



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efecto del cambio de uso del suelo sobre el  
microbioma de dos ambientes del Parque Nacional  
La Malinche

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Ligia Catalina Muñoz Arenas

Directora de tesis

D.C. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2020





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del cambio de uso del suelo sobre el  
microbioma de dos ambientes del Parque Nacional La  
Malinche

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**Ligia Catalina Muñoz Arenas**

**Comité Tutorial**

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Dr. Luc Dendooven

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Dicembre, 2020

La presente tesis se realizó en el laboratorio de Ecología Microbiana del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. El trabajo fue financiado por los proyectos “Infraestructura 253217”, “Ciencia Básica 256096” y “Cátedras CONACyT 883” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Ligia Catalina Muñoz Arenas recibió una beca para realizar sus estudios de doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU/Becario: 215169/232724), en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, que está registrado en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).



Universidad  
Autónoma de  
Tlaxcala

**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 **Ligia Catalina Muñoz Arenas** 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 **“Efecto del cambio de uso del suelo sobre el microbioma de dos ambientes del Parque Nacional La Malinche”**.


Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 19 DE 2020**

  
\_\_\_\_\_  
DR. FRÉDÉRIC THALASSO

  
\_\_\_\_\_  
DR. ARTURO ESTRADA TORRES

  
\_\_\_\_\_  
DR. LUC DENDOOVEN

  
\_\_\_\_\_  
DR. JULIO CÉSAR MORALES MEDINA

  
\_\_\_\_\_  
DRA. BÁRBARA CRUZ SALAZAR



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



## **Agradecimientos**

Al Doctorado en Ciencias Biológicas del CTBC, UAT.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A la doctora Yendi E. Navarro Noya por permitirme ser parte de su grupo de trabajo así como por todo el apoyo, la dedicación y la orientación para realizar el presente proyecto.

Al doctor Arturo Estrada Torres y al doctor Luc Dendooven por la orientación académica a lo largo del desarrollo del presente proyecto.

A la doctora Bárbara Cruz Salazar y los doctores Julio César Morales Medina y Frédéric Thalasso por su acompañamiento, observaciones y aportaciones a la presente tesis.

Agradecimientos a título personal

A Dios por acompañarme en cada instante de mi vida.

A Adan, por ser el perfecto compañero, por alentarme cada día, por ayudarme a ver cosas que no podía ver y por seguir conmigo en este viaje. A Jacob por haber crecido juntos y sobre todo a Ana Paula por haberme regalado la oportunidad para realizar este posgrado.

A mi familia extensa: Mamá, Papá, Josa, Lupe y Fabiola, el haber crecido juntos me ayudó en todos los sentidos y me condujo a este momento. A las pequeñas Regina, Renata, Isa y Luisa. A los gordies.

A la UPAEP por darme las facilidades para seguir superándome, en especial a todo el equipo del Fondo Concursable por toda la ayuda que recibí para culminar esta etapa, sobre todo de Elizabeth Sánchez Briseño.

Al Dr. Mariano Sánchez Cuevas por todo el apoyo que recibí de su parte.

A Paulina Hernández Ortega, por el acompañamiento previo y el impulso que me dio para tomar la decisión de realizar el posgrado.

A todos los miembros de la facultad de Ing. Ambiental-UPAEP, gracias a su trabajo arduo y continuo es que otros miembros podemos tener la oportunidad de superarnos. Gracias a todos por su apoyo.

A mis amigos del laboratorio y doctorado. Juanita por enseñarme todo, Lilia por ser una ayuda constante, Carmine por todo el apoyo para el muestreo y todo el acompañamiento a lo largo de esta etapa. Ángeles, por ser la mejor amiga que encontré en este camino

A mis amigos Tita, Raciél y Manuel, por el acompañamiento constante. Sus mensajes me mantuvieron a flote, no saben lo mucho que los valoro.

A mi amigo Mauricio, por la arena y por todo lo demás.

Con todo mi amor para Ana Paula, Jacob y Adan.



## RESUMEN

El cambio de uso de suelo se ha identificado como una de las amenazas más graves a la biodiversidad y el bosque templado ha sido de los ecosistemas más afectados. La agricultura es un uso de suelo muy intensivo. Sin embargo, se conoce muy poco sobre cómo la conversión de bosque templado de alta montaña a suelos de cultivo afecta a la microbiota del suelo. En este trabajo se utilizaron técnicas metagenómicas de tipo shotgun para analizar la diversidad taxonómica y funcional, la estructura taxonómica y las redes de interacción de las comunidades microbianas de suelos de bosque con dos tipos de vegetación, es decir, de encino y pino-encino, y de cultivo del Parque Nacional La Malinche.

En general, los suelos mantuvieron su riqueza de especies microbianas después del cambio de uso de suelo y no afectó a la diversidad de Archaea, sin embargo, la diversidad bacteriana a los diferentes órdenes de  $q$ , disminuyó entre un 45 y 55% cuando el bosque de encino fue convertido a cultivo y entre un 65 y 75% cuando el bosque de pino encino fue convertido a cultivo. La pérdida de la diversidad bacteriana se correlacionó positivamente ( $R^2=0.41$ ) con el 10-25% de pérdida de diversidad funcional a diferentes órdenes de  $q$ . Se esperaba una tendencia similar a la disminución de diversidad bacteriana en las comunidades de virus de DNA, por ser sus huéspedes potenciales, sin embargo, se encontró mayor diversidad viral en los suelos de cultivo que de bosques.

Con respecto al efecto del cambio de uso de suelo de bosque a cultivo en la estructura taxonómica de la microbiota del suelo, el análisis diferencial de abundancia mostró que los phyla *Thaumarchaeota* y *Gemmatimonadetes* aumentaron en los suelos de cultivo independientemente del tipo de vegetación original, mientras que, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *Acidobacteria* disminuyeron cuando el bosque de encino se convirtió a cultivo, y *Chlamydiae* cuando el bosque de pino-encino. Todas las especies de *Bacteroidetes* diferencialmente abundantes entre suelos de bosque y cultivo disminuyeron en los suelos de cultivo, mientras que, las especies pertenecientes al phylum *Actinobacteria* aumentaron. En general, especies del género *Bradhyrhizobium* fueron más abundantes en suelos de bosque y especies de *Stenotrophomonas* y *Raoultella* dominaron en los suelos de cultivo. El cambio de uso del suelo

disminuyó el contenido de nitrógeno total y el contenido de carbono orgánico, dos características que definen a la comunidad microbiana. En el cambio de uso de suelo del bosque de pino-encino también disminuyeron significativamente el pH y los contenidos de limo y arcilla, en tanto aumentó el contenido de arena.

Por último, se determinó cómo el cambio de uso de suelo afecta a las interacciones ecológicas potenciales entre los microorganismos del suelo mediante un análisis de redes basado en proporcionalidades. En los suelos de cultivo se encontraron 4.5 veces más conexiones y más cercanas que en los de bosque. La intersección de las redes mostró un fuerte rearrreglo de las interacciones cuando cambia el uso del suelo. Esto podría demostrar que las relaciones en suelos de bosque son más específicas que en el suelo de cultivo y que éstas mantienen equilibrios dentro del ecosistema.

## Contenido

RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	4
Cambio de uso de suelo y su impacto en la biodiversidad .....	5
Cambio de uso de suelo y establecimiento de un nuevo estado en las comunidades bacterianas.....	7
JUSTIFICACIÓN .....	9
OBJETIVOS .....	10
Objetivo general .....	10
Objetivos específicos .....	10
CAPÍTULO 1: Efecto del cambio de uso de suelo sobre la diversidad taxonómica y funcional del microbioma del suelo de bosque templado de encino y de pino-encino. ....	11
1.1 Antecedentes .....	11
1.2 Pregunta de investigación (PI), Hipótesis (H) y predicciones (P).....	12
1.3 Metodología .....	13
1.3.1 Sitio de estudio .....	13
1.3.2 Extracción y secuenciación del DNA metagenómico (Shotgun) .....	14
1.3.3 Análisis bioinformáticos .....	15
1.3.4 Determinación de la diversidad.....	15
1.3.5 Análisis estadísticos .....	16
1.4 Resultados y discusión .....	16
CAPÍTULO 2. Cambios en la estructura microbiana de suelos de bosque que cambiaron su uso a cultivo.....	25
2.1 Antecedentes .....	25
2.2 Pregunta de investigación (PI), Hipótesis (H) y predicciones (P).....	26
2.3 Metodología .....	27
2.3.1 Análisis fisicoquímicos del suelo .....	27
2.3.2 Análisis diferencial de abundancias .....	27
2.4 Resultados y discusión .....	28
CAPÍTULO 3: La conversión de bosque templado a cultivo afecta las interacciones ecológicas potenciales de las comunidades microbianas del suelo.....	43
3.1 Antecedentes .....	43
3.2 Pregunta de investigación (PI), Hipótesis (H) y Predicciones (P).....	44

3.3 Metodología .....	45
3.3.1 Construcción de redes de proporcionalidad .....	45
3.4 Resultados y Discusión .....	45
CONCLUSIONES .....	52
REFERENCIAS .....	53
GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	67
ANEXOS.....	68
PUBLICACIONES .....	72

## INTRODUCCIÓN

Cerca del 31% de la superficie terrestre, es decir 4,060 MHa, son bosques (FAO 2020). Actualmente, los bosques están bajo gran presión antropogénica y su degradación ha disminuido los servicios ecosistémicos que proveen. Prácticas antropogénicas como cultivos intensivos, monocultivos, tala inmoderada de especies, explosión demográfica, entre otras, son las principales causas del cambio de uso de suelo (Ceja 2008). Se ha documentado que el cambio de uso del suelo, en especial para agricultura y pastoreo, ha ocasionado la pérdida de casi la mitad de los pastizales y cerca de un tercio de los bosques naturales en el mundo (Machovina y cols. 2015). La pérdida de los bosques es de suma importancia pues almacenan cerca del 80% del carbono de la superficie terrestre y más del 50% del carbono orgánico total (Bhattacharya y cols. 2016). Los bosques, además, ofrecen otros servicios como la productividad primaria, el ensamblaje de especies, dan estructura a la vegetación, el reciclaje de nutrientes, sirven de hábitat para fauna, entre muchos otros (Trumbore y cols. 2015). Uno de los bosques más afectados es el bosque templado. En Norteamérica, aproximadamente el 99% de los bosques templados ha tenido un manejo intensivo, se ha convertido a agricultura o a pastoreo, o ha sido degradado y/o fragmentado (Tyrrell y cols. 2012).

Algunas regiones son especialmente importantes debido a su biodiversidad y se encuentran normalmente entre gradientes ambientales y en regiones de transición ecológica (Brooks y cols. 2001). Un ejemplo es la zona de transición Neártica-Netropical o Zona de Transición Mexicana (ZTM) que corresponde a la transición biogeográfica de las regiones Neártica y Neotropical. La ZTM es una de las regiones con mayor diversidad biológica en el mundo debido a su geología, a su geografía y a diferentes historias evolutivas que convergieron en esta área (Halffter y Morrone 2017, Martínez-Falcón y cols. 2018). La ZTM comprende un gradiente de diferentes climas y al menos el 20% de sus especies de vertebrados son endémicas de la región (Ceballos y García 2013, Martínez-Falcón y cols. 2018). Lamentablemente, en México se perdieron 2.6 MHa de bosque templado en casi 20 años (1993-2002) y la ZTM ha sido una de las regiones más afectadas debido al cambio de uso del suelo por actividades agrícolas o de pastoreo (Sánchez-Colón y cols. 2009).

Un caso de degradación de suelos es el Parque Nacional La Malinche (PNLM) o Matlalcuéyetl. El PNLM está ubicado en la zona central oriente de México y forma parte de la cordillera neovolcánica dentro de la ZTM. Aunque el PNLM es un Área Natural Protegida desde 1938, el 60% de su superficie está dedicada a actividades antropogénicas: forestal, pecuario y agrícola (Arriaga y cols. 2000). Debido al cambio de uso y cobertura de suelo, así como por las presiones que ejercen las comunidades aledañas a la zona, el PNLM ha sido catalogado como un Área Natural Protegida no efectiva (Figuroa y Sánchez-Cordero 2008). Entre los ecosistemas presentes en el PNLM se encuentra el bosque templado, por lo que el PNLM es un buen modelo para estudiar los cambios en la estructura de las comunidades microbianas cuando ocurre un cambio de uso de suelo, pues preserva bosque conservado cerca de zonas de agricultura.

### Cambio de uso de suelo y su impacto en la biodiversidad

El cambio de uso de suelo se ha identificado como una de las amenazas más severas para la biodiversidad (Sala y cols. 2000, Tsiouli y cols. 2015) y la pérdida de biodiversidad es uno de los principales impulsores del cambio en los ecosistemas (Hooper y cols., 2012). El cambio de uso de suelo provoca cambios en los factores ambientales, como la intensidad de la luz incidente, la estructura del suelo, la cantidad de nutrientes, la temperatura, la humedad, entre otros (Zhang y cols. 2016). La conversión de los bosques a sistemas agrícolas altera las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, cambia la cantidad y calidad de los insumos de carbono orgánico, altera el reciclaje de nutrientes y estimula la descomposición del carbono orgánico del suelo (Murty y cols. 2002). Además, la conversión de bosque a campos de cultivo ha causado la pérdida del 73% de los bosques a nivel global (Hosonuma y cols. 2012). El cambio en el uso de la tierra, el manejo intensivo del suelo y las presiones asociadas, por ejemplo los cambios en las propiedades del suelo, reducen la riqueza y abundancia de especies macroscópicas comparado con sitios de vegetación primaria (Butchart 2010, Ripple y cols. 2015, Newbold y cols. 2015, 2016). Por ejemplo, el aumento de la intensidad del uso del suelo de cultivos de Europa disminuyó la diversidad taxonómica y funcional de la fauna, así como el nivel trófico promedio de las redes tróficas del suelo (Tsiouli y cols. 2015).

No sólo la diversidad sobre suelo de un ecosistema es importante, sino también la microbiota bajo el suelo. Los microorganismos del suelo son muy abundantes y diversos. Se estima que existen hasta  $10^9$  células y  $10^4$  especies por gramo de suelo, y el tamaño de la biomasa microbiana del suelo, alrededor de  $1000 \text{ kg C ha}^{-1}$ , es comparable con la biomasa sobre el suelo (Fierer 2017). La comunidad microbiana del suelo, además, juega un papel muy importante en muchas funciones como en el reciclaje de nutrientes, en los ciclos biogeoquímicos, en la productividad de las plantas, e impactan en la regulación del clima, por lo que es esencial para mantener la integridad de los ecosistemas terrestres (Griffiths y Philippot 2013). Sin embargo, existe poco conocimiento de su diversidad.

Medir la diversidad biológica en un ecosistema, más allá de su valor intrínseco, es un indicador valioso de si los ecosistemas que benefician a las sociedades humanas y a las economías tienen el potencial de mantener su resiliencia y funcionamiento (Díaz y cols. 2006). Una de las hipótesis más ampliamente aceptada es que la disminución en la estabilidad de los ecosistemas es en gran medida consecuencia de la pérdida de la diversidad biológica (Loreau y cols. 2002). Esta hipótesis se basa en la idea intuitiva que la probabilidad de encontrar especies capaces de adaptarse a condiciones cambiantes es mayor en los ecosistemas más diversos, permitiendo el funcionamiento de los ecosistemas.

El cambio de uso de suelo causa presiones a largo plazo en el ecosistema del suelo. La disminución en la riqueza de especies vegetales causada por el cambio de uso de suelo puede inducir la pérdida de diversidad de microorganismos bajo suelo, debido a que las especies microbianas especialistas tendrían un limitado rango de nutrientes para metabolizar u organismos para alimentarse (De Deyn y Van Der Putten 2005). También, es muy probable que la pérdida de diversidad bajo suelo tenga efectos negativos tanto en el ambiente como en la sustentabilidad de la producción agrícola debido a la alteración de las funciones microbianas (Tardy y cols. 2014). Bosques de alta montaña de la ZTM se han convertido a campos de cultivo causando pérdidas en las reservas de carbono, alteraciones en las propiedades del suelo y en las comunidades microbianas del suelo (Bravo-Espinosa y cols. 2014, Gómez-Acata y cols. 2016, Fusaro y cols. 2019).

