



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Transmisión materna de microbiota bacteriana  
durante el desarrollo embrionario  
en una lagartija vivípara**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P r e s e n t a**

**Nina Marcela Montoya Ciriaco**

**Director:** Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

**Codirector:** Dr. Aníbal Helios Díaz de la Vega Pérez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2024





**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Transmisión materna de microbiota bacteriana  
durante el desarrollo embrionario  
en una lagartija vivípara**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P r e s e n t a**

**Nina Marcela Montoya Ciriaco**

**Comité tutorial**

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Dr. Aníbal Helios Díaz de la Vega Pérez

Dr. Sergio Iván Ancona Martínez

Dr. Arturo Estrada Torres

Dr. Sean Rovito

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2024

---

---

## FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia, Humanidades y Tecnología (CONAHCyT), proyecto Ciencia de Frontera (número: CF-2019-137748), proyecto de Infraestructura (número: INFRA-205945) y el programa Cátedras CONAHCyT (número: 883). El trabajo de campo fue realizado en el municipio de Ixtenco, Tlaxcala y el trabajo experimental en el Laboratorio de Interacciones Bióticas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala y en el Laboratorio de Ecología Molecular de Suelos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CDMX.

Nina Marcela Montoya Ciriaco recibió una beca de doctorado por parte del CONAHCyT (número: 703251).

El Doctorado en Ciencias Biológicas está acreditado en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP).



---

---

# CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS



**Posgrado en Ciencias Biológicas**  
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

**COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Nina Marcela Montoya Ciriaco** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Transmisión materna de microbiota bacteriana durante el desarrollo embrionario en una lagartija vivípara”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
TLAXCALA, TLAX., A 01 DE DICIEMBRE DEL 2023

---

DR. LUC JULIEN JEROME DENDOOVEN

---

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

---

DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ

---

DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA

---

DRA. STEPHANIE ELIZABETH HEREIRA PACHECO



Sistema Institucional de Autogestión de la Calidad Certificado bajo  
la Norma: ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015

Km. 1.5 Carretera Tlaxcala/Puebla CP 90070 Tel:2464621557 e-mail: [posgrado.clbc@uatx.mx](mailto:posgrado.clbc@uatx.mx) Tlaxcala, Tlax.

---

---

# CARTA NO PLAGIO



Centro de Investigación en Ciencias Biológicas

Asunto: Análisis de similitud de tesis

## COMITÉ ACADÉMICO

### POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **Nina Marcela Montoya Ciriaco** titulada "**Transmisión materna de microbiota bacteriana durante el desarrollo embrionario en una lagartija vivípara**" para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**.

La tesis de **Nina M. Montoya Ciriaco** fue revisada por todos los miembros del comité tutorial y por los miembros del comité de examen de grado. La versión final del documento de tesis se sometió a un análisis de similitud en el programa Turnitin, LLC el día 08 de de enero de 2024. Se analizaron un total de 18,224 palabras y 103,129 caracteres, excluyéndose la portada y la sección de Bibliografía, y se encontró una similitud general del 9%. Todas las coincidencias encontradas no representaron >1% del total del texto y en la inspección manual de las coincidencias se encontró que la mayoría era por "Fraseología de uso común".

Por lo anterior, confirmamos que **la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

**ATENTAMENTE**  
**"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"**  
**TLAXCALA DE XICOTÉNCATL A 08 DE ENERO DE 2024**

**DRA. YENDI E. NAVARRO NOYA**  
**DIRECTORA DE TESIS**



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008

Km 10.5 Autopista San Martín Texmelucan - Tlaxcala, San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, C.P. 90120  
248 481 5482 E-mail. cicb@uatx.mx.



NOMBRE DEL TRABAJO

**tesis.final.docx**

AUTOR

**Nina Montoya**

RECuento DE PALABRAS

**18224 Words**

RECuento DE CARACTERES

**103129 Characters**

RECuento DE PÁGINAS

**91 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**13.2MB**

FECHA DE ENTREGA

**Jan 8, 2024 7:02 PM CST**

FECHA DEL INFORME

**Jan 8, 2024 7:04 PM CST****● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 7% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala por la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Humanidades y Tecnología (CONAHCyT) por la beca otorgada durante el doctorado (703251).

A los miembros del comité tutorial, Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya, Dr. Aníbal Helios Díaz de la Vega Pérez, Dr. Sergio Iván Ancona Martínez, Dr. Arturo Estrada Torres y Dr. Sean Rovito por su enseñanza, apoyo, tiempo y dedicación en este proyecto de investigación.

Al Dr. Luc Dendooven, Jefe del Laboratorio de Ecología Molecular de Suelos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CDMX por su colaboración y soporte financiero en el trabajo experimental de este proyecto de investigación.

A los sinodales del examen predoctoral, Dra. Bibiana C. Montoya Loaiza, Dra. Eria Rebollar Caudillo, Dra. Rocío J. Alcántara Hernández, Dr. Fausto R. Méndez de la Cruz y Dr. Arturo Estrada Torres por su apoyo y comentarios que enriquecieron este proyecto de investigación.

---

---

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios y a mi familia, a mis padres María Guadalupe Ciriaco Almaraz y Pablo Roberto Montoya Baca, a mis hermanas Lina y Magdalena Montoya Ciriaco, a mi esposo Gabriel Barreto Cruz, a mi cuñado Fernando Flores Cardoso, y a mi sobrina Lina Fernanda Flores Montoya por su amor, entrega, palabras de ánimo y apoyo incondicional durante toda mi vida y en estos últimos 4 años.

A toda mi familia, mi abuelos, tíos y primos por su amor, cariño, sonrisas y palabras de aliento recibidas.

A la Dra. Yendi Navarro y Dr. Luc Dendooven por abrirme las puertas de sus laboratorios y de su casa, por enseñarme, guiarme y ser parte fundamental de mi crecimiento y desarrollo profesional y personal.

A mi comité tutorial en estos 4 años, mis directores de tesis: Dra. Yendi Navarro Noya y Dr. Aníbal Díaz de la Vega Pérez, Dr. Arturo Estrada Torres, Dr. Sean Rovito y Dr. Sergio Ancona Martínez por su tiempo y dedicación a este proyecto de investigación.

A todos mis amigos del laboratorio de Ecología Molecular de Suelos del Cinvestav, Zacatenco: Dr. Mario Hernández, Dr. Marco Luna Guido, Blanca Ramírez, Dra. Gabriela Medina, Dra. Shona Laurette, Dra. Laura Afanador, Dra. Claudia Ibarra y Dr. Valentín Pérez por su amistad, compañerismo y momentos e historias compartidas durante más de 4 años.

A mis amigos del laboratorio de Interacciones Bióticas en Tlaxcala y del Cinvestav: Dra. Stephanie Elizabeth Hereira Pacheco, Dra. Elizabeth Selene Gómez Acata, Dr. Mauricio Hernández Espinal y a todos los compañeros de servicio social por su amistad, apoyo y compañerismo.

Gracias a todos. Gracias totales.

---

---

# DEDICATORIA

A Dios y a mi familia, por su amor incondicional.

---

---

## RESUMEN

La microbiota participa desde las primeras etapas de desarrollo en la salud y estado físico del huésped. Sin embargo, el proceso y las rutas de traslado de las bacterias para colonizar el ambiente placentario y/o amniótico desde la embriogénesis en los vertebrados aún no se conoce completamente, y en vertebrados no mamíferos ha sido poco explorada. En este estudio buscamos evidencia de transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario a través del análisis de metabarcoding del gen 16S rRNA, utilizando a la lagartija vivípara *Sceloporus grammicus* como modelo de estudio. Nuestros resultados identificaron a genes bacterianos 16S rRNA en el ambiente amniótico de los embriones de *S. grammicus*. Sin embargo, la diversidad bacteriana fue baja y la estructura similar entre los embriones, esto comparado con la diversidad bacteriana en los sitios anatómicos maternos. Lo que sugiere que existen fuertes controles en la transferencia bacteriana de la madre a su descendencia. Además, encontramos que el 78% de las variantes de secuencia de amplicón embrionaria (ASVs) están en la microbiota materna, sugiriendo que la transmisión bacteriana de la madre al embrión es un proceso continuo y que algunas bacterias pudieron ser transferidas durante las primeras etapas embrionarias. Asimismo, las bacterias embrionarias detectadas en el embrión se superponen principalmente con las bacterias presentes en la boca y la piel ventral aséptica de la madre. Sin embargo, es difícil concluir que las ASVs compartidas se originan a partir de estos tejidos maternos. Finalmente, este estudio aporta evidencia de transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario en el reino animal. Además, estos hallazgos destacan que la transmisión materna podría ser incluida en los efectos maternos que impactan a la descendencia.

---

---

## ABSTRACT

The microbiota participates since the first stages of development in the health and physical condition of the host. However, the process and routes of bacteria transfer to colonize the placental and/or amniotic environment from embryogenesis in vertebrates are still largely unknown, especially in non-mammalian vertebrates. In this study, we used metabarcoding analysis of the 16S rRNA gene to search for evidence of vertical microbiota transfer during embryonic development using the viviparous lizard *Sceloporus grammicus* as a study model. Our results detected 16S rRNA bacterial genes in the amniotic environment of *S. grammicus* embryos. However, the bacterial diversity is low and the structure is similar between the embryos compared to the bacterial diversity in the maternal anatomical sites. This suggests that there are strong controls on bacterial transfer from the mother to her offspring. Additionally, we found that 78% of the embryonic amplicon sequence variants (ASVs) are in the maternal microbiota, suggesting that bacterial transmission from the mother to the embryo is a continuous process and that some bacteria could be transferred during the early embryonic stages. In addition, the embryonic bacteria detected in the embryo mainly overlap with the bacteria present in the mother's mouth and aseptic ventral skin. However, it is difficult to conclude that the shared ASVs originate from these maternal tissues. Finally, this study provides evidence of vertical transfer of microbiota during embryonic development in the animal kingdom. Furthermore, these findings highlight that maternal transmission could be included in maternal effects that impact offspring.



---

---

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Microbiota:** Comunidad compleja de microorganismos que incluye bacterias, arqueas y eucariotes, además de virus que ocupan un hábitat definido. Estos microorganismos tienen una relación mutualista obligada con su huésped y desempeñan un papel fundamental en su desarrollo integral.

**Microbioma:** Conjunto completo de microorganismos (microbiota) y sus genes, presente en un huésped específico. Este microbioma contiene cientos de genes más que el genoma del huésped.

**Gen 16S rRNA:** Código de barras ampliamente utilizado en estudios de microbioma para la identificación taxonómica de bacterias. Contiene regiones variables y regiones altamente conservadas, lo que permite que sea un gen informativo. Ha sido recopilado en bases de datos integrales que contienen datos confiables y de alta calidad.

**Región V3-V4:** Región hipervariable del gen 16S rRNA altamente conservada, útil para clasificar taxones a nivel superior, es decir, Phylum y Clase.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Técnica molecular que permite la amplificación exponencial de una molécula de DNA, lo que genera millones de copias de un fragmento.

**Secuenciación de DNA:** Proceso que determina el orden de las cuatro bases nucleotídicas (adenina, timina, citosina y guanina) de un fragmento de DNA.

**Amplicon sequence variants (ASVs):** Secuencia única e individual de DNA derivada del análisis de genes marcadores. En español se denomina variante de secuencia de amplicón.

---

---

**Análisis de Componentes Principales (PCA):** Análisis exploratorio basado en distancias euclidianas útil para visualizar la ordenación de los datos, este muestra las distancias euclidianas y las variables que contribuyen a la explicación de la variación de la muestra.

---

---

# ÍNDICE

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>- 4 -</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>- 7 -</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>- 8 -</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>- 9 -</b>
5.1 Objetivo general	- 9 -
5.2 Objetivos específicos	- 9 -
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>- 10 -</b>
6.1 Modelo de estudio	- 10 -
6.2 Sitio de estudio y muestreo	- 10 -
6.3 Disección del intestino materno y fetal	- 11 -
6.3.1 Disección de las hembras	- 11 -
6.3.2 Disección de los embriones	- 12 -
6.4 Extracción de DNA	- 12 -
6.5 Construcción de bibliotecas y secuenciación	- 13 -
6.6 Análisis bioinformático y estadístico.	- 14 -
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>- 18 -</b>
7.1 Diversidad alfa de la microbiota bacteriana materna y embrionaria	- 18 -

---

---

7.2 Composición taxonómica de microbiota bacteriana materna y embrionaria	- 22 -
7.3 Composición y estructura a nivel de ASVs de la microbiota bacteriana materna y embrionaria	- 24 -
7.4 Posible contaminación por reactivos.	- 26 -
7.5 Predicción funcional de la microbiota bacteriana materna y embrionaria	- 27 -
7.6 Superposición de la microbiota bacteriana materna y embrionaria	- 29 -
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>- 32 -</b>
8.1 Grupos bacterianos y funciones putativas en las muestras maternas y embrionarias.	- 36 -
8.2 Impacto ecológico y evolutivo de la transferencia vertical de microbiota en reptiles.	- 39 -
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>- 42 -</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>- 43 -</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>- 44 -</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>- 59 -</b>
12.1 Scripts	- 59 -
12.2 Metadata	- 63 -
12.3 Metadatos del SRA	- 66 -
<b>13. PUBLICACIONES</b>	<b>- 68 -</b>
Artículos publicados durante el periodo del Doctorado en Ciencias Biológicas	- 70 -

---

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Muestras recolectadas de ocho hembras gestantes de *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023. - 14 -

**Figura 2.** Gráfica de barras con la abundancia relativa (%) de las comunidades bacterianas a diferentes niveles taxonómicos en el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo (muestras embrionarias), y la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas) y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023. - 22 -

**Figura 3.** Heatmap de las 50 variantes de secuencia de amplicón (ASV) más abundantes (%) en la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas), piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828), y el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en última etapa de desarrollo (muestras embrionarias). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023. - 23 -

**Figura 4.** Análisis de componentes principales (PCA) de la estructura de las comunidades bacterianas a nivel de variantes de secuencia de amplicón (ASV) en la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas) y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828), y el líquido

---

---

amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo (muestras embrionarias). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.- 25

-

**Figura 5.** Distancias Aitchison de las comunidades bacterianas de muestras maternas y embrionarias de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828).

Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

- 26 -

**Figura 6.** Heatmap de las funciones bacterianas en la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas, púrpura), piel ventral aséptica (control aséptico, azul) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann 1828), y el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo (muestras embrionarias, verde). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

- 28 -

**Figura 7.** Variantes de secuencia de amplicón (ASVs) compartidas entre la boca, cloaca, intestino delgado y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann 1828), y el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo. Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

- 29 -

**Figura 8.** Variantes de secuencia de amplicón (ASVs) compartidas entre cada madre y sus embriones. Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

- 30 -

---

---

**Figura 9.** Rastreo del origen bacteriano de los embriones de *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828) mediante el algoritmo FEAST (rastreo rápido de fuentes microbianas por sus siglas en inglés). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Análisis de calidad del conjunto de datos de secuenciación del gen 16S rRNA de muestras maternas y embrionarias de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023. - 19 -

**Tabla 2.** Números de Hill de las comunidades bacterianas maternas y embrionarias de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023. - 20 -

**Tabla 3.** Números de Hill de las comunidades bacterianas en la boca, cloaca, intestino delgado y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828) y líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo. Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023. - 21 -



---

---

# 1. Introducción

El microbioma funciona como regulador plástico entre los efectos del genotipo del huésped y los efectos externos que interactúan para moldear al fenotipo del huésped (**Mueller y Sachs 2015**), mejorando así su adecuación y posibilidades de supervivencia (**Gould y cols. 2018**). La relación microbiota-huésped es muy compleja y bidireccional, ya que las características del huésped definen la composición de la microbiota y esta a su vez, impacta en el huésped. Por ejemplo, el sistema inmune define a la diversidad de la microbiota, mientras que, esta modula la respuesta inmune del huésped (**Gilbert y cols. 2015**).

La microbiota coloniza casi todas las regiones anatómicas de su huésped, e.g. tracto intestinal, superficie de la piel, ojos, oídos, boca, cavidad nasal, pulmones y aparato reproductor. La microbiota del tracto intestinal está conformada por millones de microorganismos, representa más del 90% de la microbiota del huésped y juega un papel muy importante en la salud y desarrollo de su huésped pues participa en procesos muy importantes, e.g. la digestión y absorción de nutrientes, modulación del sistema inmune, barrera de defensa contra patógenos, desarrollo neurológico, reproducción, comportamiento, etc. (**Colston y Jackson 2016, Wang y cols. 2017**).

La microbiota participa en las diferentes etapas de la reproducción, desde la preconcepción, la cópula, la gestación y el nacimiento. Por ejemplo, en humanos, la microbiota del fluido folicular está involucrada en el éxito de la implantación y la maduración de los ovocitos (**Moreno y cols. 2016**). La microbiota del líquido seminal es muy diversa y podría estar asociada a la fertilidad masculina (**Weng y cols. 2014**). En lagartijas *Zootoca vivipara*, después de la cópula, la microbiota cloacal de los machos induce un cambio significativo en la microbiota cloacal de las hembras, siendo esta más diversa, y esto podría tener un efecto en la gestación y en el éxito reproductivo (**White y cols. 2011**). Durante la gestación, un proceso fisiológico que involucra una adaptación importante del cuerpo materno, la composición y estructura de la microbiota cambia en los sitios anatómicos involucrados (**Schoenmakers y cols.**

---

---

2019). Por ejemplo, disminuye la riqueza de especies en la microbiota vaginal e intestinal, la diversidad beta aumenta, y la abundancia relativa de Actinobacteria y Proteobacteria es alta (Aagaard y cols. 2012, Koren y cols. 2012, Di Simone y cols. 2020).

La microbiota coloniza a su huésped desde el nacimiento y esto contribuye a definir la estructura y composición de las comunidades microbianas de la microbiota de la descendencia desde etapas tempranas del desarrollo y a lo largo de la vida (Wassenaar y Panigrahi 2014, Colston y Jackson 2016, Rothschild y cols. 2018). Esta colonización microbiana durante el nacimiento en humanos representa uno de los mecanismos más ampliamente reconocidos de transmisión materna de microbiota (Dominguez-Bello y cols. 2010, Perez-Muñoz y cols. 2017). Sin embargo, el uso de secuenciación de última generación ha desafiado esta creencia tradicional y ha planteado la existencia de un microbioma placentario que inicia la colonización del embrión antes del nacimiento (Aagaard y cols. 2014). Por ejemplo, en humanos, se han detectado bacterias en el útero de embarazos sanos y sugieren que estas bacterias inician y contribuyen al desarrollo normal del embrión. Los estudios han detectado bacterias en el líquido amniótico (Collado y cols. 2016), el meconio (Jiménez y cols. 2008), el cordón umbilical y la placenta (Aagaard y cols. 2014, Verstraelen y cols. 2016, Schoenmakers y cols. 2019). Jiménez y cols. (2008) informaron que el meconio no es estéril como se creía. Esta primera evacuación intestinal alberga una comunidad de microorganismos compleja, por ejemplo: se ha detectado a *Enterococcus* y *Escherichia coli*. Estas bacterias fueron detectadas en baja abundancia y diversidad, no obstante, desafían la visión tradición del útero estéril. Sin embargo, estos resultados siguen siendo debatidos y poco aceptados en el campo de la investigación.

En el reino animal existe evidencia de múltiples mecanismos de transferencia vertical de microbiota, por ejemplo, durante la embriogénesis o reproducción sexual o asexual, principalmente en invertebrados (Bruijning y cols. 2022). En otros tipos de vertebrados como las aves, peces y reptiles, es poco explorado y los estudios están centrados en la búsqueda de patógenos durante la puesta de huevos. Actualmente, no existe evidencia de transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario en vertebrados no mamíferos, y las

---

---

rutas de diseminación bacteriana, así como el probable origen materno de los microorganismos sigue sin ser explorado.

---

---

## 2. Antecedentes

El desarrollo animal puede depender de señales microbianas que resultan de interacciones transitorias o colonización permanente por microorganismos y de señales moleculares microbianas (**Bosch y McFall-Ngai 2021**). Durante el desarrollo embrionario animal, los microorganismos y sus señales moleculares se incorporan en el desarrollo normal, pues participan en la maduración del sistema inmune e intestinal del huésped (**Koleva y cols. 2015, Gilbert y cols. 2015, Rook y cols. 2017**). Por ejemplo, la diferenciación intestinal en ratones gnotobióticos no se lleva a cabo, lo que sugiere que la microbiota proporciona señales de desarrollo al epitelio intestinal (**Hooper y cols. 2001, Gilbert y cols. 2015**) y la función de células mieloides es reducida. Sin embargo, al colonizar a los ratones con una microbiota compleja los defectos en la formación de estas células son restaurados. Por lo tanto, la microbiota intestinal puede instruir el desarrollo de células inmunitarias al promover la hematopoyesis (**Khosravi y cols. 2014**). En peces, la microbiota intestinal inicia la división celular en las células madre intestinales a través de la vía de señalización de  $\beta$ -catenina (**Rawls y cols. 2004**). En roedores, existe evidencia que sugiere que los metabolitos de la microbiota gastrointestinal liberados al comienzo de la vida del huésped influyen en el desarrollo del cerebro y la barrera hematoencefálica (**Mayer y cols. 2014, Perez-Muñoz y cols. 2017**). Debido a que los simbiontes microbianos son importantes para el desarrollo y supervivencia animal, deben existir mecanismos confiables para facilitar su transferencia, es decir, a través de la vía materna (transferencia vertical) o entre individuos de la misma especie u otras especies (transferencia horizontal) (**Bright y Bulgheresi 2010, Bosch y McFall-Ngai 2021**).

