modifican la calidad y diversidad de los suelos, como un primer efecto directo la afinidad de las propiedades físicas y en un segundo efecto de manera indirecta las propiedades químicas; modificando las aportaciones de nutrientes provenientes de la descomposición de la materia orgánica generada en el proceso de la degradación y humidificación del mantillo (Salas, 1987; Park y Min, 2003; Certini, 2005; Acosta-Martínez et al., 2007; Saynes et al., 2012). Así también, en la agricultura y aprovechamiento silvícola pueden tener consecuencias ecológicas en los ecosistemas forestales, mostrando efectos negativos en el almacenamiento y disponibilidad de nutrientes, los cuales pueden afectar las propiedades biológicas, físicas y químicas de los suelos (Dueñez-Alanis et al., 2006; Saynes et al., 2012). En estos términos, las prácticas agrícolas y un aprovechamiento silvícola inadecuados, donde no se considera el clima y la topografía, puede generar procesos severos de degradación en suelo (Rodríguez-Rivera et al., 2018).

A pesar de que el suelo es el principal sostén del bosque es uno de los recursos que ha sido subestimado por la falta de atención y regulación, lo cual se ve reflejado en los altos niveles de pérdida y degradación de suelos. La modificación y/o disminución de la cubierta vegetal ocasiona erosión, compactación, deslizamiento y como consecuencia

un efecto en los servicios ecosistémicos y la abundancia de las especies (Villanueva-Jiménez et al., 2006).

Los cambios de uso de suelo como la agricultura de conservación suelen tener efectos menos evidentes en la estructura bacteriana, sin embargo, si presentan variaciones en la riqueza y abundancia de los microorganismos, los cuales son influenciados por las características de contenido de agua y las concentraciones de NO_3^- (Romero-Salas et al., 2021). De igual forma, se ha evidenciado que la actividad agrícola impacta sobre las comunidades microbianas del suelo, cambiando su estructura, la riqueza y la abundancia de las especies, e incluso afectar su nicho ecológico y su participación en los ciclos biogeoquímicos (Chaudhry et al., 2012; Wagg et al., 2014; Zhang et al., 2016; Schloter et al., 2018).

1.3. Suelo y su relación con el microbiota en ecosistemas forestales

Los suelos forestales son ecosistemas con una gran variedad de organismos, así como de interacciones planta-microorganismo suelo, las cuales son determinantes para la estructura y funcionamiento del ecosistema. Sin embargo, se ha documentado que los cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo promueven modificaciones en las comunidades bacterianas y eucarióticas presentes en el mismo (Fracetto et al., 2013) que afecta la funcionalidad del ecosistema (Anderson y Cairney, 2004; Bridge y Spooner, 2001; Thorn, 1997). Aun cuando el estudio de la diversidad e interacciones de bacterias y eucariotas a nivel comunitario es complejo debido a que la ocurrencia y abundancia de esas taxa se ve reflejado por cambios en la función y estructura de una comunidad como un efecto de las perturbaciones naturales o antrópicas.

Actualmente, el estudio de la composición y diversidad de bacterias y eucariotas en suelo por medio de técnicas de extracción de DNA y amplificación de genes 16S y 18S ha permitido evaluar la diversidad de estos grupos taxonómicos y resaltar su función como importantes indicadores ecológicos para la salud, sostenibilidad y vulnerabilidad de un ecosistema (Bisker et al., 2020). Adicionalmente, el estudio de 16S y 18S apoyado en índices de diversidad ecológica (diversidad alfa y beta) ha facilitado las comparaciones espaciales y temporales entre tipos de suelos y/o tratamientos, dando una mayor evaluación de efectos de los cambios a corto o largo plazo dentro de una comunidad, brindando así mejores estrategias de conservación (Gruyter et al., 2020).

Lo anterior es fundamental ya que es conocido que el funcionamiento, la estabilidad y la productividad de los ecosistemas terrestres depende en gran medida a la riqueza, diversidad y la estructura de las poblaciones vegetales (Acosta-Martínez et al., 2007, Zhang et al., 2013). Por otra parte, la presencia de un tipo de cubierta vegetal en el suelo genera diferentes interacciones entre las distintas especies presentes, las cuales tienen implicaciones en la funcionalidad del ecosistema. Diversos estudios sugieren una interacción entre las propiedades del suelo y la composición de la estructura microbiana (e.g. Zhang et al., 2013; Chávez-Vergara et al., 2016, Enríquez-Velázquez et al., 2017). En este contexto, se ha planteado que la resiliencia del suelo está regida por las características físicas y químicas del mismo, las cuales a su vez afectan la estructura y funcionalidad del microbioma presente en el suelo (Chávez-Vergara et al., 2016, Enríquez-Velázquez et al., 2017).

Por ejemplo, en los bosques la degradación de la materia orgánica, el ciclo de nutrientes y la descomposición de xenobióticos debido al cambio de uso de suelo, pueden usarse para indicar variaciones en la calidad del suelo y con ello comprender el funcionamiento del ecosistema (Acosta-Martínez et al., 2007). De este modo la composición química de la hojarasca, como del sustrato inicial y algunos componentes químicos específicos liberados en el suelo a través de la descomposición de la hojarasca, juegan un papel importante en la distribución de la composición de la comunidad microbiana (Bray et al., 2012; Prescott y Grayston, 2013). Características como el pH funcionan como reguladores de la composición bacteriana mientras que la composición de las comunidades fúngicas está estrechamente asociada a cambios en el estado nutrimental del suelo (Marschner et al., 2004), Se ha documentado que los hongos son más sensibles a los cambios en el uso del suelo y la vegetación dominante debido a interacciones simbióticas con sus raíces (Dang et al., 2018).

Por ejemplo, la sinergia o simbiosis en el suelo entre plantas y microbioma del suelo es fundamental en ecosistemas degradados donde existe escasez de nutrientes minerales. Por un lado, los microorganismos del suelo transforman sustratos orgánicos y liberan elementos minerales que influyen en el crecimiento de las plantas durante la sucesión secundaria, pero a su vez, las plantas importan carbono (C) y nitrógeno (N) al subsistema del suelo en forma de hojarasca y exudados de raíces, que son utilizados y transformados por las comunidades del suelo. A su vez la diversidad de microorganismos en el suelo puede mejorar el desarrollo vegetal debido a la presencia

de bacterias que están involucradas en la fijación de nitrógeno, oxidación de amonio, y como control biológico de organismos patógenos (Enríquez-Velázquez et al., 2017).

Es por ello, que se debe poner especial énfasis y evaluar los procesos de cambios y cobertura vegetal en el suelo. Particularmente porque se ha demostrado que dichos cambios pueden tener efectos a nivel espacial y temporal en la abundancia, diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas y eucariotas (Liu et al., 2018; Priha et al., 2001; Zhang et al., 2016).

1.4. Historia agrícola, uso local y manejo forestal comunitario en el área de estudio

Ixtlán de Juárez es una comunidad con ascendencia zapoteca y cabecera del Distrito de Ixtlán de Juárez en la Sierra Juárez. Esta comunidad es reconocida a nivel internacional por la conservación sustentable de sus recursos forestales (Bray et al., 2007). En la región, y en particular en la comunidad se tiene evidencia de prácticas agrícolas de milpas de maíz y frijol, y extracción de madera para uso local desde época prehispánica, período durante el cual se implementaba la tumba-roza-quema con agricultura de rotación (milpa) durante un período de tiempo limitado. A partir del siglo XVII con la llegada de los españoles, se cambia e intensifica la agricultura de milpa a terrenos permanentes y se inserta al maíz y frijol, los cultivos de trigo y café, así como la ganadería, con un incremento en la fragmentación y pérdida de hábitat (Aquino-Vázquez et al., 2021). A partir de los años 60s, la actividad agrícola comenzó a decrecer paulatinamente con una recuperación subsecuente de la cobertura vegetal. Actualmente, se practica una agricultura de milpa cuya producción se destina al consumo doméstico. En la actualidad, en la comunidad solo se utiliza menos del 30% de los terrenos agrícolas originales, con cultivos de milpa donde se siembra maíz acompañado con calabaza, frijol o haba, y solo se obtiene una cosecha anual, con una producción promedio de cerca de 1 t/ha (Aquino-Vázquez et al., 2021).

Por otro lado, en Ixtlán de Juárez la actividad de uso local de los bosques templados tiene una larga historia de aprovechamiento, particularmente para leña y construcción o cubrir las necesidades de pequeños aserraderos actividad que ha decrecido en las últimas décadas debido al uso de gas, y a que la madera para construcción se obtiene de las áreas manejadas (Bretado-Velázquez et al., 2018; Aquino-Vázquez et al., 2021).

En cambio, el manejo forestal es de historia más reciente. En la comunidad empezó a partir de los años 40s, cuando se instalan pequeños aserraderos privados que operan hasta 1956, tiempo en que inició la concesión otorgada a Fapatux (Ramos-Morales y Clark-Tapia, 2018).

De manera general, el uso local y aprovechamiento hasta medianos del siglo XX fue de selección de árboles con base en las necesidades locales y para cubrir los pequeños aserraderos. Sin embargo, a partir de la concesión forestal otorgada a la FAPATUX, se pasó del sistema Método Mexicano de Ordenación de Montes (MMOM). Este se basa en cortas de selección y extracción de los mejores árboles (altura y diámetro), con mínimo control del daño ocasionado a especies asociadas en el derribo, y donde la recuperación del bosque se daba por especies de bajo interés comercial (Hernández-Díaz et al., 2008; Bretado-Velázquez et al., 2018). En 1970 se observó que los bosques de segundo crecimiento (recuperados después de una extracción o de disturbios) mostraban estructuras regulares o semirregulares, por lo que se impulsó una silvicultura de manera intensiva conocida como el Método de Desarrollo Silvícola (MDS) donde se aplicó principalmente métodos de árboles padre, cortas de liberación y aclareos con la finalidad de llevar a los bosques a un sistema coetáneo regular (Hernández, 2007; Bretado-Velázquez et al., 2018).

El MDS es un método intensivo que busca transformar bosques irregulares en bosques regulares al final del turno, para asegurar una producción sostenida. Este método aplicó diversos tratamientos como cortas de liberación, aclareos, preclareos, podas y tratamientos complementarios al suelo, como quemas prescritas. En 2005, se introduce al municipio el tratamiento de matarrasa en franjas alternas (clearcutting method), que consiste en cortar todos los árboles de una franja alterna con vegetación, para generar un bosque regular, además de tratamientos complementarios en el suelo (escarificación) y quemas prescritas para facilitar la regeneración de pino (Bretado-Velázquez et al., 2018).

De manera tradicional, el uso de los recursos del bosque es una práctica de aprovechamiento antigua en Ixtlán de Juárez y su intensidad de uso está vinculada con el desarrollo de la comunidad y las necesidades de mercado local, regional o internacional. No obstante, la extracción de árboles incluso a bajas intensidades afecta la estructura de la comunidad (Ríos-Altamirano et al., 2018; Clark-Tapia et al., 2018),

además que un aprovechamiento selectivo de árboles maduros no solo reduce la complejidad del bosque al convertirse los pinos en la especie dominante (Clark-Tapia et al., 2018), sino que también se afecta la diversidad y composición de especies (Ríos-Altamirano et al., 2018) y las propiedades físicas y químicas del suelo aun cuando las prácticas de aprovechamiento reciban certificación internacional de buen manejo.

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la región de la Sierra Juárez carece de estudios de genómica del suelo con énfasis en analizar la abundancia y diversidad del microbiota asociada a este, lo cual es sumamente esencial, al ser no solo una región de alta prioridad para conservación de la biodiversidad con base a Conabio, sino también, porque se requiere información fisicoquímica y biológica de los suelos para lograr una mayor gestión y conservación en el sector de manejo forestal comunitario.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto del cambio de la cobertura vegetal por actividades humanas en el microbiota de suelos en el bosque templado de la comunidad de Ixtlán de Juárez, Oaxaca en cuatro áreas bajo condiciones de manejo diferentes: manejo forestal, agricultura, uso local y vegetación sin aprovechamiento.

3.2. Objetivos particulares

- Analizar el efecto de cambio en la estructura y cobertura vegetal en los parámetros fisicoquímicos del suelo en las cuatro áreas de manejo de la comunidad de Ixtlán de Juárez.
- Realizar un diagnóstico del efecto de cambio en la estructura y cobertura vegetal en la abundancia y presencia de bacterias y eucariotas en cuatro áreas de manejo del sitio de estudio.
- Analizar el efecto de cambio en la estructura y cobertura vegetal en la diversidad y riqueza de bacterias y eucariotas en cuatro áreas de manejo
- Evaluar el efecto de las características fisicoquímicas y orográficas sobre la estructura de las poblaciones de bacterias y eucariotas presentes en las cuatro áreas de manejo de la comunidad de Ixtlán de Juárez.

4 METODOLOGÍA

4.1. Descripción del área de estudio

La Sierra Juárez es un macizo montañoso de aproximadamente 170,000 hectáreas, ubicado en el distrito de Ixtlán de Juárez en el norte del estado de Oaxaca. Sierra Juárez es considerada una de las 16 áreas con mayor biodiversidad del mundo por el Fondo Mundial para la Naturaleza. Se ubica entre los 17°19'07 "N y 96°29'00" O. Se caracteriza por un relieve accidentado que se eleva entre los 1.500 y 3.200 m snm y pendientes pronunciadas que van desde los 30° hasta los 60°. Su vegetación se caracteriza por un predominio de diferentes especies de pino (*Pinus* spp.) y encino (*Quercus* spp.), por lo que se conforman bosques de pino, encino, o mixtos de pino-encino y encino-pino. Además, está la presencia de bosques caducifolio, nuboso y subtropical (Smart Wood, 2002).

La zona forestal se gestiona con diferentes métodos silvícolas (e.g. MDS, y tratamiento de matarrasa en franja), pero sobre todo predomina el uso local (aprovechamiento de árboles para uso como combustible o construcción). Además, en los bosques existe el cambio de uso de suelo hacia actividades agrícola, ganadera y urbana. Para este estudio, se seleccionaron tres actividades humanas distintas que impactan en el ecosistema forestal. Dos actividades, 1) manejo forestal y 2) uso local, no implican cambio de uso de suelo debido a la vocación forestal, mientras que la tercera sí, representada por agricultura. Adicionalmente, se seleccionaron sitios de vegetación conservada como control.

Se ha de destacar, que el efecto directo en la estructura y cobertura vegetal difiere entre cada tipo de actividad. Por ejemplo, tanto en agricultura y manejo forestal conlleva la remisión total de la cobertura vegetal, sin embargo, ambas actividades difieren en el impacto en el suelo y en los procesos secundarios de recuperación de la vegetación. En prácticas agrícolas, la estructura y cobertura vegetal esta sujeta a la presencia de un cultivo particular (e.g. maíz), con efectos directos a la estructura y propiedades del suelo por prácticas de barbecho, quemas e incorporación de fertilizantes, mientras que en matarrasa, la estructura y cubierta vegetal es resultado de la reforestación con pino y reemplazo de especies por sucesión ecológica, y los efectos sobre el suelo son indirectos. Por otro lado, en uso local, el efecto sobre la estructura y cubierta vegetal es

de bajo impacto, ya que no implica la remoción total de árboles, al extraerse individuos muertos, o partes parciales de árboles como ramas o tallos múltiples, y el suelo sufre una afectación mínima, comparado con las actividades anteriores.

El área de manejo forestal seleccionada utiliza el tratamiento de “matarrasa en franjas” (Hernández, 2007), que implica la remoción total de la vegetación, así como del mantillo sobre el suelo de franjas de 50 x 200 m (Fig. 1, Ccr 1-2) intercaladas con franjas de vegetación natural sin perturbación, siendo estos los sitios seleccionados como control (Fig. 1, Vg 1-2). Una vez que se ha aprovechado un bosque, en las franjas taladas se plantan *Pinus oaxacana* Mirov (\approx *P. pseudostrobus* Lindl. var. *oaxacana*) un pino originario de México y comúnmente conocido como pino oaxacana. En total, se seleccionaron para el análisis dos franjas taladas y dos franjas de vegetación.

Asimismo, se seleccionó el área agrícola (Fig.1, Ag), con más de 400 años de ser cultivado principalmente con maíz (*Zea mays* L.) en asociación con calabazas (*Cucurbita* spp.) y frijoles (*Phaseolus* spp.), además de dos sitios que han sido utilizados para uso local (la vegetación se utiliza para leña) por más de 100 años (Fig.1, Lu1-2).

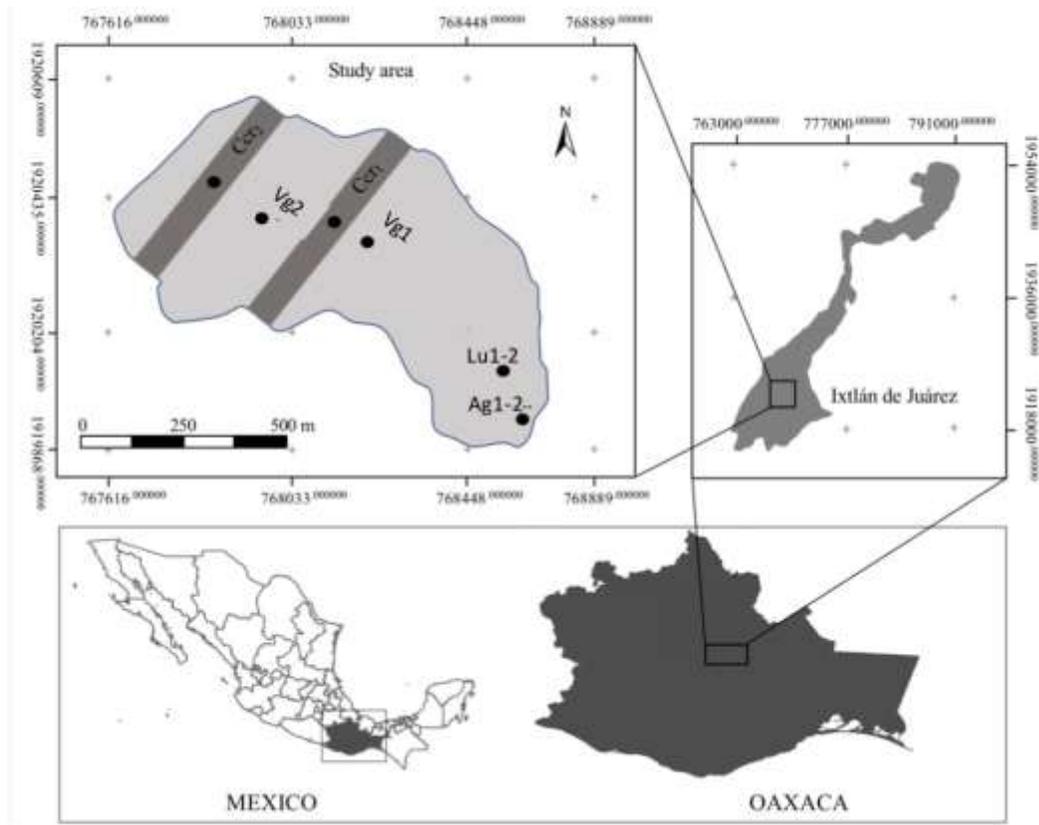


Figura 1. Localización de área de estudio y sitios de muestreo.

4.2. Muestreo de suelo

Para la colecta de suelo se siguió un método estratificado sistemático, para ello en casa tratamiento seleccionado se estableció un transecto altitudinal dentro del cual se establecieron tres puntos de muestreo separados 50 m cada uno (Fig. 2). Para el análisis fisicoquímico, en cada punto de muestreo (altitud) se tomaron tres muestras de suelo y cada colecta tuvo una separación de 5 m (Fig. 2). Cada muestra consistió en aproximadamente 1 kg de suelo, la cual se colectó en los primeros 15 cm a la superficie, posteriormente de que se eliminó la materia orgánica (varía entre 0 a 50 cm) (Fig. 3). Las muestras fueron colocadas en bolsas de polipropileno debidamente etiquetadas y fueron trasladadas al laboratorio de ecología molecular No.53 del CINVESTAV.

Las muestras de suelo tomadas en cada punto de muestreo (altitud) se mezclaron para contar con una muestra de cada sitio, y un total de tres muestras por sitio. Como tal, se obtuvieron 24 muestras de suelo (3 muestras de cada punto x 2 réplicas por tratamiento x 4 tratamientos).