## Cambio de uso de suelo y establecimiento de un nuevo estado en las comunidades bacterianas.

El estudio de la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas cuando experimentan una perturbación es primordial. El cambio de uso de suelo altera las comunidades vegetales, las cuales, no solo capturan la energía que sustenta la producción primaria en los ecosistemas terrestres y tienen un papel fundamental en el ciclo del carbono, también interactúan de forma directa con las comunidades microbianas bajo suelo (McKinley 2019). La respuesta de las comunidades microbianas al cambio de uso de suelo es compleja y deriva en una comunidad microbiana diferente en términos taxonómicos y funcionales (Mendes y cols. 2015). La diversidad también es dependiente de los mismos impulsores que afectan la estabilidad del ecosistema. Así, se ha observado que el establecimiento de un nuevo estado de la comunidad microbiana del suelo depende de características edáficas como la relación C:N en el suelo, contenido de arena y pH (Fierer y Jackson 2006, Kuramae y cols. 2014). La vegetación también es un factor determinante para el establecimiento del nuevo estado de la comunidad microbiana a través de recursos de entrada al suelo, así como la influencia de las comunidades bacterianas a través de la especificidad de las interacciones rizosféricas (Marschner y cols. 2004, Schlatter y cols. 2018). El tercer componente que puede influenciar el nuevo estado, es la comunidad por sí misma debido a que un cambio en la disposición de recursos, puede llevar a los miembros con un estilo de vida generalista a inhibir el crecimiento de miembros especialistas (Russel y cols. 2017). Por lo que la presencia de uno o algunos miembros de la comunidad, y no la diversidad, es frecuentemente un determinante para la estabilidad del ecosistema y cada ecosistema tendrá su propio miembro clave (Ives y Carpenter 2007). Además, las poblaciones de especies dentro de una comunidad interactúan una con otra y los cambios en el arreglo y complejidad de las comunidades microbianas del suelo impacta en las relaciones ecológicas entre especies y entre procesos metabólicos (Ives y Carpenter 2007). Una combinación de cambios en la diversidad, las propiedades del suelo, nueva vegetación, interacciones microbianas y la retroalimentación entre ellos conducirán en conjunto a un nuevo estado en las comunidades microbianas cuando ocurre el cambio de uso de suelo.

Aunque el nuevo estado, es decir, la respuesta de la comunidad ante la perturbación, frecuentemente es sitio específico, se ha observado que las interacciones entre los



microorganismos del suelo no son aleatorias y que coocurren con un cierto patrón (Barberán y cols. 2012), por lo que esos patrones pueden servir como indicadores del efecto del cambio de uso de suelo. Los análisis de interacciones ecológicas a través de redes de correlación pueden aportar información sobre cómo la estructura de la comunidad cambia a través del tiempo (Brisson y cols. 2019) o para identificar especies clave que podrían jugar roles importantes en la estructura de la comunidad microbiana (Shi y cols. 2016).

En esta investigación se utilizaron técnicas metagenómicas de tipo shotgun para caracterizar el microbioma del suelo de bosque con dos tipos de vegetación, es decir, encino y pino-encino, y de campos de cultivo de maíz dentro del perímetro del PNLN para analizar el efecto del cambio de uso de suelo forestal a agrícola sobre diferentes aspectos de la microbiota del suelo. El microbioma se refiere a la colección de genomas de los microorganismos que conforman una comunidad. Esta tesis está dividida en tres capítulos donde se reporta el efecto del cambio de uso del suelo sobre la diversidad taxonómica y funcional (capítulo 1), sobre la estructura taxonómica de la comunidad microbiana (capítulo 2) y sobre las interacciones ecológicas potenciales entre grupos taxonómicos y entre genes codificantes de proteínas de las comunidades microbianas del suelo.

## JUSTIFICACIÓN

La ecología de las comunidades microbianas del suelo en bosque templado de alta montaña ha sido poco estudiada, y dado que las comunidades microbianas son una pieza fundamental en los servicios ecosistémicos, en este trabajo se investigó cómo afecta el cambio de uso de suelo de bosque a cultivo diferentes aspectos ecológicos de las comunidades microbianas del suelo como son: su diversidad, estructura, composición, potencial funcional e interacciones ecológicas. Todo esto, con un gran nivel de detalle a través de técnicas metagenómicas.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar el efecto de cambio de uso de suelo forestal a agrícola sobre la diversidad, la estructura taxonómica y las interacciones ecológicas de las comunidades microbianas de bosque templado de alta montaña de dos tipos de vegetación del Parque Nacional La Malinche

### Objetivos específicos

Determinar la composición microbiana y de genes codificantes de proteínas de suelos forestales y de suelos agrícolas del PNLM mediante técnicas metagenómicas.

Comparar la diversidad taxonómica y funcional y la estructura taxonómica de las comunidades microbianas de suelos forestales de dos tipos de vegetación y suelos agrícolas del PNLM.

Determinar el efecto del cambio de uso del suelo de bosque de encino y de pino-encino a zona agrícola sobre las propiedades fisicoquímicas de suelos del PNLM y su relación con los cambios en la estructura de las comunidades microbianas.

Determinar el efecto del cambio de uso del suelo de forestal a agrícola sobre las interacciones ecológicas potenciales entre especies microbianas del suelo.

## CAPÍTULO 1: Efecto del cambio de uso de suelo sobre la diversidad taxonómica y funcional del microbioma del suelo de bosque templado de encino y de pino-encino.

### 1.1 Antecedentes

Se han observado efectos contrastantes del cambio de uso del suelo sobre la diversidad taxonómica de las comunidades bacterianas del suelo en diferentes ecosistemas. Por ejemplo, Lee-Cruz y cols. (2013) estudiaron el efecto del cambio de uso del suelo de bosque tropical a plantación de palma de aceite sobre las comunidades de bacterias del suelo. La conversión de bosques primarios a plantaciones de palma indujo la pérdida de especies y las comunidades bacterianas fueron más heterogéneas en los suelos de las plantaciones de palma que en las de los bosques. En el mismo sentido, Amoo y Balalola (2019) compararon las comunidades bacterianas de suelos de bosques nativos y de plantaciones adyacentes de pino, con el objetivo de determinar los efectos del cambio de uso del suelo. La diversidad bacteriana de los bosques nativos fue más alta que la encontrada en las plantaciones comerciales. Por otro lado, diversas investigaciones han evaluado el impacto de la conversión de la selva tropical semidecidual amazónica y pastizales naturales a suelos de cultivo en la composición y estructura del microbioma del suelo mediante estrategias metagenómicas (Mendes y cols. 2015, Castañeda y Barbosa 2017, Goss-Souza y cols. 2017, Kroeger y cols. 2018). Estos estudios encontraron que los suelos de cultivo fueron similares o más diversos que el ecosistema original y que la redundancia funcional supera la transformación que sufre el ecosistema. En todos los estudios mencionados anteriormente han determinado la diversidad mediante índices de Shannon y Simpson que, si bien nos acercan al entendimiento de la diversidad, no la cuantifican. En este sentido, los números efectivos o números de Hill permiten comparar la magnitud de la diversidad entre dos comunidades (Moreno y cols. 2011).

Si bien, los análisis en bosques húmedos, selva tropical y pastizales han sido considerables, el efecto en la biodiversidad del suelo cuando un bosque templado de alta montaña es convertido a suelo de cultivo aún no ha sido investigado. Dado que las condiciones ambientales y la

vegetación son diferentes y que la respuesta de las comunidades puede ser sitio-específica, es difícil predecir el efecto del cambio de uso del suelo en un bosque templado. También, es posible que bosques con diferente tipo de cobertura vegetal de la misma región puedan tener respuestas diferentes.

En este capítulo se reporta la diversidad taxonómica de Bacteria, Archaea y Virus de DNA y la diversidad funcional expresada en número efectivo de especies y número efectivo de funciones, respectivamente, de suelos de bosque de encino y de pino-encino y de suelos de cultivo convertidos a partir de estos dos tipos de bosque. Esto, con el objetivo de determinar el efecto del cambio de uso del suelo sobre la diversidad taxonómica y funcional de bosque templado a cultivo.

## 1.2 Pregunta de investigación (PI), Hipótesis (H) y predicciones (P)

PI: ¿Cómo afecta el cambio de uso del suelo a la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades microbianas del suelo de bosque templado?

H<sub>1</sub>: El cambio de uso del suelo de bosque a cultivo afecta negativamente a la diversidad taxonómica de especies microbianas del suelo.

P<sub>1</sub>: Existe mayor número efectivo de especies de Bacteria, Archaea y Virus de DNA en suelos de bosque de pino-encino y de encino que en suelos que cambiaron de uso a cultivo.

H<sub>2</sub>: El cambio de uso del suelo de bosque a cultivo afecta negativamente a la diversidad funcional del suelo.

P<sub>2</sub>: Existe mayor número efectivo de funciones en suelos de bosque de pino-encino y de encino que en suelos que cambiaron de uso a cultivo.

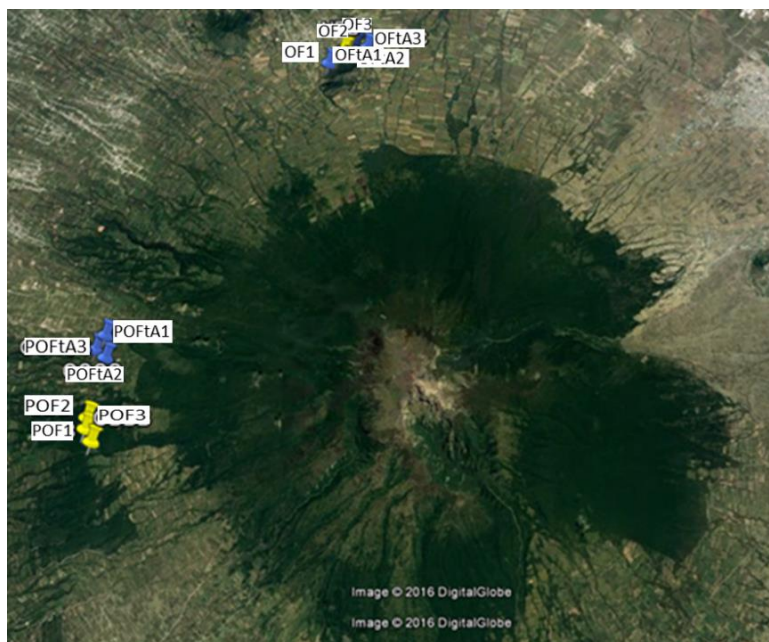
## 1.3 Metodología

### 1.3.1 Sitio de estudio

El suelo se muestreó en el PNLM localizado en la zona este central de México que forma parte de la ZTM. Los ecosistemas en el PNLM son bosques de alta montaña con diferente cobertura vegetal: pino (*Pinus* L.), abeto (*Abies* Mill.), encino (*Quercus* L.) y pino-encino. Debido a que más del 60% de su superficie se ha modificado por actividades antropogénicas el PNLM es considerado un área natural protegida no efectiva (Arriaga y cols. 2000). Se muestrearon cuatro sitios diferentes y cuatro ecosistemas del PNLM, es decir, bosque de encino (OF, por su acrónimo en inglés), bosque de pino-encino (POF), bosque de encino convertido a suelo de cultivo (OFtA) y bosque de pino encino convertido a suelo de cultivo (POFtA). El muestreo de los suelos se realizó el 16 y 17 de noviembre de 2016. La clasificación de los suelos fue cambisol y al tiempo del muestreo, todos los suelos de agricultura estaban cultivados con maíz (*Zea mays* L.). Se realizó un muestreo sistemático de los 0-20 cm del horizonte superior del suelo de acuerdo con Petersen y Calvin (1986). Cada ecosistema se muestreó por triplicado ( $n=3$ ) y el número de muestras se mantuvo en los análisis de laboratorio ( $N=12$ ). La información de los sitios de muestreo puede observarse en la tabla 1 y la localización geográfica en el PNLM en la figura 2.

Tabla 1 Información del sitio de muestreo.

Ecosistema	OF	OFtA	POF	POFtA
Coordenadas geográficas	19°19'33.8" N 98°03'06.6" O	19°19'41.2" N 98°02'59.2" O	19°13'16.5" N 98°07'21.4" O	19°14'22.3" N 98°07'11.0" O
Altitud (msnm)	2,699	2,677	2,708	2,700
Precipitación media anual (mm)	721-857			
Temperatura media anual (°C)	6.4-7.2			
Clasificación climática de Köppen	Cb'(w2)			
Clasificación del suelo	Cambisol			



*Figura 1 Localización geográfica de los sitios de muestreo por ecosistema. Bosque de encino (OF), Bosque de Pino-Encino (POF), Bosque de Encino convertido a cultivo (OFtA) y Bosque de Pino-Encino convertido a cultivo (POFtA). El número representa la réplica por ecosistema muestreado.*

### 1.3.2 Extracción y secuenciación del DNA metagenómico (Shotgun)

La técnica de secuenciación shotgun consiste en la extracción del DNA metagenómico y su secuenciación masiva (Escobar-Zepeda y cols. 2015). Se obtuvo DNA metagenómico a partir de 30 g de suelo de cada una de las 12 muestras. La extracción de DNA se realizó por lisis química y lisis enzimática (Chávez-Romero y cols. 2016). Se eliminaron los ácidos húmicos y fúlvicos de 60 submuestras de 0.5 g de suelo mediante lavados con pirofosfato de sodio decahidratado 0.15 M y regulador de fosfatos 0.15 M pH 8 y se realizaron la extracción de DNA. Se realizaron un total de 1,152 extracciones. El DNA obtenido se mezcló y purificó en columnas de Sephadex One-step Removal Zymo-Spin™ IV-HRC (Zymo Research, E.E.U.U.). El DNA purificado se cuantificó con el Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, E.E.U.U.) en un fluoroespectrómetro NanoDrop™ 3300 (Thermo Scientific, E.E.U.U.).

La generación de la librería de DNA metagenómico se realizó con el Nextera DNA Sample prep kit Illumina Compatible (Epicentre, E.E.U.U.). La secuenciación se realizó en un HiSeq 4000

(Illumina Inc., E.E.U.U.) por MacroGen Inc. (Seul, República de Corea) siguiendo el protocolo HiSeq 3000 4000 System User Guide Document # 15066496 v04 HCS 3.3.52. Las secuencias obtenidas fueron tipo paired end con una longitud de 101 bases.

### 1.3.3 Análisis bioinformáticos

Las secuencias crudas obtenidas de la secuenciación se recortaron en base a su calidad con el software Trimmomatic v0.36 (Bolger y cols. 2014), es decir, se conservaron para análisis posteriores aquellas secuencias con longitud mayor a 36 nucleótidos y una calidad mayor a 23 en la escala de PHRED ( $Q > 23$ ). Las secuencias paired-end con buena calidad se analizaron para su clasificación taxonómica con el clasificador “Kraken Taxonomic Sequence Classification System” en su versión 2.0 (Wood y Salzberg, 2014). La abundancia a diferentes niveles taxonómicos se determinó con Bracken en su versión 2.0 (Lu y cols. 2017). Para el análisis funcional, las secuencias con buena calidad fueron ensambladas *de novo* con el ensamblador MEGAHIT v1.1.3 para obtener contigs (Li y cols. 2016). Los contigs fueron comparados con BLASTX contra la base de datos RefSeq de proteínas no redundantes con el alineador de secuencias DIAMOND (Buchfink y cols. 2014). Se hizo la anotación con MEGAN v6.13.1 (Huson 2015) usando la clasificación SEED. La clasificación SEED es una categorización jerárquica de funciones organizada en 5 niveles de subsistemas, cada subsistema agrupa roles funcionales que conforman una vía metabólica, un complejo o una clase de proteínas (Overbeek y cols. 2005).

### 1.3.4 Determinación de la diversidad

Los números efectivos de Archaea, Bacteria y Virus de DNA, así como de los subsistemas funcionales 1 y 2, se calcularon usando las abundancias de genes y contigs metagenómicos. Los porcentajes de traslape y recambio de especies o funciones se determinaron a través de la partición multiplicativa de la diversidad beta. El perfil de la diversidad alfa a los órdenes de diversidad  $q=0, 1, 2, 3$  y 4 de las comunidades del suelo y la tasa de traslape y recambio a  $q=0, 1$  y 2 entre comunidades fueron obtenidos con en el script en R “Metagenome Diversity” (Ma y



Li, 2018). La proporción de diversidad que comparten en tamaño las comunidades del suelo de bosque y de cultivo se calculó como describen Moreno y cols. (2011), con la ecuación 1

*Ecuación 1*

$$\text{Porcentaje de cambio de diversidad} = \frac{D_{\text{cultivo}} \times 100}{D_{\text{Bosque}}}$$

### 1.3.5 Análisis estadísticos

Se usó un análisis de varianza de doble vía (2-vías ANOVA) para determinar el efecto de la vegetación, el uso de suelo y la interacción entre ambos sobre la diversidad alfa taxonómica y funcional. También, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la correlación entre la diversidad taxonómica y la funcional a  $q=0, 1, 2$  y  $3$ . Debido a que la diversidad de Bacteria fue la más afectada por el cambio de uso del suelo, se realizó un análisis restringido de coordenadas principales (CAP) con la abundancia relativa de los phyla bacterianos y la diversidad taxonómica a  $q=0, 1, 2, 3$  and  $4$  con el paquete vegan v.2.5 (Oksanen y cols. 2018).