La transferencia vertical de microbiota ocurre en el Reino Animal a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, 1) animales como las moscas, pulgones, cochinillas y cucarachas adquieren bacterias de sus padres durante la alimentación (**Baumann 2005, Douglas 2021, Sacchi 1988**), 2) por transmisión transovárica en la que las bacterias se transfieren durante la infección intracelular de los ovocitos, 3) durante la reproducción sexual o asexual existe inoculación temprana de microorganismos (**Kaiwa y cols. 2014**), 4) por transferencia de

---

---

bacterias durante la puesta de huevos (**Trevelline y cols. 2018**) y 5) por transferencia bacteriana durante el paso por el canal de parto (**Kohl y cols. 2017**).

Los mecanismos de transferencia vertical de microbiota han sido estudiados principalmente en invertebrados como insectos, nematodos, esponjas, almejas y ostras (**Goffredi and Barry 2002, Taylor y cols. 2007, Su y cols. 2021, Unzueta-Martínez y cols. 2022**). En vertebrados mamíferos, los estudios principales sobre transferencia han sido durante o después del parto y en animales modelo como chimpancés *Pan troglodytes schweinfurthi* (**Moeller y cols. 2016**) y ratones (**Jiménez y cols. 2008**). Sin embargo, en vertebrados no mamíferos, la investigación ha sido limitada. En aves y peces, la investigación se ha centrado en la transferencia vertical de patógenos. Por ejemplo, en especies ovíparas, la transmisión transovárica de patógenos en la yema de huevo se ha documentado en gallinas ponedoras, pollos (**Gantois y cols. 2009, Armour y Ferguson. 2015**) y salmónidos (**Brock y Bullis 2001**). Mientras que existen muy pocos ejemplos en animales silvestres. En la raya *Leucoreja erinacea*, la microbiota bacteriana de la piel, las branquias y la cápsula del huevo fue estudiada durante el desarrollo embrionario, esto reveló una comunidad bacteriana muy diversa en la superficie interna de la cápsula del huevo (**Mika y cols. 2021**). En reptiles de vida libre, en las tortugas *Podocnemis expansa* y *P. unifilis* se detectaron bacterias de la familia Enterobacteriaceae en los huevos, pero no en sus nidos, lo que sugiere un probable origen materno (**De Morais y cols. 2010**). En otro estudio, se aisló *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* de la albúmina y yema de huevos recién eclosionados de la cloaca de tortugas *Chelonia mydas* (**Al-Bahry y cols. 2009**). En la lagartija *Sceloporus undulatus*, las comunidades bacterianas de sus huevos difieren de la microbiota de su entorno (**Trevelline y cols. 2018**). Actualmente, no existe evidencia de transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario en vertebrados vivíparos no mamíferos ni se ha determinado el origen anatómico materno de estos microorganismos.

Existen algunas rutas sugeridas de transferencia materna en mamíferos, estas incluyen que: 1) los microorganismos vaginales maternos migran al tracto gastrointestinal fetal desde el aparato reproductor femenino, 2) las bacterias orales maternas son trasladadas a la placenta por

---

---

diseminación hematológica (Aagaard y cols. 2014) y 3) las bacterias intestinales maternas son transportadas a todo el cuerpo fetal por translocación del epitelio intestinal y absorción de las células dendríticas a la luz intestinal (Rescigno y cols. 2001, Funkhouser y Bordenstein 2013, Gosalbes y cols. 2013). Aún así, esto sigue siendo desconocido y poco explorado en vertebrados vivíparos no mamíferos.

Las lagartijas vivíparas son un modelo excelente para estudiar el proceso que dirige la placentación en los vertebrados (Brandley y cols. 2012). Los cambios morfológicos y funcionales en las placentas de las lagartijas con diferentes estrategias nutricionales proporcionan evidencia contundente de la evolución de la viviparidad, que podría involucrar a los mecanismos de transferencia vertical de microbiota. Por ejemplo: existen diferentes grados de viviparidad, desde aquellas lagartijas con placentas que solo intercambian gases y agua, hasta las que presentan placentas morfo-fisiológicamente funcionales para la nutrición del embrión, como las placentas presentes en los humanos (Méndez de la Cruz y cols. 2018). En este estudio investigamos las comunidades bacterianas en el tracto intestinal y en el ambiente amniótico (líquido amniótico, membrana amniótica y yema extraembrionaria) de los embriones de *S. grammicus* y en los tejidos maternos, por ejemplo: boca, cloaca e intestino delgado. Esto se abordó con tres preguntas: 1. ¿Existe la transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario en la lagartija vivípara *S. grammicus*?, 2. ¿Cuál es la identidad taxonómica y las funciones potenciales de estas bacterias? y 3. ¿Cuál es el posible origen materno de estas bacterias?. Los resultados de este estudio ampliarán el panorama actual acerca de los diferentes mecanismos de transferencia vertical de microbiota en el Reino Animal. Además de incrementar la amplia gama de funciones que la microbiota es capaz de realizar en su huésped, por ejemplo, su implicación en el proceso reproductivo y un posible papel durante el desarrollo embrionario de vertebrados no mamíferos en su ambiente natural. Además de destacar que el microbioma materno podría considerarse dentro de los efectos maternos que afectan el desarrollo integral de la descendencia.

---

---

### **3. Justificación**

La adecuación de los organismos depende fundamentalmente de la relación con su microbiota. Actualmente, la controversia acerca de la colonización del huésped durante el desarrollo embrionario es cada vez más debatida en vertebrados mamíferos. Investigar esta transferencia vertical de microbiota en una lagartija vivípara aportará datos útiles para el entendimiento de la colonización bacteriana durante la embriogénesis.

---

---

## 4. Hipótesis

### **Hipótesis 1**

La transferencia vertical de microbiota ocurre durante el desarrollo embrionario.

### **Predicción 1**

Se detectarán marcadores genéticos de origen bacteriano en el ambiente amniótico y tracto intestinal de embriones de *S. grammicus* comparando con el control aséptico.

### **Hipótesis 2**

La microbiota transferida a la descendencia durante el desarrollo embrionario proviene principalmente de la boca de la madre.

### **Predicción 2**

La superposición de ASVs entre la microbiota del tracto intestinal embrionario y la microbiota oral materna es mayor comparado con la superposición entre la microbiota del tracto intestinal embrionario y del intestino delgado y cloaca materna, y el mismo patrón para el ambiente amniótico.



---

---

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

- Evaluar la posible existencia de transferencia materno-fetal y su origen.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Detectar marcadores genéticos de origen bacteriano en el ambiente amniótico y tracto intestinal de embriones de *S. grammicus*.
- Comparar la microbiota oral, cloacal e intestinal de la madre con la microbiota amniótica e intestinal del embrión.

---

---

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Modelo de estudio

*Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828; Orden Squamata), o lagartija del mezquite, es una especie ampliamente distribuida desde el Sur de Estados Unidos hasta el sur de México (**Sites y cols. 1992**). Es una especie vivípara, exitosa y fácilmente adaptable a diferentes condiciones ambientales. Habita en bosques de pino-encino, desiertos y páramos de alta montaña, y desde 550 hasta 4,440 msnm (**Lemos-Espinal y Smith 2007**). El fenotipo de *S. grammicus* ha sido ampliamente estudiado en montañas altas del centro de México (**Barrios 2018, Díaz de la Vega-Pérez y cols. 2019, Domínguez-Godoy y cols. 2020, Montoya-Ciriaco y cols. 2020**). Además, es una lagartija lecitotrófica, es decir, la madre suministra nutrientes al embrión a través del huevo. Sin embargo, la placenta de *S. grammicus* está constituida de diferentes membranas extraembrionarias que están en contacto con el huevo y la pared uterina (**Villagrán 1989**), esta puede permitir el intercambio gaseoso, aunque también puede administrar agua y moléculas orgánicas e inorgánicas en menor concentración al embrión (**Blackburn 2015**). La evidencia en otras especies de *Sceloporus* indica que podrían existir adaptaciones en la placenta para intercambiar nutrientes y así mantener en desarrollo a sus embriones en condiciones ambientales restrictivas. Por ejemplo, la placenta de *S. jarrovi* contiene orgánulos citoplasmáticos que sintetizan, secretan y absorben moléculas (**Blackburn y cols. 2010**). Además, existe evidencia de transferencia y secreción uterina, así como de absorción fetal en otras especies vivíparas lecitotróficas como *S. mucronatus* (**Villagrán y cols. 2005, Thompson y cols. 2006**).

### 6.2 Sitio de estudio y muestreo

La colecta de lagartijas se realizó con autorización de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (oficio SGPA/DGVS/00107/20). El sitio de muestreo está localizado a 2,600 msnm (19° 14' N, 97° 55' W) en Ixtenco, Tlaxcala, México. Esta área se caracteriza por un clima templado-semiárido con temperatura media de 14.5±6.6 °C, humedad relativa media de 58.2±28.8%, calidad térmica de 8.7±1.26 °C (**Domínguez-Godoy y cols. 2020**) y cultivos de maíz (*Zea mays* L.). A 2,600 msnm, *S. grammicus* se alimenta de más de

---

---

veinticinco familias de Insecta y Arachnida y tiene un tamaño corporal promedio de  $10 \pm 2$  cm (Montoya-Ciriaco y cols. 2020). Ocho hembras gestantes ( $n=8$ ) con sus respectivos embriones en etapa de desarrollo 40 (el embrión presenta características de neonato, esto incluye coloración y escamas diferenciadas) (Villagrán 1989) de la época reproductiva fueron recolectadas el 25 de marzo del 2021. La técnica por palpación se usó para determinar la preñez de las lagartijas. Las lagartijas fueron recolectadas manualmente, almacenadas y transportadas individualmente en bolsas asépticas de tela al laboratorio de Interacciones Bióticas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala. En el laboratorio, las lagartijas fueron mantenidas individualmente a 20–25 °C en oscuridad, esto para evitar estrés hasta su eutanasia y disección al día siguiente de su captura. Cada lagartija fue manipulada con guantes estériles antes, durante y después de la disección, es decir, nunca hubo contacto entre la piel humana y la piel de la lagartija.

## **6.3 Disección del intestino materno y fetal**

### **6.3.1 Disección de las hembras**

Las lagartijas fueron manipuladas y sacrificadas siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 ( $n=8$ ). Todos los procedimientos experimentales posteriores fueron realizados bajo estrictas condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar Clase II (NuAire, MN, EE. UU.). Antes de la disección, fueron tomadas muestras de boca y cloaca siguiendo la técnica de raspado con un hisopo de rayón (COPEN, Italia). Los hisopos fueron colocados inmediatamente en tubos estériles de polipropileno de 1.5 mL y almacenados a -20 °C. Después del hisopado, los individuos fueron colocados en una placa de disección estéril y desinfectados utilizando gasas impregnadas con una cantidad suficiente de peróxido de hidrógeno al 20% (v/v), después, hipoclorito de sodio al 2% (v/v), luego, etanol al 70% (v/v) y finalmente, se enjuagaron dos veces con agua estéril. El material usado para la desinfección fue desechado para evitar contaminación por escamas o algún residuo de la lagartija. Posterior a la desinfección del individuo, todas las manipulaciones fueron realizadas con placas de disección y guantes de nitrilo nuevos y estériles (UniSeal, China), y esto fue cambiado con frecuencia para evitar la contaminación cruzada. A continuación, una muestra con hisopo de la región ventral del cuerpo fue tomada como control de la técnica aséptica (en adelante, piel ventral aséptica). Usando

---

---

instrumentos estériles, la piel ventral de la lagartija fue cortada para exponer los órganos internos. La piel externa nunca fue tocada por los instrumentos quirúrgicos ni por otros órganos. Después, el tracto intestinal fue extraído cuidadosamente para revelar los embriones en el útero. Los instrumentos quirúrgicos fueron limpiados y flameados cada vez entre cada corte quirúrgico. Los embriones fueron extraídos del cuerpo materno, colocados individualmente en cajas Petri estériles y almacenados a 4 °C hasta la disección de su tracto intestinal, inmediatamente después de la disección del adulto. Finalmente, el tracto intestinal materno fue extraído y se disectó el intestino delgado (la región entre estómago y recto, justo antes del ciego), posteriormente la muestra fue almacenada en tubos estériles a -20°C hasta la extracción de DNA al día siguiente.

### **6.3.2 Disección de los embriones**

Aproximadamente, dos embriones fueron analizados por cada hembra ( $n=17$ ). Al inicio, aproximadamente 100–200  $\mu$ L de líquido amniótico fue recolectado con jeringas de insulina (BD Ultra-Fine™, 31GX8mm). Después, la membrana amniótica externa (en adelante, membrana) fue retirada y colocada en un tubo estéril, finalmente, aproximadamente 50–100  $\mu$ L fueron recolectados de la yema extraembrionaria (en adelante, yema) con jeringas de insulina. El embrión fue transferido a una placa de disección estéril y el tracto intestinal fue diseccionado. Cada embrión fue disectado con placas de disección, guantes e instrumentos quirúrgicos nuevos y estériles. Todas las muestras embrionarias fueron colocadas y almacenadas en tubos de propileno estériles a -20°C hasta su posterior extracción de DNA en un plazo no mayor a cinco días. Solo se consideraron las muestras libres de contaminación cruzada, es decir, muestras que no contenían membrana con yema, por ejemplo. Como resultado, obtuvimos seis muestras de membrana, cuatro muestras de yema y seis muestras de líquido amniótico de un total de diecisiete embriones.

### **6.4 Extracción de DNA**

La extracción de DNA de los fluidos (líquido amniótico y yema), tejidos (tracto intestinal materno y embrionario y membrana) e hisopos (boca, cloaca y piel ventral aséptica materna)

---

---

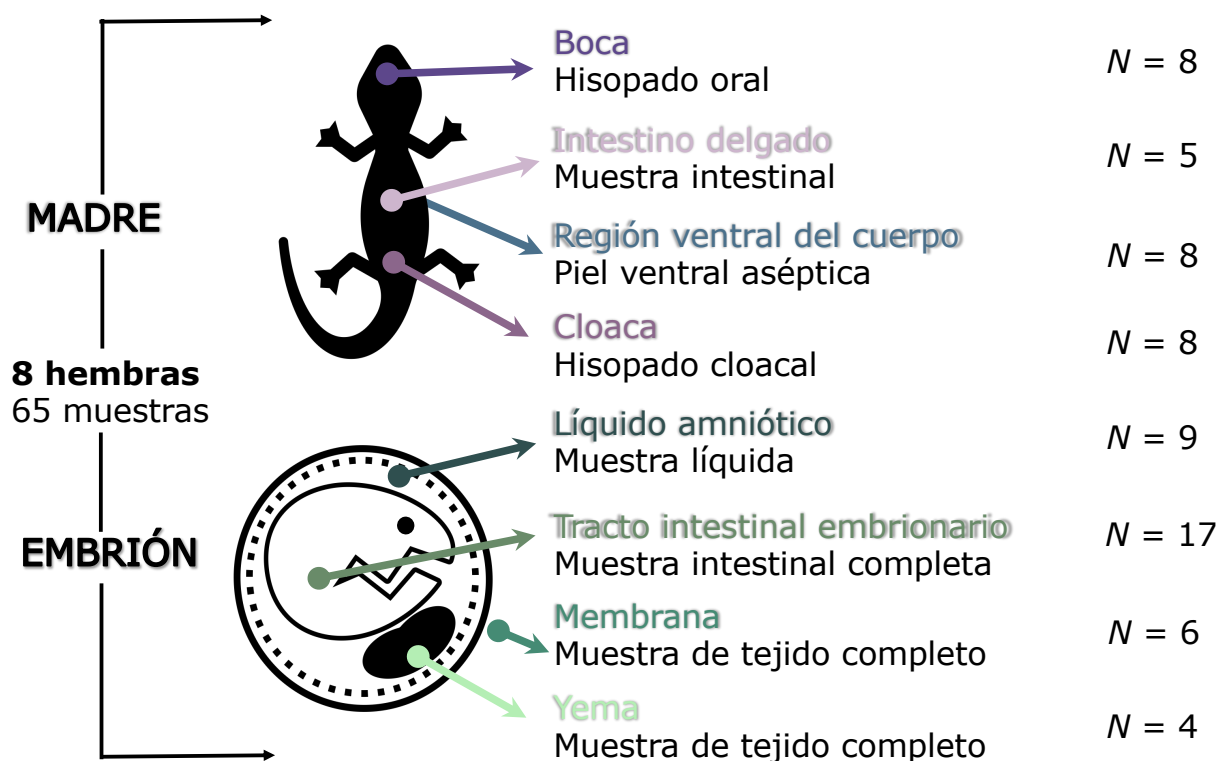
fue realizada con el kit UCP Pathogen Mini (Qiagen, Alemania). El kit de aislamiento fue seleccionado para aumentar la extracción de DNA bacteriano sobre el DNA del huésped. El DNA obtenido fue almacenado a -20°C para la construcción de bibliotecas. En cada lote de extracción fueron incluidos controles blanco. Los controles blanco fueron verificados de contaminación mediante electroforesis y amplificación del gen 16S rRNA.

## **6.5 Construcción de bibliotecas y secuenciación**

El DNA fue usado para la construcción de bibliotecas a través de la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA con los iniciadores 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAA TCC-3'). Todos los iniciadores fueron modificados con el adaptador de la plataforma de secuenciación y una etiqueta de 8 nt. Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incluían un paso de desnaturalización inicial a 95° C por 10 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 95° C por 45 segundos, alineamiento a 53° C por 45 segundos y extensión a 72° C por 45 segundos, finalmente un paso de extensión final a 72° C por 10 min. La amplificación de los genes 16S rRNA fue realizada por quintuplicado y los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Los productos de la amplificación fueron combinados en una sola mezcla y purificados con el kit DNA clean (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Los amplicones purificados fueron cuantificados con el kit Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA (Invitrogen, Waltham, MA) en un Fluoroespectrómetro Nanodrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), normalizados y combinados en cantidades equimolares para la secuenciación. Controles blanco, de reactivos y positivos fueron incluidos en cada corrida de PCR. Todos estos controles fueron incluidos en el proceso de amplificación de genes bacterianos con los adaptadores de la secuenciación y no se obtuvieron amplicones.

La secuenciación fue realizada a través de la plataforma Illumina MiSeq 300-pb PE (Illumina, San Diego, California, USA.) mediante el Servicio de Secuenciación DNA MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias crudas fueron analizadas para identificar secuencias de DNA humano, estas podrían servir como indicadores potenciales de contaminación durante el proceso de secuenciación. No se detectó DNA humano. Después de la secuenciación, las

siguientes muestras contenían lecturas suficientes para el análisis posterior: intestino delgado ( $n=5$ ), boca ( $n=8$ ), cloaca ( $n=8$ ), piel ventral aséptica materna ( $n=8$ ), tracto intestinal ( $n=17$ ), líquido amniótico ( $n=9$ ), membrana ( $n=6$ ) y yema embrionario ( $n=4$ ) produciendo un total de 65 muestras (**Figura 1**).



**Figura 1.** Muestras recolectadas de ocho hembras gestantes de *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

## 6.6 Análisis bioinformático y estadístico.

Los datos de secuenciación fueron procesados con el software Quantitative Insights Into Microbial Ecología versión 2 (QIIME 2-2021.4) (Bolyen y cols. 2019). Las secuencias fueron demultiplexadas, el ruido de la secuenciación fue eliminado, las lecturas paired-end unidas, las lecturas de baja calidad, singletons y secuencias quiméricas fueron eliminadas. Posteriormente, las *Amplicon Sequence Variants* (ASV) fueron inferidas con los siguientes parámetros: --p -trunc-len-f 250, --p-trunc-len-r 200, --p-max-ee-f 2, --p-max-ee-r 2 y --p-pooling-method 'pseudo' utilizando DADA2 (Callahan y cols. 2016). La asignación

---

---

taxonómica de las ASVs fue realizada con el clasificador Sklearn basado en el algoritmo Naive Bayes utilizando la base de datos de referencia SILVA versión 138 y entrenado en la región V3-V4 del gen 16S rRNA (Glöckner y cols. 2017). Un método de filtrado basado en la alineación de las secuencias representativas fue aplicado utilizando vsearch con los siguientes parámetros: perc-identity=0.97 y perc-query-aligned=0.95 (Rognes y cols. 2016). Las secuencias no alineadas y secuencias de DNA huésped y 16S rRNA de mitocondrias y cloroplastos fueron eliminadas. El paquete *decontam* versión 1.14.0 en R fue utilizado para eliminar los contaminantes de los reactivos después de la secuenciación (Davis y cols. 2018). Este análisis es recomendado en estudios de muestras de baja biomasa y permite perfilar una microbiota con mayor posibilidad de representar a la comunidad real.