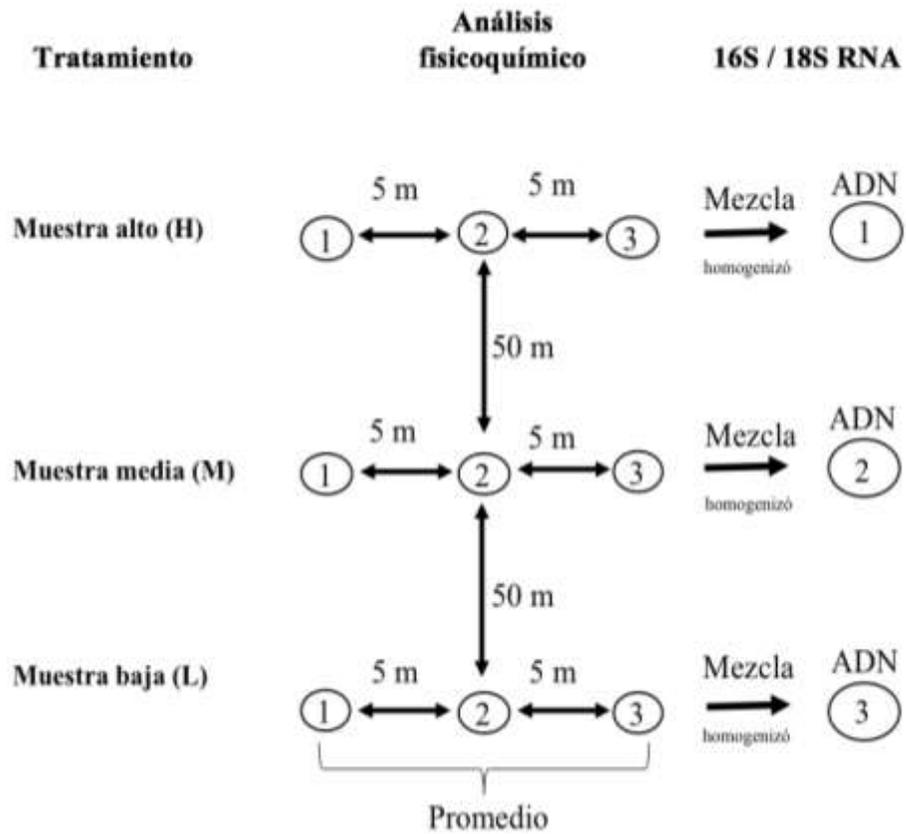


Figura 2. Esquema de muestreo de suelo para análisis físicoquímico y molecular de cada tratamiento.



Uso local



Agricultura



Matarrasa



Vegetación natural

Figura 3. Sitios de muestreo en cada tratamiento.

4.3. Caracterización fisicoquímica de los suelos

A las muestras de suelo se les realizó una caracterización fisicoquímica para lo cual fueron secadas al aire posteriormente tamizadas. Los parámetros por determinar fueron: capacidad de retención de agua (CRA) por el método gravimétrico (Cassel et al., 1986), conductividad eléctrica (CE) con el método de pasta saturada (Rhoades et al., 1989), nitrógeno total con el método de Kjeldahl (Bremner et al., 1996), carbono orgánico total (TOC) (Chung et al., 2004), tamaño de partícula del sedimento (Gee et al., 1986) y pH (Thomas et al., 1996).

4.4. Activación biológica de los suelos colectados

El suelo utilizado para el desarrollo de este trabajo se pre-activó. el proceso anterior radicó en pesar 60 g de suelo seco en frascos de vidrio de capacidad de 125 mL en los cuales se ajustó a una capacidad de retención de agua (CRA) de 40%, las unidades fueron colocadas dentro de un tambo el cual contenía 2 L de agua destilada con el fin de evitar la desecación de las muestras, así también, se colocaron frascos de 150 mL que contenían NaOH 1M para evitar inundar la atmósfera con CO₂. La preactivación se realizó durante 7 días en obscuridad a 22°C bajo condiciones aerobias. Posteriormente cada unidad experimental se colocó dentro de jarras de 1L con un volumen de aproximadamente 10 mL de agua destilada, así también se introdujeron frascos de 50 mL que contenían 20 mL de NaOH 1M (Fig. 4). Las muestras se incubaron por un periodo de 56 días durante los cuales se realizaron muestreos los días 0, 1, 3, 7, 14, 28 y 56 en cada día de muestreo se retiraron las muestras del microcosmos, se procedió primero a separar el suelo, se pesaron 5.0 g de suelo en bolsas de polipropileno estériles, los cuales se emplearon para extracción de DNA.



Figura 4. Microcosmos para la activación de suelo.

4.5. Extracción de DNA metagenómico.

Para el análisis molecular se llevó a cabo remoción de la materia orgánica con base a Ceja-Navarro et al., (2010), lo anterior se efectuó colocando 0.5 g de suelo en tubos de centrifuga con capacidad de 15 ml a los cuales se les adiciono 10 ml de pirofosfato de sodio 0.15 M y se procedió a agitarlos en un agitador Vortex marca Genie2 hasta resuspender. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min, y se procedió a eliminar el sobrenadante, dicho procedimiento se repitió en un promedio de 10 veces dependiendo el tipo tratamiento a analizar, a continuación se eliminó el exceso de pirofosfato, para lo cual se emplearon lavados con 10 ml de regulador de fosfatos pH 8 y se agitó con un agitador vortex marca Genie 2 para resuspender, se continuó con la centrifugación a 10 000 rpm durante 15 min, dicho procedimiento se efectuó por cinco veces, donde las muestras tratadas con pirofosfato y con regulador fueron procesadas inmediatamente para la extracción de DNA la cual se realizó mediante tres protocolos diferentes, descritos a continuación:

- a) lisis enzimática: el protocolo fue reportado por Sambrook y Rusel (2001) se basa en el uso de lisozima para realizar lisis enzimática
- b) lisis química: protocolo de extracción se basa en lo explicado por Hoffman y Winston (1987) el cual consiste en lisis química usando soluciones de detergentes
- c) por choque térmico: como lo sugiere Chávez-Romero et al. (2016) el cual consiste en lisis química y choque térmico (Incubación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche y posterior someter a calentamiento a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos)

En los tres protocolos de extracción se realizó lisis mecánica usando FastPrep-24TM5G, el cual se efectuaron tres ciclos de agitación a una velocidad de 5.5 m s^{-1} durante 40 segundos y reposo de 4 minutos entre cada ciclo. De cada método de extracción se realizó por triplicado; como tal, se extrajeron 1.5 g de suelo. En total, se extrajeron 4.5 g de ADN de cada muestra de suelo de cada punto de muestreo ($n = 3$) y, en total 27 g de ADN por tratamiento ($n = 4$).

Finalmente, se evaluó la calidad del DNA metagenómico obtenido con cada protocolo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en regulador TAE 1X; se corrió por 30

minutos a 70 V. La mezcla de DNA metagenómico se guardó a -20 °C y se hicieron alícuotas de trabajo para los análisis posteriores.

4.6. Amplificación del gen 16S rRNA

Para la determinación de la diversidad bacteriana se amplificó la región V3-V4 empleando para ello los iniciadores 341-F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805-R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC 3') (Klindworth et al., 2013). Los iniciadores tuvieron identificadores moleculares de 8 bases propuestos por el protocolo de Illumina. Las reacciones de PCR para amplificación del gen 16S rRNA de bacterias son las descritas en la tabla 1, donde cada reacción se realizó por triplicado.

El tamaño del amplicón se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% usando Syber Gold y marcador de talla molecular 100 pb de Thermo Scientific. Los productos de tres reacciones por muestra se mezclaron para la construcción de bibliotecas para secuenciación.

Tabla 1. Condiciones de la PCR para la amplificación del gen 16S rRNA de bacterias.

Reactivo	Concentración inicial	μL para una reacción
MgCl ₂	25 mM	1.5
Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	10X	1.25
dNT	10 mM	0.25
BSA	10 mg mL ⁻¹	1
DMSO		0.5
Iniciador F	10 pM	0.25
Iniciador R	10 pM	0.25
Taq polimerasa	1UI μL ⁻¹	0.0625
DNA	ND	1
H ₂ O	Completar a 12.5 μL	-

Desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 40 s, 46°C por 1min, y 72°C de 30s, finalmente una extensión 72°C por 5min,

dNTP: Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (ATP, CTP, TTP, GTP).

BSA: Albúmina sérica bovina

DMSO: Dimetilsulfóxido

4.7. Amplificación del gen 18S rRNA Eucariota

La determinación de la diversidad de eucariotas se realizó empleando los primers para microorganismos eucariotas Euk-817F (5'-TTA GCA TGG AAT AAT RRA ATA GGA-3') and Euk-1536(5'-ATT GCA ATG CYC TAT CCC CA-3'). Las condiciones para la reacción las son las descritas en la tabla 2. Cada reacción se realizó por triplicado, la amplificación se verificó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% empleando marcador molecular de 100 pb de Thermo Scientific. Los productos de tres reacciones por muestra se mezclaron para la construcción de librerías para secuenciación.

Tabla 2. Condiciones de la PCR para amplificación del gen 18S rRNA eucariota.

Reactivo	Concentración inicial	μL para una reacción
MgCl ₂	25 mM	3.0
Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	10X	2.5
dNT	10 mM	0.5
BSA	10 mg mL ⁻¹	2
DMSO		0.5
Iniciador F	10 pM	0.5
Iniciador R	10 pM	0.5
Taq polimerasa	1UI μL^{-1}	0.125
DNA	ND	1
H ₂ O	Completar a 25 μL	-

Desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min ,94 durante 45 s, seguido de 35 ciclos de 50 °C por 1min finalmente una extensión 72°C por 1min (Rousk et al., 2010)

dNTP: Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (ATP, CTP, TTP, GTP).

BSA: Albúmina sérica bovina

DMSO: Dimetilsulfóxido

4.8. Construcción de librería para secuenciación

De cada muestra se amplificó por triplicado para cada gen 16S rRNA bacterias y 18S rRNA eucariotas respectivamente. Se purificaron para eliminar los residuos de la reacción usando el kit FastGene™ PCR extracción (Genetics), y se siguieron las especificaciones del fabricante usando un volumen final de elución de 30 µL de agua. Se comprobó la eficiencia de la purificación mediante gel de agarosa al 1.5%; posteriormente se cuantificó por triplicado cada muestra usando PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, USA), para lo cual se realizó una dilución 1:50 de la muestra purificada en TE 1X (Tris-EDTA pH8) y se mezcló en volúmenes iguales de PicoGreen 1X. Finalmente, la mezcla se reposó por 5 min en oscuridad, a una temperatura de 4 °C se midió la concentración en NanoDrop™ 3300 Fluorespectrometer (Thermo Scientific Nanodrop) utilizando para las lecturas 2 µL de la muestra previamente descrita. Con base en las concentraciones obtenidas se mezclaron las diferentes muestras para obtener concentraciones equivalentes.

Siguiendo las especificaciones del protocolo de Illumina se incorporó un multi-identificador para cada conjunto de muestras con similar concentración. Para finalmente eliminar los residuos de la reacción usando el kit FastGene™ PCR extraction (Genetics), siguiendo las especificaciones del fabricante se aplicó un volumen final de elución de 30 µL de agua. Finalmente, la secuenciación se realizó con el protocolo de Illumina en Macrogen Inc. DNA Sequencing Service, Seoul, Korea utilizando la plataforma de Illumina Miseq.

4.9. Análisis de secuencias para genes 16S rRNA bacteria y 18S rRNA eucariota.

Las secuencias de bacterias obtenidas se analizaron con el software QIIME pipeline versión 1.9.1, se inició con el pareado y ensamblando Paired-end en fastq-join, de este modo se realizó la desmultiplex de las lecturas, para hacer un filtrado de aquellas con baja calidad (menos de 19 Phred score) así como de quimeras. Se seleccionaron las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con una similitud del 97% aplicando la base de datos de Greengenes v13_8 con un algoritmo UCLUST (Edgar, 2010). El alineamiento de secuencias se realizó aplicando el algoritmo de PyNAS versión 1.2.2 con un umbral de identidad mínima de 75% (Caporaso, 2010). La asignación taxonómica

se efectuó mediante el uso del clasificador Bayesian rRNA (<http://edp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jps>) mediante una representación de las secuencias seleccionadas para OTU₉₇ (Wang et al., 2007). Con la asignación taxonómica y los metadatos de las muestras se realizó la construcción de matrices BIOM de las cuales fueron eliminados los singletons para el cálculo de la diversidad alfa de $q = 0, 1$ y 2 obtenidos de las tablas BIOM rarificadas a 3310 lecturas por muestra con script de MetagenomaDiversity.R (Ma y Li, 2018).

Las bibliotecas obtenidas de 18S rRNA (Blaxter et al., 1998) se procesaron, agruparon y asignaron taxonómicamente como lo previamente descrito para bacterias, y las lecturas demultiplicadas se sometieron a una identificación y eliminación de quimera usando USEARCH v.6.1 con una identidad de 98% (Edgar, 2010).

Las lecturas de alta calidad se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTUs) utilizando el método de referencia abierta en un umbral de similitud de 97% con el selector de UCLUST versión 1.2.22, utilizando el script pick_otus.py (Edgar, 2010). La taxonomía se asignó a secuencias OTU representativas utilizando BLAST dentro de QIIME, contra las bases de datos SILVA 18S/132release (rep_set y taxonomía de 7 niveles, <http://www.arb-silva.de/>), con un umbral de confianza de 99% (Quast et al., 2013). Las OTUs sin coincidencias significativas (<90% de identidad) después de la asignación taxonómica se etiquetaron como BU no identificadas. Por ello, los datos se filtraron con filter_sample_from_otu_table.py para eliminar secuencias singletons” (las secuencias que aparecieron < 2 veces en el conjunto de datos) y OTUs de baja abundancia que constituyeron <0,001% de lecturas en el conjunto de datos total recomendado para los datos de secuenciación de Illumina (Cewart et al., 2015; Haenel et al., (2017). Después de la eliminación de quimeras y singlentions, 86,642 secuencias (en promedio \pm DS de 4125.9 ± 3010.5) permanecieron en el conjunto de datos de 18S (6.2% de pérdida).

Los archivos de las tablas de OTUs con siete niveles taxonómicos (Otus_table_taxa_L6) obtenidos en el algoritmo summarize_taxa.py (abundancias absolutas) y summarize_taxa_through_plots.py (abundancias relativas) fueron utilizadas para realizar análisis de comunidad en R (R Development Core Team 2013). Los niveles dominio, filo, clase, orden, familia, género y especie, fueron supervisados y se verificó su identidad taxonómica en la base de datos del Centro Nacional para la Información

Biocientífica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>), y OTUs con dudosa clasificación o sin clasificación fueron eliminados de la base de datos a nivel de género (<1%).

4.10. Análisis estadístico del gen 16S bacteria y 18S eucariotas

Para el análisis estadístico se empleó el software R (R Core Team 2013) por medio de la función de ANOVA Test (aov function) se determinó el efecto del tratamiento y las características del suelo, mediante el análisis paramétrico se determinó el efecto del tratamiento en la diversidad alfa y por medio de un análisis estadístico robusto de t1 way de la paquetería WRS2 v.1.1-4 (Mair y Wilcos, 2017). Asimismo, se construyó un mapa de calor (heatmap) con la abundancia relativa de bacterias y las características del suelo con el fin de representar los cambios y magnitudes de la abundancia por sitio. Lo anterior se obtiene mediante valores numéricos que se muestran por colores, agrupados en filas y columnas por su similitud se efectuó empleando la paquetería de pheatmap v1.0.12 (Kolde, 2017).

Dada la naturaleza de los datos se realizó un análisis de abundancia diferencial, lo anterior se realizó empleando la paquetería ALDEx versión 2, en este análisis se utiliza un modelo multinomial de Dirichlet para inferir en la abundancia a partir de los recuentos optimizados para tres o más repeticiones, las lecturas se asignan a las características de cada muestra, éstas se normalizan y posteriormente se calcula la diferencia estadística entre las características que componen cada grupo donde las pruebas informan valores de p corregidos empleando el argumento (aldex.kwargument,ALDEx2package,Gloor et al., 2019).

Asimismo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) en el cual se evaluó el efecto del tratamiento (agricultura, uso local matarrasa, y vegetación natural) sobre los grupos bacterianos, para ello, se empleó el análisis de abundancia diferencial, con el fin de obtener un enfoque composicional. Para dicho análisis se empleó la paquetería vegan v2.6-4 (Oksanen et al. 2019). Por medio de los análisis multivariados (perMANOVA) se realizó la correlación entre los grupos de bacterias y las características del suelo por la altitud empleando el argumento de adonis2 de la paquetería Vegan. Finalmente, se analizó un posible efecto de las características del suelo por tratamiento

en la abundancia relativa de los diferentes grupos de bacterias, para lo cual se empleó el algoritmo Random Forest (Breiman y Cutler, 2015).

Posteriormente, se analizaron las secuencias del gen 18S, para cada sitio se obtuvo la abundancia relativa de las especies (Otus_table_taxa_L6), la cual fue normalizada antes de graficar con el paquete ggplot2 v.3.3.6 (Wickham et al., 2016) en el software R versión 3.0.3 (R Core Team, 2014). Se realizó un análisis de Kruskal Wallis a partir de correcciones múltiples al logaritmo de la abundancia relativa con el paquete ggplot2 y reshape (Wickham y Wickhamet, 2015). Además, como un análisis exploratorio de diferencias entre variables ambientales y la abundancia a nivel de filo se realizó un análisis de correlación de Kendall con el paquete ggplot2.

Para determinar las similitudes entre los sitios, se analizó la abundancia relativa a nivel de género (Otus_table_taxa_L6) utilizando la técnica de visualización de mapas de calor. usando los paquetes circlize 0.4.11 (Gu et al., 2020), ComplexHeatmap v.3.15 (Gu et al., 2016), dendextend v.1.16.0 (Galili et al., 2015) y ggplot2 en el software R (R core team 2014), con agrupación de UPGMA y una correlación cofenética de 0.91.

Finalmente, se evaluó el efecto del tratamiento (agricultura, uso local, matarrasa, y vegetación natural) sobre los grupos de eucariotas a nivel de filo y orden con un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando una matriz varianza-covarianza y 1000 repeticiones con los paquetes devtools v. 1.13.6 (Wickman et al., 2021), ggplot2 v.3.3.6 (Wickham et al., 2016), ggforce v.0.1.2 (Pedersen et al., 2020), y factoextra v.1.03 (Kassambara y Mundt, 2017) en el software R (R core team 2014).

4.11. Diversidad de especies

La diversidad alfa entre tratamientos se estimó con base en el archivo Otus_table_taxonomy_L6 como el número de especies efectivas (Hill, 1973, Jost, 2006). Donde la diversidad de orden cero ($q = 0$, Riqueza de especies) es igual a la riqueza de especies, la diversidad del orden 1 ($q = 1$, Shannon) pesa proporcionalmente todas las especies de acuerdo con su abundancia en la comunidad y la diversidad de orden 2 ($q = 2$, Simpson) da más peso a las especies. El análisis se realizó con la paquetería de "iNEXT" 2.0.5 (Hsieh et al., 2016) y "vegan" v. 2.3.-2 (Oksanen et al., 2015) en el software R versión 3.0.3 (R Core Team, 2014), con intervalos de confianza de 95%. Se uso una prueba de Kruskal-Wallis (K-W) implementada en la función hilldiv::div_test

(Alberdi y Gilbert, 2019) usando R para determinar si los valores medios de diversidad variaban entre tratamientos analizados.

Se estimó además la completitud del muestreo para cada tipo de vegetación mediante un análisis de la cobertura de la muestra. La completitud considera la proporción del número total de individuos de las especies representadas en el inventario, por lo que es considerada una medida de la integridad del muestreo (Chao y Jost, 2012). Los valores de completitud pueden variar de 0 (mínima completitud) a 1 (máxima completitud) (Chao y Jost, 2012, González-Tokman, et al., 2018), Un valor superior 0.5 es considerado un inventario aceptable (Hsieh et al., 2016). Ambos análisis se realizaron con la paquetería “iNEXT” 2.0.5 (Hsieh et al., 2016) y “vegan” v. 2.3.-2 (Oksanen et al. 2015) en el software R versión 3.0.3 (R Core Team, 2014), con intervalos de confianza de 95%.

La medición de la diversidad β , se realizó dentro de cada tratamiento y entre sitios (meta comunidad). Con base en el archivo `Otus_table_taxonomy_L6`. Para evaluar el recambio de especies (diversidad β_{total}) se utilizó el método propuesto por Carvalho et al. (2012), que relaciona el reemplazo de especies (β_{repl}), es decir, el remplazo en la composición de especies que se sustituyen entre los sitios, y las diferencias en riqueza de especies (β_{rich}), que explican la β_{total} a partir de la función beta-multi de la paquetería BAT (Cardoso et al., 2017).