### 1.4 Resultados y discusión

Las curvas de diversidad taxonómica a nivel de especie fueron diferentes para cada dominio estudiado. El perfil de las curvas indicó que el ensamblaje de las comunidades fue moderadamente desigual para Archaea y Virus de DNA, mientras que el pronunciado descenso de la curva de Bacteria indicó una comunidad altamente desigual (Fig. 2A). En general, el número efectivo de especies de orden  $q=0$  ( ${}^0D_\alpha$ ) de las comunidades del suelo de Archaea, Bacterias y Virus de DNA fue igual independientemente del tipo de vegetación, es decir, bosque de encino o bosque de pino encino, o por la interacción de la vegetación y el uso de suelo (Tabla 2). La  ${}^0D_\alpha$  corresponde a la riqueza de especies pues no toma en cuenta su abundancia relativa (Chao y cols. 2014). El número efectivo de especies de orden  $q=1$  ( ${}^1D_\alpha$ ), que considera a las “especies típicas”, es decir, valora a las especies por su frecuencia (Jost 2006), indicó que la

vegetación tiene un efecto profundo en las comunidades de Archaea y Bacteria, mientras que, el uso de suelo solo afecta a las comunidades bacterianas. Se encontró el mismo resultado cuando  $q \geq 2$  ( ${}^{2,3,4}D_\alpha$ ), índices que valoran principalmente a las especies dominantes.

La proporción de la diversidad que comparten las comunidades de Archaea en los bosques y su correspondiente suelo de cultivo, fue casi del 100% para todos los órdenes  $q$ , independientemente de la vegetación (Fig. 2B y C). Esto indica que el mismo número de especies estuvieron presentes en todos los suelos y que las especies presentes tuvieron abundancias semejantes independientemente si las especies típicas o dominantes cambiaron entre suelos, es decir, la diversidad se mantuvo. Sin embargo, se obtuvieron diferentes resultados para las comunidades bacterianas. Se encontró el mismo número total de especies en los suelos de bosque y de cultivo, pero hubo un efecto sobre la abundancia de las especies que se reflejó en la disminución del porcentaje de cambio de la diversidad alfa considerando a las especies típicas y las dominantes. En el caso del bosque de encino, la diversidad de los suelos de cultivo equivale a entre un 45% y 55% de la diversidad contenida en el bosque, mientras que, la diversidad de los suelos de cultivo provenientes del bosque de pino-encino fue solo de entre un 25% y 35% de la diversidad contenida en el bosque (Fig. 4B).

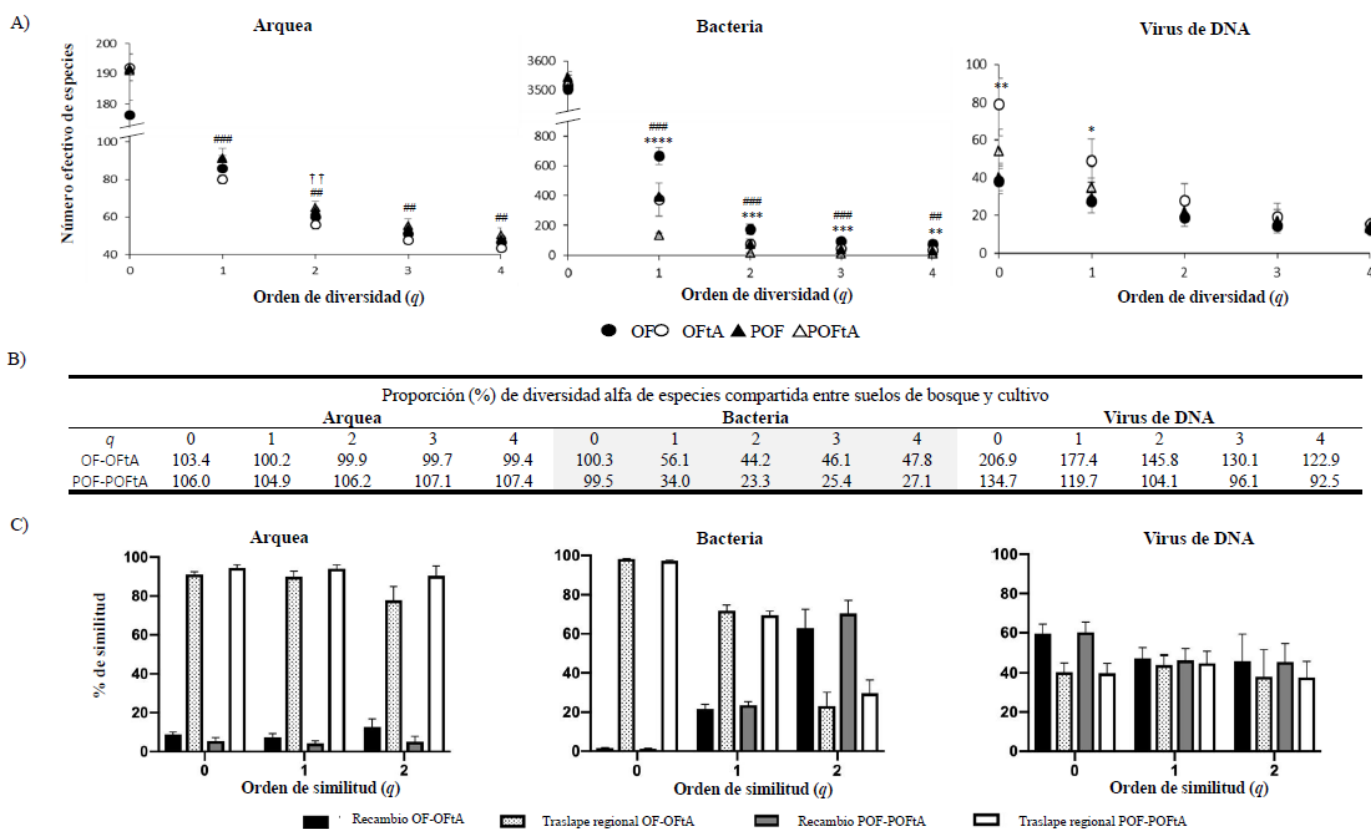


Figura 2 Efecto del cambio de uso de suelo de bosque a cultivo del Parque Nacional la Malinche en la diversidad taxonómica microbiana. A) Perfil de diversidad alfa a diferentes órdenes  $q$ , para Archaea, Bacteria y Virus de DNA con efecto significativo por el uso de suelo  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ , vegetación  $\#p \leq 0.05$ ,  $\#\#\#p \leq 0.001$ , y la interacción entre uso de suelo y vegetación  $\dagger p \leq 0.05$ ,  $\dagger\dagger p \leq 0.01$ ,  $\dagger\dagger\dagger p \leq 0.001$ . B) Porcentaje de cambio en magnitud de la diversidad alfa a diferentes órdenes  $q$  entre suelos de bosque y cultivo: 0% significa que el suelo de bosque tiene 100% más diversidad que los suelos de cultivo, 100% significa que son igualmente diversos y valores mayores a 100% indican que el suelo de cultivo fue más diverso que el suelo de bosque. C) Porcentajes de recambio y traslape regional entre suelos de bosque y cultivo, 100% de recambio indica comunidades totalmente diferentes en diversidad mientras 100% de traslape regional indica comunidades igualmente diversas.

Con respecto a la diversidad funcional, la riqueza de funciones fue afectada por el tipo de vegetación cuando se considera el subsistema 1 de la clasificación SEED, pero no el uso del suelo (Fig. 3A y Tabla 3). Las  ${}^1D_\alpha$  y  ${}^{2,3,4}D_\alpha$  fueron afectadas por el uso de suelo, es así como la  $D_\alpha$  de funciones de cultivo correspondió al 75% y 90% de la diversidad de los bosques. La tasa

de recambio de funciones fue de entre 18% y 30% más alta (Fig. 3C) y las funciones que se traslapan fueron más bajas en los suelos correspondientes a bosque de encino que en los bosques de pino-encino. La redundancia funcional puede ocurrir para funciones más generales debido a que algunos genes pueden tener la misma función. En los suelos estudiados aquí, sin embargo, esto no se observó y se encontró una gran pérdida de diversidad funcional (10%-45%) cuando se analizó el subsistema 2 de la clasificación SEED.

*Tabla 2 ANOVA de dos vías comparando el porcentaje de variación de diversidad taxonómica como función del uso de suelo (bosque-cultivo) y tipo de vegetación (bosque de encino-bosque pino-encino) y su interacción.*

Efecto	% de variación total de la diversidad taxonómica											
	Archaea				Bacteria				Virus			
	q=0	q=1	q=2	q=3	q=0	q=1	q=2	q=3	q=0	q=1	q=2	q=3
Uso de suelo-Vegetación	19.42	8.63	15.29*	15.78	8.85	0.17	2.57	2.36	12.29	11.82	8.28	6.37
Vegetación	14.96	63.91***	59.25**	55.14 **	31.78	43.17 ***	43.81 ***	44.28 ***	8.91	7.40	1.92	0.28
Uso de suelo	16.38	7.43	3.07	1.10	0.54	49.73 ****	44.08 ***	40.79 ***	51.00 **	35.86 *	12.41	3.53

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$

*Tabla 3 ANOVA de dos vías comparando el porcentaje de variación de diversidad funcional como función del uso de suelo (bosque-cultivo) y tipo de vegetación (bosque de encino-bosque pino-encino) y su interacción.*

Efecto	% de variación total de la diversidad funcional							
	Subsistema 1				Subsistema 2			
	q=0	q=1	q=2	q=3	q=0	q=1	q=2	q=3
Uso de suelo-vegetación	0.00	2.61	2.14	2.17	56.32 ***	1.94	1.80	2.11
Vegetación	50.00 *	14.80	15.74	15.92	13.14 *	14.74	15.90	15.96
Uso de suelo	5.55	46.10 *	43.72 *	43.17 *	16.33 *	44.19 *	43.08 *	43.07 *

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$

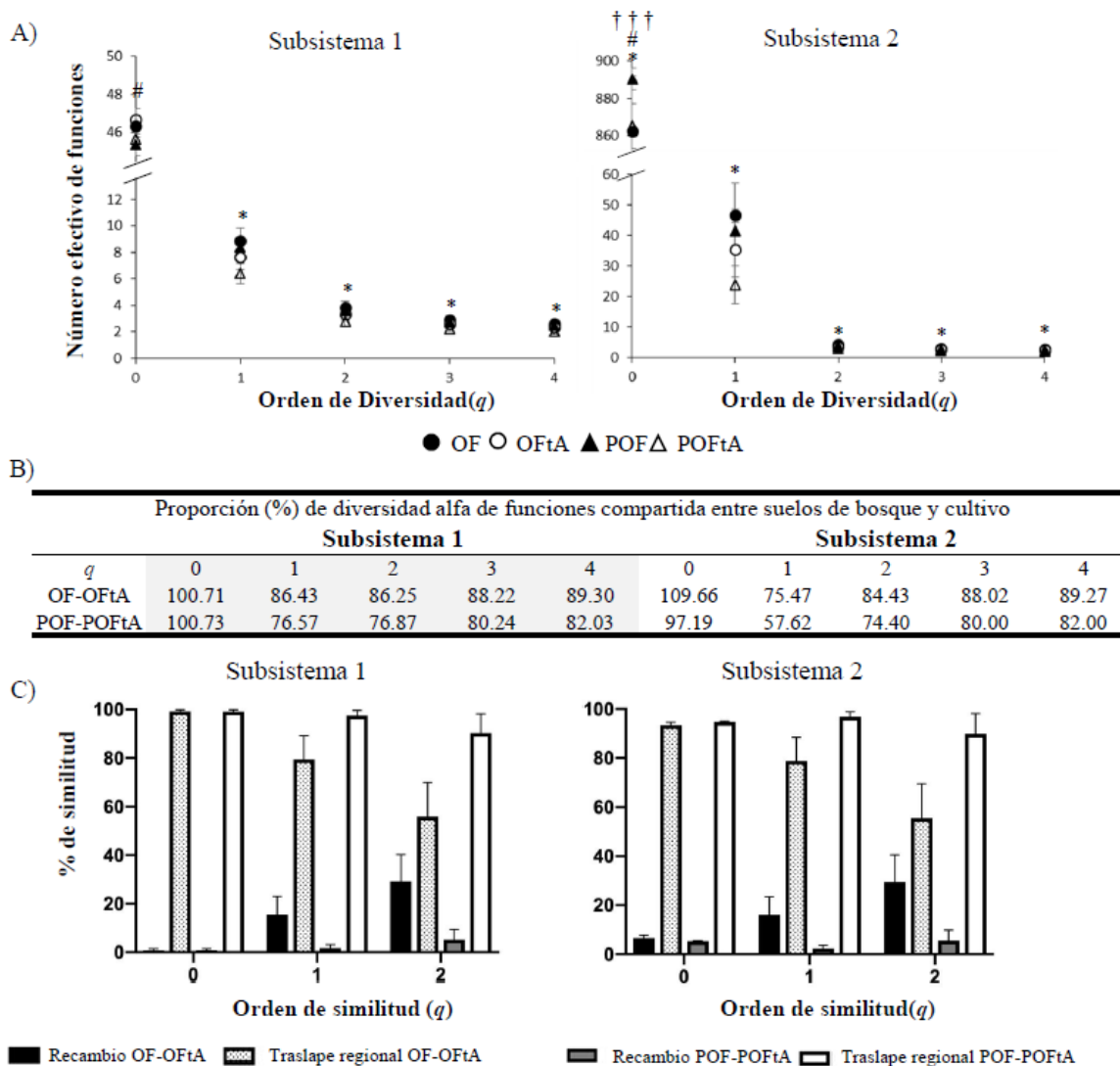


Figura 3 Efecto del cambio de uso de suelo de bosque a cultivo del Parque Nacional la Malinche en la diversidad funcional microbiana. A) Perfil de diversidad alfa a diferentes órdenes  $q$  para el subsistema 1 y 2 de la clasificación SEED con efecto significativo por el uso de suelo  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ , vegetación  $\#p \leq 0.05$ ,  $\#\#p \leq 0.01$ ,  $\#\#\#p \leq 0.001$ , y la interacción entre uso de suelo y vegetación  $\dagger p \leq 0.05$ ,  $\dagger\dagger p \leq 0.01$ ,  $\dagger\dagger\dagger p \leq 0.001$ . B) Porcentaje de cambio en magnitud de diversidad alfa a diferentes órdenes  $q$  entre suelos de bosque y cultivo, 0% significa que el suelo de bosque tiene 100% más diversidad que los suelos de cultivo, 100% significa que son igualmente diversos y valores mayores a 100% indican que el suelo de cultivo fue más diverso que el suelo de bosque. C) Porcentajes de recambio y traslape regional entre suelos de bosque y cultivo, 100% de recambio indica comunidades totalmente diferentes en diversidad mientras 100% de traslape regional indica comunidades igualmente diversas

Debido a que las comunidades de Archaea tuvieron poco cambio cuando la vegetación fue removida, la pérdida de diversidad funcional fue resultado de la pérdida de diversidad en las comunidades bacterianas. La correlación de Pearson demostró que la diversidad funcional ( $q=1,2,3$ ) estuvo positivamente correlacionada con la diversidad de bacteria ( $q=1,2$ ), pero no con la diversidad de Archaea (Tabla 4 y Anexo-Tabla S2 y S3).