Las funciones potenciales de las comunidades bacterianas en las muestras embrionarias y maternas fueron predichas con PICRUST versión 2.0.0 (Douglas y cols. 2020). Este tipo de análisis es solo una predicción basada en la reconstrucción filogenética ancestral, sin embargo, resulta útil para un panorama amplio del potencial funcional de una comunidad bacteriana (Langille y cols. 2013). Los datos fueron alineados con la base de datos del genoma de referencia del Integrated Microbial Genomes con modelos de Markov. La abundancia de rutas metabólicas está basada en los números de clasificación de enzimas (números EC) y fue inferida con MetaCyc (Caspi y cols. 2016). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software R versión 4.1.2 (R Core Team 2021).

La diversidad taxonómica alfa fue calculada con la tabla de observaciones de ASVs y determinada con números de Hill a los órdenes de diversidad  $q=0$  (riqueza de especies),  $q=1$  (especies típicas) y  $q=2$  (especies dominantes) con la función 'hill\_div' y el paquete *hilldiv* versión 1.5.1 en R (Alberdi y Gilbert 2019). Las diferencias significativas en el número efectivo de ASV entre muestras maternas y embrionarias, y entre secciones fueron probadas con modelos lineales de efectos mixtos utilizando la identidad individual (materna o embrionaria según corresponda) como un factor aleatorio con la función 'lme' en el paquete *nlme* versión 3.1-162 en R (Pinheiro y Bates 2006). La importancia del efecto fue calculada con 1000 simulaciones Monte Carlo utilizando el paquete *pgirmess* versión 2.0.0 en R. Un

---

---

método de aprendizaje supervisado fue aplicado para seleccionar las ASV y las funciones predichas que más contribuyeron a las diferencias en las composiciones entre las muestras utilizando *q2-sample-classifier* 2023.5.0.dev0 dentro de QIIME 2 (Bokulich y cols. 2018). Las ASVs y funciones predichas fueron seleccionadas con el puntaje más alto de importancia (importancia de cada característica de entrada para la precisión del modelo).

La tabla de frecuencias de ASVs y funciones predichas fue utilizada para calcular la abundancia relativa de grupos taxonómicos bacterianos y funciones de las muestras embrionarias y maternas. Los mapas de calor se construyeron utilizando el paquete *ComplexHeatmap* versión 2.13.2 en R (Gu y cols. 2016). Un enfoque composicional fue utilizado para investigar la estructura y composición de las comunidades bacterianas (Gloor y cols. 2016). En primer lugar, los valores de cero conteos fueron reemplazados en la tabla de observaciones de las ASV con un método multiplicativo de cero conteo (CZM) usando la función 'cmultRepl' en el paquete *zCompositions* versión 1.4.0-1 en R. Los conjuntos de datos fueron transformados con relación logarítmica centrada (*clr*) con la función 'codaSeq.clr' en el paquete *CoDaSeq* versión 1.3.4 en R (Gloor y cols. 2017). Un análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para explorar la estructura bacteriana materna y embrionaria utilizando la tabla transformada *clr*. La importancia de las diferencias entre las comunidades bacterianas maternas y embrionarias fue probada con un análisis de varianza multivariante permutacional (perMANOVA) utilizando distancias de Aitchison (Gloor y cols. 2017) con la función 'adonis' en el paquete *vegan* versión 2.6-4 en R (Oksanen y cols. 2019). Las comparaciones por pares de distancias de Aitchison entre el mismo individuo y entre las muestras embrionarias con muestras de su madre se seleccionaron manualmente para probar la diferencia en las distancias entre las muestras maternas y embrionarias. Las diferencias significativas fueron determinadas con la prueba de Fisher-Pitman con 10000 permutaciones de Monte-Carlo utilizando el paquete *coin* versión 1.4-2 en R (Hothorn y cols. 2008).

La partición de la diversidad beta en dos componentes: recambio y anidamiento fue determinada con el método descrito por Podani y Schmera (2011) basado en el índice de disimilitud de Jaccard con la siguiente ecuación:



---

---

$$\beta_{CC} = \beta_{-3} + \beta_{rich} \text{ (Ecuación 1)}$$

donde:  $\beta_{CC}$ =disimilitud total,  $\beta_{-3}$ =recambio y  $\beta_{rich}$ = anidamiento por diferencia de riqueza

Los diagramas de Venn fueron construidos con las especies compartidas de las muestras embrionarias y maternas con la función 'get\_set' y el paquete *VennDiagram* versión 1.7.3 en R (**Chen y Boutros 2011**). La matriz de ASV compartidas fue obtenida con la función 'betapart.core' del paquete *betapart* versión 1.5.6 en R (**Baselga y Orme 2012**). La superposición fue calculada en relación con las ASVs en los tejidos embrionarios como el porcentaje de ASVs embrionarios compartidos con los ASVs maternos.

El análisis FEAST fue realizado para determinar la contribución de las diferentes fuentes maternas a los embriones. Este análisis divide las muestras en sus componentes de origen, utilizando un algoritmo de maximización de expectativas determina la proporción de cada fuente conocida y desconocida a los datos. Mediante iteraciones sucesivas, ajusta la estimación para lograr un valor que se ajuste a los datos observados (**Shenhav y cols. 2019**). El análisis se hizo con cada madre y sus respectivos embriones. Las muestras maternas fueron establecidas como fuentes y las muestras embrionarias como sumideros.

---

---

## 7. Resultados

### 7.1 Diversidad alfa de la microbiota bacteriana materna y embrionaria

La secuenciación produjo un total de 766,270 lecturas ( $11,794 \pm 10,529$  en promedio por muestra) y 780 variantes de secuencia de amplicón (ASV) (**Tabla 1**). En general, las muestras maternas tienen una diversidad alfa significativamente mayor que las muestras embrionarias (considerando la riqueza [ $q=0$ ] y las ASVs frecuentes [ $q=1$ ];  $P<0.05$ ; **Tabla 2**). La riqueza bacteriana ( $q=0$ ) en las muestras maternas fue similar en las secciones estudiadas ( $P>0.05$ ), mientras que en las muestras embrionarias fue diferente en el siguiente orden: tracto intestinal ( $33\pm7$ ) > líquido amniótico ( $31\pm9$ ) y membrana ( $21\pm2$ ) > yema ( $20\pm3$ ) ( $P<0.05$ ; **Tabla 3**). La diversidad bacteriana en las secciones maternas considerando las ASVs frecuentes ( $q=1$ ) y dominantes ( $q=2$ ) fue mayor en el intestino delgado que en la boca y la cloaca. En el embrión, la diversidad de ASVs frecuentes fue mayor en el tracto intestinal que en la yema, mientras que la diversidad de ASVs dominantes fue similar en las secciones embrionarias (**Tabla 2.3**). A pesar de que fue utilizada una técnica aséptica para desinfectar la región ventral del cuerpo, algunas bacterias no fueron eliminadas, lo que resultó en un total de  $45\pm9$  ASVs.

**Tabla 1.** Análisis de calidad del conjunto de datos de secuenciación del gen 16S rRNA de muestras maternas y embrionarias de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

<b>Muestra</b>	<b>Locación</b>	<b>N</b>	<b>Crudas</b>	<b>Filtradas</b>	<b>Eliminadas</b>	<b>Unidas</b>	<b>No quiméricas</b>
<b>Madre</b>	Boca	8	9,399 ± 3,329	8,582 ± 3,065	8,542 ± 3,032	8,387 ± 2,936	8,262 ± 2,794
	Cloaca	8	16,597 ± 9,056	15,328 ± 8,328	15,282 ± 8,293	15,082 ± 8,143	14,533 ± 7,735
	Intestino delgado	5	3,379 ± 4,996	2,700 ± 4,066	2,511 ± 3,986	2,355 ± 3,861	2,272 ± 3,765
	Piel ventral aséptica	8	8,907 ± 4,828	8,118 ± 4,395	8,089 ± 4,389	7,973 ± 4,344	7,934 ± 4,324
	<b>Media</b>		10,211 ± 7,508	9,301 ± 6,926	9,236 ± 6,924	9,080 ± 6,830	8,869 ± 6,554
<b>Embrión</b>	Líquido amniótico	9	13,599 ± 3,558	12,279 ± 3,243	12,230 ± 3,247	12,078 ± 3,210	11,986 ± 3,188
	Intestino embrionario	17	20,221 ± 19,500	18,084 ± 17,686	17,986 ± 17,662	17,796 ± 17,451	17,545 ± 17,100
	Membrana	6	12,753 ± 3,182	11,230 ± 2,677	11,067 ± 2,631	10,973 ± 2,605	10,887 ± 2,599
	Yema	4	10,521 ± 2,367	9,621 ± 2,196	9,591 ± 2,193	9,531 ± 2,204	9,490 ± 2,199
	<b>Media</b>		16,243 ± 14,140	14,550 ± 12,798	14,461 ± 12,779	14,311 ± 12,627	14,151 ± 12,373
<b>Total</b>	<b>Media</b>		13,552 ± 12,036	12,208 ± 10,905	12,130 ± 10,889	11,977 ± 10,765	11,794 ± 10,529

**Tabla 2.** Números de Hill de las comunidades bacterianas maternas y embrionarias de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

Muestra	Número efectivo de Variantes de Secuencia de Amplicón		
	$q = 0$	$q = 1$	$q = 2$
	Promedio	Promedio	Promedio
<b>Madre</b>	53.7	11.6	6.7
<b>Embrión</b>	26.1	4.8	3.3
<i>F</i> value <sup>a</sup>	9.4	5.6	3.8
<i>p</i> value	<b>0.003</b>	<b>0.020</b>	0.054
<i>p</i> value (permutado) <sup>b</sup>	<b>0.001</b>	<b>0.007</b>	<b>0.034</b>

<sup>a,b</sup> Modelos lineales de efectos mixtos con 1000 permutaciones de Monte-Carlo. La identidad materna y embrionaria fue usada como factor aleatorio para probar las diferencias significativas.

**Tabla 3.** Números de Hill de las comunidades bacterianas en la boca, cloaca, intestino delgado y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828) y líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo. Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

Muestra	Locación	Número efectivo de Variantes de Secuencia de Amplificación		
		$q = 0$	$q = 1$	$q = 2$
MADRE	Boca	58.0 ± 60.5	8.5 ± 12.1 <b>a</b>	3.9 ± 4.5 <b>a</b>
	Cloaca	41.0 ± 14.8	6.4 ± 4.4 <b>a</b>	4.5 ± 3.6 <b>a</b>
	Intestino delgado	71.4 ± 61.3	26.0 ± 17.5 <b>b</b>	15.6 ± 11.2 <b>b</b>
	Piel ventral aséptica	44.5 ± 8.7	5.6 ± 0.7 <b>a</b>	3.1 ± 0.5 <b>a</b>
	<i>F</i> value <sup>a</sup>	0.593	4.522	5.349
	<i>p</i> value	0.627	<b>0.015</b>	<b>0.008</b>
	<i>p</i> value (permutado) <sup>b</sup>	0.703	<b>0.016</b>	<b>0.006</b>
EMBRIÓN	Líquido amniótico	31.1 ± 8.7 <b>ab</b>	4.9 ± 0.5 <b>ab</b>	3.4 ± 0.3
	Tracto intestinal	32.8 ± 7.4 <b>b</b>	5.6 ± 1.1 <b>a</b>	3.6 ± 0.5
	Membrana <sup>c</sup>	20.7 ± 1.7 <b>a</b>	4.6 ± 0.4 <b>ab</b>	3.4 ± 0.3
	Yema	20.0 ± 3.0 <b>a</b>	4.3 ± 0.7 <b>b</b>	3.1 ± 0.4
	<i>F</i> value <sup>d</sup>	6.535	3.602	1.562
	<i>p</i> value	<b>0.006</b>	<b>0.043</b>	0.245
	<i>p</i> value (permutado) <sup>e</sup>	<b>0.004</b>	<b>0.036</b>	0.285

<sup>a,b</sup> Modelos lineales de efectos mixtos con 1000 permutaciones de Monte-Carlo e identidad materna como factor aleatorio para probar las diferencias significativas.

<sup>c</sup> Membrana externa que contiene el embrión.

<sup>d,e</sup> Modelos lineales de efectos mixtos con 1000 permutaciones de Monte-Carlo e identidad embrionaria como factor aleatorio para probar las diferencias significativas.

## 7.2 Composición taxonómica de microbiota bacteriana materna y embrionaria

La composición taxonómica de las muestras embrionarias (líquido amniótico, tracto intestinal embrionario, membrana y yema) fue similar y estuvo dominada por el Phyla Proteobacteria y Firmicutes (**Figura 2A**). A niveles taxonómicos más bajos, las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria, y las familias Xanthomonadaceae y Comamonadaceae fueron las más abundantes en el ambiente amniótico (**Figura 2B y 2C**). Por el contrario, la composición taxonómica de las muestras maternas varió entre los diferentes sitios.



**Figura 2.** Gráfica de barras con la abundancia relativa (%) de las comunidades bacterianas a diferentes niveles taxonómicos en el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo (muestras embrionarias), y la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas) y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

El intestino delgado materno estuvo dominado por Firmicutes, seguido por Proteobacteria, Actinobacteriota y Bacteroidota, la boca por Proteobacteria, Campylobacterota y Bacteroidota, y la cloaca por Campylobacterota y Proteobacteria (**Figura 2A**). La abundancia relativa de Verrucomicrobiota y Desulfobacterota fue <1% en las muestras maternas. El intestino delgado estuvo dominado por las clases Gammaproteobacteria, Clostridia, Bacteroidia

y Actinobacteria, y las familias Lachnospiraceae y Pseudomonadaceae. La comunidad bacteriana en la boca estuvo dominada por las clases Gammaproteobacteria, Campylobacteria y las familias Comamonadaceae, Helicobacteriaceae y Xanthomonadaceae, mientras que en la cloaca por Campylobacteria, Gammaproteobacteria, Helicobacteraceae y Hafniaceae (**Figura 2B y 2C**). La piel ventral aséptica está dominada por Proteobacteria, la clase Gammaproteobacteria y las familias Comamonadaceae, Pseudomonadaceae y Xanthomonadaceae (**Figura 2A, 2B y 2C**).



**Figura 3.** Heatmap de las 50 variantes de secuencia de amplicón (ASV) más abundantes (%) en la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas), piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828), y el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en última etapa de desarrollo (muestras embrionarias). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

---

---

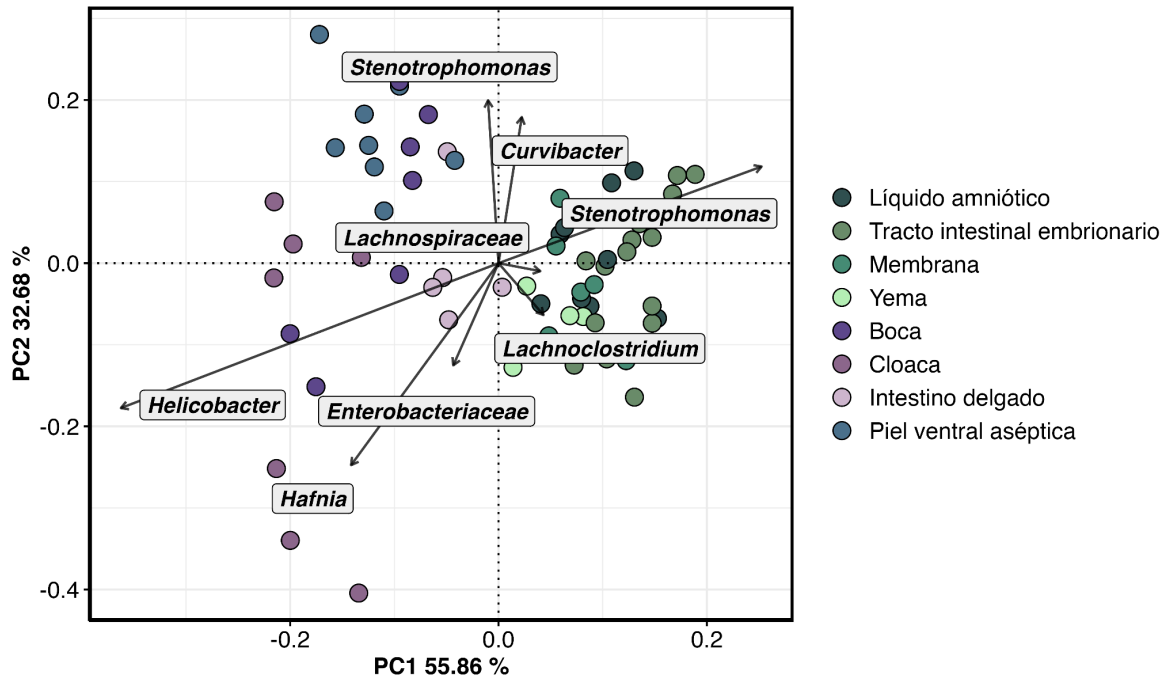
### 7.3 Composición y estructura a nivel de ASVs de la microbiota bacteriana materna y embrionaria

La ASV más abundante en todas las muestras maternas y embrionarias pertenece a *Curvibacter lanceolatus* (ASV 1) (**Figura 3**). Las ASVs 2, 8, 13, 15 y 43, abundantes en todas las muestras excepto en el intestino delgado materno, fueron identificadas como *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* y *Curvibacter*. Un grupo de ASVs exclusivo del tracto intestinal embrionario fue identificado como *Ralstonia* (ASV 10), *Bradyrhizobium* (ASV 21) y *Bosea* (ASV 45). Las muestras maternas también mostraron grupos únicos, como *Pseudomonas* (ASV 5), *Variovorax* (ASV 12) y *Stenotrophomonas rhizophila* (ASV 18), y fueron muy abundantes en la boca materna. En la cloaca materna, las ASVs más abundantes fueron *Helicobacter* (ASV 4), *Hafnia paralvei* (ASV 7) y *Hafnia* (ASV 14 y 16). En particular, la ASV 4 (*Helicobacter*) fue más abundante en la cloaca materna en comparación con todas las demás muestras. Varias ASVs, incluidas miembros de Enterobacteriaceae (ASV 9, 20, 31, 35, 37 y 42), estuvieron compartidas entre la boca materna y la cloaca. El intestino delgado materno posee un grupo de ASVs miembros de Lachnospiraceae (i.e., ASV 23, 29, 40, 34 y 48), y *Lachnoclostridium* y *Hungatella* (ASV 33 y 41). La piel ventral aséptica compartió algunos ASV con otros epitelios maternos, como la mucosa oral y cloacal, incluidos las ASV 4, 5, 12 y 18.

El PCA reveló dos grupos principales. Las muestras embrionarias formaron un grupo a la derecha muy cerca unas de otras, lo que indica menor variación en la estructura bacteriana de las muestras embrionarias, mientras que las muestras maternas formaron un grupo más disperso a la izquierda. El grupo de las muestras embrionarias está separado de la piel ventral aséptica, lo que indica que las comunidades bacterianas de los embriones son diferentes a las comunidades bacterianas del control aséptico (**Figura 4**). El perMANOVA usando distancias Aitchison mostró diferencia significativa entre la estructura de las comunidades bacterianas embrionarias y maternas, específicamente entre el ambiente amniótico, el tracto intestinal embrionario y la piel ventral aséptica, lo que explica el 66% de la varianza total ( $F = 16.11$ ,  $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.66$ ). La ASV 3, perteneciente a *Stenotrophomonas*, estuvo enriquecida en las muestras embrionarias, específicamente en el tracto intestinal embrionario. La ASV 23

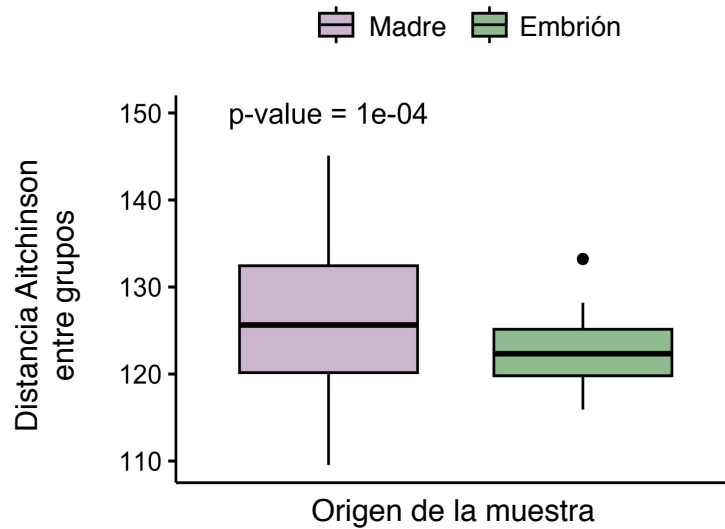


(Lachnospiraceae) y ASV 4 (*Helicobacter*) están enriquecidas en el intestino delgado y cloaca materna (**Figura 4**).