Finalmente, para investigar los factores ambientales que afectan la diversidad de especies, primero se realizó una correlación de Spearman's entre la matriz de abundancia de orden y la matriz de datos ambientales usando los paquete `vegan` y `ggplot2`, citados anteriormente. Además, se analizó las matrices de (i) abundancia de especies presentes en cada sitio de muestreo y (ii) las variables ambientales utilizando un análisis de correspondencia canónica (CCA; ter Braak, 1986); las ordenaciones se realizaron con el programa XLSTAT v. 2015 (Addissoft, 2015). La matriz de datos ambientales incluyó 12 variables, tres variables geográficas (altitud, latitud, longitud), así como 9 variables edáficas seleccionadas a partir de un análisis de multicolinealidad con los paquetes `car` v.3.1-1 (Fox et al., 2012) y `corrplot` v.0.84 (Wei et al., 2017) en el software R versión 3.0.3 (R Core Team, 2014).

5. RESULTADOS

5.1. Características fisicoquímicas del suelo en los sitios de estudio

Los sitios de muestreo presentaron un tipo de suelo arcilloso, limoso o arcilloso-arcilloso (Tabla 3). El pH varió de 6.5 en las partes altas del suelo agrícola a 4.3 en suelo de matarrasa, sin embargo, fue significativamente mayor en el suelo de agricultura que en los otros sitios ($p=0.012$). Por otro lado, el C orgánico fue significativamente mayor en las áreas de uso local y vegetación que en el sitio de agricultura y matarrasa ($p<0.001$). La altitud y su interacción con la vegetación no presentaron algún efecto significativo con sobre CRA, N total y textura del suelo, pero el N total fue significativamente mayor en los sitios de uso local que en la vegetación ($p=0.010$).

5.2. Obtención de secuencias y diversidad alfa en bacterias

Los análisis de secuencias arrojaron un total de 226165 secuencias las cuales representaron un 7012 OTUs agrupados a 26 filos bacterianos y 471 grupos de bacterias asignados a nivel taxonómico de género. La curva de rarefacción fue asintótica lo cual indicó que el análisis de más secuencias sólo habría producido un número limitado de más OTUs (Fig. 5). La riqueza de especies o OTUs ($q = 0$) osciló entre 488 en los sitios de uso local en la sección baja y 1008 en la parte inferior del suelo de cultivo, pero no se vio afectada significativamente por la vegetación o la altitud (Tabla 4).

La exponencial del índice de Simpson ($q = 2$) mostró una gran variación, pero no fue afectada significativamente por el uso del suelo. La diversidad beta mostró un efecto significativo del tipo de uso del suelo en la riqueza de especies ($q = 0$) ($p=0.0029$) pero no en otros órdenes de diversidad ($q = 1, q = 2$) (Tabla 4).

Tabla 3. Características promedio del suelo analizado en los cuatro tratamientos de estudio.

Tratamiento	Altitud	pH	CRA ^a	Carbon Orgánico	Nitrógeno total	Arcilla	Limo	Arena	Textura del suelo USDA
				(g kg ⁻¹ dry soil)					
Agricultura	A	6.5 A b	371 ^A	29.4 ^B	1.03 ^A	190 ^A	350 ^A	460 ^A	limo
	M	6.2 A	356 ^A	46.8 ^{BC}	1.24 ^A	210 ^A	300 ^A	490 ^A	limo
	B	5.9 AB	319 ^A	34.2 ^C	0.91 ^A	200 ^A	310 ^A	490 ^A	limo
Matarrasa	A	4.8 B	277 ^A	39.6 ^C	1.08 ^A	420 ^A	140 ^A	440 ^A	limo
	M	4.8 B	334 ^A	41.2 ^C	1.11 ^A	420 ^A	260 ^A	320 ^A	arcilla
	B	4.3 B	372 ^A	37.0 ^C	1.13 ^A	460 ^A	110 ^A	440 ^A	arcilla
Uso local	A	5.2 AB	423 ^A	91.0 ^A	1.06 ^A	770 ^A	20 ^A	210 ^A	arcilla
	M	5.0 AB	376 ^A	86.0 ^{AB}	1.68 ^A	740 ^A	30 ^A	230 ^A	arcilla
	B	5.6 AB	399 ^A	82.0 ^{AB}	1.14 ^A	750 ^A	30 ^A	220 ^A	arcilla
Vegetación	A	5.2 AB	310 ^A	82.3 ^{AB}	0.85 ^A	520 ^A	130 ^A	350 ^A	arcilla
	M	5.5 AB	348 ^A	70.3 ^{AB}	0.80 ^A	320 ^A	410 ^A	270 ^A	Limo arcilloso
	B	5.1 AB	278 ^A	88.5 ^{AB}	0.74 ^A	530 ^A	120 ^A	350 ^A	arcilla

CRA: capacidad de retención de agua
^b Los valores con una letra en mayúscula marcan una diferencia significativa entre los suelos (p<0,05)

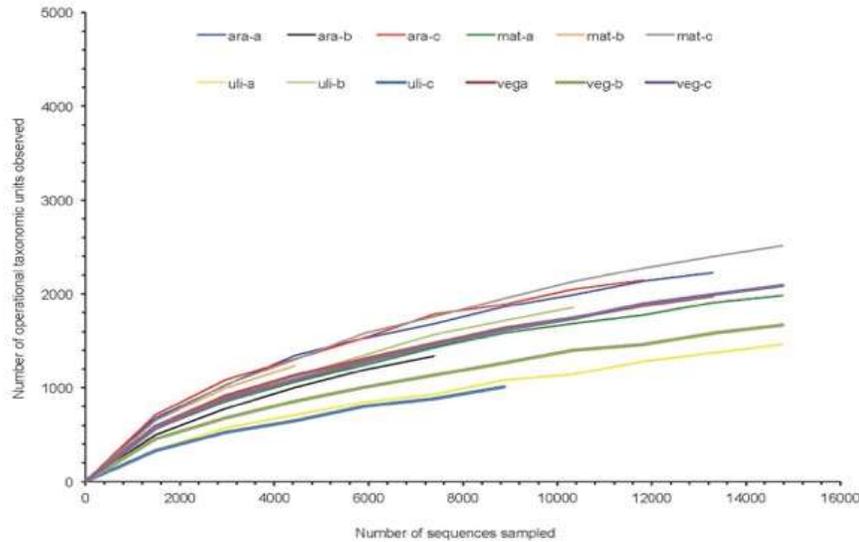


Figura 5. Curvas de rarefacción con número de secuencias versus número de OTUs en cada uno de los tratamientos y su altitud.

Tabla 4. Diversidad alfa con valores de $q=0$ riqueza de especies, $q=1$ exponencial de índice de Shannon, $q=2$ el inverso del índice de Simpson o especies dominantes en los suelos de estudio.

Tratamiento	$q=0$	$q=1$	$q=2$
Agricultura	897	347	105
Matarrasa	832	319	96
Uso local	727	231	60
Vegetación	603	118	27
<i>F</i> valor	1.60	2.69	2.99
<i>p</i> valor	0.322	0.186	0.152

La diversidad β , registró una similitud total (β_{Total}) de especies compartidas dentro de cada tratamiento inferior a 50%, con un valor menor en agricultura. Por otro lado, con excepción de agricultura se observó una mayor variación explicada por el reemplazo de especies (β_{repl}), que por diferencias en riqueza de especies (β_{rich}) en cada tratamiento (Fig. 6).

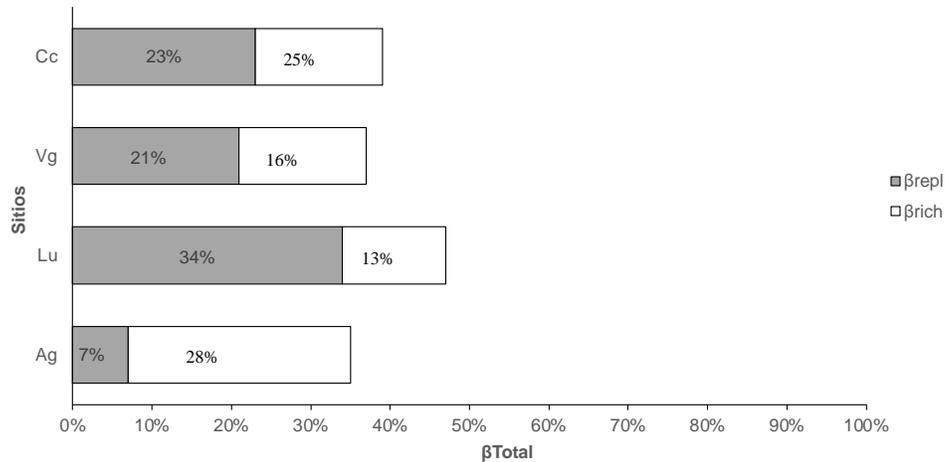


Figura 6. Diversidad β total en cada tratamiento para 16S la sección gris (β repl) de cada barra indica el remplazo de especies, mientras que la sección blanca (β rich) indica las diferencias en riqueza, donde Ag: agricultura, Cc: matarrasa, UL: uso local, Vg vegetación natural.

Por otra parte, se obtuvo que los valores de completitud para cada tratamiento fueron satisfactorios ya que los valores en todos los tratamientos fueron superiores a 0.9 (Fig. 7).

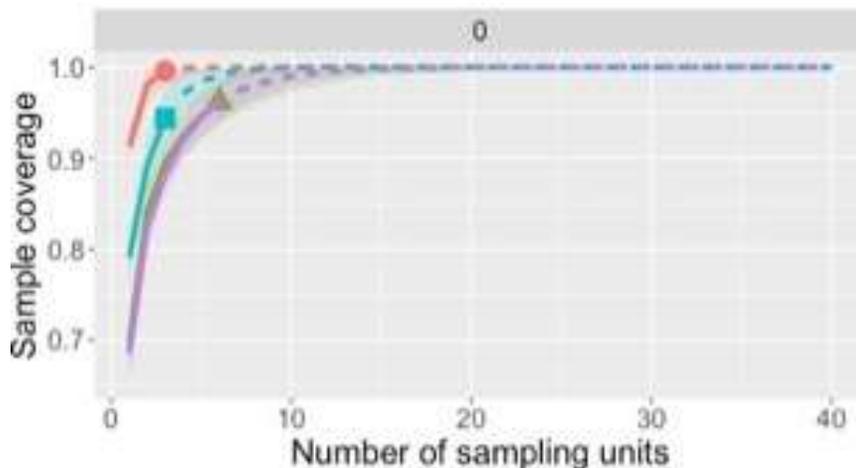


Figura 7. Análisis de la cobertura de la muestra a partir del número de OTUs encontradas en cuatro tratamientos. Las bandas corresponden al intervalo de confianza del 95%. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, UL uso local y Vg vegetación natural.

5.3. Estructura de la comunidad bacteriana

En el mapa de calor, la abundancia relativa, es mostrada en color blanco para grupos poco abundantes, mientras que las bacterias con mayor abundancia se muestran en rojo (Fig. 8) La abundancia porcentual explicada con random forest solo pudo ser explicada para un grupo limitado de bacterias (e.g. WPS-2, *Bradyrhizobium*) con relación al efecto de los suelos de cada sitio.

La comunidad bacteriana que tiene un dominio mayor fueron Proteobacteria (abundancia relativa $40.13 \pm 12.47\%$), seguido de Actinobacteria ($20.15 \pm 12.72\%$) y Acidobacteria ($14.50 \pm 5.75\%$) (Fig. 9a). La abundancia relativa de algunos filos mostró variaciones significativas entre los diferentes tratamientos, donde la abundancia relativa de las Proteobacteria osciló entre el $26.33 \pm 6.80\%$, en el suelo de agricultura a $52.47 \pm 11.88\%$, en el suelo forestal de uso local, con un tamaño de efecto de 2.6. Ninguno de los valores esperados del valor p corregido por Benjamini-Hochberg fue significativo al comparar los filos bacterianos en los suelos, donde el tamaño del efecto fue a menudo mayor (>1.3) (Fig. 9a). Se encontró un tamaño del efecto mayor en los filos bacterianos, cuando se comparó el suelo con uso agrícola con los diferentes suelos forestales y fue menor cuando se comparó con los diferentes suelos forestales.

A nivel de género, las *Halomonas* ($14.50 \pm 17.59\%$) fue el género bacteriano más abundante, seguido de Verrucomicrobia DA101 ($3.39 \pm 1.66\%$) y *Streptomyces* ($2.93 \pm 4.83\%$) (Fig. 9b). Dieciocho grupos bacterianos de un total de 471 fueron afectados significativamente por el tratamiento. El tamaño del efecto de más OTUs bacterianas fue mayor cuando se comparó el suelo con uso agrícola (arable) con el suelo gestionado con fines forestales, a cuando se comparara los diferentes suelos forestales (Fig. 9b). un total de 73 OTUs tuvieron un tamaño del efecto > 1.3 al comparar el suelo de uso agrícola con el suelo de matarrasa (cleared and reforested), 53 al compararlo con el suelo de uso local (sustainable) managed) y 65 al compararlo con el suelo de vegetación (natural forest). Sin embargo, solo fueron 19 OTUs al comparar el suelo del sitio de matarrasa con el suelo dedicado al uso local y 14 con el suelo forestal natural. El tamaño del efecto de sólo siete OTUs bacterianas fue superior a 1.3 al comparar el suelo de uso local con el suelo de vegetación natural.

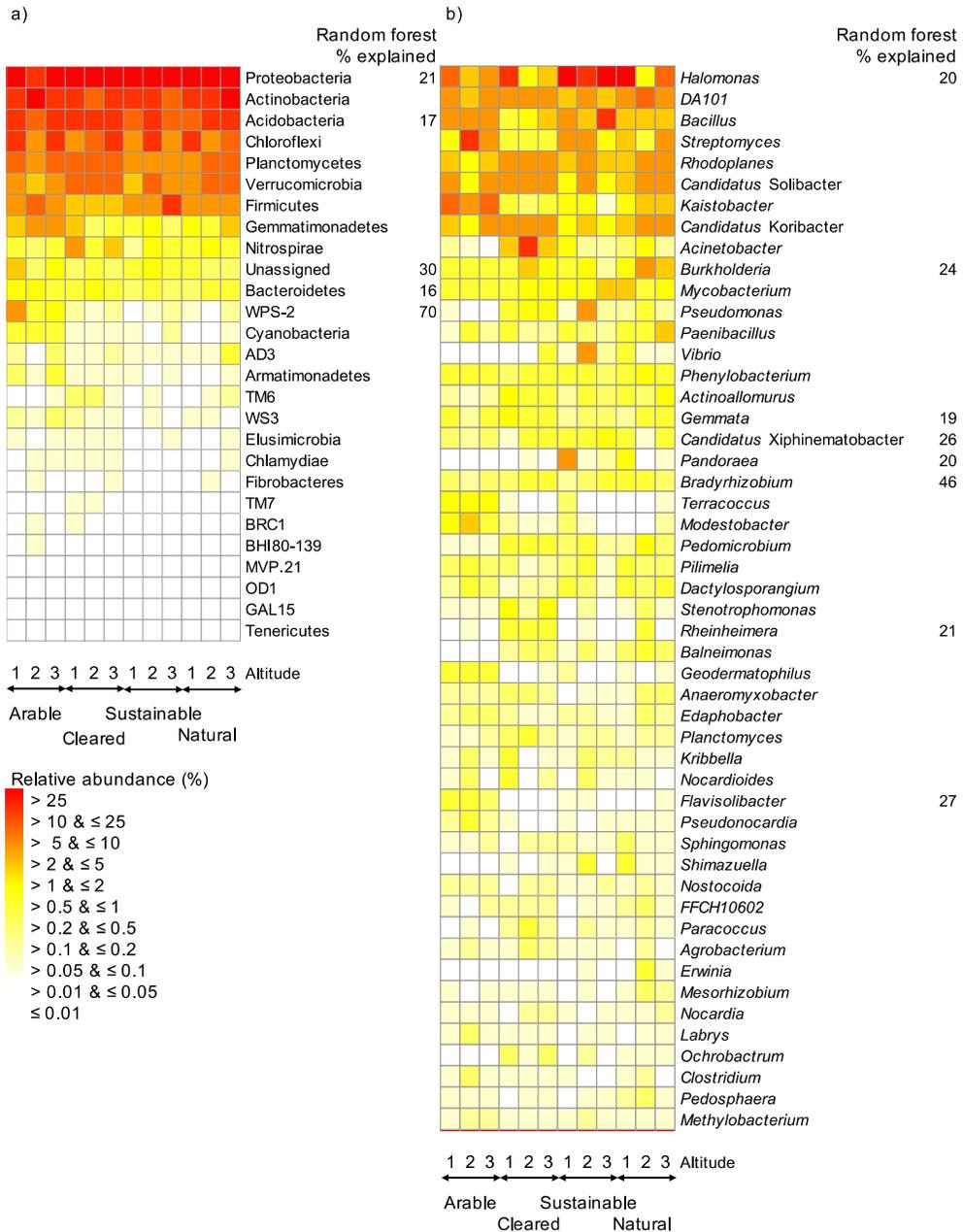
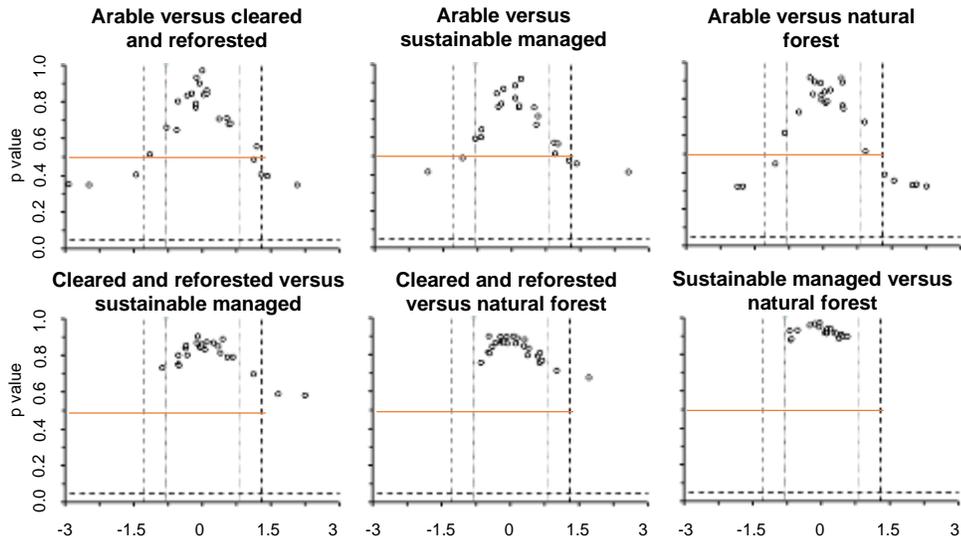


Figura 8. Mapa de calor con la abundancia relativa (a) de los filos bacterianos y (b) de los 50 géneros más abundantes en los tratamientos de agricultura (Arable), matarrasa (Cleared), uso local (Sustainable), vegetación natural (Natural) y altitud.

En el análisis de ACP se presentan los resultados del análisis de componentes principales (ACP), a nivel taxonómico de filo y género donde se observó que existe separación significativa ($p < 0.05$) de los resultados según el tratamiento y puntos de muestreo. A nivel de filo y orden los dos primeros componentes con criterio de valor

propio (> 1) explicaron más de 25% de la variabilidad de los datos, distribuidos en 19.24% y 15.79% para el primer factor, así como 17.51% y 9.54% para el segundo a nivel de filo y género, respectivamente (Fig. 10 a y b). En ambos niveles taxonómicos, el análisis agrupó y separó a los tratamientos de estudio, donde agricultura y matarrasa mostraron mayor asociación. Se observó que los ejes 1 y 2 mostraron una mayor agrupación de fillos y géneros asociados a agricultura y matarrasa, y en menor medida a uso local.

a) Bacterial phyla



b) Bacterial groups assigned up to the taxonomic level of genus

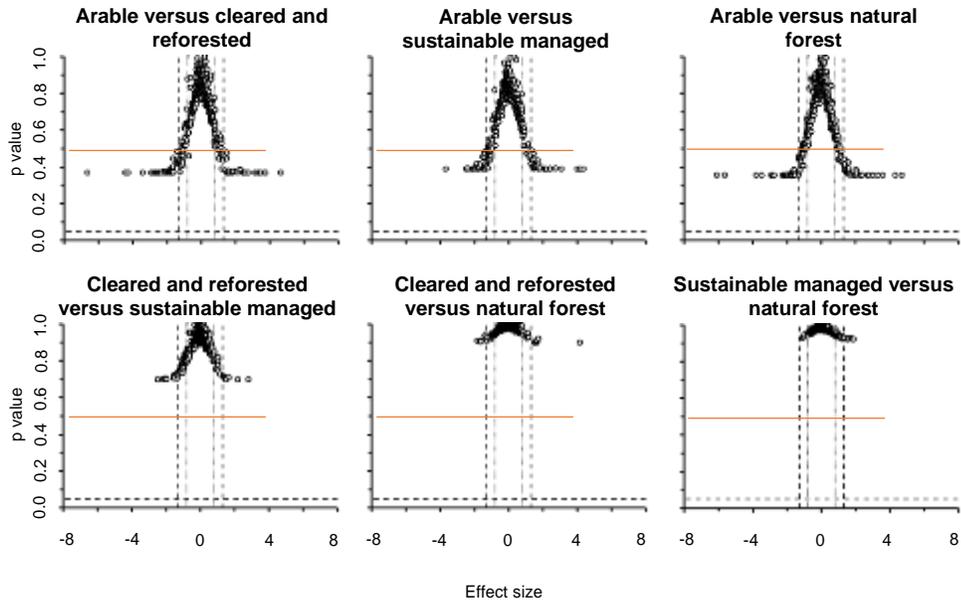


Figura 9. Diagrama de volcán donde cada punto representa un grupo taxonómico de bacterias a nivel de (a) filo) y (b) género con tamaño de efecto en el eje X, muestra el logaritmo base 2 (\log_2) de la relación entre los diversos tratamientos respecto a la significancia estadística (\log_2 del valor de p corregido por Benjamini-Hochberg). Línea de color continuo señala la significancia $p < 0.05$, mientras las líneas discontinuas grises horizontales y verticales el límite para el efecto del tamaño.