*Tabla 4 Coeficientes de correlación de Pearson ( $R^2$ ) significativos entre la diversidad funcional de los subsistemas 1 y 2 de la clasificación SEED y la diversidad taxonómica.*

Diversidad taxonómica $q$ orden $D_{\alpha}$ -Dominio	$^0D_{\alpha}$	$^1D_{\alpha}$	$^2D_{\alpha}$	$^3D_{\alpha}$	$^4D_{\alpha}$
<b>Diversidad funcional del subsistema 1 de la clasificación SEED</b>					
$^0D_{\alpha}$ -Bacteria	(-) 0.37*				
$^1D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.47*				
$^2D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.41*				
$^3D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.33*				
$^1D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.41*	(+) 0.41*	(+) 0.41*	(+) 0.41*
$^2D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.34*	(+) 0.33*	(+) 0.33*	(+) 0.33*
<b>Diversidad funcional del subsistema 2 de la clasificación SEED</b>					
$^0D_{\alpha}$ -DNA Virus	(+) 0.47*				
$^2D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.36*				
$^1D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.40*	(+) 0.41*	(+) 0.41*	(+) 0.41*
$^2D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.33*	(+) 0.33*	(+) 0.33*	(+) 0.33*

El signo entre paréntesis indica el tipo de correlación. \*  $p < 0.05$

Las comunidades de Archaea son consideradas como microorganismos excepcionales que en ambientes no-extremos juegan roles limitados en los ciclos biogeoquímicos (Moissl-Eichinger y cols. 2018). Sin embargo, recientemente, se ha encontrado que los microorganismos de Archaea, están distribuidos ampliamente y comprenden una extensa diversidad de estilos de vida y repertorio de genes (Martínez-Núñez y Pérez-Rueda, 2016). La  $D_{\alpha}$  de Archaea se mantuvo e incluso aumentó cuando el suelo de pino-encino fue convertido a suelo de cultivo. Martínez-Núñez y Pérez-Rueda (2016) sugirieron que Archaea contiene enzimas más promiscuas que les proveen de un repertorio enzimático para hacer frente a múltiples variables ecológicas en ambientes con grandes fluctuaciones. Las comunidades de Archaea en suelos de cultivo que fueron reforestados por más de 20 años en la meseta Tibetana fueron igualmente diversos y mostraron alta similitud entre suelos (Jiao y cols. 2018). Las comunidades de Archaea

fueron más equitativas que las de bacteria, esto podría explicar por qué el efecto del cambio de uso de suelo en la diversidad bacteriana fue diferente comparado con la diversidad de Archaea. Wittebolle y cols. (2009) demostraron que la equitatividad inicial de una comunidad es un factor clave para preservar la estabilidad funcional de un ecosistema bajo un estrés ambiental. Es probable que la pérdida de diversidad bacteriana en el suelo dé como resultado una reducción en los servicios ecosistémicos. Algunos estudios han argumentado que cualquier pérdida en la diversidad microbiana podría impactar negativamente en la funcionalidad del ecosistema y en su provisión de servicios (Delgado-Baquerizo y cols. 2016). Los bosques caducifolios de encino pueden contener más de 200 especies de plantas (Slezák & Axmanová, 2016) comparado con sólo 20 en los cultivos de maíz (Eilu y cols. 2003). La cantidad y composición de los residuos vegetales y los compuestos orgánicos en la rizósfera de un suelo de bosque son, por lo tanto, más altos y variados que en suelos de cultivo. En resumen, los microorganismos asociados con plantas contribuyen substancialmente a la diversidad microbiana (Delgado-Baquerizo y cols. 2016).

El análisis CAP mostró que los phyla bacterianos con mayor efecto sobre la diversidad bacteriana fueron *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Fig. 6). *Proteobacteria* fue el phylum más abundante en todos los suelos y condujo la  ${}^0D_\alpha$  debido a que contuvo 1731 de las 3652 especies detectadas en los suelos (Anexo-Tabla S4). El CAP mostró que *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* afectaron  ${}^{1,2,3,4}D_\alpha$ . La abundancia relativa de *Bacteroidetes* disminuyó con la deforestación, probablemente porque son degradadores de materia orgánica como polisacáridos y proteínas, y la fracción de materia orgánica es mayor en un bosque que en un suelo de cultivo (Thomas y cols. 2011). Cualquier cambio en la fracción orgánica del suelo tendrá un efecto sobre la diversidad. La abundancia relativa de *Actinobacteria* y *Firmicutes* disminuyó en los suelos de encino cuando el suelo cambió su uso, pero no en los suelos de pino- encino. Los suelos de cultivo tuvieron un menor número de especies dominantes,  ${}^{2,3,4}D_{\alpha\text{Cultivo}} < {}^{2,3,4}D_{\alpha\text{Bosque}}$ , lo que sugiere comunidades bacterianas menos equitativas.

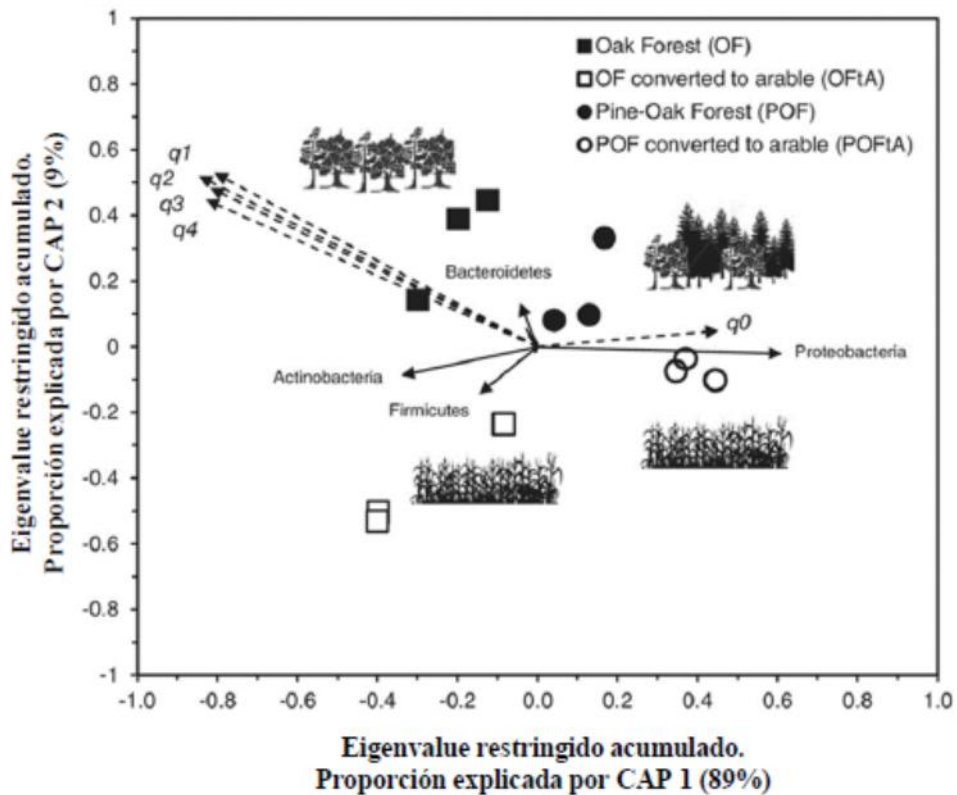


Figura 4 Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) con la abundancia relativa de phyla bacterianos y diversidad taxonómica a órdenes  $q = 0, 1, 2, 3$  y  $4$ , de suelos de bosque y cultivo del Parque Nacional La Malinche, México.

Encontramos que la pérdida en diversidad de especies bacterianas se correlacionó con la pérdida de diversidad funcional. Las comunidades bacterianas son conocidas por tener alta redundancia genética y metabólica que les permite hacer frente a las presiones ambientales. Sin embargo, el cambio de uso de suelo, combinado con prácticas de agricultura intensiva tiene un profundo efecto en el suelo, por ejemplo, la labranza intensiva induce degradación del suelo y el tipo de grano plantado puede afectar la estructura de la comunidad microbiana. Convertir bosque tropical a plantíos de soya (*Glycine max* (L.) Merr.) (Mendes y cols. 2015) o bosques a viñedos (Castañeda y Barbosa, 2017) no tuvo un efecto en la diversidad funcional, pero el maíz sí lo tuvo. En general, se encontró que el ecosistema del suelo mantuvo su riqueza sin importar el cambio de uso de suelo. Se ha reportado que los legados ecosistémicos, es decir, condiciones



previas de un ecosistema que persisten después de una perturbación, regulan varias funciones del suelo, como la descomposición de materia orgánica o las emisiones de N<sub>2</sub>O (Kallenbach y Grandy 2015, Abraha y cols. 2018). Es probable que la riqueza de especies microbianas que no cambia sirva como un reservorio de diferentes funciones que después son observadas como un efecto de legado. Por otro lado, Castañeda y Barbosa (2017) sugirieron que la diversidad compartida antes y después del cambio de uso de suelo es más un efecto de dispersión como resultado de la cercanía de los ecosistemas. De la misma manera, la similitud en la riqueza de especies entre el bosque y el suelo de cultivo parece ser consecuencia de la vecindad entre los ecosistemas.

La comunidad viral del suelo es de gran importancia debido a que puede influenciar la biodiversidad del suelo y la ecología. Por ejemplo, los virus pueden transferir genes de un hospedero a otro y las infecciones virales pueden dar forma a las comunidades microbianas. Esto afecta indirectamente a los ciclos biogeoquímicos y al recambio de nutrientes. Se esperaba que los cambios en la diversidad bacteriana afectaran a las comunidades virales como ya ha sido reportado (Hurwitz y cols. 2014). Sin embargo, se observó mayor diversidad viral en los suelos de cultivo que en los suelos de bosque y un recambio de especies similar al traslape regional (Fig. 2A y B). Otros grupos taxonómicos no investigados en este trabajo, hongos y vertebrados, pudieron haber cambiado la diversidad viral. Aún no es claro como las características del suelo y las prácticas de manejo de los ecosistemas afectan a las comunidades virales. Se ha reportado que la aplicación de fertilizantes incrementa la abundancia de virus (Chen y cols. 2014) y que la variabilidad temporal debida a las estaciones del año también afecta su abundancia en suelos de bosque y cultivo (Narr y cols. 2017). Las comunidades virales son muy dinámicas debido a que los virus tienen capacidades evolutivas extremas, así como alta diversidad genética, lo que les ha permitido parasitar a todos los grupos de organismos conocidos y adaptarse rápidamente a numerosas especies hospederas.

## CAPÍTULO 2. Cambios en la estructura microbiana de suelos de bosque que cambiaron su uso a cultivo.

### 2.1 Antecedentes

La estructura de las comunidades microbianas del suelo, es decir, la ocurrencia y abundancia de los diferentes grupos taxonómicos, está definida por las características ambientales y propiedades del suelo. El cambio de uso de suelo implica una serie de cambios en las condiciones ambientales como ya se mencionó anteriormente. Se ha observado que los distintos grupos microbianos responden diferencialmente a estos cambios. Por ejemplo, la abundancia relativa de *Acidobacteria* en el suelo disminuyó notablemente con la conversión de bosque tropical a plantación de palma, mientras que, la abundancia relativa de *Actinobacteria* aumentó (Lee-Cruz y cols. 2013). En el bosque tropical de Indonesia se encontró que el cambio de uso del suelo a monocultivo de árboles de caucho impactó negativamente la abundancia de *Proteobacteria* mientras que, estimuló a *Actinobacteria* (Schneider y cols. 2015, Berkelmann y cols. 2018). En otro ejemplo, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, *Dictyoglomi* y *Tenericutes* fueron más abundantes en bosques nativos de Sudáfrica, mientras que, *Planctomycetes* y *Nitrospirae* fueron más abundantes en plantaciones forestales (Amoo y Babalola, 2019). Por otro lado, se ha relacionado al phylum *Bacteroidetes* como indicador de fatiga de suelos de agricultura sin importar el origen del suelo (Wolińska y cols. 2017).

Por su parte, las propiedades fisicoquímicas del suelo han mostrado relación también con la estructura de las comunidades microbianas del suelo. Por ejemplo, en Brasil se encontró que cuando el suelo del bosque tropical nativo cambió su uso a agricultura, ganadería o fue deforestado, las propiedades del suelo cambiaron y existió una correlación positiva entre la estructura de la comunidad de bacterias de cada sitio con el contenido de C, Mn, K, N y  $\text{NO}_3^-$ , así como con el pH (Mendes y cols. 2015). También, Gómez-Acata y cols. en 2016 reportaron cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo, i.e. pH, materia orgánica, nitrógeno y carbono total, debido al cambio de suelo forestal a suelo agrícola en bosque templado, donde

altos valores de pH y contenido de materia orgánica, favorecieron a bacterias pertenecientes a los phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* y valores bajos de pH favorecieron a los phyla *Acidobacteria*, *Chloroflexi* and *Gemmatimonadetes* (Gómez-Acata et al., 2016). Los cambios en la estructura de las comunidades microbianas del suelo debido a las propiedades fisicoquímicas son notorios, incluso en suelos con el mismo uso, así, en bosques a diferentes altitudes *Actinobacteria* se correlacionó positivamente con el contenido de materia orgánica y pH, más que con la altitud, por su parte *Acidobacteria* mostró relación negativa con el pH y los phyla de *Archaea* no mostraron cambios significativos en su estructura y diversidad. De la misma forma diferentes clases de *Bacteroidetes* correlacionaron positivamente con el contenido de C y N, más que con la altitud. (Siles y Margesin, 2016). En general, se ha observado que cambios en el C total, la relación C:N y el pH debidos al cambio de uso de suelo son los factores que mejor explican la variación de las comunidades bacterianas (Fierer y Jackson 2006, Lauber y cols. 2008, Fierer y cols. 2012, Kuramae y cols. 2014).

El cultivo de maíz y el uso de prácticas agrícolas tradicionales representan un manejo muy intensivo del suelo por lo que la deforestación del bosque y el manejo intensivo del suelo pudo haber afectado a un gran número de grupos taxonómicos microbianos del PNL. Al igual que en otros ecosistemas, el cambio en las propiedades fisicoquímicas del suelo puede explicar las variaciones en el microbioma del suelo. Hasta nuestro conocimiento, son muy pocos los estudios que han evaluado la estructura taxonómica del suelo en bosque templado mediante herramientas metagenómicas.

## 2.2 Pregunta de investigación

PI: ¿Cómo es afectada la estructura de la comunidad microbiana por las propiedades fisicoquímicas del suelo cuando cambia su uso de bosque a cultivo?

## 2.3 Metodología

El sitio de muestreo, la extracción y secuenciación del DNA, así como los análisis bioinformáticos corresponden con los mencionados en las secciones 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.3, respectivamente.

### 2.3.1 Análisis fisicoquímicos del suelo

Los análisis fisicoquímicos se hicieron de acuerdo con Chávez-Romero y cols. (2016). Brevemente, el pH se determinó a partir de 10 g de suelo, en una suspensión 1:2.5 suelo-agua utilizando un potenciómetro 916 Ti-Touch (Metrohm, Suiza). La humedad relativa se obtuvo a partir de 15 g de suelo utilizando un analizador de humedad PMB 53 (ADAM, Reino Unido). La determinación de la distribución de partículas del suelo se realizó por el método del hidrómetro. El carbono orgánico del suelo (COS) se determinó a partir de 200 mg de suelo mediante un analizador TOC SSM-5000 (SHIMADZU, Japón). La capacidad de retención de agua (CRA) fue obtenida por el método gravimétrico. El nitrógeno total (NT) se obtuvo por el método Kjeldahl y la conductividad electrolítica mediante el extracto obtenido de los suelos saturados de agua. Se realizó una prueba de Mann-Whitney para determinar el efecto del cambio de uso de suelo sobre las propiedades fisicoquímicas de los suelos de bosque y su respectivo suelo de cultivo. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado como significativo.

### 2.3.2 Análisis diferencial de abundancias

Se determinaron a los phyla y las especies microbianas que fueron diferencialmente abundantes, es decir, que difieren en abundancia entre grupos experimentales, con respecto a una referencia elegida, en este caso, la media geométrica del número de lecturas por grupo taxonómico (Fernandes y cols. 2013). Las abundancias diferenciales se obtuvieron entre cada suelo de bosque y su respectivo cambio a cultivo, y entre suelos de bosque y cultivo, mediante el paquete ALDEx2 (Fernandes y cols. 2013). Brevemente, se realizó una transformación clr (center log-ratio) con la matriz de conteos de lecturas de Bacteria, Archaea y Virus, usando la media geométrica de cada muestra como vector de referencia y 1000 simulaciones de Monte-Carlo. Posteriormente, se realizó una t de Welch entre suelos con diferente origen, se determinó el

tamaño de efecto y especies con valor de  $p \leq 0.01$  se consideraron significativos. Se realizó un análisis CAP con los phyla y las especies diferencialmente abundantes entre los suelos y las características fisicoquímicas de los suelos no colineales, es decir, pH, CE, COS, NT, limo y arena.