**Figura 4.** Análisis de componentes principales (PCA) de la estructura de las comunidades bacterianas a nivel de variantes de secuencia de amplicón (ASV) en la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas) y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828), y el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo (muestras embrionarias). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

Las distancias Aitchison entre las muestras embrionarias fueron significativamente más bajas que las distancias de las muestras maternas ( $P < 0.001$ ; **Figura 5**).



**Figura 5.** Distancias Aitchinson de las comunidades bacterianas de muestras maternas y embrionarias de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

#### 7.4 Posible contaminación por reactivos.

Al revisar la literatura sobre las comunidades bacterianas en ambientes con baja biomasa, encontramos un estudio que analizó los posibles contaminantes de reactivos en el meconio de bebés prematuros (Heida y cols. 2021). El estudio identificó a *Curvibacter lanceolatus* como posible contaminación del reactivo (Davis y cols. 2018). Dado que la ASV más abundante y prevalente en nuestro estudio fue *C. lanceolatus*, el mismo análisis para verificar posibles contaminantes de reactivos en nuestras muestras fue aplicado, aunque ninguno de nuestros controles de reactivos dio positivo. Identificamos cinco ASV como posibles contaminantes: grupo *Eubacterium*, *Parabacteroides*, *Lachnoclostridium*, Ruminococcaceae y Lachnospiraceae. Sin embargo, esos grupos bacterianos son típicas bacterias intestinales, por lo que descartamos que se trate de contaminantes de los kits de reactivos.

---

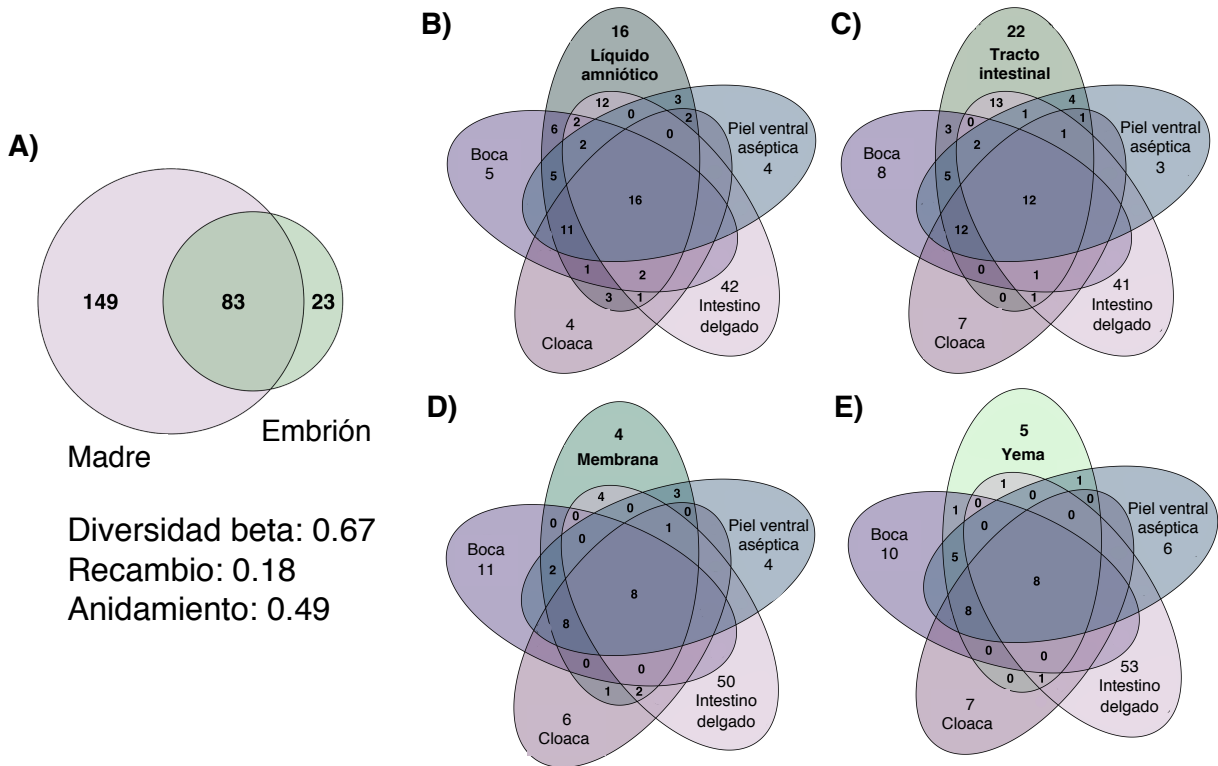
---

## 7.5 Predicción funcional de la microbiota bacteriana materna y embrionaria

Las funciones más abundantes en las muestras embrionarias estuvieron relacionadas con la degradación de compuestos aromáticos y aminoácidos, por ejemplo, degradación de leucina y 4-aminobutanoato, fermentación de piruvato y biosíntesis de NAD y del grupo hemo. La biosíntesis de cofactores, transportadores y vitaminas, fermentación y degradación de carbohidratos fueron las funciones más abundantes en los tejidos maternos, por ejemplo, degradación de fucosa y ramnosa, biosíntesis de menaquinol y dimetilmenaquinol, biosíntesis de dTDP-N-acetiltomosamina, y fermentación de piruvato y succinato (**Figura 6**). La biosíntesis de CMP-legionaminato I (ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradecy-D-glycero-D-galactonulosónico) fue exclusivo del tracto intestinal embrionario y el intestino delgado materno, mientras que la degradación de compuestos aromáticos, como la degradación de mandelato y catecol fueron exclusivas del tracto intestinal embrionario.



**Figura 6.** Heatmap de las funciones bacterianas en la boca, cloaca, intestino delgado (muestras maternas, púrpura), piel ventral aséptica (control aséptico, azul) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann 1828), y el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo (muestras embrionarias, verde). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

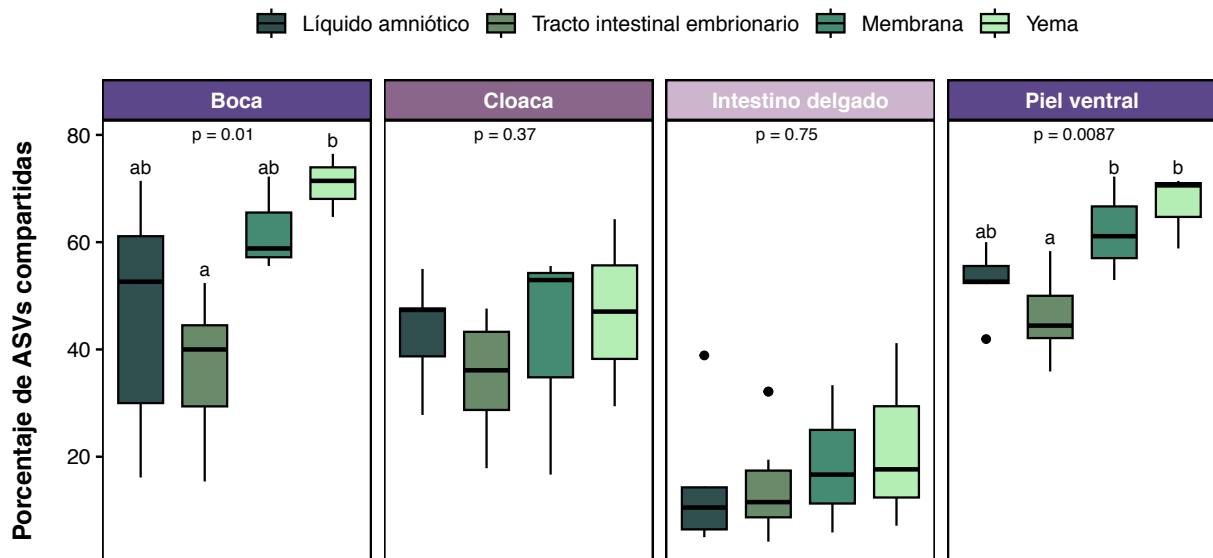


**Figura 7.** Variantes de secuencia de amplicón (ASVs) compartidas entre la boca, cloaca, intestino delgado y piel ventral aséptica (control aséptico) de hembras gestantes *Sceloporus grammicus* (Wiegmann 1828), y el líquido amniótico, tracto intestinal, membrana y yema de embriones en la última etapa de desarrollo. Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

## 7.6 Superposición de la microbiota bacteriana materna y embrionaria

Las ASVs presentes en muestras embrionarias fueron comparadas con las ASVs encontradas en las muestras maternas. Por lo tanto, encontramos que el 78% (83 de 106) de las ASVs detectadas en tejidos embrionarios también estaban presentes en tejidos maternos (**Figura 7A**). La disimilitud de Jaccard fue de 0.67, lo que significa que las especies no compartidas entre muestras maternas y embrionarias representan el 67% del total de especies. El análisis de partición de la diversidad beta en recambio y anidamiento (**Podani y Schmera 2011**), se usó para probar si las comunidades bacterianas embrionarias eran un subconjunto de la microbiota bacteriana materna. Las métricas de distancia revelaron que 0.49 (73% de la disimilitud total) fue consecuencia del anidamiento y el 0.18 (27% de la disimilitud total) del recambio de especies. La comparación de las ASVs compartidas entre las muestras embrionarias y maternas mostró una superposición significativa. El líquido amniótico compartió el 55% (45 de 82) de

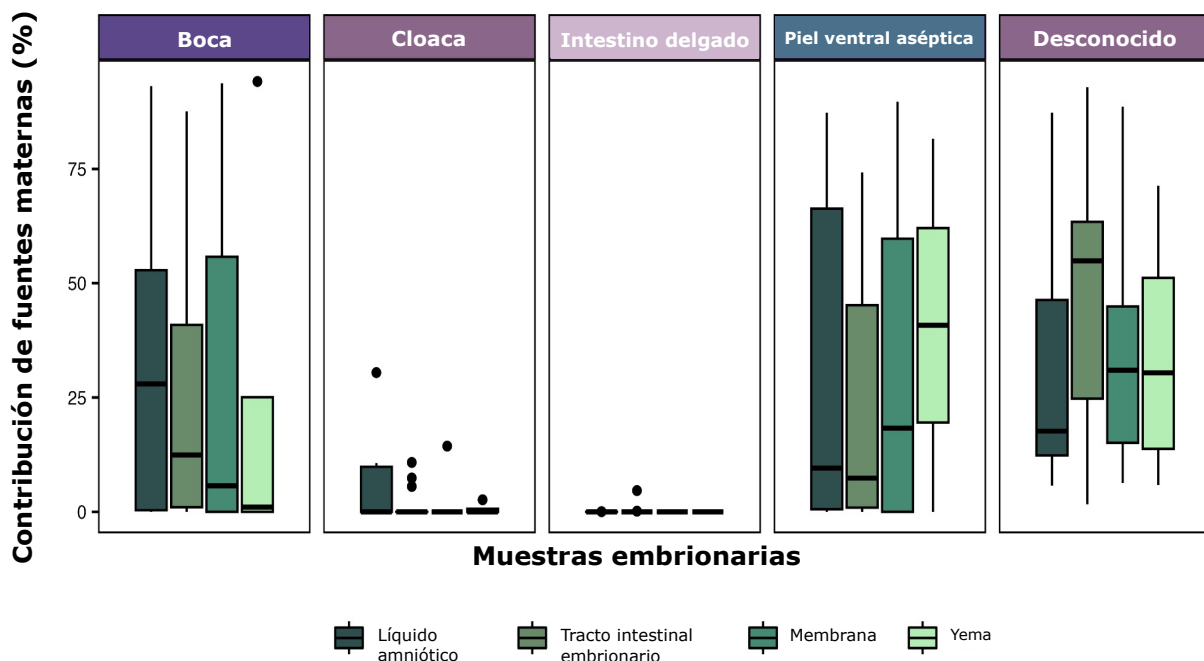
sus ASVs con la boca, el 44% (36 de 82) con la cloaca, el 42% (35 de 82) con el intestino delgado materno y el 47% (39 de 82) con la piel ventral aséptica (**Figura 7B**). Además, el 20% de las ASVs del líquido amniótico fueron compartidas con todas las muestras maternas (boca, cloaca e intestino delgado) y el 33% con todas las muestras epiteliales (boca, cloaca y piel ventral aséptica). El tracto intestinal embrionario compartió el 40% (31 de 78) de sus ASVs con el intestino delgado (el 16% de las ASVs están compartidas entre los dos intestinos), el 43% con la boca, el 36% con la cloaca materna y el 49% con la piel ventral aséptica (**Figura 7C**). Además, el 15% de las ASVs del tracto intestinal embrionario se compartieron entre todas las muestras maternas, el 30% con epitelios maternos y el 28% no se compartió con ninguna muestra materna. La yema y la membrana tienen las comunidades bacterianas más pequeñas y casi todas sus ASVs se superponen con las ASVs de los tejidos maternos (88% de la yema y 83% de la membrana; **Figura 7D y 7E**). Específicamente, la yema compartió el 73% (22 de 30) de sus ASVs con la boca, el 56% con la cloaca, el 30% con el intestino delgado materno y el 73% con la piel ventral aséptica, mientras que la membrana compartió el 54% (18 de 33) con la boca, el 60% con la cloaca, el 45% con el intestino materno y el 66% con la piel ventral aséptica.



**Figura 8.** Variantes de secuencia de amplicón (ASVs) compartidas entre cada madre y sus embriones. Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

Cuando comparamos únicamente las ASVs encontradas en las muestras embrionarias con las ASVs de los tejidos de su madre correspondiente, se obtuvo una superposición que osciló entre

el 4 y el 76 % (**Figura 8**). La mayor superposición fue detectada entre la boca materna y la piel ventral aséptica con los tejidos embrionarios, mientras que la superposición menor fue entre el intestino delgado materno y los tejidos embrionarios. La variación intraindividual en las muestras embrionarias fue baja, mientras que en las muestras maternas fue alta (**Figura 5**). El perMANOVA mostró una diferencia significativa entre las comunidades bacterianas embrionarias y maternas ( $F=7.78$ ,  $P<0.001$ ,  $R^2=0.61$ ).



**Figura 9.** Rastreo del origen bacteriano de los embriones de *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828) mediante el algoritmo FEAST (rastreo rápido de fuentes microbianas por sus siglas en inglés). Tomado de Montoya-Ciriaco y cols. 2023.

Además, el posible origen materno de las bacterias en los embriones fue determinado utilizando el análisis FEAST (rastreo rápido de fuentes microbianas por sus siglas en inglés). En general, los resultados indicaron altas contribuciones de la boca materna (media 28.2%), de la piel ventral aséptica (media 27.8%) y de fuentes desconocidas (media 45.4%) (**Figura 9**). El intestino y la cloaca materna no fueron una fuente potencial y significativa de bacterias. Más de la mitad de la composición bacteriana del tracto intestinal embrionario (54.8%) se originó de fuentes desconocidas. Este resultado fue consistente con la presencia significativa de ASVs únicos en las muestras embrionarias.

---

---

## 8. Discusión

La transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario es aún poco explorada en embriones de vertebrados. Aquí, determinamos la diversidad de genes bacterianos 16S rRNA en embriones de *S. grammicus* y su ambiente amniótico y lo comparamos con la diversidad observada en el intestino delgado, boca y cloaca materna. Es importante señalar que la presencia de DNA bacteriano no indica necesariamente la existencia de una comunidad bacteriana activa, en crecimiento y que colonice el ambiente embrionario. No obstante, pueden ocurrir interacciones biológicas transitorias entre los microorganismos y el embrión en desarrollo (**Bosch y McFall-Ngai 2021**). Las bacterias pueden inducir componentes de vías conservadas en el desarrollo animal temprano (**Yanai 2018**). Sin embargo, la posibilidad de que el DNA bacteriano traspase el ambiente embrionario es baja. Los estudios realizados en ratones (**Phillipe y Adeli 2017**) y cabras (**Steinkraus y cols. 2012**) han demostrado que la barrera placentaria proporciona una protección eficaz contra el DNA. En ratones, sin embargo, el DNA fetal fue detectado en la sangre materna en baja concentración, similar a la presencia de DNA fetal libre de células en el plasma materno observado en humanos (**Sekizawa y cols. 2003**).

Encontramos una superposición significativa y parcial entre la microbiota bacteriana embrionaria y la materna. Por ejemplo, las ASVs que fueron detectadas en el tracto intestinal embrionario no estuvieron presentes en los tejidos maternos. Lo más probable es que estas bacterias ingresaron durante las primeras etapas de desarrollo, ya que la microbiota bacteriana materna cambia durante la gestación (**Trevelline y cols. 2019**). Por lo tanto, es posible que la microbiota materna comience a moldearse para transferir verticalmente a bacterias específicas a su descendencia. La inoculación bacteriana de fuentes maternas es un proceso continuo y no único, y el proceso de colonización temprana representa un equilibrio entre la entrada y la selección bacteriana (**Ferretti y cols. 2018**). Para confirmar esto, podría realizarse una investigación similar con lagartijas en la primera etapa de gestación. Este equilibrio podría ser crítico y crucial para el programa de desarrollo de las lagartijas, lo que posiblemente induzca a una diversidad más baja de ASVs bacterianos en los embriones comparada con los tejidos



---

---

maternos. Esta baja diversidad se observó en este estudio y ha sido reportado en otros vertebrados (**Aagaard y cols. 2014**). Al nacer, los animales están expuestos a una gran variedad de bacterias ambientales provenientes de su hábitat, dieta, relaciones sociales, etc. (**Selma-Royo y cols. 2020, Coscia y cols. 2021**). A pesar de que el ambiente placentario es considerado un ambiente de baja biomasa con diversidad limitada (**Aagaard y cols. 2014**), los microorganismos en el ambiente placentario pueden afectar significativamente el desarrollo embrionario. Numerosos estudios han documentado ejemplos de bacterias patógenas que invaden el ambiente placentario con efectos perjudiciales (**Han y cols. 2004, Arce y cols. 2009, Prince y cols. 2016, de Goffau y cols. 2019**).

Casi todas las ASVs encontradas en la membrana y la yema estaban presentes en los tejidos maternos, mientras que las del líquido amniótico estaban en un nivel intermedio. Es posible que la membrana y la yema actúen como filtros para la inoculación microbiana y que las bacterias transitorias observadas en el líquido amniótico están en camino hacia el embrión. El organismo modelo, el calamar hawaiano (*Euprymna scolopes*) establece una interacción mutualista con la bacteria Gram-negativa *Vibrio fischeri*. Durante la embriogénesis, el calamar produce un cóctel complejo de péptidos antimicrobianos (AMP) para prevenir la colonización de la superficie celular de la cría por bacterias Gram-positivas (**Pacheco y Sperandio 2009, Heath-Heckman y cols. 2014**). Una composición similar de ASVs entre embriones de diferentes madres fue observada, lo que sugiere la existencia de fuertes controles de transmisión, como mecanismos de reclutamiento y selección bacterianos (**Bruijning y cols. 2022**). Las ASVs más abundantes en los embriones de *S. grammicus* fueron en su mayoría bacterias Gram-negativas (ver Figura 2.3). Por lo tanto, una hipótesis podría sugerir que, durante la formación de la membrana extraembrionaria y la yema, estas estructuras producen AMPs que filtran o seleccionan bacterias específicas.

En organismos placentarios, por ejemplo, los humanos, el tráfico transplacentario ha sido propuesto como una ruta de intercambio celular entre madre-feto. Este mecanismo podría estar involucrado en la selección de bacterias en la placenta materna y en la membrana fetal del embrión. La membrana extraembrionaria está íntimamente ligada a la placenta de *S. grammicus*

---

---

y contiene trofoblastos y células especializadas similares a las células presentes en la placenta humana (**Villagrán 1989, Thompson y cols. 2006**). Estas células epiteliales participan en la selección bacteriana y/o defensa de patógenos vía AMPs, defensinas y receptores de células T (**King y cols. 2007, Tangerås y cols. 2014, Arora y cols. 2017**). Así, una segunda hipótesis sin excluir a la primera es que la placenta constituye el primer filtro entre el ambiente materno y fetal. Sin embargo, los mecanismos exactos que rigen la restricción o promoción del acceso microbiano siguen siendo indefinidos (**Arora y cols. 2017**).