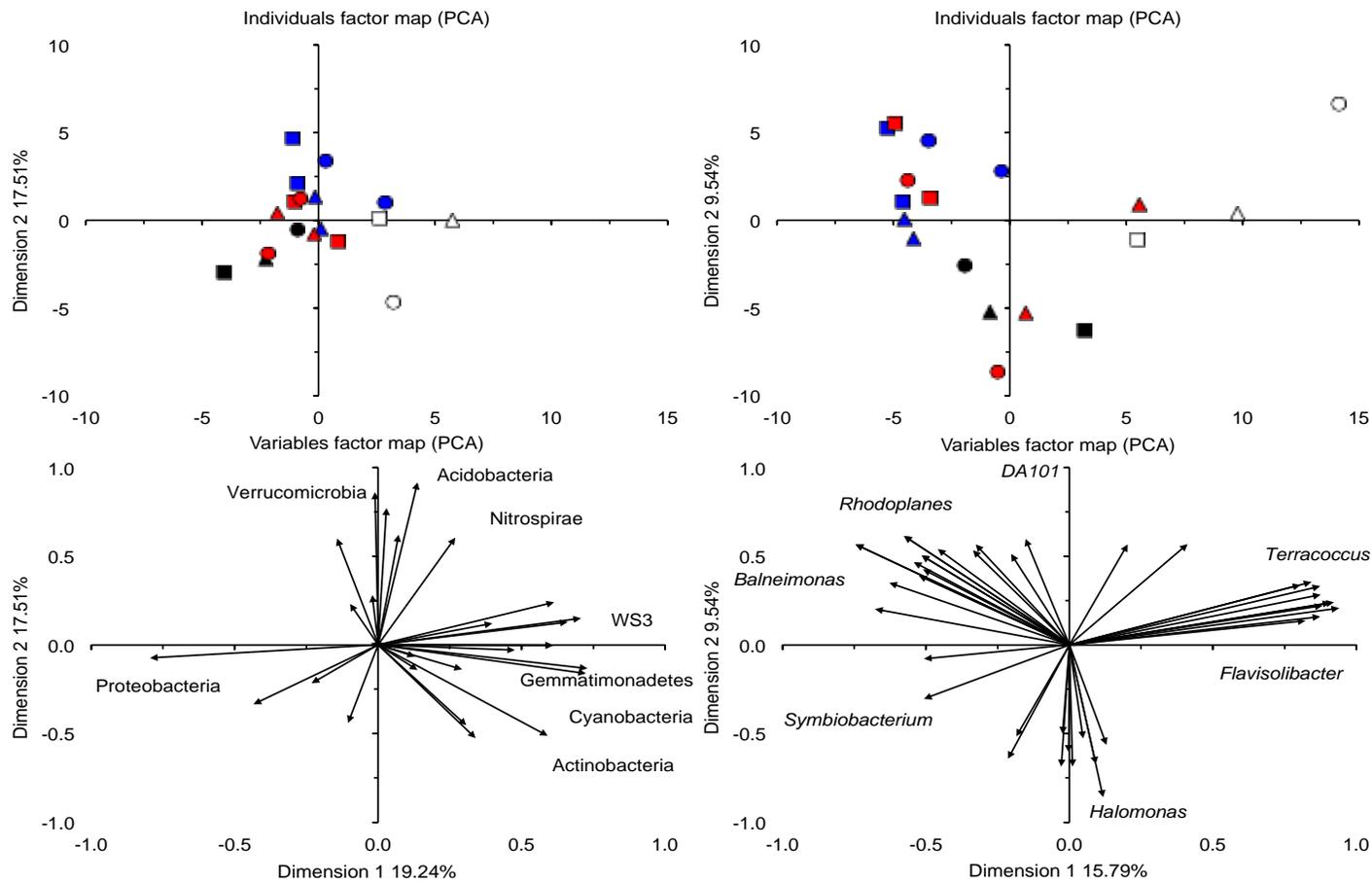
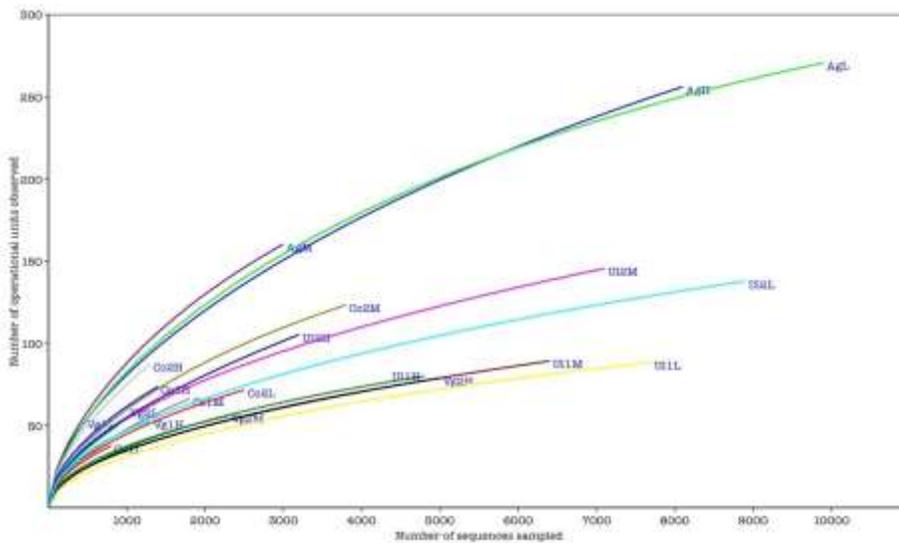


Figura 10. Análisis de componentes principales (a) con fillos bacterianos, (b) géneros bacterianos asignados a suelo agrícola parte alta (□), parte media (□) parte baja (□), matarrasa parte alta (■), matarrasa parte media (●) y matarrasa parte baja (▲), vegetación parte alta (■) vegetación parte media (●) vegetación parte baja(▲).

5.4. Asignación taxonómica y abundancia del gen 18s rRNA eucariota

El número total de secuencias una vez filtrada fue de 85,315 con un promedio de 4215.85 ± 305.10 , considerando solo secuencias > 1000 , debido a que diversas muestras de los tratamientos de uso local y agricultura no se obtuvieron secuencias o su número se redujo después del filtro primario (Fig. 11). Por otra parte, el número total de OTUs únicos observado fue de 554, con un promedio de 205.9 ± 62.27 . El mínimo número de OTUS fue de 42 obtenido en el tratamiento de matarrasa en franja (muestra Cc1L), mientras el máximo fue de 272 en el sitio de agricultura (muestra Ag1L).



contribución relativa fue el reino Fungi, en donde los filos Ascomycota (48.7%), Basidiomycota (48 %) y Mucoromycota (1.5%) fueron los más abundantes a nivel de orden. No obstante, que los porcentajes entre los filos Ascomycota y Basidiomycota son similares, el número de órdenes y especies es significativamente mayor en Ascomycota.

En el filo Ascomycota, los grupos más abundantes fueron Hypocreales (25.2%) y Helotiales (10.75%), mientras que Basidiomycota fueron los órdenes Lepidostromatales (37.35%) y Tremellales (12.26%). Umbelopsidales (1.08%) fue el orden más abundante en el filo Mucoromycota (Fig. 13). Los demás órdenes fueron menores a 1%, de estos los más importantes son Cladosporiales (0.98%), Onygenales (0.93%), Glomerellales (0.47%), Pleosporales (0.51%), Pezizales (0.25%), Boletales (0.74%) y Mortierellales (0.69%) todos del filo Ascomycota, con excepción de los últimos órdenes que correspondió a Basidiomycota. Otros dos órdenes con abundancia baja, pero filo diferente fueron Rhizophydiales (0.40%) del filo Chytridiomycota y Dermocystida (0.68%) del filo Holozoa (Fig. 13). Las especies con mayor ocurrencia y abundancia (aproximadamente 60% del total) correspondieron a *Lepidostroma akagene* (35.4%) y *Shaerodes retispora var. retispora* (24.5%) de los filos Basidiomycota y Ascomycota, respectivamente.

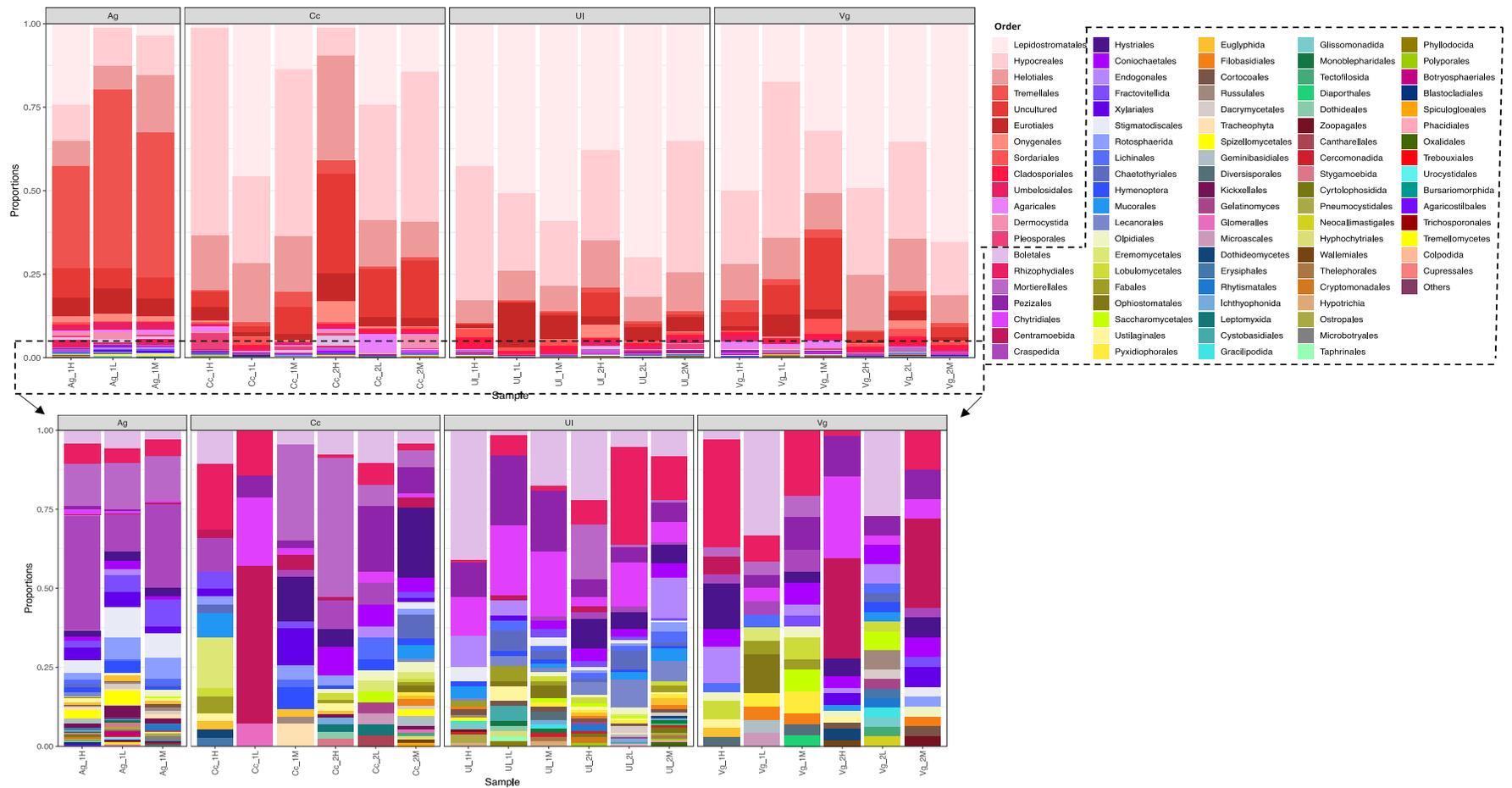


Figura 12. Abundancia relativa de órdenes en eucariotas en cada punto de muestreo de los diversos tratamientos analizados.

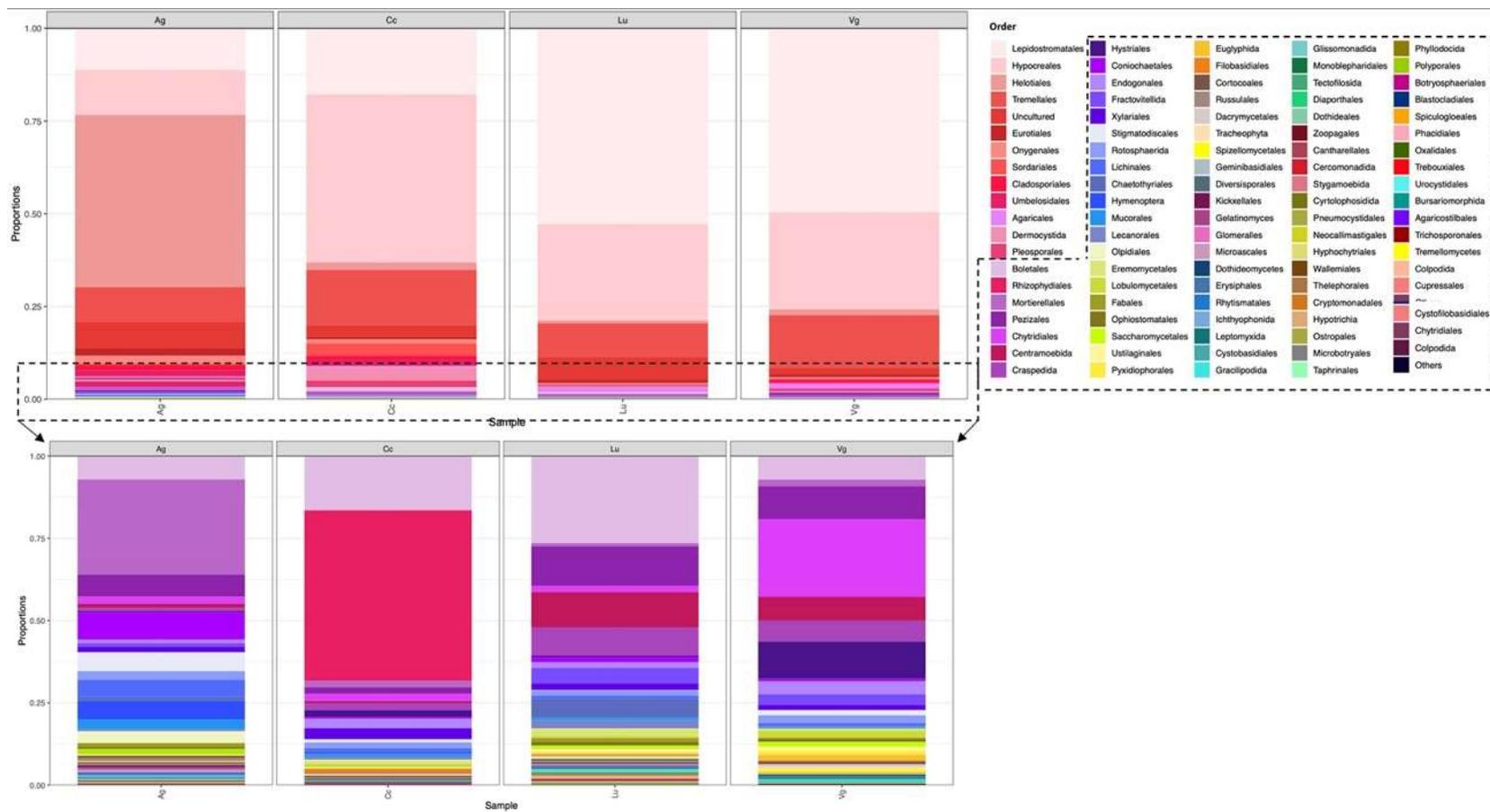


Figura 13. Abundancia relativa promedio de órdenes en eucariotas de los diversos tratamientos analizados. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local y Vg: vegetación natural.

De manera general, se encontró diferencias significativas en la abundancia de grupos taxonómicos entre tratamientos. En la figura 14 se presenta la abundancia a nivel de filo de los tratamientos analizados, con excepción de cinco filos (Cercozoa, Discosea, Mucoromycota, Streptophyta y Zoopagomycotina), en el resto se encontró diferencias significativas en la abundancia entre tratamientos.

En el mapa de calor (Fig. 15) la contribución relativa muestra en color azul órdenes poco abundantes dentro de los tratamientos, mientras que grupos con mayor abundancia son mostrados en color rojo. El dendrograma en filas diferencio tres clados conformado por diversos órdenes con base a su ocurrencia y contribución relativa. La gráfica de caja de la derecha mostró un promedio negativo en 90% en los órdenes de eucariota debido a su baja abundancia en algunos tratamientos. Además, el análisis del mapa de calor generó un dendrograma en columnas, separando a los tratamientos con base en su contribución, donde agricultura y uso local difieren significativamente de matarrasa y vegetación natural (Fig. 15).

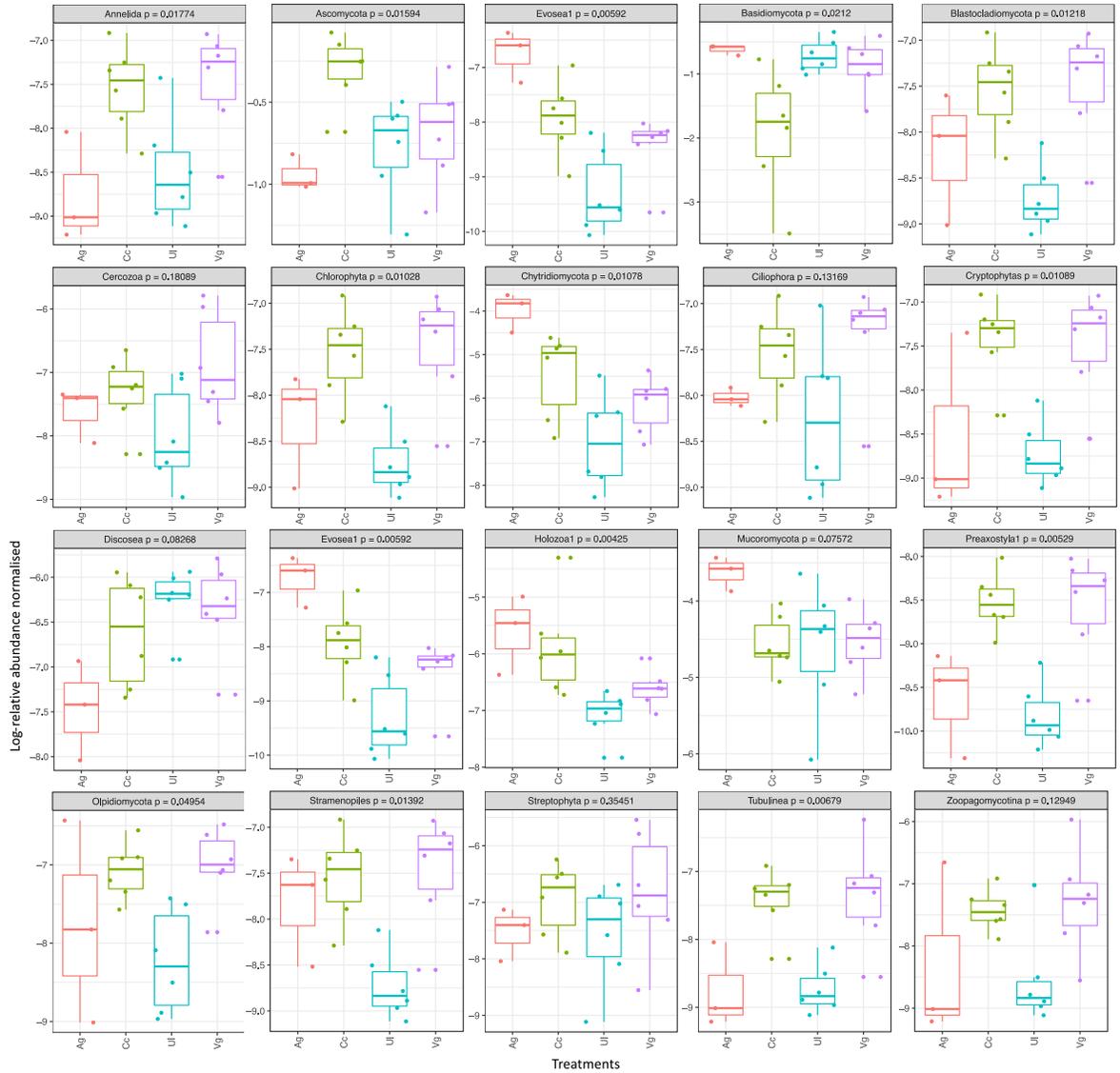


Figura 14. Logaritmo de la abundancia relativa a nivel de filo de los diversos tratamientos analizados. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, UI: uso local, Vg: vegetación natural con un p nivel de significancia del análisis de Kruskal-Wallis.