## 2.4 Resultados y discusión

Se identificaron un total de 40 phyla de Bacteria y de Archaea. Los phyla bacterianos dominantes fueron *Proteobacteria* y *Actinobacteria* y *Euryarchaeota* de Archaea en todos los suelos. Los phyla procarióticos diferencialmente abundantes se muestran en la Fig. 5. La abundancia de los phyla *Thaumarchaeota*, *Proteobacteria* y *Gemmatimonadetes* aumentó significativamente en los suelos de cultivo independientemente del tipo de vegetación original, mientras que, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *Acidobacteria* disminuyeron cuando el bosque de encino se convirtió a cultivo, y *Chlamydiae* cuando el bosque de pino-encino se convirtió a zona agrícola.

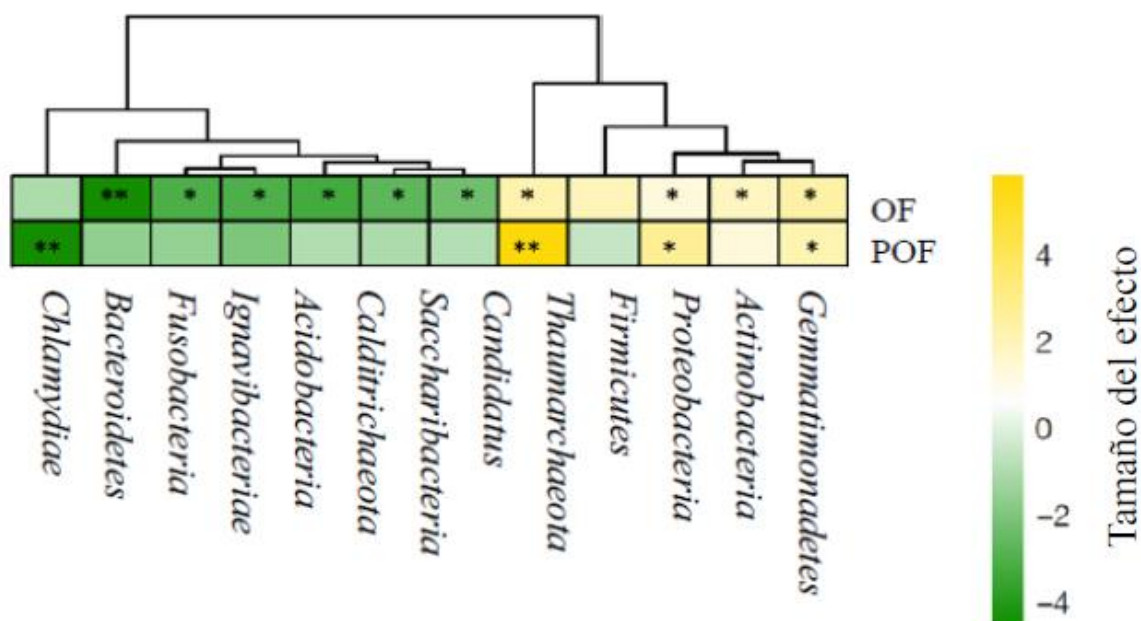


Figura 5 Phyla de Bacteria y Archaea diferencialmente abundantes en suelo de bosque de pino-encino (POF) o de bosque de encino (OF) \* $p \leq 0.05$  y \*\* $p \leq 0.01$

Se identificaron un total de 4,084 especies, que comprendieron 3,651 bacterias, 212 Archaea y 221 Virus, de las cuales, 180 fueron diferencialmente abundantes entre el ecosistema de bosque de pino-encino (POF) y su cultivo (POFtA) y 203 entre el ecosistema de bosque de encino (OF) y cultivo (OFtA). De ellos, 46 especies fueron diferencialmente abundantes en ambos bosques cuando cambiaron su uso a cultivo (Fig. 6). Las especies bacterianas diferencialmente abundantes pertenecen a los phyla *Proteobacteria* (96 entre POF y POFtA, 46 entre OF y OFtA), *Actinobacteria* (37, 37), *Bacteroidetes* (35, 103), *Firmicutes* (4, 15), *Gemmatimonadetes* (2, 0), *Chlamydiae* (2, 0) y *Acidobacteria* (1, 0), *Chloroflexi* (0, 1) y *Cyanobacteria* (0, 1). Por su parte, dos especies de Archaea variaron en ambos ecosistemas y pertenecen al phylum *Thaumarchaeota* (Fig. 6E) y fueron más abundantes en suelos de cultivo comparado con el suelo de bosque. *Candidatus Nitrosopumilus sediminis* (*Thaumarchaeota*) fue más abundante en el suelo POFtA comparado con POF y *Halorubrum lacusprofundi* (*Euryarchaeota*) fue más abundante en el suelo OFtA comparado con el OF (Fig. 14).

Todas o la mayoría de las especies diferencialmente abundantes que pertenecen a los phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* aumentaron en los suelos de cultivo, siendo las especies de los géneros *Achromobacter*, *Raoultella* y *Stenotrophomonas* de *Proteobacteria* las que tuvieron el mayor incremento cuando cambió el uso del suelo (Fig. 6). Por su parte, todas las especies diferencialmente abundantes del phylum *Bacteroidetes* disminuyeron en los suelos de cultivo. Se observó un patrón similar cuando se hizo el análisis considerando el tipo de vegetación, las especies diferencialmente abundantes de *Actinobacteria* que, aunque no son las mismas especies en los dos tipos de bosque, aumentaron en el cultivo (Fig. 7). Las especies diferencialmente abundantes de *Bacteroidetes* tuvieron el mismo patrón y disminuyeron cuando el bosque cambió a cultivo (Fig. 8). Es importante resaltar que el suelo OF tuvo más especies diferencialmente abundantes de *Bacteroidetes* que el suelo POF. El patrón de cambio de las especies diferencialmente abundantes del phylum *Proteobacteria* se observó por género y por tipo de vegetación, es decir, las especies de *Pseudomonas* fueron más abundantes en POF que en POFtA (Fig. 8), mientras que, las especies de *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella* y

*Stenotrophomonas* fueron más abundantes en POFtA que en POF (Fig. 11). Cabe destacar que la abundancia de *Serratia proteomaculans* y *Bradhyrhizobium lablabi* disminuyó 688 veces y 3 veces, respectivamente, cuando el suelo cambió a cultivo (Fig. 9 y 10). Las especies de *Bradhyrhizobium* fueron más abundantes en suelos OF que en OFtA y las especies de *Stenotrophomonas* fueron dominantes en los suelos de OFtA (Fig. 12). La figura 13 muestra las abundancias relativas de las especies de *Firmicutes* y la figura 14 de otros phyla de bacteria y archaea.

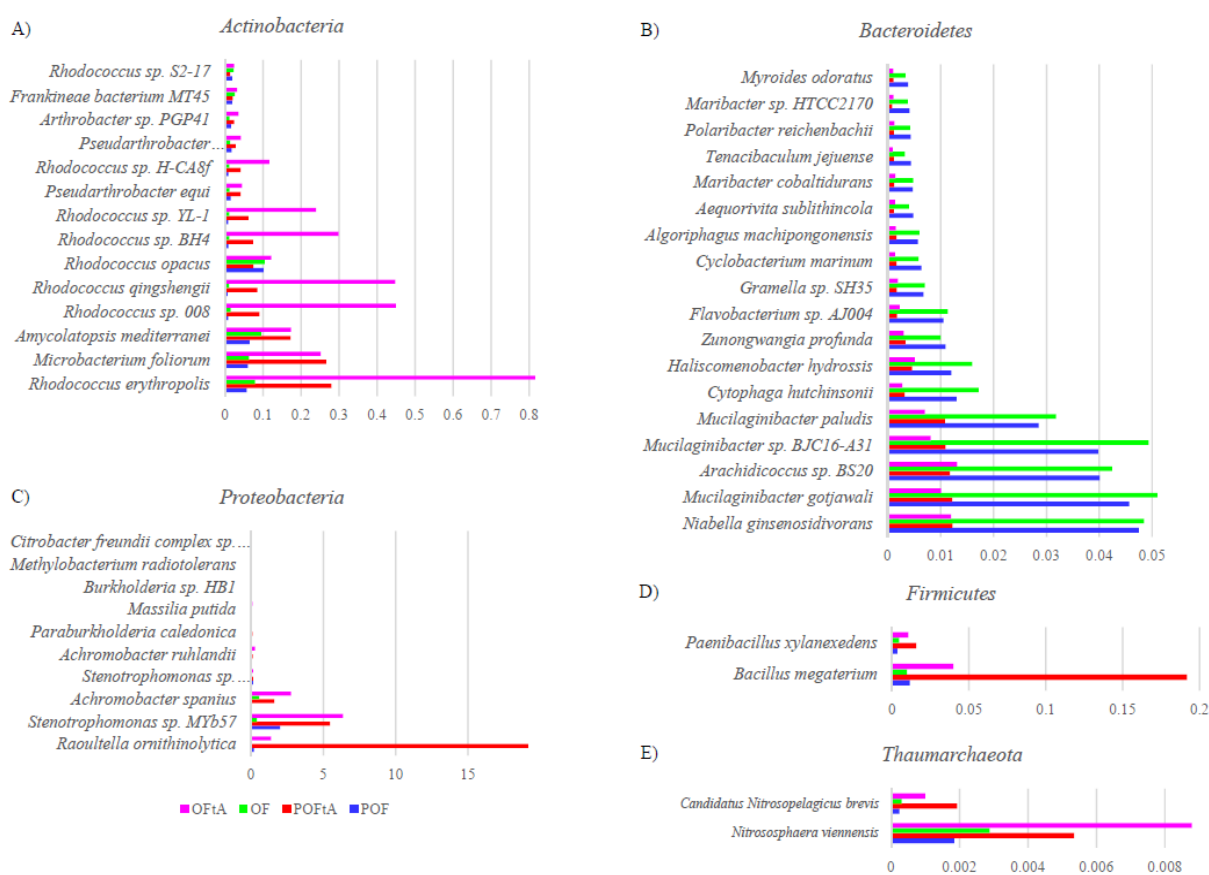


Figura 6 Abundancia relativa de las especies de Bacteria y Archaea diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) en suelo de bosque de pino-encino (POF) que cambió a cultivo (POFtA) y suelo de bosque de encino (OF) que cambió a cultivo (OFtA). A) Actinobacteria, B) Bacteroidetes, C) Proteobacteria, D) Firmicutes, E) Thaumarchaeota

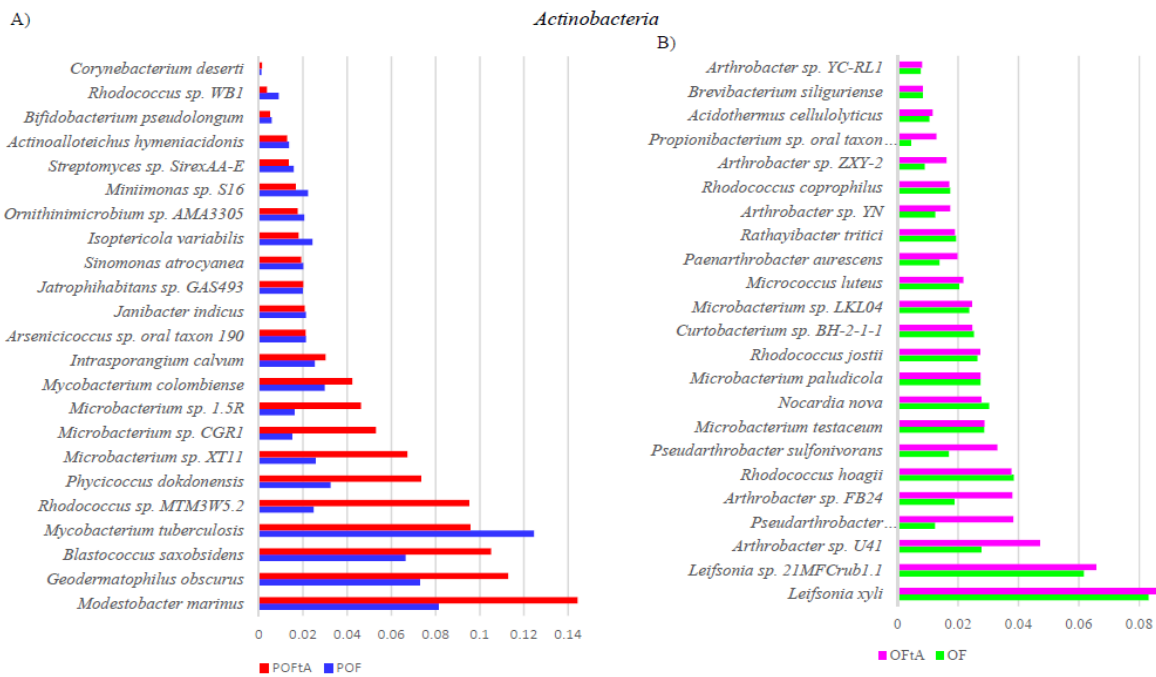


Figura 7 Abundancia relativa de especies del phylum Actinobacteria que fueron diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) en A) suelos de bosque de pino-encino (POF) convertidos a cultivo (POFtA) y B) suelos de bosque de encino (OF) convertidos a cultivo (OFtA)



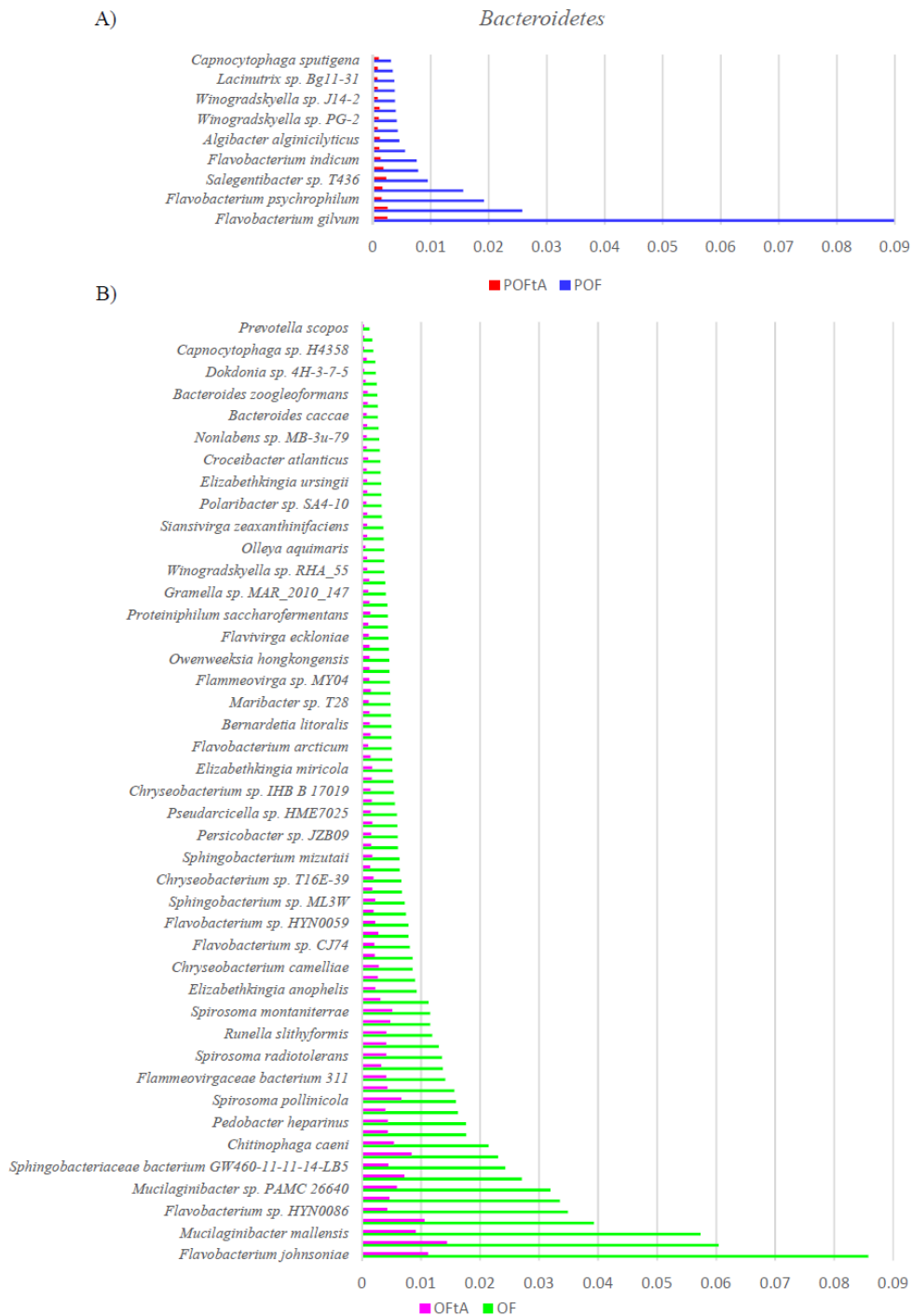


Figura 8 Abundancia relativa de especies del phylum *Bacteroidetes* diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) en A) suelos de bosque de pino-encino (POF) convertidos a cultivo (POFtA) y B) suelos de bosque de encino (OF) convertidos a cultivo (OFtA)