En los mamíferos, la exposición temprana a la peptidoglicana (PG) de las bacterias comensales Gram-negativas es importante para la maduración adecuada del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT) (**Bouskra y cols. 2008**). La falta de exposición a simbiontes bacterianos o exposición a patógenos durante este período crítico puede tener efectos negativos en la salud del tracto intestinal y la respuesta inmunitaria general (**Senchukova 2023**). Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas, ya sea de vida libre o asociadas con un huésped, liberan fragmentos de PG en el ambiente circundante cuando sus paredes celulares se dañan o reestructuran. El huésped detecta estos fragmentos de PG como señal de presencia bacteriana. Sin embargo, en algunas especies Gram-negativas comensales o mutualistas, se liberan cantidades significativas del monómero PG, que actúa como una señal que media una respuesta específica en el epitelio de los huéspedes susceptibles (**Pacheco y Sperandio 2009, McFall-Ngai y Ruby 2021**).

La microbiota bacteriana de los tejidos embrionarios tuvo la mayor superposición con la microbiota detectada en la boca materna y la piel ventral aséptica, seguida por la de la cloaca. La mucosa de la boca y cloaca de los reptiles comparten algunas similitudes, por ejemplo, son capas húmedas y viscosas que recubren las superficies internas de sus respectivas estructuras. Ambas contienen células glandulares que producen moco y otras sustancias para mantener la humedad y proteger la superficie de la mucosa (**Iwasaki 2002, Girling 2013, Masyitha y cols. 2020**). Sin embargo, su estructura y función difieren significativamente, estando la mucosa de la boca relacionada con la alimentación, masticación y digestión, mientras que la mucosa de la cloaca está relacionada con la eliminación de desechos y la reproducción. Aunque existen

---

---

algunas similitudes ambientales y algunas ASVs bacterianas se compartieron entre estas dos estructuras en este estudio, es probable que alberguen diferentes tipos de bacterias debido a sus distintas funciones fisiológicas (**Hernández y cols. 2023**). Las bacterias que se encontraron en la piel ventral aséptica son las bacterias que interactúan más íntimamente con el epitelio, ya que el método aséptico probablemente eliminó las capas más superficiales de bacterias. Aunque identificamos muchas ASVs compartidas entre la boca materna y la piel ventral aséptica con los tejidos embrionarios, es difícil determinar de manera concluyente que estas ASV se originan a partir de estos tejidos maternos. Los individuos a menudo albergan especies bacterianas similares, por lo que la identificación de la transmisión basada únicamente en coincidencias a nivel de especie es insuficiente. Las especies bacterianas pueden incluir múltiples variantes de cepas de subespecies que son específicas de diferentes regiones anatómicas (**Ferretti y cols. 2018**). Una posible alternativa es utilizar perfiles de tipificación a nivel de cepa para detectar y cuantificar los casos de transmisión materno-embrionaria.

Los bebés humanos nacidos por cesárea albergan bacterias intestinales similares a las que se encuentran en la piel materna, y esto es bien conocido (**Perez-Muñoz y cols. 2017**). Aún es debatido el mecanismo exacto de la transferencia bacteriana de la piel materna al intestino del recién nacido. La hipótesis predominante sugiere que las bacterias de la piel se transmiten durante el contacto o interacción de la piel del recién nacido con la madre o del recién nacido con el personal médico (**Wang y cols. 2020**). Aquí, observamos una alta similitud entre las bacterias de la piel materna y las detectadas en los embriones, a pesar de que los embriones nunca estuvieron en contacto directo con los tejidos de la piel materna. Estos hallazgos indican que las bacterias de la piel pueden transmitirse potencialmente antes del nacimiento e influir en el desarrollo de los vertebrados.

La alta similitud de las bacterias orales maternas con las bacterias de los embriones ha sido detectada en estudios de transmisión materna en humanos (**Aagaard y cols. 2014, Wassenaar y cols. 2014**). El rol y la implicación biológica de estas bacterias orales comensales en la transmisión materna es aún desconocido. Una posible explicación es que las bacterias orales facilitan la transmisión hematogena uniéndose al endotelio vascular y alterando su

---

---

permeabilidad, funcionando, así como "facilitador" para que otras bacterias comensales puedan alcanzar el ambiente placentario (Aagaard y cols. 2014). Esta habilidad para destruir la integridad del endotelio es atribuida a *Fusobacterium nucleatum* (Fardini y cols. 2011). Esta bacteria comúnmente identificada en la boca contiene adhesinas que se unen a la cadherina endotelial vascular.

En este estudio, un nivel bajo de superposición entre las ASVs intestinales embrionarias y adultas fue detectado. Kohl y cols. (2017) reportaron que las bacterias fecales de lagartos neonatos de la especie vivípara *Phymaturus williamsi* se superponen  $34\pm 6\%$  con la de sus madres, mientras que en este estudio encontramos un menor nivel de superposición ( $15\pm 10\%$ ) entre adultos de *S. grammicus* y ASVs embrionarias intestinales. En humanos recién nacidos se han detectado varias especies bacterianas de la microbiota bacteriana vaginal o de la piel materna en los primeros días de vida, pero esto es transitorio y eventualmente son reemplazadas por las bacterias intestinales típicas (Ferretti y cols. 2018). Esto podría deberse a diferencias sustanciales en las condiciones ambientales entre la placenta y el tracto intestinal después del nacimiento, como el tipo y la forma de los nutrientes ingeridos por el recién nacido, que pueden no favorecer la supervivencia de las bacterias de la piel en el ambiente intestinal. Por ejemplo, cuando se dan alimentos sólidos derivados de plantas a bebés humanos, en su intestino se han encontrado comunidades bacterianas involucradas en el metabolismo de los polisacáridos vegetales (Koenig y cols. 2011, Barko y cols. 2018). En lagartijas *S. grammicus* adultas, las comunidades bacterianas también mostraron una baja superposición entre el intestino delgado y la boca ( $4.7\pm 2.4\%$ ), piel ventral aséptica ( $4.8\pm 1.6\%$ ) y cloaca ( $5.1\pm 2.3\%$ ).

## **8.1 Grupos bacterianos y funciones putativas en las muestras maternas y embrionarias.**

Las muestras maternas estuvieron dominadas por bacterias de los Phyla Proteobacteria y Firmicutes. En humanos, Proteobacteria fue el Phylum más abundante tanto en el líquido amniótico como en la placenta (Collado y cols. 2016) y también se encontró en pandas hembras en la etapa final de la gestación (Zhao y cols. 2019). En particular, *Lachnoclostridium* y

---

---

Lachnospiraceae fueron dominantes en el intestino delgado materno de *S. grammicus*. Es conocido que la familia Lachnospiraceae es parte de la microbiota intestinal en animales y está involucrada en la fermentación de carbohidratos complejos (Vacca y cols. 2020, Wang y cols. 2020). *Lachnoclostridium* produce ácidos grasos de cadena corta como el butirato, y este contribuye a la permeabilidad del cordón umbilical de los embriones humanos (Voltolini y cols. 2012, Dai y cols. 2015). Otros grupos bacterianos como Enterobacteriaceae y *Hafnia* se identificaron en la cloaca materna, y estudios previos han demostrado que estas bacterias están enriquecidas en el tracto intestinal y en el aparato reproductor de mujeres embarazadas con sobrepeso (Collado y cols. 2008, Koren y cols. 2012). Estos estudios informaron que estos taxones inducen insensibilidad a la insulina materna y adiposidad, lo que facilita el almacenamiento de energía y aumenta la disponibilidad de nutrientes en el plasma para la transferencia al embrión (Collado y cols. 2008). *Helicobacter* mostró una alta abundancia relativa significativa en la boca y en la cloaca, en comparación con las otras muestras maternas. Una alta prevalencia similar de *Helicobacter* ha sido observada en muestras orales y cloacales de cocodrilos del Orinoco, lo que genera preocupación sobre la posible transmisión de enfermedades zoonóticas (Rudolf y cols. 2018). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para investigar con más detalle la posible función de *Helicobacter* como microbiota bacteriana comensal en reptiles. No obstante, para comprender mejor el papel de estos grupos taxonómicos bacterianos maternos en el desarrollo embrionario de las lagartijas, es importante evaluar los cambios bacterianos durante la gestación y correlacionarse con los cambios presentes en el embrión y el ambiente amniótico. Además, estudiar los cambios en la microbiota y el perfil metabólico de las madres durante la gestación podría proporcionar información sobre sus posibles funciones en el desarrollo embrionario.

*Curvibacter lanceolatus*, *Stenotrophomonas* y *Brevundimonas* fueron los géneros más abundantes en los tejidos embrionarios y en la boca, cloaca y piel ventral aséptica materna de *S. grammicus*. *Stenotrophomonas* se ha detectado en otras zonas del cuerpo humano, e.g. líquido cefalorraquídeo o sangre, (Berg y Martínez 2015) y sus funciones principales son la degradación de carbohidratos (Morales-Jiménez y cols. 2012, Dantur y cols. 2015). Cabe destacar que *Stenotrophomonas* también fue abundante en los tejidos embrionarios de lagartijas

---

---

con un probable origen en los tejidos maternos. Esto sugiere que *Stenotrophomonas* podría desempeñar un papel importante en el ambiente amniótico, aunque se necesita más investigación para comprender las funciones específicas de esta bacteria.

Las ASVs pertenecientes a *Ralstonia* fueron exclusivas del tracto intestinal embrionario. Es difícil especular sobre la presencia de *Ralstonia* en el embrión. En general, estas bacterias pueden colonizar diferentes zonas del cuerpo animal, incluida la cavidad oral (**Tian y cols. 2022**), el tracto intestinal (**Udayappan y cols. 2017**), los órganos reproductivos (**Koedooder y cols. 2020**) y se ha encontrado en las heces de *S. grammicus* (**Montoya-Ciriaco y cols. 2020**). En humanos, se ha informado que *Ralstonia* forma parte de la microbiota central de la leche materna y contribuye a estimular el desarrollo y maduración del sistema inmune (**Murphy y cols. 2017, Jost y cols. 2013**). En otros estudios, *Ralstonia* se ha identificado como residente de la interfaz materno-embionaria, e.g. la decidua endometrial, la placenta, el corion y el amnios (**Parnell y cols. 2017, Parnell y cols. 2019**).

Investigamos las funciones potenciales de las comunidades bacterianas tanto en el embrión como en la madre para comprender sus posibles funciones. Las funciones predichas relacionadas con la degradación de la mucina, como las vías de degradación de fucosa y ramnosa, fueron más abundantes en las muestras maternas (boca, cloaca e intestino delgado). Esto sugiere la presencia de bacterias que utilizan la mucina como fuente de carbono (**Asnicar y cols. 2017**). Además, las funciones relacionadas con el metabolismo de carbohidratos indican la presencia de bacterias estrictamente anaerobias en el intestino materno y bacterias aerobias o anaerobias facultativas en el tracto intestinal embrionario (**Houghteling y Walker 2015**). Otra función descrita que fue más abundante en las muestras maternas está relacionada con la biosíntesis de vitamina K, específicamente “la supervía de biosíntesis de menaquinol y dimetilmenaquinol”. La vitamina K es un metabolito secundario producido por bacterias mutualistas, lo que destaca la asociación de la microbiota bacteriana con su huésped e ilustra la comunidad bacteriana más compleja en la madre en comparación con la microbiota del embrión. Adicionalmente, las vías de fermentación de piruvato y succinato fueron más abundantes en las muestras maternas que en las muestras embrionarias. Estas vías producen ácidos grasos de

---

---

cadena corta, e.g. acetato, propionato y butirato (Koh y cols. 2016). Estos metabolitos pueden ser usados por las células epiteliales intestinales de la madre como fuente de energía y podrían contribuir a la diferenciación del epitelio embrionario (Morrison 2016, Oliphant y cols. 2019).

Vías relacionadas a la biosíntesis de cofactores y vitaminas, e.g. NAD y la biosíntesis del grupo hemo fueron más abundantes en las muestras embrionarias. Estas moléculas son aceptores o donadores de electrones, obtienen energía del metabolismo y participan en la glucólisis, gluconeogénesis y estrés oxidativo (Yu y cols. 2021). Estas vías podrían jugar un papel importante en la obtención de energía para el desarrollo del embrión y generar un equilibrio redox en el ambiente amniótico.

Una función relacionada con el metabolismo de L-leucina fue muy abundante en las comunidades bacterianas embrionarias y maternas. La leucina ha sido identificada como un precursor importante para la biosíntesis de ácidos grasos en tejidos embrionarios (Feller y Feist 1962). Los ácidos grasos y las proteínas son componentes importantes de los tejidos embrionarios, principalmente en la yema (Speake y Thompson 2000). Durante el desarrollo, la madre suministra precursores de estos componentes al embrión a través de las membranas fetales, lo que podría explicar la gran abundancia de esta función tanto en la madre como en el embrión. La biosíntesis de CMP-legionaminato fue exclusiva del intestino materno y embrionario. Esta función está implicada en la modulación del sistema inmune (Schoenhofen y cols. 2009). Esto podría indicar que la interacción bacteria-intestino está participando en la maduración del sistema inmunológico de los embriones en desarrollo de la lagartija *S. grammicus*.

## **8.2 Impacto ecológico y evolutivo de la transferencia vertical de microbiota en reptiles.**

La lagartija vivípara *S. grammicus* ha desarrollado adaptaciones a las condiciones ambientales difíciles en las montañas altas del centro de México. Estas adaptaciones incluyen cambios en la morfología, fisiología, comportamiento, microbioma intestinal e historia de vida (Díaz de la

---

---

**Vega-Pérez y cols. 2019, Domínguez-Godoy y cols. 2020, Plasman y cols. 2020, Montoya-Ciriaco y cols. 2020, Domínguez-Godoy y cols. 2022).** La evidencia de otras especies de *Sceloporus* indica que las adaptaciones en la placenta pueden permitir el intercambio de nutrientes para mantener el desarrollo de los embriones en condiciones ambientales restrictivas (**Blackburn y cols. 2010**). Existe evidencia de transferencia y secreción uterina, así como absorción fetal en otras especies lecitotróficas vivíparas (**Villagrán y cols. 2005**), lo que podría afectar eventos importantes de la historia de vida (**Thompson y cols. 2006, Blackburn 2015**). **Bruijning y cols. (2022)** demostraron que la transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario puede aumentar la variación fenotípica entre huéspedes, lo que podría desempeñar un papel en la radiación adaptativa en lagartijas. Este fenómeno ocurre cuando una sola especie ancestral de lagartija evoluciona en múltiples especies distintas, cada una adaptada a diferentes nichos ecológicos. La capacidad de las lagartijas para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, combinada con la presión selectiva de varios nichos ecológicos, puede haber contribuido a la radiación adaptativa en las lagartijas (**Hall 2009, Ren y cols. 2016, Wollenberg y cols. 2019**). Nuestros hallazgos sugieren la posibilidad de que la lagartija vivípara *S. grammicus* haya desarrollado adaptaciones a las duras condiciones ambientales, y podría implicar adaptaciones en la placenta, incluidos los mecanismos de transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario. Estudios anteriores encontraron que las lagartijas lecitotróficas dependen de los nutrientes de la yema para el desarrollo del embrión, mientras que el calcio y los nutrientes de tamaño pequeño se obtienen a través de la placenta (**Stewart 2013**). Los resultados informados en este estudio mostraron que un grupo selectivo de bacterias que se encuentran en el embrión también se obtienen a través de la placenta. Queda por descubrir la función de la placenta para incorporar o restringir la inclusión de estas bacterias.

Nuestros hallazgos también destacan la importancia de la transferencia vertical de microorganismos durante el desarrollo embrionario como un efecto materno crucial que puede afectar la supervivencia de la descendencia a su entorno. Los efectos maternos se refieren a la influencia que tiene la madre sobre los rasgos fenotípicos de su descendencia, independientemente de la herencia genética (**Mousseau y cols. 1998**). Esto puede suceder a través de diversos mecanismos, e.g. la transferencia de nutrientes, hormonas y otras moléculas



---

---

a través de la placenta o la yema, la interacción madre-hijo durante el cuidado parental y la exposición de la descendencia a su microbiota. Aún se desconoce si este último tiene un valor adaptativo para la madre o para el embrión. Sin embargo, algunos mecanismos propuestos sugieren que el feto puede obtener energía de la sangre de la madre de manera más eficiente, o que las bacterias productoras de metabolitos, e.g. butirato, mantienen las funciones del epitelio intestinal fetal y promueven la tolerancia inmunológica de la madre (**Koren y cols. 2012, Blaser y Dominguez-Bello. 2016**).

---

---

## 9. Conclusiones

En conclusión, en este estudio fueron detectados genes bacterianos 16S rRNA en los embriones de *S. grammicus*. Sin embargo, la diversidad es baja y la estructura de la comunidad bacteriana es similar entre los embriones. Esto sugiere que existen fuertes controles sobre la transmisión materna de microorganismos al embrión. Una superposición significativa y parcial fue detectada entre la microbiota materna y embrionaria, lo que sugiere que la transmisión bacteriana materna a la descendencia es un proceso continuo y que algunas bacterias podrían haberse transferido durante la primera etapa embrionaria. Las bacterias embrionarias se superponen principalmente con las bacterias presentes en la boca materna y la piel ventral aséptica. No obstante, es difícil concluir que las ASV compartidas se originan a partir de estos tejidos maternos. En general, nuestros resultados destacan la importancia de la transferencia vertical bacteriana durante el desarrollo embrionario en *S. grammicus*.

---

---

## 10. Perspectivas

Este estudio detectó bacterias en el ambiente amniótico del embrión de *S. grammicus*, estos resultados enaltecen y aumentan la evidencia de transferencia vertical de microbiota antes del nacimiento en el Reino Animal. Sin embargo, aún quedan espacios por cubrir en este tema tan controversial y debatible en vertebrados mamíferos y no mamíferos. Nuestro estudio está basado en metabarcoding del 16S rRNA y así identificamos algunas bacterias en el ambiente amniótico. No obstante, más estudios basados en metagenómica shotgun darían información más extensa para la identificación taxonómica de los microorganismos, además de proporcionar evidencia más certera de las funciones de estos microorganismos. Por otro lado, incorporar el uso de las ciencias ómicas como la metabolómica o proteómica para determinar los metabolitos producidos por las bacterias presentes en el ambiente placentario de los animales vertebrados, daría un gran paso en esta búsqueda de transferencia vertical de microbiota durante el desarrollo embrionario. Además, estos productos derivados de la actividad bacteriana podrían contribuir en el rastreo del origen materno de estos microorganismos y a su vez en las posibles rutas o vías en las que las bacterias maternas son trasladadas al ambiente placentario de la descendencia.

Las preguntas de investigación que se pueden abordar son: ¿Cuáles son las funciones primordiales que llevan a cabo estas bacterias durante el desarrollo embrionario? ¿Qué metabolitos y componentes de proteínas participan en el desarrollo embrionario del huésped? y ¿Cuáles son los mecanismos involucrados en el origen, diseminación y selección bacteriana? Las respuestas a estas preguntas son cruciales para la biología del desarrollo en el Reino Animal.

---

---

## 11. Referencias

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6:237ra65-237ra65.
- Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, Raza C, Rosenbaum S, Van den Veyver I, Milosavljevic A, Gevers D, Huttenhower C, Petrosino J, Versalovic J. 2012. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One* 7:6.
- Al-Bahry S, Mahmoud I, Elshafie A, Al-Harthy A, Al-Ghafri S, Al-Amri I, Alkindi A. 2009. Bacterial flora and antibiotic resistance from eggs of green turtles *Chelonia mydas*: an indication of polluted effluents. *Mar Pollut Bull* 58:720-725.
- Alberdi A, Gilbert MTP. 2019. A guide to the application of Hill numbers to DNA-based diversity analyses. *Mol Ecol Resour* 19:804-817.
- Arce RM, Barros SP, Wacker B, Peters B, Moss K, Offenbacher S. 2009. Increased TLR4 expression in murine placentas after oral infection with periodontal pathogens. *Placenta* 30:156-162.
- Armour NK, Ferguson-Noel N. 2015. Evaluation of the egg transmission and pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* isolates genotyped as ts-11. *Avian Pathol* 44:296-304.
- Arora N, Sadovsky Y, Dermody TS, Coyne CB. 2017. Microbial vertical transmission during human pregnancy. *Cell Host Microbe* 21:561-567.
- Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Truong DT, Scholz M, Armanini F, Ferreti P, Gorfer V, Pedrotti A, Tett A, Segata N. 2017. Studying vertical microbiome transmission from mothers to infants by strain-level metagenomic profiling. *MSystems* 2:e00164-16.
- Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. 2018. The gastrointestinal microbiome: a review. *J Vet Intern Med* 32:9-25.
- Barrios Montiel Rodrigo. 2018. Implicaciones ecofisiológicas del gradiente altitudinal en *Sceloporus grammicus*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.