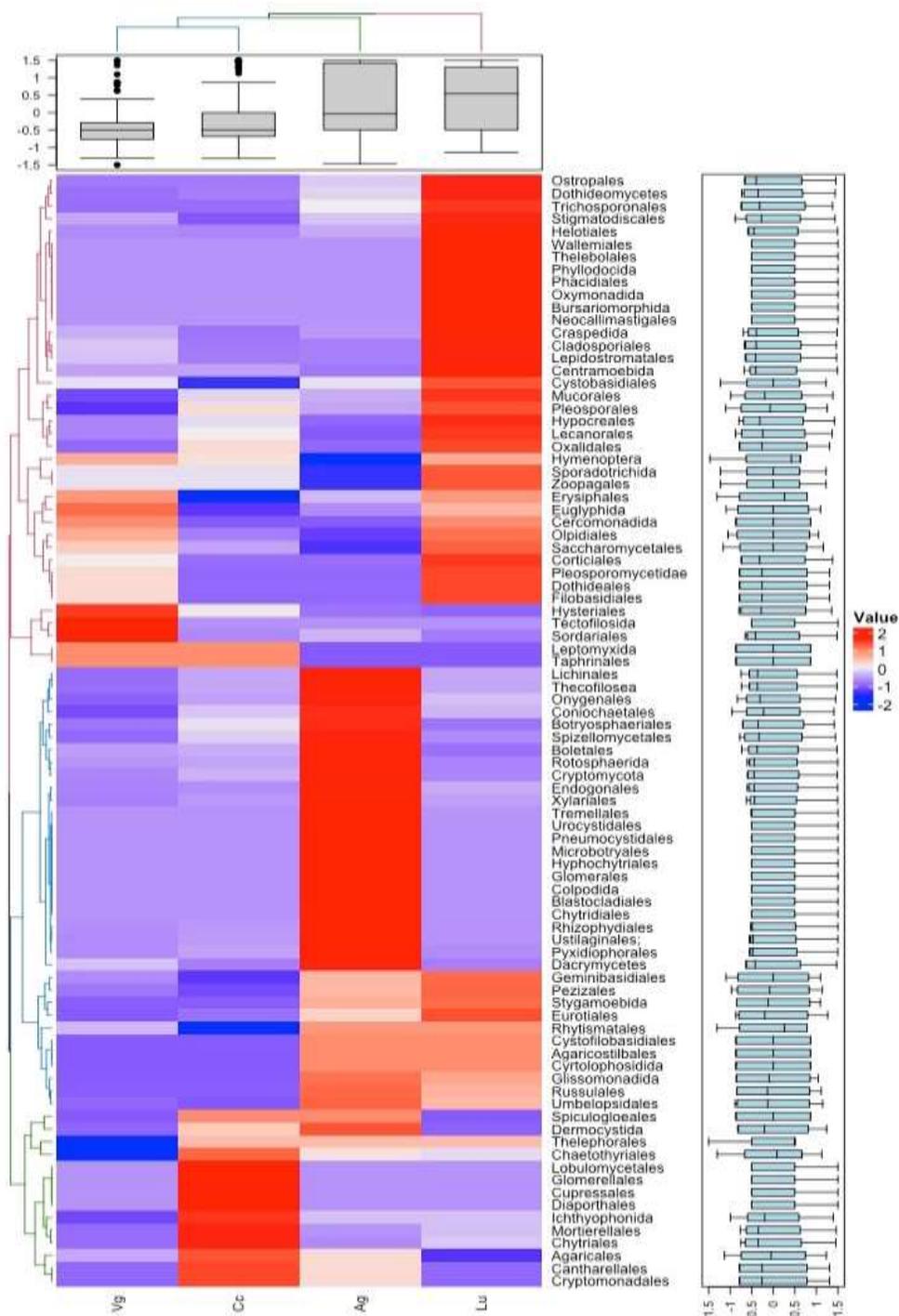


Figura 15. Mapa de calor basado en el valor relativo de la abundancia de órdenes de eucariota (en filas) de los tratamientos analizadas (en columnas). Ag: agricultura, Cc: matarrada, Ul: uso local, Vg: vegetación natural). El color azul oscuro significa el valor mínimo y aumenta hacia el color rojo.

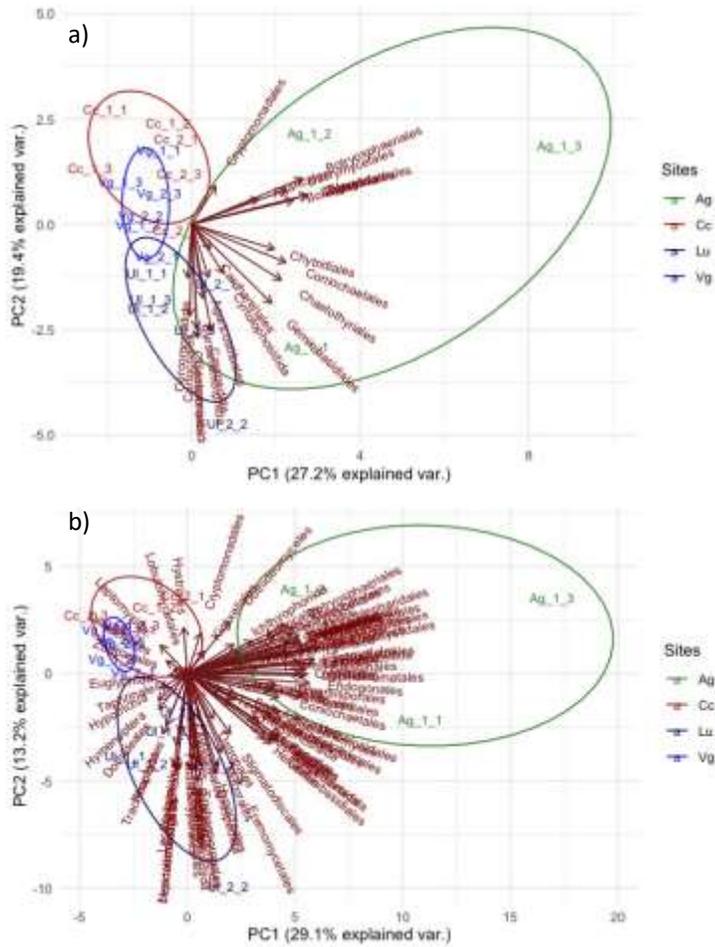


Figura 16. Análisis de componentes principales (ACP) a partir de abundancias a nivel de filo (a) y órdenes (B) en los tratamientos.

En la figura 16 se indican los resultados del análisis de componentes principales (ACP), a nivel taxonómico de filo y orden donde se observó que existe separación significativa ($p < 0.05$) de los resultados según el tratamiento y puntos de muestreo. A nivel de filo y orden los dos primeros componentes con criterio de valor propio (> 1) explicaron más del 40% de la variabilidad de los datos, distribuidos en 27.2% y 29.1% para el primer factor, así como 19.4% y 13.2% para el segundo a nivel de filo y orden, respetivamente (Fig. 16 a y b). En ambos niveles taxonómicos, el análisis agrupó y separó a los tratamientos de estudio, donde matarrasa y agricultura mostraron mayor asociación. Se observó que los ejes 1 y 4 mostraron una mayor agrupación de filos y órdenes asociados a agricultura y en menor medida a uso local.

5.6. Diversidad alfa y beta en gen 18 eucariota

El número efectivo de OTU mostró diferencias significativas entre los tratamientos según los números de Hill. Se observó que la agricultura presentó la mayor riqueza de OTUs y la menor fue la vegetación natural (Fig. 17) Al comparar la riqueza de especies efectiva en 18S entre tratamientos, se observó que la agricultura (925) presentó mayor riqueza de especies ($q=0$), seguida del uso local (724) y matarrasa (491) y la menor obtenida en vegetación natural (312) (Fig. 18a). La diversidad de especies moderadamente abundantes, que corresponde al exponente de diversidad de Shannon ($q = 1$), mostró que la vegetación natural (128) presentó significativamente menor equidad en la abundancia de especies, en contraste agricultura (754) exhibió la mayor equidad en la abundancia, mientras que uso local (545) y matarrasa (489) presentaron valores intermedios (Fig. 18b). Los valores de $q = 2$ (el inverso del índice de Simpson) presentaron diferencia de dominancia entre tratamientos, donde la agricultura (720) presentó la mayor dominancia de especies, mientras que la vegetación natural (214) fue la menor (Fig.18c).

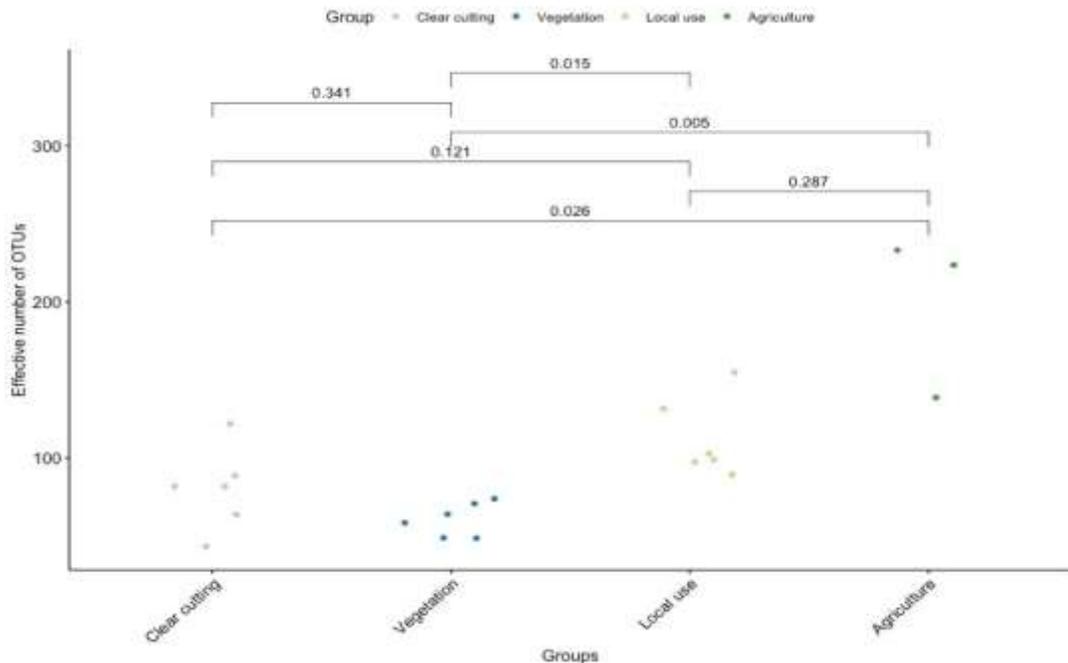


Figura 17. Número efectivo de OTUs entre tratamientos (grupos) basados en el número de Hill, incluidos los análisis post-hoc por pares.

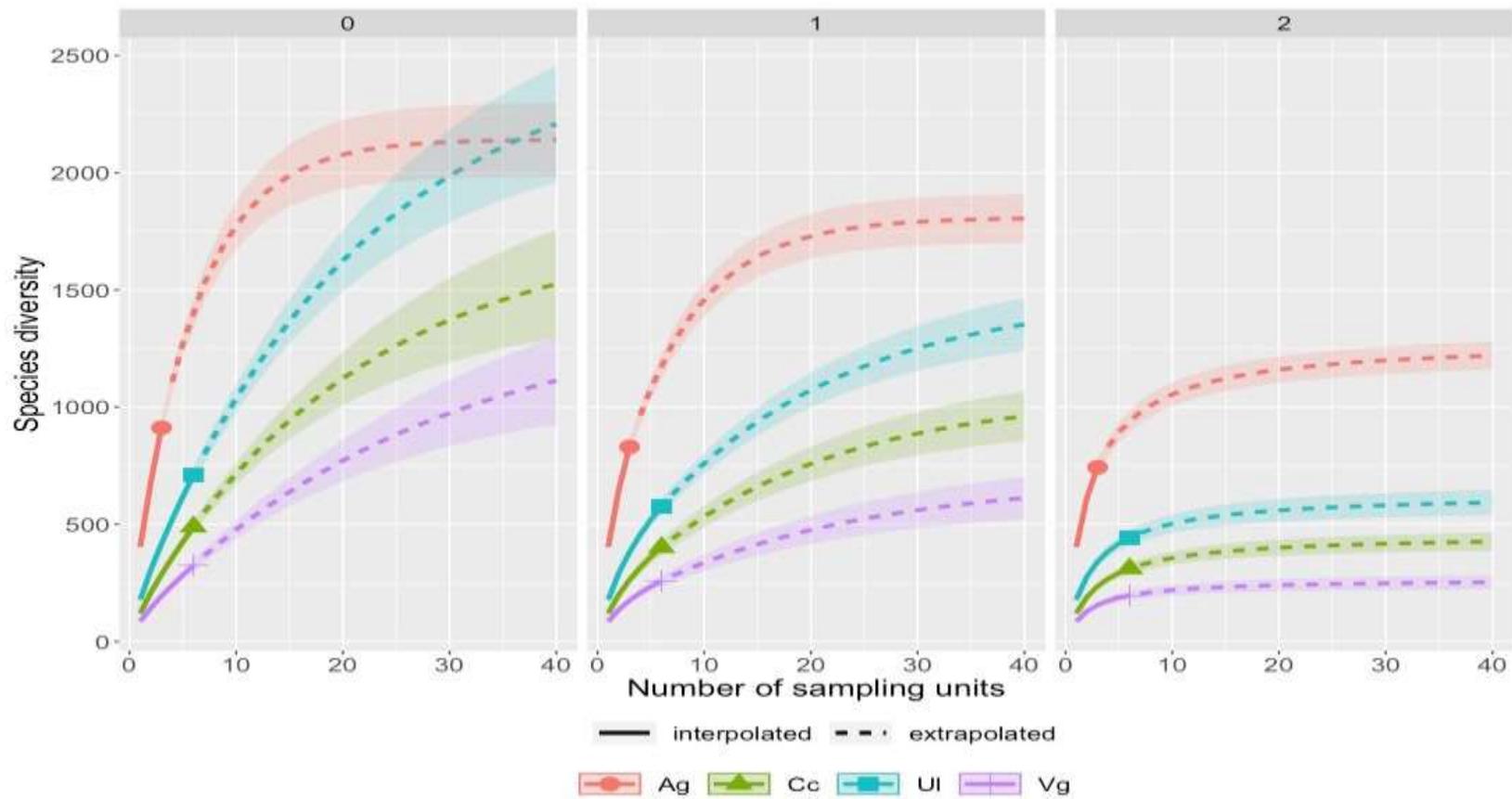


Figura 18. Curvas de interpolación (rarefacción)/extrapolación de la diversidad de especies en los cuatro tratamientos, con base en los números de Hill: a) $q=0$: riqueza (número efectivo de especies), b) $q=1$: exponente de la diversidad Shannon, c) $q=2$: inverso del índice de diversidad de Simpson. Las bandas corresponden al intervalo de confianza al 95%. Donde: Ag: agricultura, Cc: matarrasa, UI: uso local y Vg: vegetación natural.

Por otra parte, se obtuvo que los valores de completitud para cada tratamiento fueron satisfactorios ya que valores superiores a 0.5 con excepción del tratamiento de matarrasa que mostró un valor de 0.48 (Fig. 19).

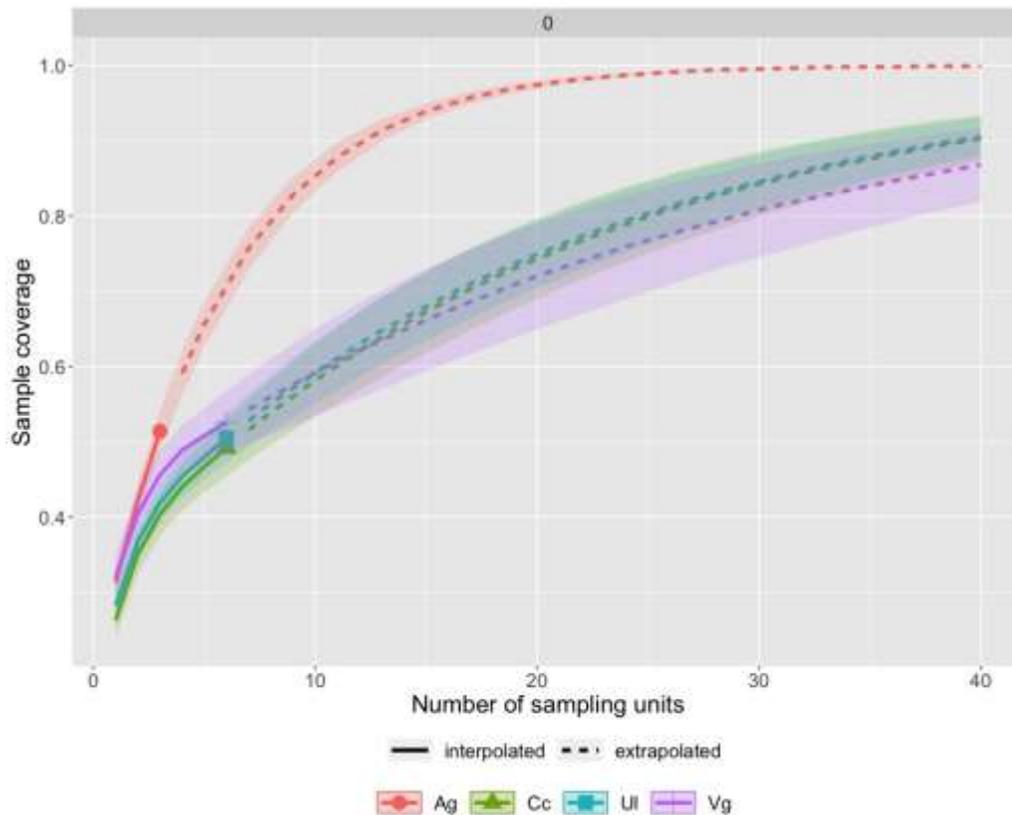


Figura 19. Análisis de la cobertura de la muestra a partir del número de OTUs encontradas en cuatro tratamientos. Las bandas corresponden al intervalo de confianza del 95%. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local y Vg: vegetación natural.

Con respecto a la diversidad β , se obtuvo que la similitud total (β_{Total}) de especies compartidas dentro de cada tratamiento fue superior a 60%, con rangos de similitud de 63 % obtenido en agricultura a 76% de matarrasa. Por otro lado, existe una mayor variación explicada por el reemplazo de especies (β_{repl}), que por diferencias en riqueza de especies (β_{rich}) en cada tratamiento (Fig. 20).

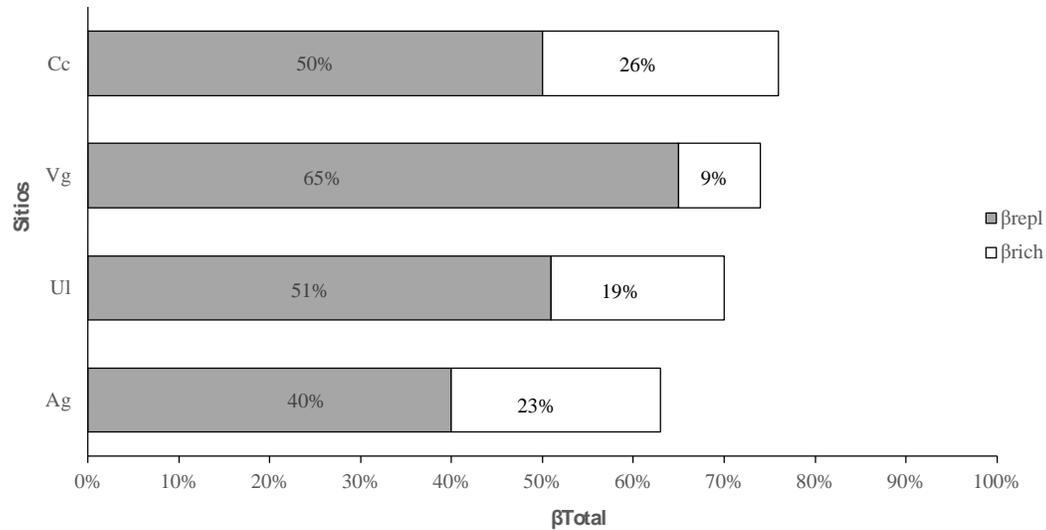


Figura 20. Diversidad β total de cada tratamiento para 18S la sección gris (β repl) de cada barra indica el remplazo de especies, mientras que la sección blanca (β rich) indica las diferencias en riqueza. Ag: agricultura, Cc: matarrasa, Ul: uso local y Vg: vegetación natural.