Proteobacteria

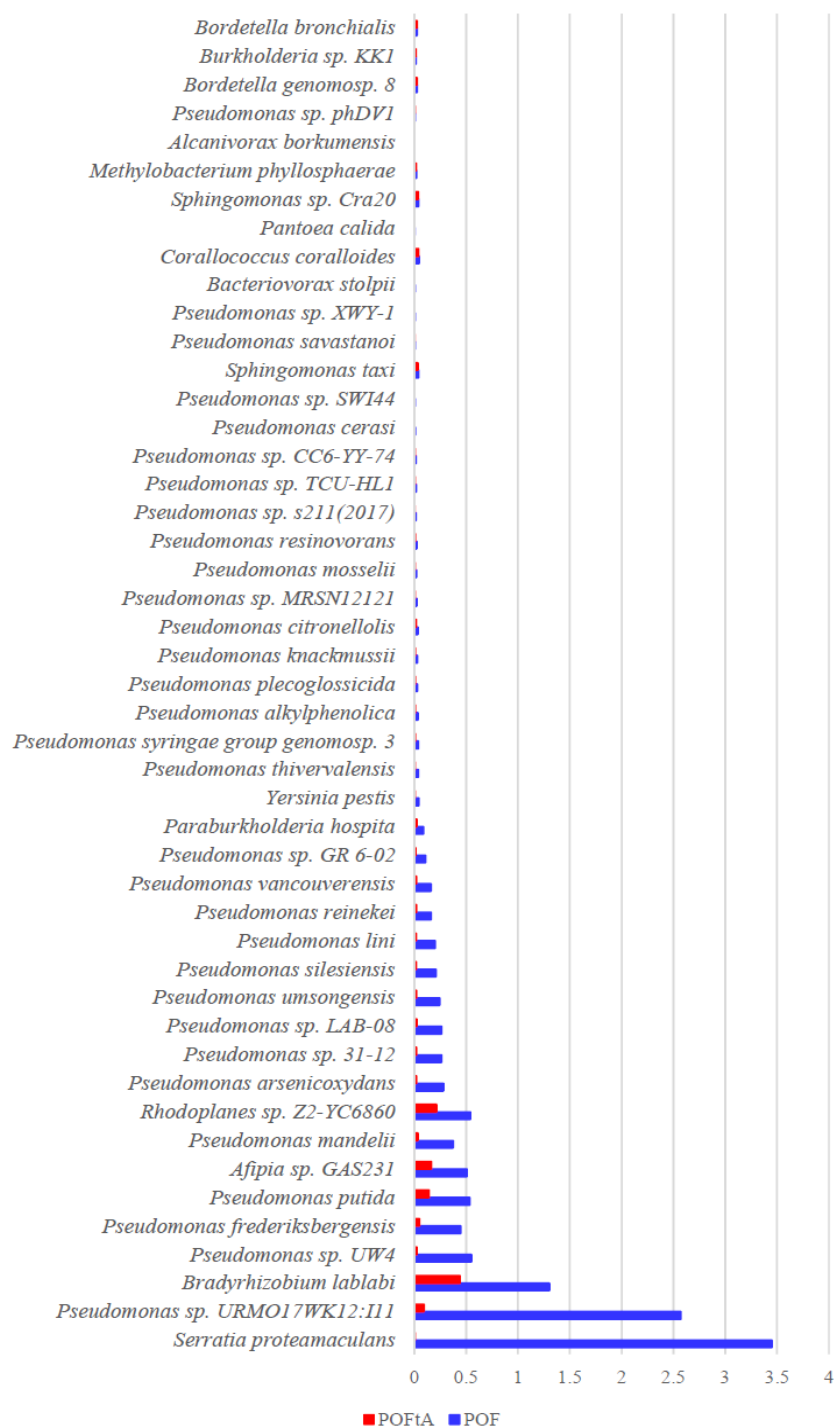


Figura 9 Abundancia relativa de especies más frecuentes del phylum Proteobacteria diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) entre suelos de bosque de pino-encino (POF) y de cultivo (POFtA).

Proteobacteria



Figura 10 Abundancia relativa de especies del phylum Proteobacteria, que fueron diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) y tuvieron menor abundancia relativa en suelos de bosque de pino-encino (POF) que en suelos de cultivo (POFtA).

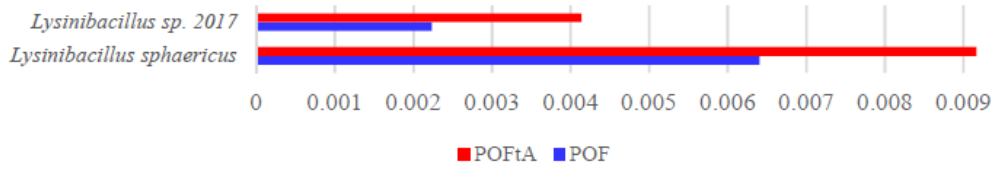
Proteobacteria



Figura 11 Abundancia relativa de especies del phylum Proteobacteria, que fueron diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) en suelos de bosque de encino (OF) convertidos a cultivo (OFtA)

A)

*Firmicutes*



B)

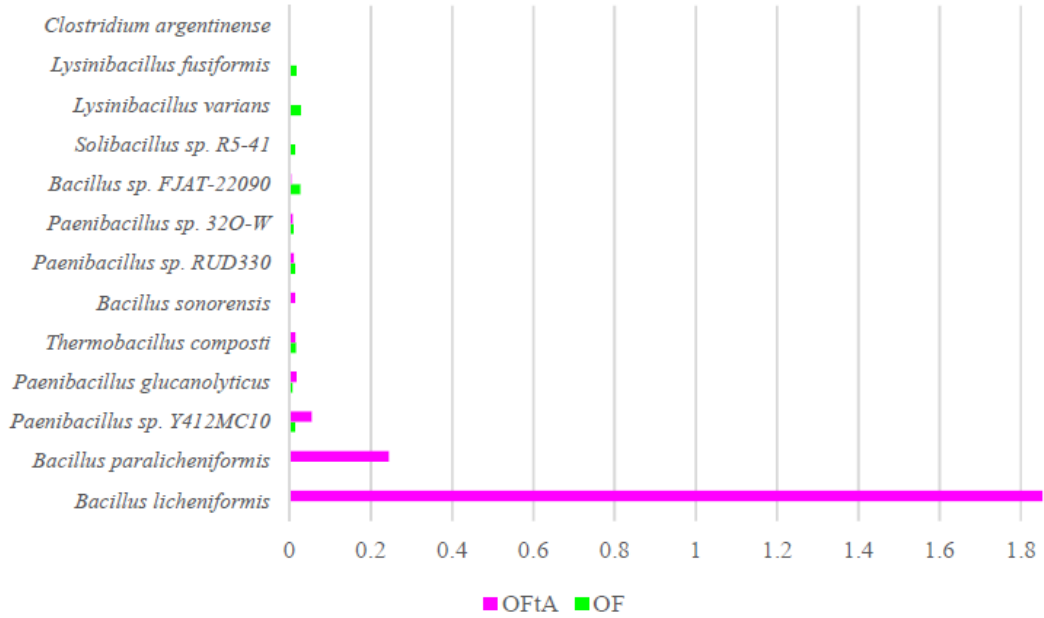


Figura 12 Abundancia relativa de especies del phylum Firmicutes diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) en A) suelos de bosque de pino-encino (POF) convertidos a cultivo (POFtA) y en B) suelos de bosque de encino (OF) convertidos a cultivo (OFtA).

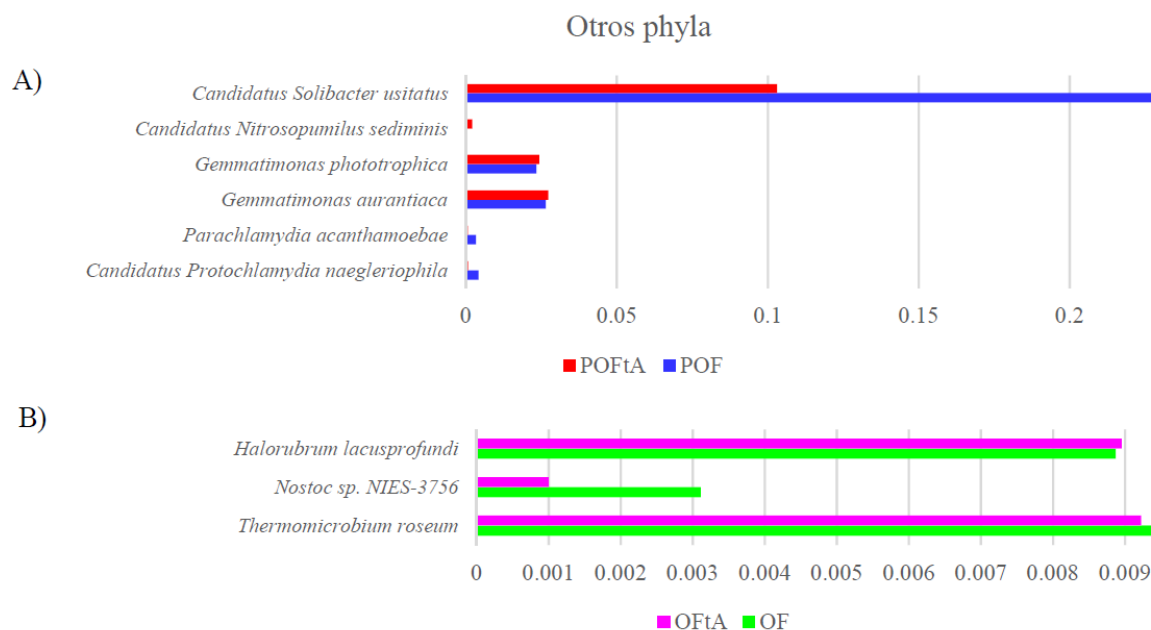


Figura 13 Abundancia relativa de especies de otros phyla (Archaea y Bacteria) diferencialmente abundantes ( $p \leq 0.01$ ) en A) suelos de bosque de pino-encino (POF) convertidos a cultivo (POFtA) y en B) de bosque de encino (OF) convertidos a cultivo (OFtA).

El cambio de uso de suelo disminuyó el COS, el NT y la CRA en los dos tipos de bosque. La conductividad electrolítica fue la misma en los suelos de bosque y de cultivo. El pH y la cantidad de arcilla y limo disminuyeron cuando el bosque de pino-encino fue convertido a cultivo, pero no en el bosque de encino. La disminución de arcilla y limo resultó en un aumento de la cantidad de arena (Tabla 5).

Tabla 5 Propiedades fisicoquímicas de suelo de bosque y de cultivo del “Parque Nacional la Malinche”

	pH	CE	CRA	COS	NT	Arcilla	Arena	Limo	Clasificación textural
		$\mu\text{S}$	$\text{g H}_2\text{O/Kg}$ suelo seco	$\text{g/Kg}$ de suelo seco					
POF	6.2	645	641.3	25.7	1.8	28.6	798.1	173.2	Franco arenoso
POFtA	5.2	792.7	424.9	11	1.3	11	908.5	80.3	Arenoso
Valor de $p$	<b>0.05</b>	0.7	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	
OF	6.0	731	588.8	18.0	1.6	14.5	828.9	156.4	Franco arenoso
OFtA	5.3	471	451.9	7.7	1.1	34.4	848.8	116.7	Arenoso
Valor de $p$	0.1	0.3	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>	0.2	0.358	0.2	

POF: bosque de pino-encino, POFtA: bosque de pino-encino convertido a cultivo, OF: bosque de encino, OFtA: bosque de encino convertido a cultivo.

CE: conductividad electrolítica, CRA: capacidad de retención de agua, COS: carbono orgánico del suelo, NT: nitrógeno total.

El análisis CAP con datos taxonómicos (a nivel de phylum y de especies) y con las características físicoquímicas de los suelos reveló una clara separación entre los suelos de bosque y de cultivo (Fig. 15). Las comunidades microbianas de los bosques fueron más parecidas entre ellas y las comunidades de los suelos de cultivo muy diferentes entre sí. La varianza de la estructura taxonómica a nivel de phylum fue significativamente explicada por  $\text{COS} > \text{NT} > \text{pH} > \text{limo}$  y la estructura a nivel de especie  $\text{COS} > \text{pH} > \text{limo} > \text{NT} > \text{arena}$  (Tabla 6).

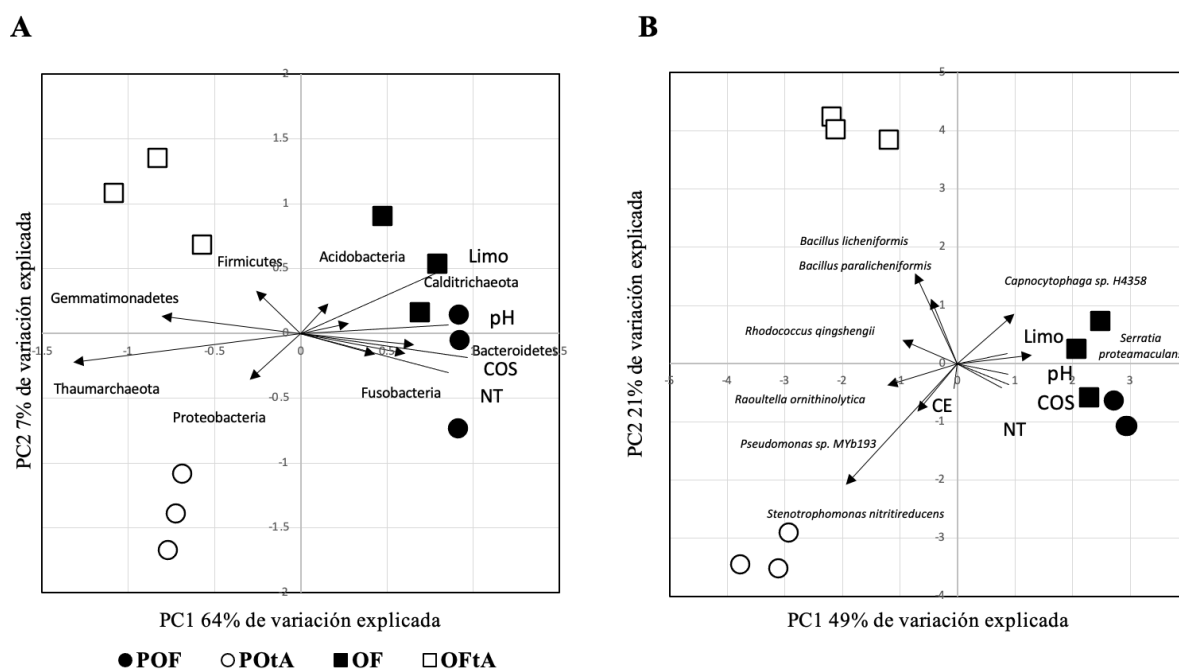


Figura 14 Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) con las propiedades del suelo y grupos taxonómicos a nivel de A) phylum de Bacteria y Archaea y B) de especies diferencialmente abundantes entre suelos de bosque de pino-encino (POF) y convertidos a cultivo (POFtA) y de bosque de encino (OF) y convertidos a cultivo (OFtA)

Fusaro y cols. (2019) reportaron que el cambio de uso de suelo disminuyó en más del 50% los almacenes de COS en el Parque Nacional La Malinche. El cambio de uso de suelo, además de disminuir el COS en un 57%, también disminuyó el TN en un 28-31% y la CRA en un 24-33% como se ha observado en otros ecosistemas (Guo y Grifford 2002, Trivedi y cols. 2016, Owuor y cols. 2018). La disminución de limo e incremento de arena se ha documentado previamente y se ha relacionado con la pérdida de materia orgánica (Trivedi y cols. 2016), por lo que el cambio de uso del suelo tuvo un mayor impacto en las propiedades del suelo del bosque de pino-encino

que el suelo de encino donde no se observó un cambio significativo en la distribución de partículas del suelo. En otros estudios también se ha observado una disminución de *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Acidobacteria* y un aumento de *Actinobacteria* cuando disminuye el contenido de la materia orgánica (Zeng y cols. 2017, Mhete y cols. 2020) Sin embargo, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria* no mostraron correlación entre su abundancia y el contenido de materia orgánica cuando se cambió el uso del suelo de selva tropical a cultivo (Mendes y cols. 2015)