- 
- 
- Baselga A, Orme CDL. 2012. betapart: an R package for the study of beta diversity. *Methods Ecol Evol* 3:808-812.
- Baumann P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu Rev Microbiol* 59:155-189.
- Berg G, Martinez JL. 2015. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex?. *Front Microbiol* 6:241.
- Blackburn DG, Gavelis GS, Anderson KE, Johnson AR, Dunlap KD. 2010. Placental specializations of the mountain spiny lizard *Sceloporus jarrovi*. *J Morphol* 271:1153-1175.
- Blackburn DG. 2015. Viviparous placentotrophy in reptiles and the parent–offspring conflict. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 324:532-548.
- Blaser MJ, Dominguez-Bello MG. 2016. The human microbiome before birth. *Cell Host Microbe* 20:558-560.
- Bokulich NA, Dillon MR, Bolyen E, Kaehler BD, Huttley GA, Caporaso JG. 2018. q2-sample-classifier: machine-learning tools for microbiome classification and regression. *J Open Res Softw* 3(30).
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA., Alexander H, Alm EJ, Arumugan M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmuch AK, Jian L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kreps J, Languille MG, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, MacDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Ochanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen, Rivers A, Robeson 2nd MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, U1-Hasan S, Van der Hooft JJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, Von Hippel M, Walters

- 
- 
- W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CH, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37:852-857.
- Bosch TC, McFall-Ngai M. 2021. Animal development in the microbial world: Re-thinking the conceptual framework. *Curr Top Dev Biol* 141:399-427.
- Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, Eberl G. 2008. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456:507-510.
- Brandley MC, Young RL, Warren DL, Thompson MB, Wagner GP. 2012. Uterine gene expression in the live-bearing lizard, *Chalcides ocellatus*, reveals convergence of squamate reptile and mammalian pregnancy mechanisms. *Genome Biol Evol* 4:394-411.
- Bright M, Bulgheresi S. 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nat Rev Microbiol* 8:218-230.
- Brock JA, Bullis R. 2001. Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. *Aquac* 197:137-159.
- Bruijning M, Henry LP, Forsberg SK, Metcalf CJE, Ayroles JF. 2022. Natural selection for imprecise vertical transmission in host–microbiota systems. *Nat Ecol Evol* 6:77-87.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581-583.
- Caspi R, Billington R, Ferrer L, Foerster H, Fulcher CA, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Mueller LA, Ong Q, Paley S, Subhraveti P, Weaver DS, Karp PD. 2016. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* 44:D471-D480.
- Chen H, Boutros PC. 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC bioinformatics* 12:1-7.
- Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 88:894-899.

- 
- 
- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. 2016. Human gut colonization may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 6:23129.
- Colston TJ, Jackson CR. 2016. Microbiome evolution along divergent branches of the vertebrate tree of life: what is known and unknown. *Mol Ecol* 25:3776-3800.
- Coscia A, Bardanzellu F, Caboni E, Fanos V, Peroni DG. 2021. When a neonate is born, so is a microbiota. *Life* 11:148.
- Dai Z, Wu Z, Hang S, Zhu W, Wu G. 2015. Amino acid metabolism in intestinal bacteria and its potential implications for mammalian reproduction. *Mol Hum Reprod* 21:389-409.
- Dantur KI, Enrique R, Welin B, Castagnaro AP. 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *Amb Express* 5:1-11.
- Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6:226.
- De Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, Parkhill J, Charnock-Jones DS, Smith GC. 2019. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature* 572:329-334.
- De Moraes PB, De Oliveira KW, Malvácio A, de Ataíde AG, Pimenta RS. 2010. Enterobacteriaceae associated with eggs of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines: Chelonia) in nonpolluted sites of National Park of Araguaia Plains, Brazil. *J Zoo Wildl Med* 41:656-661.
- Di Simone N, Santamaria Ortiz A, Specchia M, Tersigni C, Villa P, Gasbarrini A, Scambia G, D'Ippolito S. 2020. Recent Insights on the Maternal Microbiota: Impact on Pregnancy Outcomes. *Front Immunol* 11:2372.
- Díaz de la Vega-Pérez AH, Barrios-Montiel R, Jiménez-Arcos VH, Bautista A, Bastiaans E. 2019. High-mountain altitudinal gradient influences thermal ecology of the Mesquite Lizard (*Sceloporus grammicus*). *Can J Zool* 97:659-668.

- 
- 
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R, Gordon JI. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci* 107:11971-11975.
- Domínguez-Godoy MA, Hudson R, Pérez-Mendoza HA, Ancona S, Díaz de la Vega-Pérez AH. 2020. Living on the edge: Lower thermal quality but greater survival probability at a high altitude mountain for the mesquite lizard (*Sceloporus grammicus*). *J Therm Biol* 94:102757.
- Domínguez-Godoy MA, Hudson R, Montoya B, Bastiaans E, Díaz de la Vega-Pérez AH. 2022. Too cool to fight: Is ambient temperature associated with male aggressive behavior in the mesquite lizard?. *J Zool* 317:283-293.
- Douglas AE. 2010. The symbiotic habit, p 232. Princeton University Press.
- Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MG. 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol* 38:685-688.
- Fardini Y, Wang X, Témoin S, Nithianantham S, Lee D, Shoham M, Han YW. 2011. *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol* 82:1468-1480.
- Feller DD, Feist E. 1962. The conversion of leucine carbon into CO<sub>2</sub>, fatty acids and other products by adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 62:40-44.
- Ferretti P, Pasolli E, Tett A, Asnicar F, Gorfer V, Fedi S, Armanini F, Truong DT, Manara S, Zolfo M, Beghini F, Bertorelli R, De Sanctis V, Bariletti I, Canto R, Clementi R, Cologna M, Crifò T, Cusumano G, Gottardi S, Innamorati C, Masè C, Postai D, Savoi D, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Turrone F, Ferrario C, Milani C, Mangifesta M, Anzalone R, Viappiani A, Yassour M, Vlamakis H, Xavier R, Collado CM, Koren O, Tateo S, Soffiati M, Pedrotti A, Ventura M, Huttenhower C, Bork P, Segata N. 2018. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host Microbe* 24:133-145.



- 
- 
- Funkhouser LJ, Bordenstein SR. 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol* 11:e1001631.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol Rev* 33:718-738.
- Gilbert SF, Bosch TC, Ledón-Rettig C. 2015. Eco-Evo-Devo: developmental symbiosis and developmental plasticity as evolutionary agents. *Nat Rev Genet* 16:611-622.
- Girling SJ. 2013. Basic reptile and amphibian anatomy and physiology, p 245-265. *In* *Veterinary Nursing of Exotic Pets*, 2nd ed. Wiley-Blackwell.
- Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, Bruns G, Yarza P, Peplies J, Westram R, Ludwig W. 2017. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *J Biotechnol* 261:169-176.
- Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. 2017. Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Front Microbiol* 8:2224.
- Gloor GB, Reid G. 2016. Compositional analysis: a valid approach to analyze microbiome high-throughput sequencing data. *Can J Microbiol* 62:692-703.
- Goffredi SK, Barry JP. 2002. Species-specific variation in sulfide physiology between closely related Vesicomysid clams. *Mar Ecol Prog Ser* 225:227-238.
- Gosalbes MJ, Llop S, Valles Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. 2013. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical & Experimental Allergy* 43:198-211.
- Gould AL, Zhang V, Lamberti L, Jones EW, Obadia B, Korasidis N, Gavryushkin A, Carlson JM, Beerenwinkel N, Ludington WB. 2018. Microbiome interactions shape host fitness. *Proc Natl Acad Sci* 115:E11951-E11960.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M. 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32:2847-2849.
- Hall WP. 2009. Chromosome variation, genomics, speciation and evolution in *Sceloporus* lizards. *Cytogenet Genome Res* 127:143-165.

- 
- 
- Han YW, Redline RW, Li M, Yin L, Hill GB, McCormick TS. 2004. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect Immun* 72:2272-2279.
- Heath-Heckman EA, Gillette AA, Augustin R, Gillette MX, Goldman WE, McFall-Ngai MJ. 2014. Shaping the microenvironment: evidence for the influence of a host galaxin on symbiont acquisition and maintenance in the squid-vibrio symbiosis. *Environ Microbiol* 16:3669-3682.
- Heida FH, Kooi EM, Wagner J, Nguyen TY, Hulscher JB, van Zoonen AG, Bos AF, Harmsen HJ, de Goffau MC. 2021. Weight shapes the intestinal microbiome in preterm infants: results of a prospective observational study. *BMC Microbiol* 21:1-12.
- Hernández M, Ancona S, Díaz de la Vega-Pérez AH, Navarro-Noya YE. 2023. Comparative analysis of two non-lethal methods for the study of the gut bacterial communities in wild lizards. *Integr Zool*.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292:1115-1118.
- Hothorn T, Hornik K, Van De Wiel MA, Zeileis A. 2008. Implementing a class of permutation tests: the coin package. *J Stat Softw* 28:1-23.
- Houghteling PD, Walker WA. 2015. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health?. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 60:294-307.
- Iwasaki SI. 2002. Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. *J Anat* 201:1-13.
- Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L Rodríguez JM. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile?. *Res Microbiol* 159:187-193.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 110:1253-1262.

- 
- 
- Kaiwa N, Hosokawa T, Nikoh N, Tanahashi M, Moriyama M, Meng XY, Maeda T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ito M, Fukatsu T. 2014. Symbiont-supplemented maternal investment underpinning host's ecological adaptation. *Curr Biol* 24:2465-2470.
- Khosravi A, Yáñez A, Price JG, Chow A, Merad M, Goodridge HS, Mazmanian SK. 2014. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* 15:374-381.
- King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JRG. 2007. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 28:161-169.
- Koedooder R, Mackens S, Budding A, Fares D, Blockeel C, Laven J, Schoenmakers S. 2019. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum Reprod Update* 25:298-325.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci* 108:4578-4585.
- Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. 2016. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* 165:1332-1345.
- Kohl KD, Brun A, Magallanes M, Brinkerhoff J, Laspiur A, Acosta JC, Caviedes-Vidal E, Bordenstein SR. 2017. Gut microbial ecology of lizards: insights into diversity in the wild, effects of captivity, variation across gut regions and transmission. *Mol Ecol* 26:1175-1189.
- Koleva PT, Kim JS, Scott JA, Kozyrskyj AL. 2015. Microbial programming of health and disease starts during fetal life. *Birth Defects Res C Embryo Today* 105:265-277.
- Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, Gonzalez A, Werner JJ, Angenent LT, Knight R, Bäckhed F, Isolauri E, Salminen S, Ley RE. 2012. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 150:470-480.
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 31:814-821.

- 
- 
- Lemos-Espinal JA, Smith HM. 2007. Anfibios y reptiles del Estado de Chihuahua, México. México, p 613. CONABIO-UNAM.
- Masyitha D, Maulidar L, Zainuddin Z, Salim MN, Aliza D, Gani FA, Rusli R. 2020. Histology of watersnake (*Enhydris Enhydris*) digestive system, p 01052. In E3S Web of Conferences, vol. 151. EDP Sciences.
- Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. 2014. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci* 34:15490-15496.
- McFall-Ngai M, Ruby E. 2021. Getting the Message Out: the Many Modes of Host-Symbiont Communication during Early-Stage Establishment of the Squid-Vibrio Partnership. *Msystems* 6:e00867-21.
- Méndez de la Cruz FR, Díaz de la Vega-Pérez AH, Centenero-Alcalá H, Jiménez-Arcos VH. 2018. Anfibios y Reptiles del Parque Nacional La Malinche, p 138. Universidad Autónoma de Tlaxcala, ISBN-978-607-545-013-1.
- Mika K, Okamoto AS, Shubin NH, Mark Welch DB. 2021. Bacterial community dynamics during embryonic development of the little skate (*Leucoraja erinacea*). *Anim microbiome* 3:1-14.
- Moeller AH, Foerster S, Wilson ML, Pusey AE, Hahn BH, Ochman H. 2016. Social behavior shapes the chimpanzee pan-microbiome. *Science Advances* 2:e1500997.
- Montoya-Ciriaco N, Gómez-Acata S, Muñoz-Arenas LC, Dendooven L, Estrada-Torres A, Díaz de la Vega-Pérez AH, Navarro-Noya YE. 2020. Dietary effects on gut microbiota of the mesquite lizard *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828) across different altitudes. *Microbiome* 8:1-19.
- Morales-Jiménez J, Zúñiga G, Ramírez-Saad HC, Hernández-Rodríguez C. 2012. Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. *Microb Ecol* 64:268-278.
- Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, Alonso R, Alamá P, Remohí J, Pellicer A, Ramon D, Simon C. 2016. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol* 215:684-703.

- 
- 
- Morrison DJ, Preston T. 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7:189-200.
- Mousseau TA, Fox CW. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecol Evol* 13:403-407.
- Mueller UG, Sachs JL. 2015. Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends Microbiol* 23:606-617.
- Murphy K, Curley D, O’Callaghan TF, O’Shea CA, Dempsey EM, O’Toole PW, Ross RP, Ryan CA, Stanton C. 2017. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: a pilot study. *Sci Rep* 7:40597.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2019. R package ‘vegan’: Community Ecology Package.
- Oliphant K, Allen-Vercoe E. 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome* 7:1-15.
- Pacheco AR, Sperandio V. 2009. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol* 12:192-198.
- Parnell LA, Briggs CM, Cao B, Delannoy-Bruno O, Schrieffer AE, Mysorekar IU. 2017. Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles. *Sci Rep* 7:11200.
- Parnell LA, Willsey GG, Joshi CS, Yin Y, Wargo MJ, Mysorekar IU. 2019. Functional characterization of *Ralstonia insidiosa*, a bona fide resident at the maternal-fetal interface. *bioRxiv* 10.1101:721977.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. 2017. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 5:1-19.
- Phillippe M, Adeli S. 2017. Cell-free DNA release by mouse placental explants. *PLoS One* 12:e0178845.
- Pinheiro JC, Bates DM. 2000. Theory and computational methods for nonlinear mixed-effects models. *In* *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. 1st ed. Springer, New York, NY.

- 
- 
- Plasman M, Bautista A, McCue MD, Díaz de la Vega-Pérez AH. 2020. Resting metabolic rates increase with elevation in a mountain-dwelling lizard. *Integr Zool* 15:363-374.
- Podani J, Schmera D. 2011. A new conceptual and methodological framework for exploring and explaining pattern in presence-absence data. *Oikos* 120:1625-1638.
- Prince AL, Ma J, Kannan PS, Alvarez M, Gisslen T, Harris RA, Sweeney EL, Knox CL, Lambers DS, Jobe AH, Chougnet CA, Kallapur SG, Aagaard KM. 2016. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 214:627-e1.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>.
- Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci* 101:4596-4601.
- Ren T, Kahrl AF, Wu M, Cox RM. 2016. Does adaptive radiation of a host lineage promote ecological diversity of its bacterial communities? A test using gut microbiota of *Anolis* lizards. *Mol Ecol* 25:4793-4804.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361-367.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. Vsearch: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584.
- Rook G, Bäckhed F, Levin BR, McFall-Ngai MJ, McLean AR. 2017. Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *Lancet* 390:521-530.
- Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, Costea PI, Godneva A, Kalka IN, Bar N, Shilo S, Lador D, Vila AV, Zmora N, Pevsner-Fischer M, Israeli D, Kosower N, Malka G, Wolf BC, Avnit-Sagi T, Lotan-Pompan M, Weinberger A, Halpern Z, Carmi S, Fu J, Wijmenga C, Zhernakova A, Elinav E, Segal S. 2018.

- 
- 
- Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555:210.
- Rudolf CA, Jaimes A, Espinosa-Blanco AS, Contreras M, García-Amado MA. 2018. Oral and Cloacal *Helicobacter* Detection in Wild and Captive Orinoco Crocodiles (*Crocodylus intermedius*) in Venezuela. *Vector Borne Zoonotic Dis* 18:567-569.
- Sacchi L, Grigolo A, Mazzini M, Bigliardi E, Baccetti B, Laudani U. 1988. Symbionts in the oocytes of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): Their mode of transmission. *Int J Insect Morphol Embryol* 17:437-446.
- Schoenhofen IC, Vinogradov E, Whitfield DM, Brisson JR, Logan SM. 2009. The CMP-legionaminic acid pathway in *Campylobacter*: biosynthesis involving novel GDP-linked precursors. *Glycobiol* 19:715-725.
- Schoenmakers S, Steegers-Theunissen R, Faas M. 2019. The matter of the reproductive microbiome. *Obstet Med* 12:107-115.
- Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K, Saito H, Okai T. 2003. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet* 113:307-310.
- Selma-Royo M, Calatayud Arroyo M, García-Mantrana I, Parra-Llorca A, Escuriet R, Martínez-Costa C, Collado MC. 2020. Perinatal environment shapes microbiota colonization and infant growth: impact on host response and intestinal function. *Microbiome* 8:1-19.
- Senchukova MA. 2023. Microbiota of the gastrointestinal tract: Friend or foe?. *World J Gastroenterol* 29:19.
- Shenhav L, Thompson M, Joseph TA, Briscoe L, Furman O, Bogumil D, Mizrahi I, Pe'er I, Halperin E. 2019. FEAST: rapid maximization of expectations for the monitoring of microbial sources. *Nat Methods* 16:627-632.
- Sites JW, Archie JW, Cole CJ, Flores-Villela O. 1992. A review of phylogenetic hypotheses for lizards of the genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae): implications for ecological and evolutionary studies, p 110. Bulletin of the AMNH.
- Speake BK, Thompson MB. 2000. Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 127:453-467.

- 
- 
- Steinkraus HB, Rothfuss H, Jones JA, Dissen E, Shefferly E, Lewis RV. 2012. The absence of detectable fetal microchimerism in nontransgenic goats (*Capra aegagrus hircus*) bearing transgenic offspring. *J Anim Sci* 90:481-488.
- Stewart JR. 2013. Fetal nutrition in lecithotrophic squamate reptiles: toward a comprehensive model for evolution of viviparity and placentation. *J Morphol* 274:824-843.
- Su Q, Wang Q, Mu X, Chen H, Meng Y, Zhang X, Zheng L, Hu X, Zhai Y, Zheng H. 2021. Strain-level analysis reveals the vertical microbial transmission during the life cycle of bumblebee. *Microbiome* 9:1-14.
- Tangerås LH, Stødle GS, Olsen GD, Leknes AH, Gundersen AS, Skei B, Vikdal AJ, Ryan L, Steinkjer B, Myklebost MF, Langaas M, Austgulen R, Iversen AC. 2014. Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. *J Reprod Immunol* 106:89-99.
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:295-347.
- Thompson MB, Biazik JB, Lui S, Adams SM, Murphy CR. 2006. Morphological and functional changes to the uterus of lizards with different placental complexities. *Herpetol Monogr* 20:178-185.
- Tian Z, Pu H, Cai D, Luo G, Zhao L, Li K, Zou J, Zhao X, Yu M, Wu Y, Yang T, Guo P, Hu X. 2022. Characterization of the bacterial microbiota in different gut and oral compartments of splendid japalure (*Japalura sensu lato*). *BMC Vet Res* 18:205.
- Trevelline BK, MacLeod KJ, Knutie SA, Langkilde T, Kohl KD. 2018. In ovo microbial communities: a potential mechanism for the initial acquisition of gut microbiota among oviparous birds and lizards. *Biol Lett* 14:20180225.
- Trevelline BK, MacLeod KJ, Langkilde T, Kohl KD. 2019. Gestation alters the gut microbiota of an oviparous lizard. *FEMS Microbiol Ecol* 95:fiz086.
- Udayappan SD, Kovatcheva-Datchary P, Bakker GJ, Havik SR, Herrema H, Cani PD, Bouter KE, Belzer C, Witjes JJ, Vrieze A, Victoria de Sonaville ES, Chaplin A, Van Raalte DH, Aalvink S, Dallinga-Thie GM, Heilig HG, Bergström G, Van Der Meij S, Van wagensveld BA, Hoekstra JB, Holleman F, Stroes ES, Groen AK, Bäckhed F, M de Vos Willem, Nieuwdorp M. 2017. Intestinal *Ralstonia pickettii* augments glucose intolerance in obesity. *PLoS One* 12:e0181693.