5.7. Efecto de variables ambientales en abundancia y riqueza.

En el mapa de calor se muestra el valor y asociación lineal obtenida con la correlación de Kendall, las correlaciones débiles entre las variables se muestran en color azul, mientras que las correlaciones más fuertes se muestran en color rojo (Fig. 21). De manera general, fueron pocas (< 6%) las relaciones significativas entre abundancia de filo y propiedades fisicoquímicas del suelo. Las variables materia orgánica, carbono orgánico y nitrógeno en el tratamiento de matarrasa en franja fueron las que mostraron mayor efecto en la abundancia de los filos entre tratamientos.

No obstante, que se encontró una tendencia general negativa entre la riqueza y los datos ambientales (con excepción de CRA, arcilla, humedad y nitrógeno), solo fue significativo para pH (Fig. 22).

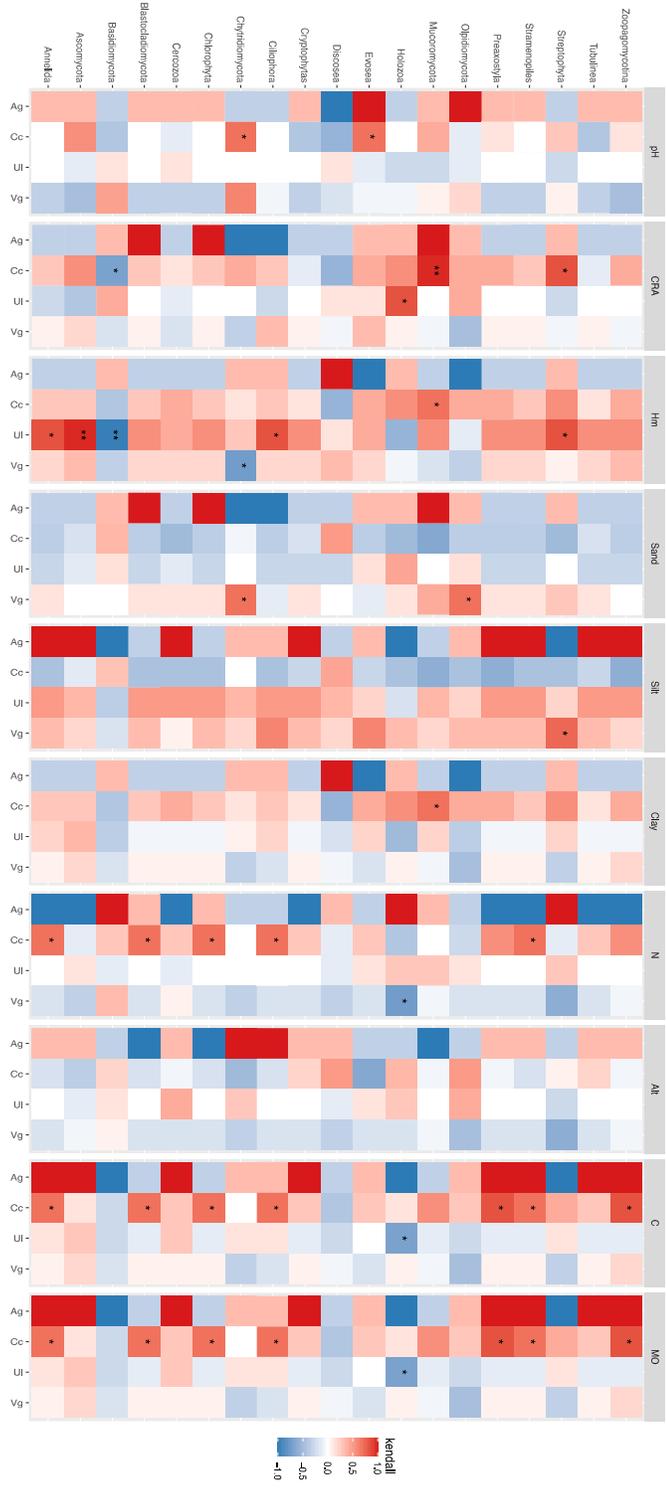


Figura 21. Mapa de calor de Kendall entre variables ambientales y la abundancia de los tratamientos a nivel de filo * y ** nivel de significancia a $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

En el ACC, el eje canónico 1 (56.05%) y el eje 2 (22.3%) capturaron una proporción significativa más alta de la varianza en las relaciones especies-sitios-ambiente, la cual mostró un efecto de las variables ambientales en la abundancia de eucariotas y una alta asociación con los tratamientos, indicó, además, efecto en la ocurrencia de las especies asociada con las variables ambientales. El eje 1 mostró una mayor presencia de filos asociado a agricultura y favorablemente con variables geográficas como latitud y longitud, así propiedades fisicoquímicas del suelo (e.g. pH, Materia orgánica, CRA), pero afectadas por nitrógeno y altitud. En el eje 3 se encontró la mayor agrupación de puntos de muestreo de tres tratamientos (matarrasa, vegetación y uso local) relacionada con cinco filos de baja abundancia y asociadas favorablemente con la variable altitud y nitrógeno (Fig. 23).

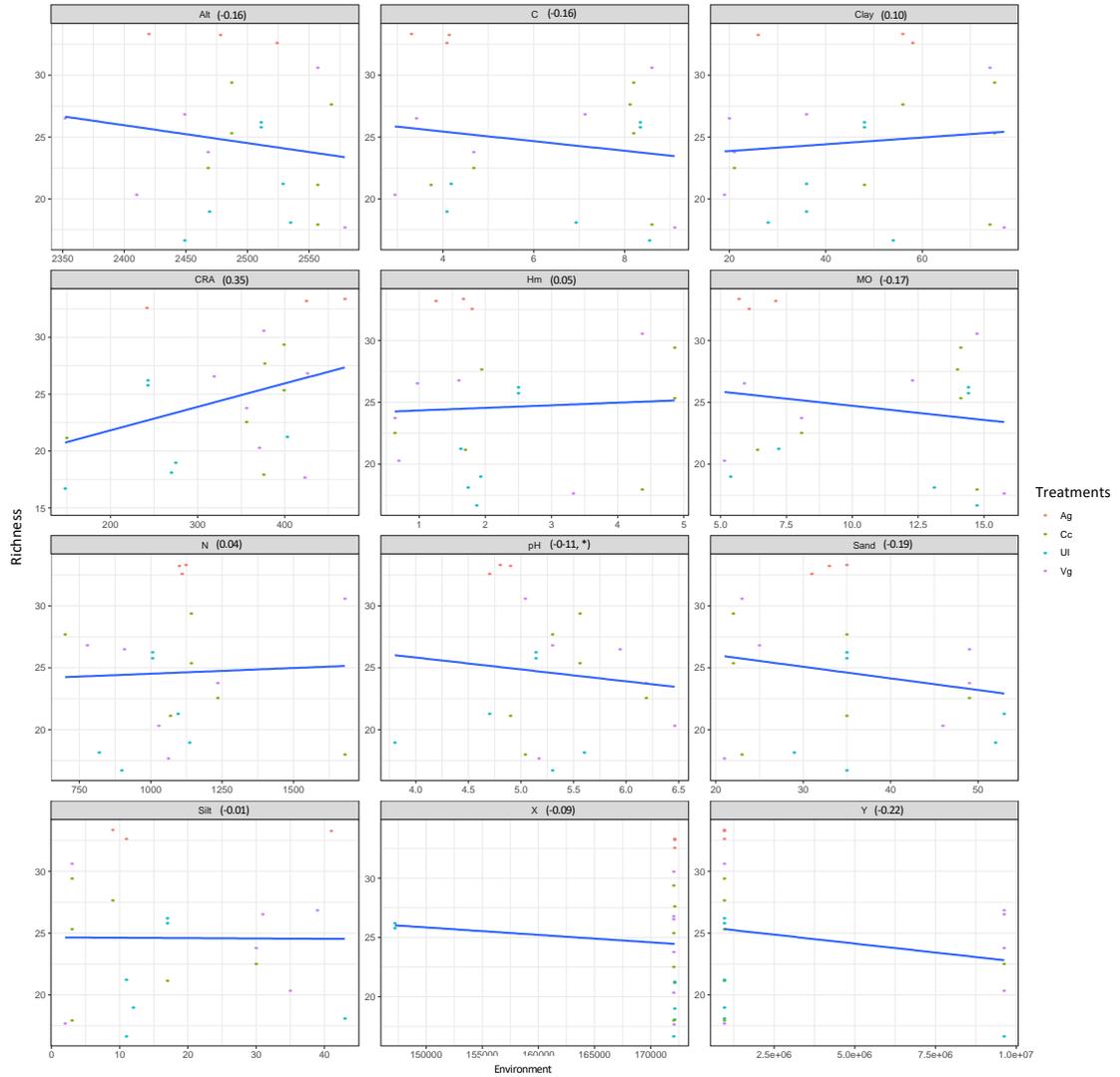


Figura 22. Correlaciones de Spearman entre las variables ambientales y la riqueza a nivel de órdenes de los tratamientos. *nivel de significancia $p < 0.05$.

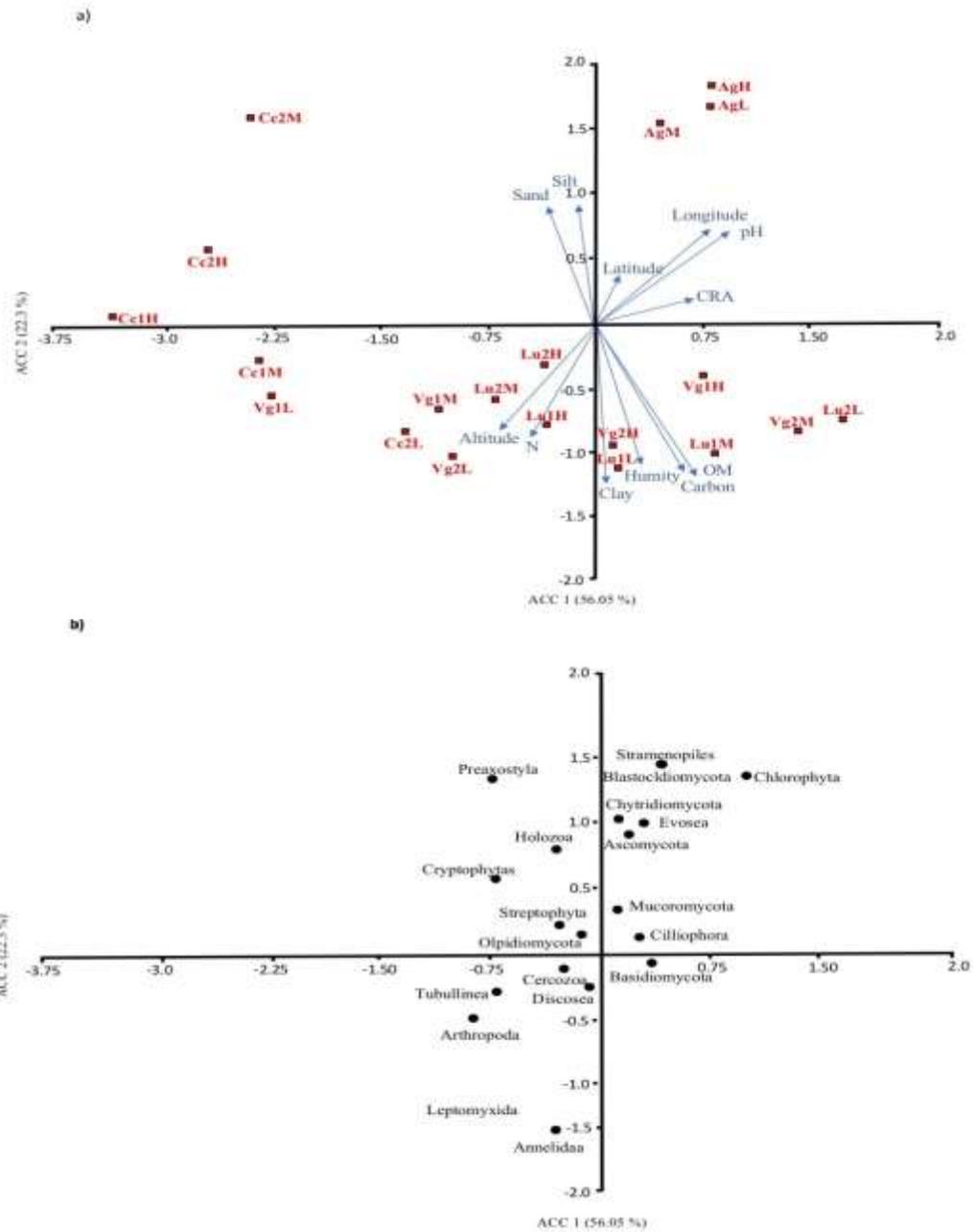


Figura 23. Análisis de correspondencia canónica a nivel de filo para tratamientos y puntos de muestreo y su asociación con variables ambientales (flechas) que tienen efecto en la diversidad de filos (círculos negros). La longitud de las flechas describe la importancia relativa de cada variable analizada y la dirección de la flecha indica la correlación entre variables.

6. DISCUSIÓN

6.1. Características del suelo en los sitios de estudio

Se conoce que cambios en la cobertura vegetal tiene efecto sobre las características del suelo, dicho efecto es reflejado especialmente en la materia orgánica, esto es debido a las prácticas de extracción de maderables las cuales modifican la cobertura vegetal de modo que los aportes de hojarasca decrecen igual que mineralización de la materia orgánica y el sustrato para los heterótrofos. De acuerdo con Certini (2005) las actividades de manejo forestal afectan en forma directa a las propiedades físicas y químicas del suelo. Por ejemplo, un cambio significativo en las propiedades físicas en sinergia con un cambio en el pH y la capacidad de intercambio catiónico implica una mayor liberación de partículas finas (arcillas) (Ellies, 1995), como ocurre en los suelos bajo tratamiento con matarrasa. El cambio porcentual en la relación arena-arcilla-limo, así como el contenido de materia orgánica y minerales que dan forma y/o modifican al tipo o unidad de suelo, es un factor importante, particularmente porque en el área de estudio predominan el suelo de tipo luvisol y Cambisol, ambos de origen residual y baja litificación que los hace propensos a deslizamientos o erosión (Clark-Tapia et al., 2016c).

El objetivo de la matarrasa en franja es incrementar la producción, eliminar la competencia y propiciar una estructura coetánea regular, lo cual puede ser una estrategia correcta, sin embargo, para el área de estudio no se recomienda la escarificación del suelo, una práctica común en la región de estudio. Si bien el objetivo de la escarificación es eliminar el horizonte orgánico para controlar o eliminar la competencia y favorecer el establecimiento de las especies forestales deseadas (Resco de Dios et al., 2005), este tratamiento no debe realizarse en el área de estudio, primero por contar con un horizonte orgánico delgado ya que existe alta regeneración de pino y aun cuando se elimine el horizonte predomina la competencia con otras especies (Clark-Tapia et al., 2018).

En este estudio la materia orgánica se redujo a la mitad en el suelo de agricultura, pero también en el sitio de matarrasa, lo anterior debido a los aportes de hojarasca, los cuales no son abundantes y en su gran mayoría solo dependerá de las aportaciones de pocas especies arbóreas debido a la técnica de aprovechamiento. Se puede suponer que cuando se eliminó toda la vegetación, el agua se llevó la mayor parte del horizonte O y

el suelo mineral superior, lo que podría, en circunstancias extremas, provocar deslizamientos de tierra (Alcántara-Ayala et al., 2006). Como se registró visualmente en diversas áreas de estudio, debido a las pendientes pronunciadas. Se sugiere que aun cuando existe reforestación en los sitios de matarrasa, la eliminación de mantillo por aclareo y una baja caída de hojarasca de los árboles jóvenes no contribuyen sustancialmente a un aumento de la materia orgánica del suelo, y sus efectos deben ser analizados a futuro.

En los sitios de uso local no disminuyó la materia orgánica lo anterior es consistente con lo reportado por Liu Et al., 2018 que sugiere que los rasgos de las especies arbóreas juegan un papel importante en el efecto de los nutrientes del suelo y, por lo tanto, al menos algunos de los cambios en las características del suelo se deben a la estructura y composición de la vegetación. Además, se sugiere que aun cuando existe reforestación en los sitios de matarrasa, la eliminación de mantillo por aclareo y una baja caída de hojarasca de los árboles jóvenes no contribuyen sustancialmente a un aumento de la materia orgánica del suelo. El aumento en el C orgánico del suelo está estrechamente relacionado con el tiempo transcurrido desde la reforestación y en este estudio fue corto, lo cual puede influir en el C orgánico.

Cuando el bosque se convierte en suelo de cultivo el pH suele aumenta lo anterior coincide con lo reportado por Navarrete et al. (2015). Esto es debido a que en los suelos de agricultura en este estudio se gestionaron de acuerdo con prácticas agrícolas de conservación, es decir, rotación de cultivos, labranza mínima, retención de residuos y uso de fertilizantes orgánicos. Siendo estos dos últimos los que tienden a mantener o incrementar el pH, lo anterior sucede cuando los residuos de los cultivos son retenidos, y como consecuencia evita la pérdida de cationes formadores de bases que absorbe la planta y la aplicación de fertilizantes favorece los cationes formadores de bases que se liberan tras la mineralización de la materia orgánica (Pocknee y Sumner 1997; Butterly et al., 2013). No obstante, el pH de los suelos en la Sierra Juárez es moderadamente ácidos (5.1-5.6) a fuertemente ácidos (<5.0), los resultados sugieren que la tendencia a volverse fuertemente ácidos, siendo este es un factor determinante en la disponibilidad o solubilidad de nutrientes como nitrógeno, calcio, magnesio, hierro, manganeso, boro, cobre y zinc. En este trabajo, se reportó un pH ácido para los suelos donde se ha aplicado el manejo forestal, lo anterior es similar a lo reportado por Enríquez-Velázquez et al., (2017) para suelos con plantaciones forestales, dada a acidez del suelo podría

indicar una disminución en la solubilidad de los elementos tales como fósforo y calcio (Fernández y Hoefft, 2009), así también se incrementa la solubilidad de otros nutrientes como nitrógeno, potasio y hierro, de este modo la deficiencia de algunos nutrientes determinarán la productividad del bosque limitado o favoreciendo el desarrollo vegetal (Plassard y Dell, 2010).

6.2. Diversidad Alfa y beta de la comunidad de bacterias y eucariotas

El suelo a menudo está dominado por microorganismos conformados por bacterias y eucariotas, que desempeñan importantes roles en los procesos biogeoquímicos del suelo y complejas cadenas alimenticias entre muchas especies (Wertz et al., 2007; Lambais et al., 2008; Wagg et al., 2014; Baldrian et al., 2012).

La abundancia y atributos comunitarios como estructura y diversidad de una o muchas taxa puede verse afectada de diferentes maneras por el cambio en el funcionamiento del ecosistema como cambios en la estructura arbórea vegetal (e.g. Wagg et al., 2014). Así como también han reportado una disminución de la diversidad bacteriana y eucariota, para bosques cuando son despejados para uso agrícola (Yurgel et al., 2017). En este estudio, no se encontró ningún efecto significativo de las actividades humanas sobre la diversidad alfa para bacterias, ello a pesar que agricultura, matarrasa y uso local mostraron mayor riqueza de OTUs que vegetación natural, y coincide con los trabajos de Goss-Souza et al. (2017) y Sun et al. (2020) donde no se han encontrado efectos en diversidad debido a actividades humanas. Sin embargo, esto difiere con el resultado de eucariotas donde se encontró una menor riqueza de especies en vegetación natural respecto a las otras actividades. El resultado de bacterias contrasta con diversos estudios que reportan un aumento de la diversidad debido al efecto de los disturbios, como la eliminación o cambios en la estructura arbórea (e.g. Navarrete et al., 2015; Lammel et al., 2021).