*Tabla 6. Varianza de la estructura taxonómica de la microbiota explicada por las características fisicoquímicas de suelos de bosque y cultivo del “Parque Nacional La Malinche”*

Característica del suelo	Varianza	F	Valor de p
Phylum			
pH	1.84	8.90	<b>0.004</b>
Carbono orgánico (COS)	2.35	15.2	<b>0.001</b>
Conductividad electrolítica (EC)	0.12	0.32	0.773
Nitrógeno total (NT)	1.86	9.20	<b>0.002</b>
Contenido de arena	1.11	3.98	0.051
Contenido de limo	1.73	7.99	<b>0.008</b>
pH + COS + NT + limo <sup>a</sup>	2.90	5.12	<b>0.003</b>
Especie			
pH	184.6	6.20	<b>0.004</b>
Carbono orgánico	200.8	7.17	<b>0.002</b>
Conductividad electrolítica	27.3	0.06	0.622
Nitrógeno total	159.3	4.95	<b>0.012</b>
Contenido de arena	124.2	3.48	<b>0.022</b>
Contenido de limo	179.5	5.95	<b>0.007</b>
pH + EC + COS + NT + limo <sup>a</sup>	361.1	3.61	<b>0.004</b>

<sup>a</sup> Modelo usado en el análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de la Fig. 15

La diferencia de abundancias de las especies microbianas del suelo es de esperarse debido al fuerte cambio en las propiedades del suelo, aunado al cambio de vegetación. Por ejemplo, el cambio en la dominancia de especies como *Bradhyrhizobium*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* en suelos de bosque por la dominancia de *Raoultella*, *Stenotrophomonas* y *Achromobacter* en



suelos de cultivo. En el capítulo anterior se reportó que los suelos de cultivo fueron menos diversos porque fueron menos equitativos y esto puede deberse a la dominancia de *Raoultella ornithinolytica* que representó el 19% de las secuencias en los suelos de cultivo. Siempre existen especies que se benefician de cambios tan impactantes como el cambio de uso suelo. En los suelos de este estudio, *Raoultella ornithinolytica* aumentó 100 veces en suelos POftA y 47 veces en suelos OFtA, por ejemplo. *Raoultella*, al igual que *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Ideonella* y *Klebsiella*, es uno de los géneros de bacterias diazotróficas asociadas con maíz (Roesch y cols. 2008). Además, produce ácido indol acético y sideróforos que la pueden hacer muy competitiva en el ambiente de la rizósfera del maíz (Xu y cols. 2019), por lo que el establecimiento de una nueva vegetación podría estar promoviendo su aumento en suelos de cultivo. Caso similar ocurre con *Stenotrophomonas* que es un género muy versátil, muy competitivo en ambientes con limitación de nutrientes y frecuentemente asociado con plantas a través de interacciones quimiotácticas mediadas por exudados radiculares (Ryan y cols. 2009), además, su presencia está fuertemente relacionada con suelos de cultivo manejados con estiércol de animales (Ding y cols. 2014, Deredjian y cols. 2016). En el área de estudio, la aplicación de estiércol no es común, pero es frecuente que el ganado padece por los campos de cultivo (Arriaga-Cabrera y cols. 2009). En particular, el aumento significativo de *Stenotrophomonas nitrireducens* en POftA pudo deberse a la fertilización con N de los cultivos. Por su parte, *Achromobacter* se ha reportado frecuentemente asociado con la rizósfera de maíz (Dohrmann y cols. 2013). Además, se ha observado que tener funciones metabólicas más eficientes que sus competidores, y no necesariamente varios nichos metabólicos, es fundamental para la prevalencia de determinadas especies (Russel y cols. 2017). El cambio de uso de suelo altera las comunidades vegetales y éstas no sólo capturan la energía que sustenta la producción primaria en los ecosistemas terrestres, afectando también al ciclo de carbono y muy importante, interactuando directamente con la comunidad microbiana bajo suelo (McKinley, 2019). Aunque los rizobiales se han estudiado principalmente en asociación con leguminosas (Poole y cols. 2018), miembros del género *Bradyrhizobium* se han encontrado más en vida libre que en asociaciones simbióticas (Vaninsberghe y cols. 2015). Los rizobiales son muy abundantes en suelos de bosque debido a su alta capacidad para descomponer celulosa (Lladó y cols. 2017).

Aunque en los suelos OF-OFtA se encontraron más especies diferencialmente abundantes que en los POF-POFtA, la disminución de la diversidad fue más fuerte en POF-POFtA porque éstos fueron menos diversos, tal como sugieren la mayoría de la hipótesis. Sin embargo, algo que destaca mucho en nuestros resultados son las comunidades microbianas tan diferentes entre los suelos de cultivo provenientes de los dos tipos de bosque. Se ha documentado previamente que la vegetación original puede tener un efecto muy importante en la composición de las comunidades microbianas del suelo (Elgersma y cols. 2011). Sin embargo, las comunidades microbianas de los suelos de los dos tipos de bosque en este estudio son muy similares entre sí posiblemente porque la composición de materia orgánica es muy parecida. Un factor que podría tener un fuerte impacto sobre el microbioma del suelo son las prácticas de cultivo, y aunque en ambos sitios actualmente se aplican prácticas de agricultura tradicional, es decir, labranza convencional, monocultivo de maíz (con siembra ocasional de cebada, frijol y haba), fertilización nitrogenada (con urea o sulfato de amonio y ocasionalmente estiércol de vaca), retiro de residuos y control manual de malezas, posiblemente la historia del manejo de los cultivos ha afectado la estructuración de las comunidades microbianas del suelo pues el cambio de uso del suelo se hizo hace 50 años.

En este estudio reconocimos patrones en la respuesta de algunos grupos taxonómicos bacterianos al cambio de uso del suelo independientemente del tipo de vegetación del bosque original. Por ejemplo, la disminución en especies del phyla *Bacteroidetes*, *Pseudomonas*, *Bradhyrhizobium* en conjunto con el aumento de *Actinobacteria*, *Raoultella* y *Stenotrophomonas*. Estos patrones podrían funcionar como indicadores de degradación o recuperación del suelo de bosque templado a través de su aumento o disminución en conjunto. En suelos con diferente uso en ambientes semiáridos se reportó un patrón similar entre *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, donde a mayor porcentaje de *Actinobacteria* hubo un menor porcentaje de *Bacteroidetes* y viceversa, esta relación *Actinobacteria*:*Bacteroidetes* se correlacionó con cambios en el uso de suelo, contenido de materia orgánica, fósforo, arcilla y arena, es decir, a menor contenido de materia orgánica, fósforo y arcilla y mayor arena, mayor porcentaje de *Actinobacteria* (Mhete y cols. 2020). Además, *Bacteroidetes* se ha identificado como un phylum sensible a la intensidad de las prácticas agrícolas y su abundancia está definida

por alto contenido de carbono y un pH que tiende a la neutralidad (Wolińska y cols. 2017), tal como los suelos de bosque del PNLM.

Un suelo más diverso es más estable ante una perturbación como el cambio de uso de suelo, como se explicó anteriormente, pero la estabilidad de una comunidad también depende de su composición original. Aunque la diversidad fue un factor importante para definir la respuesta de la comunidad a la perturbación, no ha sido el único factor que ha definido la estructura y composición de las comunidades microbianas del suelo. En nuestro estudio, el tipo de bosque y posiblemente la historia de manejo de los cultivos han dado lugar al aumento o disminución de especies y éstas, a su vez, podrían actuar como intermediarios para el establecimiento de una nueva estructura de la comunidad.

## CAPÍTULO 3: La conversión de bosque templado a cultivo afecta las interacciones ecológicas potenciales de las comunidades microbianas del suelo

### 3.1 Antecedentes

Las interacciones entre las diferentes especies definen la dinámica ecológica de las comunidades. El cambio en el arreglo taxonómico de las comunidades microbianas afectará a las relaciones entre las especies y sus rutas metabólicas, así como también el cambio en la disponibilidad de los recursos. En los capítulos anteriores se analizó el impacto que ha tenido el cambio de uso de suelo de bosque templado a cultivo de maíz sobre la diversidad, composición y estructura de las comunidades microbianas y de las propiedades fisicoquímicas del suelo y se encontró un impacto muy relevante. La mayor fuente de materia orgánica en los bosques es material de plantas muertas, tanto de tejidos aéreos como de raíces, seguido por los exudados de raíces y los simbiontes asociados (micelios de hongos micorrízicos) (Jones y cols. 2009, Averill y cols. 2014), materia fecal y cuerpos de la fauna del suelo (Kooistra y Pulleman, 2018). Una vez en el suelo, la materia orgánica es transformada por las enzimas extracelulares liberadas por los microorganismos (hongos, bacterias y arqueas) en compuestos simples que pueden ser asimilados por otros microorganismos, la fauna del suelo o las plantas (Crowther y cols. 2019). La transformación progresiva de la materia orgánica involucra sinergias microbianas múltiples, pero también interacciones como la competencia, depredación, parasitismo y mutualismo (Garbeva y cols. 2008). La transformación de bosque a cultivo implica un cambio en la cobertura vegetal, lo que altera la cantidad, diversidad y composición de las entradas de materia orgánica. De esta forma, cuando ocurre el cambio de uso de suelo, las interacciones microbianas y la retroalimentación entre ellas experimentarán re arreglos. En otros grupos de organismos se ha encontrado que el cambio de uso de suelo favorece especies con un estilo de vida generalista e inhibe el crecimiento de especies especialistas. Por ejemplo, la deforestación de la selva amazónica favoreció a hongos generalistas (Mueller y cols. 2016) y el aumento en la intensidad del uso del suelo de bosques en Alemania favoreció mariposas y palomillas con rasgos generalistas (Hambäck y cols. 2007, Habel y cols. 2019).

Los análisis de redes son una herramienta poderosa para representar la organización potencial de las comunidades microbianas así como sus interacciones (positivas como el mutualismo o negativas como la competencia) en sistemas ecológicos con diferente grado de complejidad y composición (Tian y cols. 2018, Li y cols. 2020; Luo y cols. 2020; Ma y cols. 2020). Por ejemplo, Tian y cols. (2018) reportaron redes ecológicas de comunidades bacterianas más conectadas e intrincadas en suelos de bosque primario que en bosque secundario en China, además las redes de bosque primario tuvieron mayor modularidad, es decir, que un grupo de especies interactúa fuertemente entre ellas y poco con otras, indicando un enorme potencial de interacciones microbianas y compartimiento de nicho en bosques primarios. Por otro lado, los modelos de redes pueden identificar taxa clave para el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de una comunidad (Banerjee y cols. 2018). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no hay estudios que hayan determinado el efecto del cambio de uso de suelo de bosque a cultivo sobre las redes de interacción ecológicas de la microbiota del suelo.

Tradicionalmente el análisis de redes ecológicas se ha basado en correlaciones, sin embargo, los datos obtenidos a través de secuenciación de “nueva generación” son composicionales por lo que solo contienen información relativa y, por lo tanto, las correlaciones no son apropiadas (Pearson y Henrici, 1896). Los análisis de proporcionalidad son mejor opción para calcular asociación entre parejas en datos relativos (Lovell y cols. 2015, Quinn y cols. 2017).

En este estudio examinamos el efecto de la conversión de suelo de bosque a cultivo en las interacciones ecológicas potenciales entre grupos microbianos del suelo (Bacteria, Archaea y Virus de DNA) y sus funciones, a través de redes de proporcionalidad con datos metagenómicos.

### 3.2 Pregunta de investigación (PI), Hipótesis (H) y Predicciones (P)

PI: ¿Cómo afecta el cambio de uso de suelo las interacciones entre microorganismos del suelo?

H: El cambio de uso de suelo de bosque a cultivo disminuirá las interacciones ecológicas entre microorganismos del suelo.

P<sub>1</sub>: El número de conexiones entre nodos de la red de interacciones potenciales de especies microbianas de suelos de bosque es mayor que en la red de suelos de cultivo.

P<sub>2</sub>: El número de conexiones entre nodos de la red de interacciones potenciales de funciones del microbioma de suelos de bosque es mayor que en la red de suelos de cultivo.

### 3.3 Metodología

El sitio de muestreo, la extracción y secuenciación del DNA, así como los análisis bioinformáticos corresponden a los mencionados en las secciones 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.3 respectivamente, de la presente tesis.

#### 3.3.1 Construcción de redes de proporcionalidad

Las redes de proporcionalidad se construyeron de forma separada para suelos de bosque (bosque de pino y bosque de pino-encino) y suelos de bosque que cambió a cultivo, para especies y genes (funciones potenciales). La asociación entre especies microbianas y entre genes funcionales fue determinada usando la medida de proporcionalidad  $\rho_p$  propuesta por Lovell y cols. (2015) e implementada en el paquete para R “propr” (Quinn y cols. 2017). Se consideraron las especies y funciones microbianas con más del 50% de prevalencia y más de 10 conteos en todas las muestras para evitar falsas conexiones. Se usó una transformación Box-Cox con  $\alpha = 0.5$  para el manejo de ceros y todos aquellos valores con  $\rho_p \geq 0.95$  se conservaron para la construcción de las redes. Las redes por uso de suelo y su interconexión se visualizaron en Cytoscape 3.8.0 (Shannon y cols. 2003).

### 3.4 Resultados y Discusión

Las redes de especies microbianas de bosque y cultivo tuvieron un número similar de nodos (3,299 y 3,390, respectivamente), sin embargo, los suelos de cultivo tuvieron 4.5 veces más

conexiones (vértices) que los suelos de bosque y el promedio de la longitud de las rutas de conexión fue más corta en los suelos de cultivo comparado con el bosque (Fig. 16). Esto indica que los nodos en la red de cultivo son más cercanos y mejor conectados que en la red de bosque. La mayoría de las conexiones fueron positivas en ambas redes pero en mayor proporción en cultivo (97.1%) que en bosque (90.9%). La red de bosque tuvo más modularidad (136) que la de cultivo (107). En ambas redes la mayoría de los nodos pertenecieron a *Proteobacteria*, seguido de *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, aunque los nodos altamente conectados se distribuyeron entre los diferentes phyla. La red de intersección entre la red de bosque y la de cultivo reveló que comparten 956 nodos conectados y solo 1873 conexiones (Fig. 17), por lo que, cuando el suelo cambió de bosque a cultivo ocurrió un amplio rearrreglo en las interacciones ecológicas en la comunidad microbiana.