- 
- 
- Unzueta-Martínez A, Scanes E, Parker LM, Ross PM, O'Connor W, Bowen JL. 2022. Microbiomes of the Sydney Rock Oyster are acquired through both vertical and horizontal transmission. *Anim Microbiome* 4:1-15.
- Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M. 2020. The controversial role of human gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* 8:573.
- Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui R, Vankeirsbilck N, Weyers S, Verhelst R, De Sutter P, H Pieper D, Van De Wiele T. 2016. Characterization of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ* 4:e1602.
- Villagrán M, Méndez FR, Stewart JR. 2005. Placentation in the Mexican lizard *Sceloporus mucronatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *J Morphol* 264:286-297
- Villagrán Santa Cruz M. 1989. “Desarrollo embrionario placentación y su relación con el cuerpo lúteo y la atresia folicular en *Sceloporus mucronatus* y *Sceloporus grammicus*, (Sauria: Iguanidae)”. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Voltolini C, Battersby S, Etherington SL, Petraglia F, Norman JE, Jabbour HN. 2012. A novel antiinflammatory role for the short-chain fatty acids in human labor. *Endocrinology* 153:395-403.
- Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. 2017. The human microbiota in health and disease. *Engineering* 3:71-82.
- Wang S, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, Stanton, C. 2020. Maternal vertical transmission affecting early-life microbiota development. *Trends Microbiol* 28:28-45.
- Wassenaar TM, Panigrahi P. 2014. Is a foetus developing in a sterile environment?. *Lett Appl Microbiol* 59:572-579.
- Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, Yang TL, Liu CY, Wu WY, Chang YA, Chang TH, Huang HD. 2014. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One* 9:10

- 
- 
- White J, Richard M, Massot M, Meylan S. 2011. Cloacal bacterial diversity increases with multiple mates: evidence of sexual transmission in female common lizards. *PLoS One* 6:e22339.
- Wollenberg Valero KC, Marshall JC, Bastiaans E, Caccone A, Camargo A, Morando M, Niemiller ML, Pabijan M, Rusello MA, Sinervo B, Werneck FP, Sites JW, Wiens JJ, Steinfartz S. 2019. Patterns, mechanisms and genetics of speciation in reptiles and amphibians. *Genes* 10:646.
- Yanai I. 2018. Development and evolution through the lens of global gene regulation. *Trends Genet* 34:11-20.
- Yu D, Yang Y, Long J, Xu W, Cai Q, Wu J, Cai H, Zheng W, Shu XO. 2021. Long-term diet quality and gut microbiome functionality: a prospective, shotgun metagenomic study among urban Chinese adults. *Curr Dev Nutr* 5:nzab026.
- Zhao S, Li C, Li G, Yang S, Zhou Y, He Y, Wu D, Zhou Y, Zeng W, Li T, Qu Y, Li B, Deng W, Jin L, Yu X, Huang Y, Zhang H, Zou L. 2019. Comparative analysis of gut microbiota among the male, female and pregnant giant pandas (*Ailuropoda Melanoleuca*). *Open Life Sci* 14:288-298.

# 12. Anexos

## 12.1 Scripts

Figure 3. Heatmap

Nina Montoya

14/4/2023

### Heatmap de la composición taxónomica a nivel de ASV´s

#### Cargar librerías

```
library(tidyverse)
library(heatmap)
library(ALDEx2)
library(ComplexHeatmap)
library(grid)
library(gridExtra)
library(dplyr)
library(colorRamps)
library(circlize)
library(RColorBrewer)
```

#### Cargar datos

##### OTU table

```
otu.transferencia.2600.completa <- read.csv("data/otutable.transferencia.completa.filterASVs.csv", row.names = 1,
check.names = FALSE)
```

##### Eliminar asvs con 0 counts de la otu original

```
otu.transferencia.2600.completa.sin0 <- otu.transferencia.2600.completa%>%
  filter(rowSums(across(where(is.numeric)))!=0)
```

##### Archivo de ids unassigned a filtrar de la otu table

```
deleteIDS.unassigned <- read.delim("data/listaASVs.p.filtrar.txt", check.names = F)
```

##### Filtrar de la otu, los 87 ids anteriores

```
otu.transferencia.2600.filtrada <- otu.transferencia.2600.completa.sin0 %>%
  rownames_to_column(var = "OTUID") %>%
  filter(!OTUID %in% deleteIDS.unassigned$OTUID) %>%
  column_to_rownames(var = "OTUID")

phy.ra.completa <- t(t(otu.transferencia.2600.filtrada)/colSums(otu.transferencia.2600.filtrada)*100) %>%
  as.data.frame()
```

##### Metadata

```
metadata.transferencia.completo <- read.delim("data/mapa.capII.transferencia.completo.txt",check.names = FALSE) %>%
  mutate(Seccion=Factor(Seccion, levels=c("L.amniotico","Tracto.embrionario","Membrana","Yema",
    "Boca","Cloaca","Ileon","Dorso"),
    labels = c("Amniotic fluid","Embryonic tract","Membrane","Volk",
    "Mouth","Cloaca","Small intestine","Aseptic ventral skin"))) %>%
  mutate(Origen=Factor(Origen, levels = c("Embryo","Mother","Control of aseptic technique"),
    labels = c("Embryo","Mother","Aseptic control")))
```

##### Data de features importantes

```
feature.important.taxa <- read_tsv("data/feature.important.taxa2.txt")
```

##### Taxonomía

```
taxonomia<- read.delim("data/taxonomy.tsv", check.names = F)
```

##### Tabla

```
tabla_abundantes<- phy.ra.completa %>%
  mutate(abun= rowMeans(.)) %>%
  rownames_to_column(var="OTUID") %>%
  arrange(-abun) %>%
  slice(1:50) %>%
  inner_join(taxonomia) %>%
  separate(taxonomy, into = c("dominio","phylum","clase","orden","familia","genero","especie"), sep = ";") %>%
  mutate(taxa=str_extract(genero, "[^_]+$"))

#Guardar y exportar para editar nombres
#write.csv(tabla_abundantes, "/Users/ninamontoya/Desktop/AnaLisis.2022/anaLisisR/anaLisis.finaL/tabla.abundantes.csv")
```

##### Tabla modificada

```
tabla_modificada<- read.csv("data/tabla.abundantes.csv", check.names = F) %>%
  arrange(-abun) %>%
  slice(1:50) %>%
  mutate(asv=paste0("ASV", rownames(.))) %>%
  mutate(phylum=str_replace(phylum,"p_", "")) %>%
  mutate(genero=str_replace(genero,"g_", "")) %>%
  mutate_if(is.character, str_trim) %>%
  unite("nombres", c("asv", "Taxa"), remove = F) %>%
  left_join(feature.important.taxa) %>%
  mutate_at(c("importance"), ~replace(., is.na(.), 0)) %>%
  mutate(score=importance*100)
```

### Escoger los nombres de las taxa

```
taxa_names<- tabla_modificada$taxa
```

### Ordenar la tabla por origen y sección uniendo con el metadata

```
heat<- tabla_modificada %>%
column_to_rownames(var = "nombres") %>%
select_if(is.numeric) %>%
dplyr::select(-abun, -Confidence) %>%
t() %>%
as.data.frame() %>%
rownames_to_column(var = "OTUID") %>%
inner_join(metadata.transferencia.completo, joining, by="OTUID")

#Unir con metadata
heat<- metadata.transferencia.completo %>%
inner_join(heat) %>%
arrange(factor(Origen, levels = c("Embryo", "Mother", "Aseptic control")),
        factor(Seccion, levels = c("Amniotic fluid", "Embryonic tract", "Membrane", "Yolk",
                                   "Mouth", "Cloaca", "Small intestine", "Aseptic ventral skin")))
```

### Transformación de rangos

```
heatmap<- heat %>%
column_to_rownames(var = "OTUID") %>%
dplyr::select('ASV1_Curvibacter lanceolatus', 'ASV50_Hungatella') %>%
t() %>%
as.data.frame() %>%
mutate_all(., funs(R = case_when(
  . <= 0.001 ~ 0,
  . > 0.001 & . <= 0.005 ~ 1,
  . > 0.005 & . <= 0.01 ~ 2,
  . > 0.01 & . <= 0.10 ~ 3,
  . > 0.10 & . <= 0.20 ~ 4,
  . > 0.20 & . <= 1.00 ~ 5,
  . > 1.00 & . <= 2.00 ~ 6,
  . > 2.00 & . <= 5.00 ~ 7,
  . > 5.00 & . <= 10.00 ~ 8,
  . > 10.00 & . <= 25.00 ~ 9,
  . > 25.00 & . <= 50.00 ~ 10,
  . > 50.00 & . <= 75.00 ~ 11,
  . > 75.00 ~ 12))) %>%
select_at(vars(contains("_R"))) %>%
select_all(~str_replace(., "_R", ""))
```

### COMPLEXHEATMAP

#### Paleta de colores del heatmap

```
my_palette <- viridis::viridis(n = 12, option = "B", direction = -1)
```

#### Anotación de filas

```
annotation_rows<- tabla_modificada %>%
dplyr::select(OTUID, phylum, score) %>%
column_to_rownames(var = "OTUID")

rownames(annotation_rows) <- rownames(heatmap)
```

#### Anotación de columnas (sección y origen)

```
annotation_columns <- heat %>% dplyr::select(Origen, Seccion)

rownames(annotation_columns) <- colnames(heatmap)

newnames <- lapply(taxa_names, function(x) bquote(italic(.x))))
```

#### Colores para anotaciones

```
c5<- RColorBrewer::brewer.pal(8, "Set2")[1:5]
c8<- c("#2F4F4F", "#698B69", "#458B74", "#B4EEB4", "#5D478B", "#8B668B", "#CDB5CD", "#4A708B")
c2<- c("darkseagreen", "thistle3", "cadetblue")
```

#### -Colores de sección

```
cols_seccion <- list('Section' = c("Amniotic fluid" = "#2F4F4F",
                                  "Embryonic tract" = "#698B69",
                                  "Membrane" = "#458B74",
                                  "Yolk" = "#B4EEB4",
                                  "Mouth" = "#5D478B",
                                  "Cloaca" = "#8B668B",
                                  "Small intestine" = "#CDB5CD",
                                  "Aseptic ventral skin" = "#4A708B"))
```

#### -Colores de origen

```
cols_origen<- list("Origin"= c("Embryo" = "darkseagreen", "Mother" = "thistle3", "Aseptic control" = "cadetblue"))
```

#### -Colores de phylum

```
col_phyl<- c5
names(col_phyl)<- unique(annotation_rows$phylum)
cols_phyl<-list(Phylum=col_phyl)
```

### Anotaciones

#### -Sección

```
annseccion = HeatmapAnnotation("Section" = annotation_columns$Seccion,
                               which = "column",
                               show_legend = F,
                               annotation_name_gp = gpar(fontsize = 11, fontface="bold"),
                               gp = gpar(col = "white"),
                               show_annotation_name = T,
                               col = cols_seccion)
```

-Origen

```
annorigen = HeatmapAnnotation("Origin" = annotation_columns$Origen,
  which = "column",
  annotation_name_gp = gpar(fontsize = 11, fontface="bold"),
  show_legend = F,
  gp = gpar(col = "white"),
  show_annotation_name = T,
  col = cols_origen)
```

-Phylum

```
annphyl = HeatmapAnnotation("Phylum" = annotation_rows$phylum,
  which = "row",
  show_legend = F,
  show_annotation_name = T,
  annotation_name_gp = gpar(fontsize = 11, fontface="bold"),
  annotation_legend_param = list(title_gp = gpar(fontsize = 10, fontface="bold"),
  labels_gp = gpar(fontsize = 10),
  direction="vertical"),
  gp = gpar(col = "white"),
  col = cols_phyl)
```

-Score

```
annscore = HeatmapAnnotation("Score (%)" = annotation_rows$score,
  which = "row",
  show_legend = T, show_annotation_name = T,
  annotation_name_gp = gpar(fontsize = 11, fontface="bold"),
  annotation_legend_param = list(
  title_gp = gpar(fontsize = 10, fontface="bold"),
  labels_gp = gpar(fontsize = 8),
  direction = "horizontal"),
  gp = gpar(col = "white"),
  col = list("Score (%)" = colorRamp2(c(0,2,4,6,8,10), c("#fde725", "#7ad151", "#22a884", "#4db6ac", "#807dba", "#9e9ac8"))))
```

Legendas

```
lgd1 = Legend(at=unique(annotation_rows$phylum), legend_gp=gpar(fill=c5), title="Phylum", labels_gp=gpar(fontsize=11))
lgd2 = Legend(at=sort(unique(annotation_columns$Origen)), legend_gp=gpar(fill=c2), title="Origin",
  labels_gp=gpar(fontsize=11))
lgd3 = Legend(at=sort(unique(annotation_columns$Seccion)), legend_gp=gpar(fill=c8), title="Section",
  labels_gp=gpar(fontsize=10.5))

#Lgd4 = Legend(at=unique(annotation_rows$score), legend_gp=gpar(fill=colores), title="Score",
#Labels_gp=gpar(fontsize=3))

#Unión de Legendas
pd = packLegend(list = list(lgd1, lgd2, lgd3))
```

Función para hacer cursiva la letra de los géneros

```
make_face_names<-function(mat, rc_fun, rc_names_b = NA,
  rc_names_i = NA) {
  f_names <- rc_fun(mat)
  ids_b <- rc_names_b %>% match(rc_fun(mat))
  ids_i <- rc_names_i %>% match(rc_fun(mat))
  ids_bi <- rc_names_i %>% match(rc_fun(mat))

  ids_b %>%
  walk(
    function(i)
      f_names[i] <-
      bquote(italic((rc_fun(mat)[i]))) %>%
      as.expression()
  )
  ids_i %>%
  walk(
    function(i)
      f_names[i] <-
      bquote(italic((rc_fun(mat)[i]))) %>%
      as.expression()
  )
  f_names
}
```

Colocar los taxa a transformar

```
row_labels = make_face_names(heatmap, rownames,
  rc_names_i = c("ASV1_Curvibacter lanceolatus",
  "ASV2_Stenotrophomonas",
  "ASV3_Stenotrophomonas",
  "ASV4_Helicobacter",
  "ASV5_Pseudomonas",
  "ASV6_Stenotrophomonas rhizophila",
  "ASV7_Hafnia paralvei",
  "ASV8_Brevundimonas",
  "ASV9_Salmonella",
  "ASV10_Ralstonia",
  "ASV11_Sphingobium yanoikuyae",
  "ASV12_Variovorax",
  "ASV13_Brevundimonas diminuta",
  "ASV14_Hafnia",
  "ASV15_Curvibacter lanceolatus",
  "ASV16_Hafnia",
  "ASV18_Stenotrophomonas rhizophila",
  "ASV19_Acinetobacter",
  "ASV21_Bradyrhizobium",
  "ASV22_Arthrobacter",
  "ASV24_Streptococcus",
  "ASV25_Hafnia",
  "ASV26_Pseudomonas",
  "ASV27_Buchnera",
  "ASV28_Pseudomonas",
  "ASV30_Helicobacter rappini",
  "ASV33_Lachnoclostridium",
  "ASV35_Enterococcus",
  "ASV36_Sphingomas",
  "ASV37_Enterococcus",
  "ASV38_Bacteroides",
  "ASV39_Roseburia",
  "ASV41_Hungatella",
  "ASV43_Curvibacter",
  "ASV45_Bosea",
  "ASV46_Citrobacter",
  "ASV47_Paeniclostridium",
  "ASV49_Acinetobacter schindleri",
  "ASV50_Hungatella" ))
```

## FIGURA

```
heats<-Heatmap(heatmap, col=my_palette,
  heatmap_legend_param = list(direction = "horizontal",
    labels_gp = gpar(fontsize = 7),
    legend_gp = gpar(fontsize = 9),
    title = "Relative abundance (%)",
    title_position = "topcenter",
    at = c(0,1,2,3,5,8,10,25, 50, 100),
    break_dist = 1),
  rect_gp = gpar(col = "gray", lwd = 1),
  row_names_gp = gpar(fontsize=7),
  column_names_gp = gpar(fontsize=7),
  cluster_columns = F, cluster_rows = T,
  show_column_names = F,
  show_heatmap_legend = TRUE,
  row_labels = row_labels,
  top_annotation = c(annorigen, annseccion),
  left_annotation = c(annphyl, annscore))

heats
draw(heats, heatmap_legend_side = "top",
  annotation_legend_side = "right",
  merge_legend=F,
  annotation_legend_list = list(pd))

heatm<-grid.grabExpr(draw(heats, heatmap_legend_side = "top",
  annotation_legend_side = "right",
  merge_legend=F,
  annotation_legend_list = list(pd)))

heatm

#Guardar imagen
tiff("heatmap2.tiff", width = 8.5, height = 8)
print(heatm)
dev.off()
```

Todos los scripts de trabajo están disponibles en el siguiente repositorio de github:

<https://github.com/NinaMontoya/Article-Transfer>.

## 12.2 Metadata

OTUID	BarcodeSequence	Peso	LHC_mm	LT_mm	Seccion	Origen	Sexo	Altitud_msnm
26FP3I	TAAGGCGACTCTCTAT	11.4	7.5	13.6	Ileon	Mother	Hembra	2600
26FP7I	TAAGGCGAGTAAGGAG	9.6	6.8	8.5	Ileon	Mother	Hembra	2600
26FP16I	TAAGGCGACTAAGCCT	7.7	6.3	13	Ileon	Mother	Hembra	2600
26FP8I	CGTACTAGTATCCTCT	8.7	6.8	11.6	Ileon	Mother	Hembra	2600
26FP12I	CGTACTAGACTGCATA	10.3	6.3	10.2	Ileon	Mother	Hembra	2600
26FP3B	TAAGGCGAAAAGGAGTA	11.4	7.5	13.6	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP3D	TAAGGCGACTAAGCCT	11.4	7.5	13.6	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP3C	CGTACTAGTAGATCGC	11.4	7.5	13.6	Cloaca	Mother	Hembra	2600
26FP7B	TAAGGCGAAGAGTAGA	9.6	6.8	8.5	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP7D	TAAGGCGAGTAAGGAG	9.6	6.8	8.5	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP7C	TAAGGCGAACTGCATA	9.6	6.8	8.5	Cloaca	Mother	Hembra	2600
26FP16B	CGTACTAGCTAAGCCT	7.7	6.3	13	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP16D	AGGCAGAATAGATCGC	7.7	6.3	13	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP16C	AGGCAGAACTCTCTAT	7.7	6.3	13	Cloaca	Mother	Hembra	2600
26FP8B	CGTACTAGGTAAGGAG	8.7	6.8	11.6	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP8D	CGTACTAGACTGCATA	8.7	6.8	11.6	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP8C	CGTACTAGAAGGAGTA	8.7	6.8	11.6	Cloaca	Mother	Hembra	2600
26FP12B	AGGCAGAATATCCTCT	10.3	6.3	10.2	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP12D	AGGCAGAAAGAGTAGA	10.3	6.3	10.2	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP12C	AGGCAGAAAGTAAGGAG	10.3	6.3	10.2	Cloaca	Mother	Hembra	2600

26FP17B	TAAGGCGATAGATCGC	6.2	5.8	8.3	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP17D	TAAGGCGACTCTCTAT	6.2	5.8	8.3	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP17C	TAAGGCGATATCCTCT	6.2	5.8	8.3	Cloaca	Mother	Hembra	2600
26FP18B	CGTACTAGCTCTCTAT	9.9	7	12.6	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP18D	CGTACTAGTATCCTCT	9.9	7	12.6	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP18C	CGTACTAGAGAGTAGA	9.9	7	12.6	Cloaca	Mother	Hembra	2600
26FP15B	AGGCAGAAACTGCATA	8.6	6.3	13.4	Boca	Mother	Hembra	2600
26FP15D	AGGCAGAAAAGGAGTA	8.6	6.3	13.4	Dorso	Control of aseptic technique	Hembra	2600
26FP15C	AGGCAGAACTAAGCCT	8.6	6.3	13.4	Cloaca	Mother	Hembra	2600
26FP3E4.LA	TAAGGCGATAGATCGC	11.4	7.5	13.6	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP3E9.7.LA	TAAGGCGACTCTCTAT	11.4	7.5	13.6	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP16E1.2.LA	TAAGGCGATATCCTCT	7.7	6.3	13	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP8E1.2.LA	TAAGGCGAAGAGTAGA	8.7	6.8	11.6	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP12E1.3.LA	TAAGGCGAGTAAGGAG	10.3	6.3	10.2	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP17E1.2.LA	CGTACTAGTAGATCGC	6.2	5.8	8.3	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP18E4.8.LA	TAAGGCGAACTGCATA	9.9	7	12.6	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP15E1.3.LA	TAAGGCGAAAAGGAGTA	8.6	6.3	13.4	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP15E4.6.LA	TAAGGCGACTAAGCCT	8.6	6.3	13.4	L.amniotico	Embryo	Embrion	2600
26FP16E1.2.ME	CGTACTAGGTAAGGAG	7.7	6.3	13	Membrana	Embryo	Embrion	2600
26FP8E1.ME	CGTACTAGCTCTCTAT	8.7	6.8	11.6	Membrana	Embryo	Embrion	2600
26FP12E1.3.ME	CGTACTAGTATCCTCT	10.3	6.3	10.2	Membrana	Embryo	Embrion	2600
26FP17E1.2.ME	CGTACTAGACTGCATA	6.2	5.8	8.3	Membrana	Embryo	Embrion	2600
26FP18E1.3.ME	CGTACTAGAAGGAGTA	9.9	7	12.6	Membrana	Embryo	Embrion	2600



26FP15E1.3.ME	CGTACTAGAGAGTAGA	8.6	6.3	13.4	Membrana	Embryo	Embrion	2600
26FP16E1.YE	AGGCAGAACTCTCTAT	7.7	6.3	13	Yema	Embryo	Embrion	2600
26FP8E1.YE	CGTACTAGCTAAGCCT	8.7	6.8	11.6	Yema	Embryo	Embrion	2600
26FP12E1.3.YE	AGGCAGAATAGATCGC	10.3	6.3	10.2	Yema	Embryo	Embrion	2600
26FP18E1.YE	AGGCAGAATATCCTCT	9.9	7	12.6	Yema	Embryo	Embrion	2600
26FP3E2.TE	AGGCAGAAACTGCATA	11.4	7.5	13.6	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP3E3.TE	AGGCAGAAAAGGAGTA	11.4	7.5	13.6	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP3E4.TE	AGGCAGAACTAAGCCT	11.4	7.5	13.6	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP7E1.TE	TAAGGCGACTAAGCCT	9.6	6.8	8.5	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP7E2.TE	CGTACTAGTAGATCGC	9.6	6.8	8.5	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP7E3.TE	CGTACTAGCTCTCTAT	9.6	6.8	8.5	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP16E1.TE	CGTACTAGTATCCTCT	7.7	6.3	13	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP8E1.TE	AGGCAGAATAGATCGC	8.7	6.8	11.6	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP8E2.TE	AGGCAGAACTCTCTAT	8.7	6.8	11.6	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP12E1.TE	CGTACTAGAAGGAGTA	10.3	6.3	10.2	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP12E2.TE	CGTACTAGCTAAGCCT	10.3	6.3	10.2	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP17E1.TE	CGTACTAGGTAAGGAG	6.2	5.8	8.3	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP17E2.TE	CGTACTAGACTGCATA	6.2	5.8	8.3	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP18E1.TE	CGTACTAGAGAGTAGA	9.9	7	12.6	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP15E1.TE	AGGCAGAATATCCTCT	8.6	6.3	13.4	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP15E2.TE	AGGCAGAAAGAGTAGA	8.6	6.3	13.4	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600
26FP15E3.TE	AGGCAGAAAGTAAGGAG	8.6	6.3	13.4	Tracto.embrionario	Embryo	Embrion	2600



---

---

Todas las secuencias crudas están disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y en el Archivo de lecturas de secuencias (SRA) con el número de acceso de BioProject PRJNA963006 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/963006>).