Diversos estudios exploran los efectos por cambios de uso de suelo en la comunidad bacteriana del suelo (e.g. Flores-Rentería et al., 2016; Rodríguez et al., 2013), los cuales han encontrado que la conversión a cultivos o pastos aumenta la diversidad alfa de la comunidad bacteriana y reduce su diversidad beta. Además, la disminución de la riqueza y los cambios sustanciales en la composición de la comunidad bacteriana y fúngica del suelo se han atribuido a dichos cambios (Muller et al., 2016). Lo anterior puede

visualizarse en la diversidad β , donde la similitud total (β_{Total}) es explicada por el reemplazo de especies (β_{repl}) y por diferencias en riqueza (β_{rich}). Este último es mayor que β_{repl} en el tratamiento por agricultura, en contraste con los otros tratamientos, y una explicación podría ser la constante variabilidad del ambiente (Carvalho et al., 2012) debido en nuestro estudio por la rotación y temporalidad del cultivo.

Una mayor riqueza de OTUs de bacterias y eucariotas en sitios de agricultura y en menor medida matarrasa y uso local, en comparación con áreas de vegetación natural puede ser debido a que no solo se cambia las propiedades del suelo, sino también a un cambio de la estructura y cobertura vegetal, que estimulan procesos de sucesión ecológica, y eso genera una disimilaridad entre sitios. Cambios en el suelo y perturbaciones continuas en la cobertura vegetal, como ocurre en áreas de agricultura de temporal, pueden estimular la diversidad microbiota del suelo debido a sucesiones cíclicas como lo sugieren la hipótesis de perturbación intermedia o modelo de equilibrio dinámico (Huston, 2014; Lammel et al., 2021). Para el área de estudio, resultados similares han sido reportado en plantas (Vázquez-Cortez et al., 2018), donde se sugiere que la diversidad por sucesión ecológica depende de la temporalidad de la actividad humana, ya que las actividades de matarrasa y uso local generan un cambio futuro de la estructura y cubierta vegetal arbórea, que subsecuentemente afectará la diversidad y dinámica de las especies presentes, incluido el microbioma, sin embargo es un aspecto que deberá evaluarse a futuro para sustentar dichas hipótesis.

6.3. Estructura de la comunidad bacteriana y eucariota

Los filos bacterianos Proteobacterias, Actinobacterias y Acidobacterias, son a menudo los grupos bacterianos dominantes del suelo (p. ej., Obermeier et al 2020) mientras que en eucariotas son los filos Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota y Zygomycota (e.g. Pereira de Castro et al, 2008; Buée, 2009). La dominancia de estos filos es reportada también para los bosques mexicanos (e.g. Muñoz-Arenas et al., 2020; Navarro-Noya et al., 2021; Corrales et al., 2021) siendo consistente con el microbiota dominante de los suelos analizados en este estudio.

Diversos estudios documentan efectos en la abundancia y estructura comunitaria del microbioma debido a disturbios, como eliminación o cambios en la estructura arbórea (Hunt et al. 2004; Wertz et al., 2007; Bhattacharya et al., 2016; Muñoz- Arenas et al.,

2020; Navarro-Noya et al., 2021), como los reportados en este estudio. Por ejemplo, para las bacterias la abundancia relativa de Acidobacteria mostró diferencias entre tratamientos comparación con Actinobacteria en el suelo forestal. Posiblemente este resultado es factor de que los miembros las actinobacterias son Gram positivas, metabólicamente versátiles y sus miembros juegan un papel importante en el ciclo del C y el N, i.e., descomposición de material orgánico y fijación de N₂, y como plantas simbiotes en el suelo forestal (Barka et al., 2015; Singh y Dubey, 2018). Mientras que, por otro lado, las acidobacterias son uno de los filos bacterianos más extendidos y diversos, especialmente en el suelo, pero su papel en el funcionamiento metabólico sigue siendo limitado ya que son difíciles de cultivar en el laboratorio (Kielak et al., 2016), por lo que es necesario profundizar sobre los cambios en la comunidad bacteriana obtenidos en el estudio.

Las eucariotas son los principales descomponedores de la materia orgánica y funcionan como sustrato de C o fuente de N para otros taxa (Brabcová et al., 2016), y su abundancia y estructura comunitaria puede ser afectada por acción antrópica (Bhattacharya et al., 2016; Navarro-Noya et al., 2021). Por ejemplo, el suelo forestal del área de estudio, como el analizado en otros bosques templados de México (e.g. Navarro-Noya et al., 2021) tiene mayor abundancia de hongos ectomicorrizicos que otros suelos, debido a las relaciones simbióticas que guardan los sistemas radiculares de especies de la familia Pinaceae, Fagaceae y Fabaceae que dominan en el área de estudio. Sin embargo, los cambios en dominancia en ordenes de Ascomycota y Basidiomycota en tratamientos con mayor disturbio (i.e. agricultura y matarrasa) respecto a los de menor cambio como lo son uso local y vegetación, puede ser explicado por las relaciones simbióticas de las plantas presentes y hongos ectomicorrizicos, como lo sugiere Buée et al. (2009) y Navarro-Noya et al. (2021).

Particularmente, la diferencia en especies vegetales entre. Sitios de mayor disturbio con especies de estadio sucesional temprano (e.g. pastos y leguminosas) (Clark-Tapia et al.2018), posiblemente son nichos para hongos micorrícicos arbsusculares diferentes a los presentes en los tratamientos de uso local y vegetación Otra diferencia en la abundancia entre taxa obtenida para eucariotas entre tratamientos, en particular para el sitio de agricultura con los otros sitios ha sido reportada en diversos estudios (e.g. Davis et al., 2010; Hodge, 2014; Navarro-Noya et al., 2021). Estos cambios pueden afectar de manera positiva o negativa la colonización micorrícica por la aplicación de fertilizantes

o pesticidas (Hodge, 2014), aplicación de quemas (Lammel et al., 2021)) o la presencia de organismos patógenos que afectan la ocurrencia de ciertos grupos taxonómicos (Davies et al., 2010).

Las OTUs pertenecientes a las *Halomonas*, DA101 y *Streptomyces* fueron los géneros más abundantes en los sitios de estudio. Las *Halomonas* es un género bacteriano bastante tolerante y algunas veces el género bacteriano dominante en los ecosistemas del suelo (De la Cruz-Barrón et al. 2017). Se ha informado que las *Halomonas* es un descomponedor de materia orgánica con una alta relación C: N en suelo agrícola, pero no fue correlacionado en este estudio. El género DA101 (Chthoniobacteraceae, Spartobacteria, Verrucomicrobia) el segundo género bacteriano más abundante, esta menos descrito, pero se ha encontrado enriquecido en la rizosfera de diferentes plantas un ejemplo de ello es el estudio realizado con el pimentero brasileño (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) (Dawkins y Esiobu, 2018) y especies de campanilla (*Campanula takesimana*, Nakai) (Kang et al., 2019). Fue también el género bacteriano dominante en los suelos forestales de China (Bai et al., 2015). Los miembros de *Streptomyces* son conocidos como estimulantes del crecimiento de las plantas y fijadores de nitrógeno de vida libre Actinobacterias (Dahal et al., 2017).

El cambio de uso de suelo, y los cambios en la cobertura vegetal tienen un efecto en la estructura de la comunidad bacteriana y eucariota (Szoboszlay et al., 2017; Lynn et al., 2017; Liu et al., 2018) En este estudio, la estructura de la comunidad fue diferente en el suelo de agricultura comparado con el sitio de vegetación, el suelo de uso local con el suelo de matarrasa. La abundancia relativa de OTUs perteneciente a *Balneimonas*, *Gordonia*, *Novosphingobium* y *Pedomicrobium* fue mayor en el suelo forestal, mientras que los pertenecientes a *Arthrobacter*, *Cupriavidus*, *Geobacillus*, *Geodermatophilus* y *Modestobacter*, se enriquecieron en el suelo cultivable. Lo anterior coincide con los estudios que determinaron los efectos heredados de las propiedades del suelo bajo diferentes usos intensivos de la tierra y su impacto en el desarrollo de una rica biota del suelo (Negrete-Yankelevich et al., 2020). Sin embargo, dado que la forma de gestión del bosque tuvo poco efecto en la estructura de la comunidad bacteriana, y aun cuando es significativo en eucariotas, se necesitan más estudios para saber cómo puede afectar el legado a los microorganismos del suelo.

El efecto de la remoción de la cobertura vegetal sobre los grupos bacterianos puede explicarse a veces por la relación especie-planta y por sus características o capacidades metabólicas. Algunos ejemplos de esto incluyen a los miembros de *Novosphingobium* que ha sido aislados de diferentes ecosistemas y son metabólicamente versátiles, con capacidad para degradar una amplia gama de compuestos como los hidrocarburos poliaromáticos y la madera (Kumar et al., 2017; Pop Ristova et al., 2017), además que su versatilidad y su capacidad para degradar la madera enriquece el suelo forestal, sin embargo, no se detectaron el suelo de agricultura. Los miembros de *Gordonia* (Actinomycetales) degrada xenobióticos, contaminantes ambientales y polímeros naturales lentamente biodegradables (Arenskötter et al., 2004), y pueden degradar polímeros naturales recalcitrantes lo que podría explicar su presencia en suelo forestal pero no en el suelo de agricultura.

Además, algunos miembros de *Pedomicrobium*, que se encuentra en ecosistemas acuáticos y terrestres, oxidan el Mn enzimáticamente y la deposición de óxido manganeso ocurre en polisacáridos ácidos extracelulares, (Ridge et al., 2007). Su presencia en suelo ectomicorrizosférico podría explicar su mayor abundancia relativa en suelos donde existe una mayor dominancia de *Quercus* spp. Que otras especies forestales, como el pino.

Por otra parte, algunos miembros de *Balneimonas* renombrados como *Microvirga* (Kanso y Patel 2003) son Alfacaproteobacterias de nódulos de raíces (Ardley et al., 2012) que están presentes en suelos bien desarrollados (Sánchez-Marañón et al., 2017), como los localizados en suelos forestales. Los miembros de *Arthrobacter* pueden degradar moléculas aromáticas, compuestos organoclorados y pesticidas, además de fijar el nitrógeno por lo que son consideradas promotoras del crecimiento vegetal (Gkorezis et al., 2015). En este estudio se encontró exclusivamente en el suelo agrícola y su abundancia podría ser explicada a que los miembros de *Arthrobacter* suelen estar asociados a la rizosfera y endosfera de las raíces (Rilling et al., 2018).

Otros grupos como *Cupriavidus* forman parte de la clase de Betaproteobacterias, las cuales tiene capacidad de nodulares legumbres, y han sido denominadas “beta-rizobios”, por lo que su presencia en suelos agrícolas podría estar relacionada a las características simbióticas que presentan algunas plantas, además de su resistencia al estrés hídrico. Lo mismo podría explicarse para la mayor abundancia relativa de

Geodermatophilus en el suelo cultivable en comparación con el suelo forestal, lo que podría explicarse por del Carmen Montero-Calasanz et al., (2013).

Sin embargo, los cambios en la abundancia relativa de los grupos bacterianos debidos al cambio en la cobertura vegetal no siempre son los mismos y dependerán de las características específicas del ecosistema. Por ejemplo, Navarrete et al. (2015) reporta un aumento en la abundancia relativa de bacterias putativas, bacterias copio tróficas, como las Actinomycetales, y una disminución de la abundancia relativa de taxones bacterianos, como Chlamydiae, Planctomycetes y Verrucomicrobia, en suelos deforestados.

En este estudio, la abundancia relativa de los diversos grupos taxonómicos muestra comportamientos contrastantes entre tratamientos, por ejemplo, Actinomycetales fue mayor en suelo de agricultura que en suelo forestal y la Verrucomicrobia disminuyó en suelo agrícola comparado con el suelo forestal. No obstante, la abundancia relativa de Planctomycetes fue similar en suelo agrícola que en suelo forestal y la de Chlamydiae aumenta en el suelo agrícola en comparación con el suelo forestal. Este es un aspecto reportado en otros estudios (e.g. Szoboszlay et al., 2017) donde reportan que la conversión de las tierras de cultivo en bosque aumenta la abundancia relativa de ciertos grupos, i.e. Rhizobiales pero disminuye en otros como Bacteroidetes y Nitrospirae.

Por consiguiente, la estructura del microbioma se verá afectada por las modificaciones a la vegetación y dependerá de las condiciones ambientales, como el clima, y de la nueva estructura del bosque afecte a las características del suelo. Por ejemplo, el pH, la distribución de tamaño de partículas y la composición de materia orgánica. Estas condiciones ambientales y las transformaciones a la cobertura vegetal pueden ser diferentes entre estudios, por lo que los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana serán diferentes de un suelo a otro. Este aspecto es reportado por Szoboszlay et al. (2017) quienes encontraron que el pH y la calidad de la materia orgánica del suelo explican la mayor parte de variación en la estructura de la comunidad bacteriana y fúngica.

En este estudio, el pH es más alto en agricultura que en el suelo forestal, lo cual podría haber influenciado la estructura de la comunidad bacteriana. A menudo se ha encontrado que el pH es un factor que afecta a la estructura de la microbiota e incluso

pequeños cambios pueden tener un efecto drástico en la abundancia (Tripathi et al., 2018). El N total fue un factor que también presentó un efecto significativo alto con algunos grupos bacterianos y podría estar relacionado con la composición de la materia orgánica del suelo (e.g. Pascault et al., 2010).

Como se puede apreciar son múltiples los efectos y tipo de interacciones que ocasiona el cambio de estructura y cobertura vegetal, que derivan de su eliminación total con ciclos temporales de cultivo, con la extracción y reemplazo total o parcial de especies debido a una actividad forestal, y que ocasionan no sólo un cambio de las propiedades del suelo, el recurso disponible para el microbioma, sino a incidir en la abundancia, estructura, interacciones y diversidad de estas. Se debe destacar que la gestión comunitaria del bosque en Sierra Juárez es compleja, multidimensional y se enfrenta a escenarios inéditos de cambio climático y económicos como lo sugiere Clark-Tapia et al. (2018), es por esto que los resultados de este trabajo, aunque pioneros en la región, no pueden ser identificados como productos finales, sino como el inicio de futuros estudios. Particularmente, porque este tipo de estudios son fundamentales, para generar estrategias de conservación del suelo y fauna asociada dentro los programas de manejo que se practican en la región.

7. CONCLUSIONES

- Las actividades con mayor fragmentación y pérdida de hábitat asociadas con deforestación como la agricultura y matarrasa en franja alterna afectan directa e indirectamente a las propiedades físicas y químicas del suelo, particularmente pH y C orgánico que genera efectos en la abundancia y diversidad del microbiota asociado.
- La escarificación del suelo como tratamiento complementario en la matarrasa en franja y la eliminación de materia orgánica en agricultura representan un cambio drástico en el suelo que propicia la degradación del mismo, al dejarlo expuesto, primero por la remoción total del arbolado, y después por la remoción del horizonte orgánico superficial.
- La diversidad tanto bacteriana como eucariótica tuvo un comportamiento similar en los números de Hill, al observar en el total de especies, que el tratamiento de agricultura exhibió mayor abundancia de especies que los otros tratamientos.
- Los valores de completitud para cada tratamiento de bacterias y eucariotas fueron satisfactorios, que sugiere un buen ajuste en el análisis, y representatividad de los taxa analizados.
- La diversidad beta, en 18S se explica por la variación en el reemplazo de especies (β_{repl}) y por diferencias en riqueza (β_{rich}) en cada tratamiento. Las estrategias de conservación deben orientarse a la retención de mantillo del suelo y especies arbóreas clave para disminuir el cambio drástico en las propiedades fisicoquímicas y las integraciones macrobióticas asociadas.

8. REFERENCIAS

- Abrams, E.M, Rue, D.J. (1988). The causes and consequences of deforestation among the prehistoric Maya. *Human Ecol.*, 16:377-395. doi.org/10.1007/BF00891649
- Aguirre-Hidalgo, V., y Clark-Tapia, R. (2018). Diversidad de Insectos en Áreas de Bosque de Pino-Encino con diferentes Grado de Perturbación en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. En R. Clark-Tapia, M.E. Fuente, C. Corrado-Alfonso, M.F. Ramos-Morales, V. Aguirre- Hidalgo (Coords.). *Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en Sierra Juárez,Oaxaca* (pp. 297-305). Ciudad de México, México: Editorial Fontamara.
- Alcántara-Ayala, Esteban-Chávez, O., y Parrot, J.F. (2006) Landsliding related to land-cover change: A diachronic analysis of hillslope instability distribution in the Sierra Norte, Puebla, Mexico. *Catena* 65:152-165. doi: 10.1016/j.catena.2005.11.006
- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.*, 6(8), 769-779.
- Aquino-Vázquez, C., Ramírez, J.J., y Clark-Tapia, R. 2021. La agricultura familiar en el contexto de desarrollo forestal comunitario. El caso de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. En Espinoza, J.A.M., Juárez, J.R., y Flores, J.Á.H. (Eds.). *Transformaciones rurales desde la agricultura familiar en las regiones Centro y Sur de México* (319-342). Colegio de Postgraduados-El Colegio de Tlasxcala, México.
- Baldrian P, Kolařík M, Štursová M, Kopecký J, Valášková V, Větrovský T, Žifčáková L, Šnajdr J, Rídl J, Vlček Č (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J* 6:248–258.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Bautista, L., Damon, A., Ochoa-Gaona, S., & Clark-Tapia, R. (2014). Impact of silvicultural methods on vascular epiphytes (ferns, bromeliads and orchids) in a temperate forest in Oaxaca, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 329, 10-20.
- Binkley, D., & Fisher, R. (2012). *Ecology and management of forest soils*. John Wiley & Sons.

- Bretado-Velázquez, J.L., Clark-Tapia, R., Fuente Carrasco, M.E., Aguirre-Hidalgo, V., Ramos Morales, M. F. & Sarmiento Bustos, D. (2018). Introducción al Manejo Forestal Comunitario. En R. Clark-Tapia, M. E. Fuente-Carrasco, C. Corrado-Alfonso, M. F. Ramos-Morales, & V. Aguirre-Hidalgo (Coords). Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en Sierra Juárez, Oaxaca (pp. 35–48). Ciudad de México, México: Editorial Fontamara.
- Brabcová, V., Nováková, M., Davidová, A., and Baldrian, P. (2016). Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *New Phytol.* 210, 1369–1381. doi: 10.1111/nph.13849
- Bremner JM (1996) Nitrogen-total. In: Sparks DL, Page AI, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT, Sumner ME (eds) Soil science society of America, American society of agronomy. *Methods of soil analysis Part 3. Chemical methods*, pp 1085-1121. doi:10.2136/sssabookser5.3.c37
- Bridge, P., & Spooner, B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, 232(1), 147-154.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., et al. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184, 449–456. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x
- Butterly CR, Baldock JA, Tang C (2013) The contribution of crop residues to changes in soil pH under field conditions. *Plant Soil* 366:185-198. doi:10.1007/s11104-012-1422-1
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R (2010a) PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26:266-267. doi: 10.1093/bioinformatics/btp636
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335-336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Ceja-Navarro JA, Rivera-Orduña FN, Patiño-Zúñiga L, Vila-Sanjurjo A, Crossa J, Govaerts B, Dendooven L (2010) Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on

- soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 76:3685-3691.
doi:10.1128/AEM.02726-09
- Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143(1), 1–10.
- Christensen, B.T. (1992). Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Advances in Soil Science*, 20, 1–90.
- Clark-Tapia, R., Aguirre-Hidalgo, V., Alfonso-Corrado, C., Ramírez-Santiago, R., Domínguez Yescas, R., Antúnez, P., Aquino, V. C Jiménez-Bautista, L., Aparicio-Gallardo, M., Vázquez, D. P. R. & Sarmiento B. D. (2018a). Estructura, composición y diversidad de la vegetación en áreas de manejo forestal de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. En R. Clark-Tapia, M. E. Fuente-Carrasco, C. Corrado-Alfonso, M. F. Ramos-Morales, & V. Aguirre-Hidalgo (Coords). *Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en Sierra Juárez, Oaxaca* (pp. 69–94). Ciudad de México, México: Editorial Fontamara. México.
- https://www.researchgate.net/publication/349120465_Estructura_Composicion_y_Diversidad_de_la_Vegetacion_en_Areas_de_manejo_forestal_de_Ixtlan_de_Juarez_Oaxaca
- Challenger, A. (1998). *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México; pasado, presente y futuro*. México: CONABIO, Instituto de Biología UNAM, Agrupación Sierra Madre, S.C.
- Chao, A., Gotelli, N.J., Hsieh, T.C., Sander, E.L., Ma, K.H., Colwell, R.K. & Ellison, A.M. (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs*, 84, 45–67.
- Chao, A. & Jost, L. (2012) Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, 93, 2533–2547.
- Chávez-Romero, Y., Navarro-Noya, Y.E., Reynoso-Martínez, S.C., Sarria-Guzmán, Y., Govaerts, B., Verhulst, N., Dendooven, L., Luna-Guido, M. (2016) 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. *Soil Till, Res.*, 159, 1-8.
- Clark-Tapia, R., Mendoza, D. M. M., Fuente-Carrasco, M. E., López, L. L. J., Ramos, F. M. F., Cortés, P. M, Rodríguez-Rivera, R. & Camacho, M. A. (2018b).