# 13. Publicaciones



Microbiology  
Spectrum



Open Peer Review | Microbial Ecology | Research Article

## Maternal transmission of bacterial microbiota during embryonic development in a viviparous lizard

Nina Montoya-Ciriaco,<sup>1</sup> Stephanie Hereira-Pacheco,<sup>2</sup> Arturo Estrada-Torres,<sup>2</sup> Luc Dendooven,<sup>3</sup> Fausto R. Méndez de la Cruz,<sup>4</sup> Elizabeth Selene Gómez-Acata,<sup>5</sup> Aníbal H. Díaz de la Vega-Pérez,<sup>6</sup> Yendi E. Navarro-Noya<sup>5</sup>

**AUTHOR AFFILIATIONS** See affiliation list on p. 18.

**ABSTRACT** The maternal transmission of microbiota during embryonic development of vertebrates is still poorly understood. Here, we used high-throughput sequencing of the 16S rRNA bacterial genes to determine the bacterial communities in the gastrointestinal tract and amniotic environment, i.e., the amniotic fluid, amniotic membrane and extraembryonic yolk, of embryos at the last stage of development of the viviparous lizard *Sceloporus grammicus* Wiegmann, 1828. We compared these communities to those found in the maternal intestine, mouth, cloaca, and the aseptic ventral skin as a control of the aseptic technique. Our results showed that bacterial 16S rRNA genes were present in the embryos of *S. grammicus*. Their diversity was lower and more similar in composition between individuals than those found in the maternal tissues. This suggests that a strong control exists on the transmission of bacteria from the mother to the embryos. We found 78% of the embryonic amplicon sequence variants (ASVs) in the maternal bacterial microbiota, suggesting that the transmission of bacteria from the mother to the embryos is a continuous process and some bacteria may have been transferred during early embryonic stages. The embryonic bacteria were found to overlap mostly with those found in the mouth and aseptic ventral skin of the mother, although it is difficult to conclude that the shared ASVs originated from these maternal tissues. Our study provides evidence of microbiota vertical transfer during embryonic development in the animal kingdom. It also highlights that this maternal transmission could be included in the maternal effects that impact the offspring.

**IMPORTANCE** We investigated the presence and diversity of bacteria in the embryos of the viviparous lizard *Sceloporus grammicus* and their amniotic environment. We compared this diversity to that found in the maternal intestine, mouth, and cloaca. We detected bacterial DNA in the embryos, albeit with a lower bacterial species diversity than found in maternal tissues. Most of the bacterial species detected in the embryos were also found in the mother, although not all of them. Interestingly, we detected a high similarity in the composition of bacterial species among embryos from different mothers. These findings suggest that there may be a mechanism controlling the transmission of bacteria from the mother to the embryo. Our results highlight the possibility that the interaction between maternal bacteria and the embryo may affect the development of the lizards.

**KEYWORDS** early life microbiome, Is microbiome inherited from the mother?, maternal effects, maternal microbiome, microbial transmission, reptile microbiome

Animal development might rely on microbial signals that can result from transient interactions or persistent colonization by microorganisms, or from microbial molecular cues (1). Throughout animal ontogeny, microbial communities and/or their molecular signals are integrated into development programs (2–4). For instance, studies

**Editor** Diyan Li, Chengdu University, Chengdu, Sichuan, China

**Ad Hoc Peer Reviewer** Avvari Bhaskara Balaji, Maternal Health and Research Institute, Hyderabad, India

Address correspondence to Yendi E. Navarro-Noya, yendiebenezer.navarro.n@uatx.mx, or Anibal H. Díaz de la Vega-Pérez, anibal.hellos@gmail.com.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 18.

**Received** 9 May 2023

**Accepted** 8 September 2023

**Published** 17 October 2023

Copyright © 2023 Montoya-Ciriaco et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

RESEARCH

Open Access

# Dietary effects on gut microbiota of the mesquite lizard *Sceloporus grammicus* (Wiegmann, 1828) across different altitudes



Nina Montoya-Ciriaco<sup>1</sup>, Selene Gómez-Acata<sup>2</sup>, Ligia Catalina Muñoz-Arenas<sup>1</sup>, Luc Dendooven<sup>2</sup>, Arturo Estrada-Torres<sup>3</sup>, Aníbal H. Díaz de la Vega-Pérez<sup>4\*</sup> and Yendi E. Navarro-Noya<sup>4\*</sup>

## Abstract

**Background:** High-altitude ecosystems are extreme environments that generate specific physiological, morphological, and behavioral adaptations in ectotherms. The shifts in gut microbiota of the ectothermic hosts as an adaptation to environmental changes are still largely unknown. We investigated the food ingested and the bacterial, fungal, and protistan communities in feces of the lizard *Sceloporus grammicus* inhabiting an altitudinal range using metabarcoding approaches.

**Results:** The bacterial phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, and the genera *Bacteroides* and *Parabacteroides* dominated the core fecal bacteriome, while *Zygomycota* and *Ascomycota*, and the species *Basidiobolus ranarum* and *Basidiobolus magnus* dominated the core fecal mycobiome. The diet of *S. grammicus* included 29 invertebrate families belonging to *Arachnida*, *Chilopoda*, and *Insecta*. The diversity and abundance of its diet decreased sharply at high altitudes, while the abundance of plant material and *Agaricomycetes* was significantly higher at the highest site. The composition of the fecal microbiota of *S. grammicus* was different at the three altitudes, but not between females and males. Dietary restriction in *S. grammicus* at 4150 m might explain the high fecal abundance of *Akkermansia* and *Oscillopsira*, bacteria characteristic of long fasting periods, while low temperature favored *B. magnus*. A high proportion of bacterial functions were digestive in *S. grammicus* at 2600 and 3100, while metabolism of aminoacids, vitamins, and key intermediates of metabolic pathways were higher at 4150 m. Different assemblages of fungal species in the lizard reflect differences in the environments at different elevations. Pathogens were more prevalent at high elevations than at the low ones.

**Conclusions:** Limiting food resources at high elevations might oblige *S. grammicus* to exploit other food resources and its intestinal microbiota have degradative and detoxifying capacities. *Sceloporus grammicus* might have acquired *B. ranarum* from the insects infected by the fungus, but its commensal relationship might be established by the quitinolytic capacities of *B. ranarum*. The mycobiome participate mainly in digestive and degradative functions while the bacteriome in digestive and metabolic functions.

**Keywords:** Altitudinal gradient, Ectothermic vertebrate, Fecal microbiota, High-mountain ecosystem, Intestinal microbiota, Microbiome, Mycobiome

\* Correspondence: [anibal.helios@gmail.com](mailto:anibal.helios@gmail.com); [nyendi@hotmail.com](mailto:nyendi@hotmail.com)

<sup>4</sup>Cátedras CONACyT, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

# Artículos publicados durante el periodo del Doctorado en Ciencias Biológicas



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Sapana Jadoun,  
Universidad de Concepción, Chile

REVIEWED BY  
Shagufta Jabin,  
Manav Rachna International Institute of  
Research and Studies (MRIIRS), India  
Apurva Kakade,  
Lanzhou University, China

\*CORRESPONDENCE  
Luc Dendooven,  
✉ dendooven@me.com

RECEIVED 12 May 2023  
ACCEPTED 07 August 2023  
PUBLISHED 28 August 2023

CITATION  
Aceves-Suriano CE, Montoya-Ciriaco N,  
Hernández-Guzmán M,  
Hernández-Martínez GR,  
Navarro-Noya YE, Thalasso F and  
Dendooven L (2023), Changes in the  
bacterial and microeukaryotic  
communities in the bioreactor upon  
increasing heavy metal concentrations.  
*Front. Environ. Chem.* 4:1221820.  
doi: 10.3389/fenvc.2023.1221820

COPYRIGHT  
© 2023 Aceves-Suriano, Montoya-  
Ciriaco, Hernández-Guzmán,  
Hernández-Martínez, Navarro-Noya,  
Thalasso and Dendooven. This is an  
open-access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication  
in this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

## Changes in the bacterial and microeukaryotic communities in the bioreactor upon increasing heavy metal concentrations

Claudia E. Aceves-Suriano<sup>1</sup>, Nina Montoya-Ciriaco<sup>2</sup>,  
Mario Hernández-Guzmán<sup>1</sup>, Gabriel R. Hernández-Martínez<sup>1</sup>,  
Yendi E. Navarro-Noya<sup>2</sup>, Frédéric Thalasso<sup>1</sup> and Luc Dendooven<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Soil Ecology, Cinvestav, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup>Centro de Investigación de Ciencias  
Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

Heavy metals are necessary at low concentration for biological activity, but they are often toxic for microorganisms at high concentrations. Amplicon sequencing of 16S rRNA and 18S rRNA was used to investigate changes in the bacterial and microeukaryotic communities in an activated sludge bioreactor incrementally contaminated with nickel (Ni), copper (Cu), and zinc (Zn) with an IC<sub>50</sub> value ranging from 0% to 100%, as previously determined, while an uncontaminated bioreactor served as a control. The chemical oxygen demand (COD) was on average 90% in the uncontaminated bioreactor but dropped to 49% when the heavy metal concentration was 100% IC<sub>50</sub>. The bacterial community in the uncontaminated bioreactor was dominated by Alphaproteobacteria (mostly *Agrobacterium* and *Brevundimonas*) when the heavy metal concentrations were low and Bacteroidetes (mostly *Sphingobacterium*) when the highest amounts of heavy metal concentrations were applied. The members of Ciliophora, Ascomycota, and Basidiomycota alternatively dominated in the uncontaminated bioreactor, while Ascomycota (mostly *Fusarium*) dominated in the contaminated bioreactor. The results revealed that increased concentrations of Ni, Cu, and Zn altered the bacterial and microeukaryotic communities and some putative metabolic functions.

## KEYWORDS

16S rRNA, 18S rRNA, heavy metals, bioreactor, activated sludge

## 1 Introduction

Industrialization, mining activities, and agricultural practices generate large amounts of contaminants that contribute to water, air, and soil pollution. These pollutants alter ecosystems, and some of them, such as heavy metals, might affect human and environment health (Ruangdech et al., 2017; Fatema et al., 2021). There is no specific definition of what a heavy metal is, but it is generally considered that they are characterized by an atomic weight between 63.5 and 200.6 and an element density of >5 g cm<sup>-3</sup> (Saxena et al., 2020). A total of 13 heavy metals are considered important environmental pollutants, with copper (Cu), nickel (Ni), and zinc (Zn) being among the most important contaminants (Sparks, 2005). The anthropogenic sources of these heavy metals are mainly refinery, metallurgy, chemical manufacturing, paints, batteries, and electronic equipment (Gupta



# Conversion of a High-Altitude Temperate Forest for Agriculture Reduced Alpha and Beta Diversity of the Soil Fungal Communities as Revealed by a Metabarcoding Analysis

Yendi E. Navarro-Noya<sup>1\*</sup>, Nina Montoya-Ciriaco<sup>2</sup>, Ligia C. Muñoz-Arenas<sup>2,3</sup>,  
Stephanie Hereira-Pacheco<sup>4</sup>, Arturo Estrada-Torres<sup>5</sup> and Luc Dendooven<sup>4</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Huaying Yao,  
Chinese Academy of Sciences (CAS),  
China

### Reviewed by:

Ye Deng,  
Chinese Academy of Sciences (CAS),  
China  
Heng Gui,  
Chinese Academy of Sciences (CAS),  
China

### \*Correspondence:

Yendi E. Navarro-Noya  
nyendi@hotmail.com;  
yendiebenez.navarro.ni@uatx.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Terrestrial Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 13 February 2021

**Accepted:** 03 May 2021

**Published:** 21 June 2021

### Citation:

Navarro-Noya YE,  
Montoya-Ciriaco N,  
Muñoz-Arenas LC,  
Hereira-Pacheco S, Estrada-Torres A  
and Dendooven L (2021) Conversion  
of a High-Altitude Temperate Forest  
for Agriculture Reduced Alpha  
and Beta Diversity of the Soil Fungal  
Communities as Revealed by  
a Metabarcoding Analysis.  
*Front. Microbiol.* 12:667566.  
doi: 10.3389/fmicb.2021.667566

<sup>1</sup> Laboratory of Biotic Interactions, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico, <sup>2</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico, <sup>3</sup> Facultad de Ingeniería Ambiental, UPAEP, Puebla, Mexico, <sup>4</sup> Laboratory of Soil Ecology, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, Mexico, <sup>5</sup> Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

Land-use change is one of the most important drivers of change in biodiversity. Deforestation for grazing or agriculture has transformed large areas of temperate forest in the central highlands of Mexico, but its impact on soil fungal communities is still largely unknown. In this study, we determined how deforestation of a high-altitude temperate forest for cultivation of maize (*Zea mays* L.) or husbandry altered the taxonomic, phylogenetic, functional, and beta diversity of soil fungal communities using a 18S rRNA metabarcoding analysis. The true taxonomic and phylogenetic diversity at order  $q = 1$ , i.e., considering frequent operational taxonomic units, decreased significantly in the arable, but not in the pasture soil. The beta diversity decreased in the order forest > pasture > arable soil. The ordination analysis showed a clear effect of intensity of land-use as the forest soil clustered closer to pasture than to the arable soil. The most abundant fungal phyla in the studied soils were Ascomycota, Basidiomycota, and Mucoromycota. Deforestation more than halved the relative abundance of Basidiomycota; mostly Agaricomycetes, such as *Lactarius* and *Inocybe*. The relative abundance of Glomeromycota decreased in the order pasture > forest > arable soil. Symbiotrophs, especially ectomycorrhizal fungi, were negatively affected by deforestation while pathotrophs, especially animal pathogens, were enriched in the pasture and arable soil. Ectomycorrhizal fungi were more abundant in the forest soil as they are usually associated with conifers. Arbuscular mycorrhizal fungi were more abundant in the pasture than in the arable soil as the higher plant diversity provided more suitable hosts. Changes in fungal communities resulting from land-use change can provide important information for soil management and the assessment of the environmental impact of deforestation and conversion of vulnerable ecosystems such as high-altitude temperate forests.

**Keywords:** arbuscular mycorrhiza, deforestation, ectomycorrhizal fungi, pathotrophs, high mountain forest, land-use change

## Bacterial and archaeal communities in saline soils from a Los Negritos geothermal area in Mexico



Joseph GUEVARA-LUNA<sup>1</sup>, Mario HERNÁNDEZ-GUZMÁN<sup>2</sup>, Nina MONTOYA-CIRIACO<sup>3</sup>, Luc DENDOOVEN<sup>2</sup>, Marina Olivia FRANCO-HERNÁNDEZ<sup>4</sup>, Paulina ESTRADA-DE LOS SANTOS<sup>1</sup> and María Soledad VÁSQUEZ-MURRIETA<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 11340 (Mexico)

<sup>2</sup>Laboratory of Soil Ecology, Cinvestav, Mexico City 07360 (Mexico)

<sup>3</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Federal Tlaxcala-Puebla km. 1.5, Tlaxcala 90070 (Mexico)

<sup>4</sup>Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 07340 (Mexico)

(Received June 27, 2021; revised August 5, 2021; accepted August 23, 2021)

### ABSTRACT

In recent years, there has been a growing need to understand how salinity affects microbial communities in agricultural soils. Archaeal and bacterial community diversities and structures were investigated by high-throughput sequencing analysis of their 16S rRNA in two arable soils with low electrical conductivity (EC) (2.3 and 2.6 dS m<sup>-1</sup>) and a saline soil (EC = 17.6 dS m<sup>-1</sup>). The dominant bacterial phyla in the soils were Proteobacteria (relative abundance (RA) = 46.2%), followed by Acidobacteria (RA = 13.1%) and Actinobacteria (RA = 10.0%), whereas *Serratia* (RA = 6.0%) and *Bacillus* (RA = 4.0%) were the dominant bacterial genera. *Candidatus Nitrososphaera* (53.5%) was the dominant archaeal phylotype in the arable soils, whereas *Nitrosopumilus* (RA = 0.4%) dominated in the saline soil. The archaeal and bacterial community structures were different between the soils and significantly correlated with soil sand, arsenic, barium, and antimony contents, but not with soil salinity.

**Key Words:** agricultural soil, compositional approach, microbial community, mud volcano, soil salinity, soluble anion

**Citation:** Guevara-Luna J, Hernández-Guzmán M, Montoya-Ciriaco N, Dendooven L, Franco-Hernández M O, Estrada-de los Santos P, Vásquez-Murrieta M S. 2023. Bacterial and archaeal communities in saline soils from a Los Negritos geothermal area in Mexico. *Pedosphere*. 33(2): 312–320.

### INTRODUCTION

Soil salinization is the most frequent soil degradation process that involves the accumulation of soluble salts at the soil surface as a consequence of both primary and secondary processes (FAO, 2015; Daliakopoulos *et al.*, 2016; Sáenz-Mata *et al.*, 2016). It is estimated that 50% of arable land will be saline by 2050 (Shrivastava and Kumar, 2015), and by that time, the total world population will increase to 9.77 billion, intensifying the demand for food production (FAO, 2009). Global mapping predictions indicate that areas affected by soil salinization have increased by > 100 Mha in the past three decades, with the presence of slightly saline areas, suggesting that soils from previously unaffected areas are becoming saline (Ivushkin *et al.*, 2019).

Soil microbial communities play an important role in different nutrient and biogeochemical cycles (Escalas *et al.*, 2019), as well as in the biotransformation or mineralization of persistent xenobiotics and natural complex polyphenolic compounds (Nannipieri *et al.*, 2017; Shahsavari *et al.*, 2019). Furthermore, reductions in soil microbial abundance and

biodiversity due to perturbations lead to decreased ecosystem functions (Wagg *et al.*, 2014).

In recent years, there has been a growing need to understand how salinity affects microbial communities as soils become increasingly saline due to excessive fertilizer application and inadequate irrigation. For instance, in Mexico, 3% of all soils and 10% of agricultural soils are affected by salinity, mostly as a result of irrigation (SEMARNAT, 2018). Recent studies have focused on analyzing bacterial diversity patterns in saline soils and their relationships with edaphic factors (Mhete *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020); however, few studies have considered the archaeal communities (Wei *et al.*, 2020). The objectives of this study were to investigate and compare the archaeal and bacterial community structures through high-throughput sequencing analysis of the 16S rRNA in a natural non-agricultural saline soil of a geothermal area and in two arable salt-affected soils, one nearby (0.6 km) and one further away (1.9 km) from the natural non-agricultural saline soil, and to assess their relationships with different edaphic factors using a compositional approach. We hypothesized that soil salinity is the principal edaphic factor

\*Corresponding author. E-mail: murrieta@hotmail.com.