- Bosque y agua en Sierra Juárez, Oaxaca. En R. Clark-Tapia, M. E. Fuente-Carrasco, C. Corrado-Alfonso, M. F. Ramos-Morales, & V. Aguirre-Hidalgo (Coords). *Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en Sierra Juárez, Oaxaca* (pp. 189-204). Ciudad de México, México: Editorial Fontamara.
- Comisión Nacional Forestal [Conafor]. (2010). *Manual de Conservación de suelos*. <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/ver.aspx?grupo=20&articulo=1310>
- Cumming, G.S., & Child, M.F. (2009). Contrasting spatial patterns of taxonomic and functional richness offer insights into potential loss of ecosystem services. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1524), 1683-1692.
- Dang, P., Vu, N.H., Shen, Z., Liu, J., Zhao, F., Zhu, H., Yu, X., & Zhao, Z. (2018). Changes in soil fungal communities and vegetation following afforestation with *Pinus tabulaeformis* on the Loess Plateau. *Ecosphere*, 9(8):e024011. 10.1002/ecs2.2401.
- Davies, J.L., Ngeleka, M., & Wobeser, G.A. (2010). Systemic infection with *Mortierella wolfii* following abortion in a cow. *Can. Vet. J.*, 51, 1391–1393.
- Dueñez-Alanís, J., Gutiérrez, J., Pérez, L., & Návar, J. (2006). Manejo silvícola, capacidad de infiltración, escurrimiento superficial y erosión. *Terra Latinoamericana*, 24, 233–240.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460-2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Ellies, A. (1995). Efecto del manejo sobre las propiedades físicas de suelos trumaos y rojo arcillosos. *Bosque*, 16, 101–110.
- Enríquez-Velázquez, O., Aguilar-Aguilar, R., Valencia-Cantero, E., & Velázquez-Becerra, C. (2017). Perfil fisicoquímico y microbiológico de tres distintos suelos forestales y su efecto en el crecimiento de *Pinus devoniana* Lindl. *Polibotánica*, 44, 109 118.
- FAO. (2004). *Estado y tendencias de la ordenación forestal en 17 países de América Latina*, Documento de Trabajo FM/26, Roma.
- Eren, M.I., Chao, A., Chiu, C-H., Colwell, R.K., Buchanan, B., Boulanger, M.T., Darwent, J. & O'Brien, M.J. (2016). Statistical Analysis of paradigmatic class richness supports greater paleoindian projectile-point diversity in the Southeast. *Am. Antiquity*, 81, 174–192.

- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., et al. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 22, 570–574.
- Forbes, K., Broadhead, J., Brardinoni, A.D., Gray, D., & Stokes, B.V. (2013). Forests and landslides: The role of trees and forests in the prevention of landslides and rehabilitation of landslide-affected areas in Asia Second edition. *Rap Publication*, 02.
- Fracetto, G.G., Azevedo, L.C., Fracetto, F.J., Andreote, F.D., Lambais, M.R., & Pfenning, L.H. (2013). Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. *Scientia Agricola*, 70, 59-67.
- Gayoso, J., & Alarcón, D. (1999). *Guía de conservación de suelos forestales*. Proyecto Certificación del Manejo Forestal en las Regiones Octava, Décima y Duodécima. Chile: INFOR. Universidad Austral de Chile.
- Gee, G.W., & Bauder, J.W. (1986). *Particle size analysis*. In: Klute A (ed) Methods of soil analysis, Part 1. Physical and mineralogical methods. Madison, WI, American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, pp 383-411.
- Gómez-Acata, E.S., Valencia-Becerril, I., Valenzuela-Encinas, C., Velásquez-Rodríguez, A.S., Navarro-Noya, Y.E., Montoya-Ciriaco, N., ... & Dendooven, L. (2016). Deforestation and cultivation with maize (*Zea mays* L.) has a profound effect on the bacterial community structure in soil. *Land Degrad. Developm.*, 27(4), 1122-1130.
- Grandy, A.S., Strickland, M.S., Lauber, C.L., Bradford, M.A., & Fierer, N. (2009). The influence of microbial communities, management, and soil texture on soil organic matter chemistry. *Geoderma*, 150(3-4), 278-286.
- Hernández, J., Aguirre, O.A., Alanís, E., Jiménez, J., Treviño, E.J., González, M.A., Luján, C., Olivas, J.M., & Domínguez, L.A. (2013). Efecto del manejo forestal en la diversidad y composición arbórea de un bosque templado del noroeste de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 19, 189-199. doi: 10.21829/myb.2018.2421767
- Hill, M.O. (1973). Diversity and evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54, 427–432.
- Hodge, A. (2014). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and organic material substrates. *Adv. Appl. Microbiol.* 89, 47–99. doi: 10.1016/B978- 0- 12- 800259- 9.00002- 0

- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Meth. Evol.*, 7(12), 1451-1456.
- Kass, D. (1998). *Fertilidad de suelos*. San José, Costa Rica: Editorial EUNED.
- Lal, R. (1997). Degradation and resilience of soils. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 352(1356), 997–1010.
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., & Kuramae, E.E. (2016). The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Front Microbiol.*, 7, 744. doi: 10.3389/fmicb.2016.00744
- Lambais, M.R., Otero, X.L., Cury, J.C. (2008). Bacterial communities and biogeochemical transformations of iron and sulfur in a high saltmarsh soil profile. *Soil Biol Biochem.*, 40, 2854–2864.
- Liu, S.L., Fu, B.J., Lü, Y.H., & Chen, L.D. (2002). Effects of reforestation and deforestation on soil properties in humid mountainous areas: a case study in Wolong Nature Reserve, Sichuan province, China. *Soil Use Manag.*, 18, 376-380 doi.org/10.1111/j.1475-2743.2002.tb00255.x
- Luna-Krauletz, Pérez-Contreras, S., Arreortúa Carbajal, A., Clark-Tapia, R. & Alfonso-Corrado, C. (2018). Mamíferos y presas potenciales en áreas de manejo forestal en comunidades de la Sierra Juárez, Oaxaca. En R. Clark-Tapia, M.E. Fuente, C. Corrado-Alfonso, M.F. Ramos-Morales, V. Aguirre-Hidalgo (Coords.). *Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en Sierra Juárez, Oaxaca* (pp. 121-130). Ciudad de México, México: Editorial Fontamara.
- Louis, B.P., Maron, P.A., Viaud, V., Leterme, P., & Menasseri-Aubry, S. (2016). Soil C and N models that integrate microbial diversity. *Environ. Chem. Letters*, 14(3), 331-344.
- Maritz, J.M., Rogers, K.H., Rock, T.M., Liu, N., Joseph, S., Land, K.M., & Carlton, J.M. (2017). An 18S rRNA workflow for characterizing protists in sewage, with a focus on zoonotic trichomonads. *Microb. Ecol.*, 74(4), 923-936.
- Marschner, P., Crowley, D., & Yang, C.H. (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261(1), 199-208.
- Mitchell, R.J., Hester, A.J., Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., Hewison, R.L., & Potts, J.M. (2010). Is vegetation composition or soil chemistry the best predictor of the soil microbial community?. *Plant and Soil*, 333(1), 417-430.

- Monárrez-González, J. C., Pérez-Verdín, G., López-González, C., Márquez-Linares, M.A., & González-Elizondo, M.S. (2018). Efecto del manejo forestal sobre algunos servicios ecosistémicos en los bosques templados de México. *Madera y Bosques*, 24(2), e2421569. DOI: 10.21829/myb.2018.2421569
- Muñoz-Arenas, L.C., Fusaro, C., Hernández-Guzmán, M., Dendooven, L., Estrada-Torres, A., & Navarro-Noya, Y.E. (2020). Soil microbial diversity drops with land-use change in a high mountain temperate forest: a metagenomics survey. *Environ. Microbiol. Reports*, 12(2), 185-194.
- Navarrete, A.A., Tsai, S.M., Mendes, L.W., Faust, K., de Hollander, M., Cassman, N.A., Raes, J., van Veen, J.A., & Kuramae, E.E. (2015). Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. *Mol. Ecol.*, 24, 2433-2448. doi: 10.1111/mec.13172
- Nieder, R., & Benbi, D.K. (2008). *Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment*, Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Obermeier MM, Gnädinger F, Durai Raj AC, Obermeier WA, Schmid CAO, Balázs H, Schröder P (2020) Under temperate climate, the conversion of grassland to arable land affects soil nutrient stocks and bacteria in a short term. *Sci. Total Environ.* 10703; 135494. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135494
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., & Wagner, H. (2015). The vegan package. Community ecology package. R package version 2.3-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Ondov, B D., Bergman, N.H., & Phillippy, A.M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics*, 12(1), 385
- Pascual, N., Cécillon, L., Mathieu, O., Hénault, C., Sarr, A., Lévêque, J., Farcy, P., Ranjard, L., & Maron, P.A. (2010). In situ dynamics of microbial communities during decomposition of wheat, rape, and alfalfa residues. *Microb. Ecol.* 60(4), 816-828. doi: 10.1007/s00248-010-9705-9707
- Pocknee, S., & Sumner, M.E. (1997). Cation and nitrogen contents of organic matter determine its soil liming potential. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 61: 86-92. doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100010014x
- Ramos Morales, M.F. y Clark-Tapia, R. (2018). La forestería comunitaria en la Sierra Juárez, Oaxaca. (2018). En R. Clark-Tapia, M.E. Fuente, C. Corrado-Alfonso,

- M.F. Ramos-Morales, V. Aguirre-Hidalgo (Coords.). Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en Sierra Juárez, Oaxaca (pp. 49-67). Ciudad de México, México: Editorial Fontamara.
- Resco de Dios, V., Yoshida, T., & Iga, Y. (2005). Effects of topsoil removal by soil-scarification on regeneration dynamics of mixed forests in Hokkaido, Northern Japan. *Forest Ecology and Management*, 215, 138-148.
- Richardson, D. M., Rundel, P. W., Jackson, S. T., Teskey, R. O., Aronson, J., Bytnerowicz, A., Wingfield, M. J. y Proches, S. (2007). Human impacts in pine forests: past, present and future. *Ann. Rev. Ecol., Evol., Syst.*, 38, 275-297.
- Ríos-Altamirano, A., Alfonso-Corrado, C., Aguirre-Hidalgo, V., Ángeles-Pérez, G., Mendoza Díaz, M., Rodríguez-Rivera, V., Roldán-Felix, E., & Clark-Tapia, R. (2016). Abundancia y distribución del género *Pinus* en Capulálpam de Méndez, Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y Bosques*, 22(3), 61-74. doi: 10.21829/myb.2016.2231457
- Rodríguez-Rivera, V., Zaragoza L.K., Dendooven, L., Clark-Tapia, R., Ramírez-Santiago, R. & Santiago, P.A. (2018). Suelo: un recurso forestal valioso e indispensable. En R. Clark-Tapia, M.E. Fuente-Carrasco, C. Corrado-Alfonso, M. F. Ramos-Morales, & V. Aguirre-Hidalgo (Coords). *Manejo Forestal Comunitario y Sustentabilidad en Sierra Juárez, Oaxaca* (pp. 205-222). Ciudad de México, México: Editorial Fontamara.
- Saynes, V., Etchevers, J. D., Galicia, L., Hidalgo, C., & Campo, J. (2012). Soil carbon dynamics in high-elevation temperate forests of Oaxaca (Mexico), thinning and rainfall effects. *Bosque*, 33(1), 3-11. doi:10.4067/S0717-92002012000100001
- Siles, J. A., & Margesin, R. (2016). Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors?. *Microbial. Ecol.*, 72(1), 207-220.
- Smartwood. (2002). Resumen Público de Certificación de la Comunidad de Ixtlán de Juárez. Recuperado de https://www.rainforest-alliance.org/business/forestry/documents/ixtlan_juarez.pdf
- Sun, Y., Luo, C., Jiang, L., Song, M., Zhang, D., Li, J., ...& Zhang, G. (2020). Land-use changes alter soil bacterial composition and diversity in tropical forest soil in China. *Sc.Total Environ.*, 712, 136526.

- Szoboszlay, M., Dohrmann, A.B., Poeplau, C., Don, A., & Tebbe, C.C. (2017). Impact of land-use change and soil organic carbon quality on microbial diversity in soils across Europe. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 93(12), 146.
- Técnica Informática Aplicada S.A., (TIASA). (2003). *Programa de manejo forestal para el aprovechamiento persistente de los recursos naturales forestales maderables ciclo 2003-2013, para la comunidad de Ixtlán de Juárez. Oaxaca, México.*
- Tripathi BM, Stegen JC, Kim M, Dong K, Adams JM, Lee YK (2018) Soil pH mediates the balance between stochastic and deterministic assembly of bacteria. *ISME J.*, 12:1072- 1083. doi: 10.1038/s41396-018-0082-4
- Vásquez-Cortez, V. F., Clark-Tapia, R., Manzano-Méndez, F., González-Adame, G., & Aguirre-Hidalgo, V. (2018). Estructura, composición y diversidad arbórea y arbustiva en tres condiciones de manejo forestal de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Madera y Bosques*, 24(3), e2431649. doi: 10.21829/myb.2018.2431649
- Villanueva-Jiménez, E., Villegas-Ríos, M., Cifuentes-Blanco, J., & León- Avendaño, H. (2006). Diversidad del género *Amanita* en dos áreas con diferente condición silvícola en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. *Rev. Mex.Biodivers.*, 77, 17-22.
- Wang, C.H., Wu, L., Wang, Z., Alabady, M.S., Parson, D., Molumo, Z., & Fankhauser, S.C. (2020). Characterizing changes in soil microbiome abundance and diversity due to different cover crop techniques. *PloS one*, 15(5), e0232453.
- Wertz, S. et al, (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environ. Microbiol.*, 9, 2211–2219

9. ANEXOS

9.1. Soluciones para extracción de DNA

- Solución de pirofosfato de sodio 2L

Pesar 133.76 g de pirofosfato de sodio y disolver en 1 600 mL de agua destilada previamente calentada a 60 °C, cuando esté disuelto completamente el pirofosfato se deja enfriar y se afora a 2 000 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de buffer de fosfatos pH 8

Solución I:

Pesar 71.6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ disolver con agua destilada y aforar a 1 000 mL.

Solución II:

Pesar 5.92 g de NaH_2PO_4 anhidro se disuelve en agua destilada y se afora a 250 mL.

Mezclar 948 mL de la Solución I con 52 mL de la Solución II, mezclar y verificar el pH 8 y ajustar a 2 000 mL.

*Esterilizar con calor húmedo

- Soluciones de lisis del protocolo de Valenzuela-Encinas et al. 2008.

Solución de Lisis I 250 mL

Pesar 2.1 de NaCl y agregar 50 mL de EDTA 0.5 M pH 8 disolver y aforar a 250 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente Solución

Solución de Lisis II 250 mL

Pesar 1.46 g de NaCl y disolver en 125 mL de tris HCl 1M. Pesar 30 g de SDS y disolver en la solución ajustar el pH 8 y aforar a 250 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de lisis método Hoffman y Winston 1987

Preparar 250 mL de solución. Pesar 2.5 g de SDS (1 % w/v), por separado medir 5 mL de tritón X- 100 (v/v), mezclar con una solución de 10 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM de NaCl, y 1 mM de EDTA. Mezclar suavemente hasta quedar disuelto.

*Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22 μm . Almacenar a temperatura ambiente.

- Soluciones de lisis para el protocolo Sambrook y Rusel 2001.

Buffer de lisozima EDTA 0.25 M pH 8 200 mL.

Medir 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8 y llevar a un volumen de 200 mL.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

Lisozima 10 mg mL⁻¹ prepara 10 mL

Pesar 100 mg de lisozima y disolver en Tris-Cl 10 mM pH 8 (100 μL) con 9.9 mL de agua destilada, disolver suavemente evitando la formación de espuma.

*Esterilizar por filtración con membrana y almacenar a 4°C.

Solución de SDS al 10% 250 mL

Pesar 25 g de SDS y disolver en agua destilada y aforar a 250 mL.

*Esterilizar por calor húmedo:

- Soluciones para purificar

Acetato de potasio 5 M 100 mL

Pesar 29.4 g de acetato de potasio y disolver en 60 mL de agua destilada. Adicionar 11.5 mL de ácido acético glacial y aforar a 100 mL con agua destilada.

*almacenar a temperatura ambiente.

Solución de EDTA 0.5M pH 8 1000 mL

Pesar 186.1 g de EDTA *2H₂O sal disódica, adicionar 800 mL de agua destilada disolver.; ajustar a pH 8 con NaOH. Aforar a 1L con agua destilada.

*Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

Cloroformo alcohol isoamílico (24:1) 100 mL

Añadir 96 mL de cloroformo a 4 mL de alcohol isoamílico. Tener la precaución de que el frasco este completamente seco. Almacenar la solución a 4 °C.

Solución de Polientilenglicol (PEG) 13% 250 mL

Pesar 23.4 g de NaCl y disolver en 200 mL de H₂O destilada, agregar 32.5 g de PEG y aforar a 250 mL. *Esterilizar por calor húmedo y almacenar a temperatura ambiente.

9.2. Portada del Artículo

Folia Microbiologica
https://doi.org/10.1007/s12223-022-01009-9

ORIGINAL ARTICLE



Land-use change alters the bacterial community structure, but not forest management

Viviana Rodríguez Rivera^{1,2} · Yendi E. Navarro-Noya³ · Luc Dendooven¹ · Marco Luna Guido¹

Received: 12 February 2022 / Accepted: 4 October 2022
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.i. 2022

Abstract

Deforestation has a large impact on soil fertility, especially on steep slopes, but by applying sustainable management practices, local communities in Oaxaca (Mexico) have tried to avoid the most negative effects on the forest ecosystems they manage. In this study, the characteristics and bacterial community structure were investigated from soil sampled in triplicate ($n = 3$) with different land use, i.e., arable, natural forest, sustainable managed, and reforested soil. The pH was significantly higher in the arable (6.2) than in the forest soils (≤ 5.3), while the organic matter was > 2 times higher in the natural forest (80.4 g/kg) and sustainable managed soil (86.3 g/kg) than in the arable (36.8 g/kg) and cleared and reforested soil (39.3 g/kg). The higher organic matter content in the first two soils was due to leaf litter, absent in the other soils. The species richness ($q = 0$), the typical ($q = 1$) and dominant bacteria ($q = 2$) were not affected significantly by land use. The beta diversity, however, showed a significant effect of land use on species richness ($p = 0.0029$). Proteobacteria (40.135%) and Actinobacteria (20.15%) were the dominant bacterial phyla, and *Hahomonas* (14.50%) and the *Verrucomicrobia DA101* (3.39%) were the dominant genera. The bacterial communities were highly significantly different in soil with different land use considering the taxonomic level of genus and OTUs ($p \leq 0.003$). It was found that the sustainable managed forest provided the local community with sellable wood while maintaining the soil organic matter content, i.e., sequestered C and without altering the bacterial community structure.

Keywords Arable soil · Cleared and reforested soil · Natural and sustainable managed forest soil · Soil characteristics

Introduction

Human activity has a large impact on our environment, and land-use change is one of the most important one. Land-use change, e.g., deforestation and changes in agricultural practices reduce plant and animal diversity and strongly affect the abundance of common species (FAO 2019; Rosenberg et al. 2019; Zimmer 2019; van Klink et al. 2020). In addition, numerous studies have found a significant impact on the soil microbial populations (e.g., Szoboszlai et al. 2017). For instance, Flores-Rentería et al. (2020) found that the

microbial communities grouped according to land use, i.e., arable, pasture, secondary forest, and primary tropical rain forest from Los Tuxtlas (Veracruz, Mexico) independent of season, i.e. dry or wet, indicating a large effect on soil microorganisms. Additionally, there is also growing evidence that there is a legacy of land-use change on soil biota (Negrete-Yankelevich et al. 2020).

Wood is a valuable commodity and has been extracted from forests often in an unsustainable way although more sustainable practices have been developed (Marchi et al. 2018). The felling of trees has an enormous effect on soil ecosystems especially in mountainous areas (Liu et al. 2002). This change can dramatically alter soil property legacies (e.g., nutrient availability, pH, and electrolytic conductivity), thereby affecting the soil microbial composition (Thompson et al. 2015; Negrete-Yankelevich et al. 2020). Additionally, the soil organic matter is not replenished due to the lack of falling litter, so the soil organic C content drops rapidly (Fusaro et al. 2019). The organic matter in soil is mineralized, so the C sequestered decreases, and the CO₂

✉ Marco Luna Guido
mluna@cimnestav.mx

¹ Laboratory of Soil Ecology, Cirvestav, Mexico City, Mexico

² Instituto de Estudios Ambientales, Universidad de La Sierra Juárez, Istlán de Juárez, Oaxaca, Mexico

³ Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90000 Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

Published online: 22 October 2022

Springer