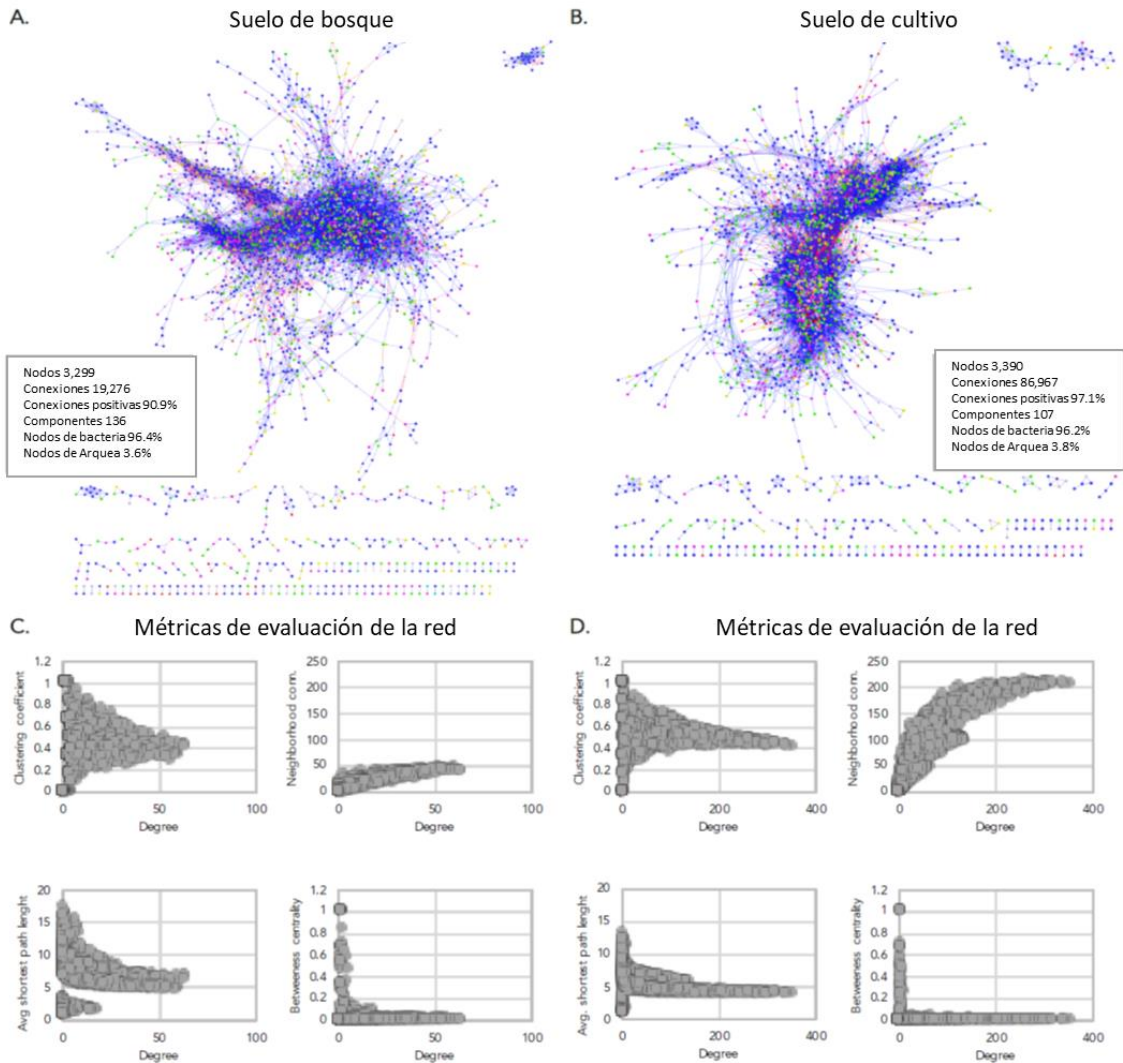
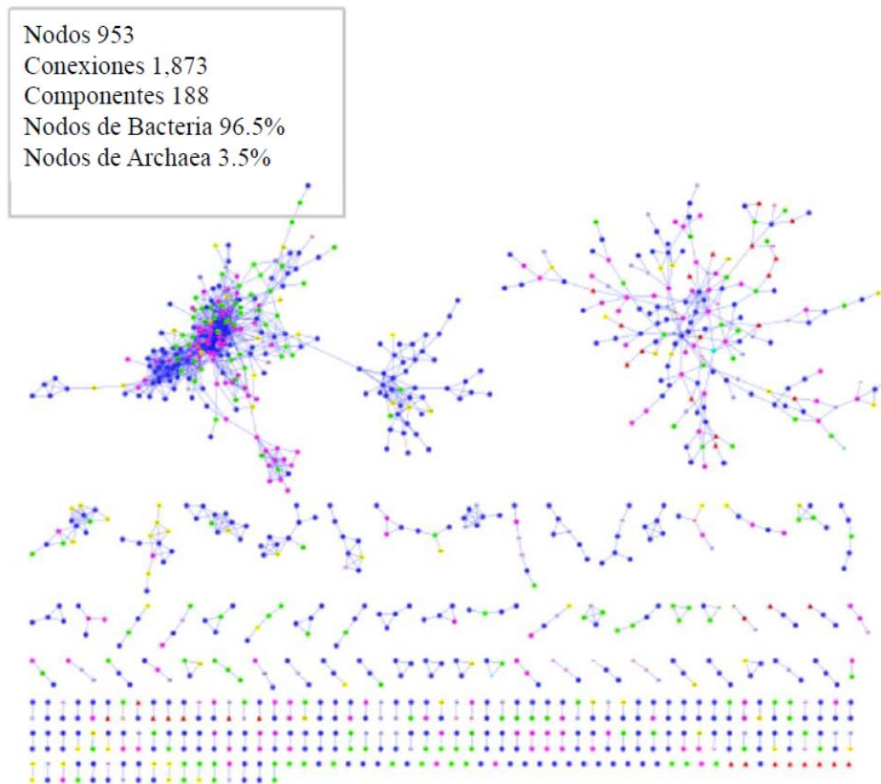


Figura 15 Red de interacciones de especies microbianas A) en bosque B) en cultivo. Los colores de los nodos indican diferentes phyla. Los enlaces azules corresponden a interacciones positivas entre dos nodos individuales y enlaces rojos indican interacciones negativas. Parámetros topológicos de las redes de C) bosque y D) cultivo de las comunidades microbianas. “Clustering coefficient” es el grado en que dos vecinos de un nodo están conectados, “neighborhood connectivity” es el promedio de conectividad de todos los vecinos de un nodo, “average shortest path length” es el número de pasos promedio a lo largo de la ruta más corta de todos los posibles pares de nodos, “betweness centrality” refleja el control de cada nodo sobre otros nodos en la red y el “degree” es el número de conexiones de un nodo.





*Figura 16 Intersección de las redes de bosque y cultivo de especies microbianas del suelo*

Por otro lado, las redes funcionales en ambos ecosistemas fueron altamente modulares y pobremente conectadas, además tuvieron casi la misma proporción de conexiones positivas y negativas (Fig.17). En general las redes de funciones fueron más simples que las redes de especies. La intersección de ambas redes no mostró alguna conexión.

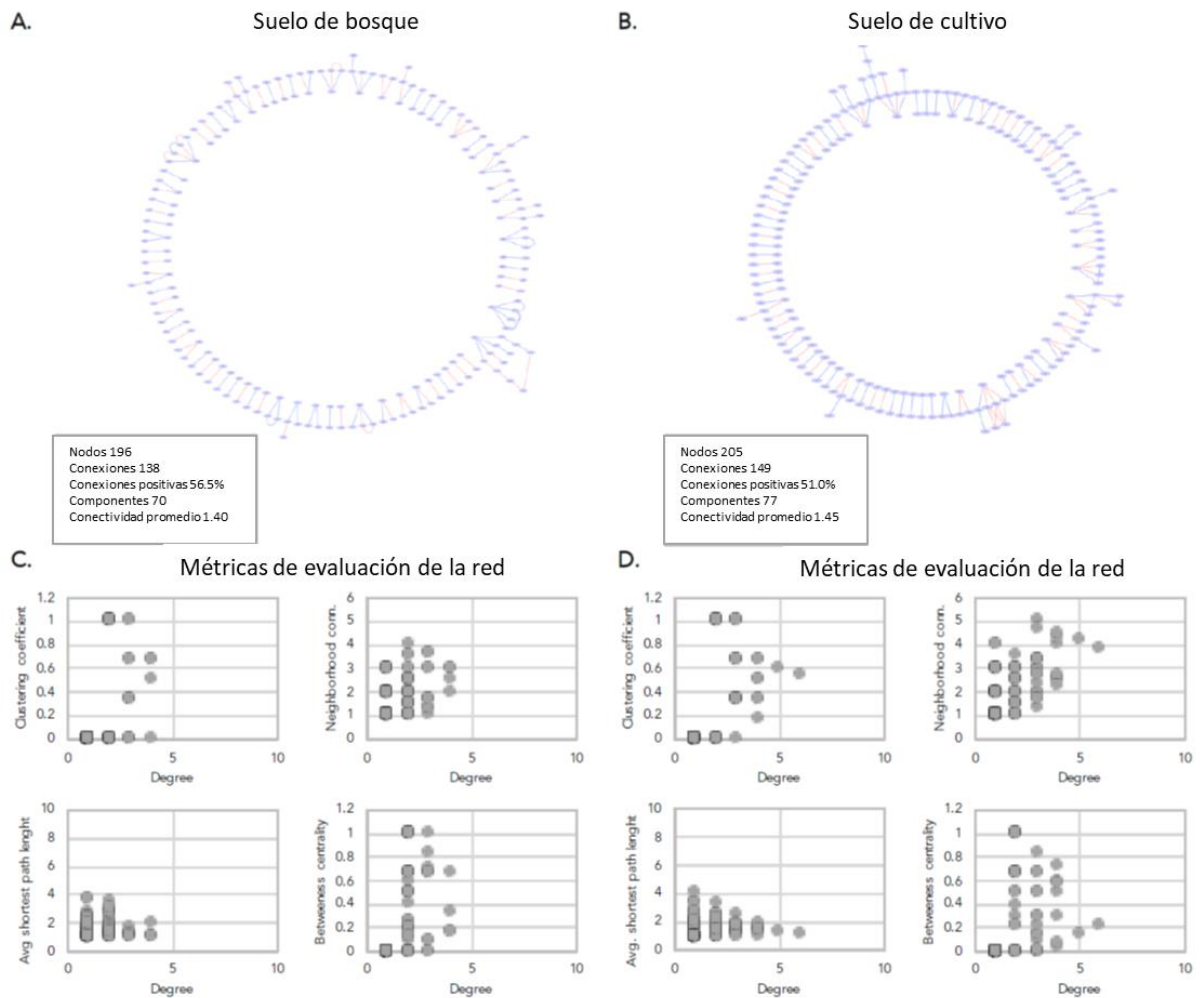


Figura 17 Red de interacción de genes (funciones) A) en bosque B) en cultivo. Los enlaces azules corresponden a interacciones positivas entre dos nodos individuales y enlaces rojos indican interacciones negativas. Parámetros topológicos de las redes de C) bosque y D) cultivo de los genes. Ver la explicación de los parámetros topológicos en la leyenda de la figura 16.

El cambio de uso de suelo, además de disminuir el carbono orgánico y el nitrógeno total del suelo también pudo afectar la composición de la materia orgánica debido al cambio de vegetación. La descomposición de material orgánico de diferente composición química pudo haber afectado las relaciones entre los microorganismos del suelo. Aparentemente, una positiva y mayor retroalimentación ocurre entre las especies microbianas en el suelo de cultivo comparado con el de bosque, posiblemente por la composición similar de materia orgánica de

los suelos de cultivo. Se ha observado que en suelos de cultivo la materia orgánica se mineraliza rápidamente (Mukumbuta y cols. 2019). El cambio de uso de suelo homogeniza o reduce la complejidad del paisaje incrementando el contacto físico y mejorando las interacciones de ciertos grupos de organismos (Kravchenko y cols. 2014, Baveye y cols. 2018). Un patrón similar fue observado en las comunidades microbianas de suelos de bosque cuya diversidad y recambio de especies disminuyó de forma significativa cuando cambió su uso a cultivo, así, la homogenización de la estructura de la comunidad microbiana promueve que ciertos grupos microbianos co-ocurran más (Tian y cols. 2018). Algunas prácticas agrícolas, como la labranza, pueden incrementar el contacto entre grupos microbianos potenciando sus interacciones (Kravchenko y cols. 2014, Baveye y cols. 2018).

También, se observaron más interacciones negativas en el suelo de bosque, debido, probablemente, a competencia o depredación. Una menor competencia en los suelos de cultivo podría ocurrir porque usualmente el N es un factor limitante para la mineralización del C orgánico y la fertilización con N en los suelos de cultivo mitiga esta limitación. Además, es importante mencionar que en este estudio no se incluyeron eucariotes, y los hongos juegan un importante papel en la descomposición de materia orgánica en los bosques. Interesantemente, ningún virus de DNA apareció como nodo en las redes y los bacteriófagos son virus de doble cadena de DNA. Posiblemente porque el recambio de especies virales fue enorme, por lo que no co-ocurrieron entre suelos.

En cuanto a las escasas redes funcionales, podría deberse a los estrictos parámetros utilizados para la construcción de las redes. Sin embargo, cuando se redujo el corte de proporcionalidad a 0.90 se obtuvo un resultado similar (datos no mostrados). Otra posibilidad es que sea preferible evaluar las interacciones entre funciones utilizando mRNA o mediante el análisis del proteoma. Se ha documentado que los ecotipos de bacterias del suelo contienen genomas más grandes que sus contrapartes en otros ecosistemas y la hipótesis es que en suelos, donde los recursos son escasos pero diversos y donde hay poca penalización por el crecimiento lento, las bacterias con genomas grandes son ecológicamente más exitosas (Konstantinidis y Tiedje, 2004). Es posible que no observamos grandes interacciones entre funciones debido a que el metagenoma del suelo

representa principalmente al reservorio genético de los microorganismos del suelo y no necesariamente la actividad.

## CONCLUSIONES

Se identificaron un total de 4,084 especies microbianas, de las cuales, 3,652 fueron de Bacteria, 212 de Archaea y 221 Virus de DNA.

La riqueza de especies microbianas y de rutas metabólicas se mantuvo en todos los suelos. Mientras que, la diversidad a los órdenes  $q=1,2,3$  y 4 de especies de Bacteria disminuyó en los suelos de cultivo y la pérdida de diversidad bacteriana se correlacionó positivamente con la pérdida de diversidad funcional.

El cambio de uso de suelo de bosque a cultivo alteró las propiedades fisicoquímicas del suelo, es decir, el contenido de carbono orgánico, nitrógeno total y capacidad de retención de agua disminuyó con el cambio de uso de suelo en ambos tipos de vegetación. Otras propiedades como el contenido de arena y arcilla cambiaron solo cuando el bosque de pino-encino cambió a cultivo.

Phyla bacterianos como *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* cambiaron en forma negativa y positiva, respectivamente, con el cambio de uso de suelo a cultivo independientemente del tipo de vegetación original. Especies de los géneros *Stenotrophomonas* y *Raoultella* dominaron en suelos de cultivo.

Existieron más interacciones microbianas en suelos de cultivo en comparación con los de bosque. Especies pertenecientes a los phyla bacterianos *Proteobacteria*, seguida de *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* presentaron el mayor número de interacciones tanto en redes de cultivo como en redes de bosque.

## REFERENCIAS

- Abraha M, Gelfand I, Hamilton SK, Chen J y Robertson GP. 2018. Legacy effects of land use on soil nitrous oxide emissions in annual crop and perennial grassland ecosystems. *Ecological Applications*, 28(5): 1362–1369. <https://doi.org/10.1002/eap.1745>
- Amoo AE y Babalola OO. 2019. Impact of land use on bacterial diversity and community structure in temperate pine and indigenous forest soils. *Diversity*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/d11110217>
- Arriaga-Cabrera L, Aguilar V y Espinoza J. 2009. Regiones prioritarias y planeación para la conservación de la biodiversidad. *Capital Natural de México: Estado de Conservación y Tendencias de Cambio*, II, 433–457.
- Arriaga L, Espinoza J, Aguilar C, Martínez E, Gómez L y Loa E. 2000. La Malinche. Anexo I. Fichas de información técnica. In *Regiones terrestres prioritarias de México* (pp. 424–426). Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad México.
- Averill C, Turner BL y Finzi AC. 2014. Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. *Nature*, 505(7484): 543–545. <https://doi.org/10.1038/nature12901>
- Banerjee, S., Schlaeppli, K., y van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9): 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>
- Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, y Fierer N. (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME Journal*, 6(2): 343–351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.119>
- Baveye PC, Otten W, Kravchenko A, Balseiro-Romero M, Beckers É, Chalhoub M, ... Vogel HJ. 2018. Emergent properties of microbial activity in heterogeneous soil microenvironments: Different research approaches are slowly converging, yet major challenges remain. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1–48. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01929>

- Berkelmann D, Schneider D, Engelhaupt M, Heinemann M, Christel S, Wijayanti M, ... Daniel R. 2018. How rainforest conversion to agricultural systems in Sumatra (Indonesia) affects active soil bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02381>
- Bhattacharya SS, Kim KH, Das S, Uchimiya M, Jeon BH, Kwon E y Szulejko, JE. 2016. A review on the role of organic inputs in maintaining the soil carbon pool of the terrestrial ecosystem. *Journal of Environmental Management*, 167: 214–227. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.09.042>
- Bolger AM, Lohse M y Usadel B. 2014. Genome analysis Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. 30(15): 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bravo-Espinosa M, Mendoza ME, Allende TC, Medina L, Sáenz-Reyes JT y Páez R. (2014). Effects of converting forest to avocado orchards on topsoil properties in the Trans-Mexican volcanic system, Mexico. *Land Degradation y Development*, 25(5): 452–467. <https://doi.org/10.1002/ldr.2163>
- Brisson V, Schmidt J, Northen TR, Vogel JP y Gaudin A. 2019. A new method to correct for habitat filtering in microbial correlation networks. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00585>
- Brooks T, Hannah L, Da Fonseca GAB y Mittermeier RA. 2001. Prioritizing hotspots, representing transitions [2]. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(12): 673. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02349-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02349-7)
- Buchfink B, Xie C y Huson DH. 2014. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12: 59. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Butchart SHM. 2010. Global biodiversity : indicators of recent declines. *Science*, 328: 1164. <https://doi.org/10.1126/science.1187512>
- Castañeda LE y Barbosa O. 2017. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ*, 5, e3098. <https://doi.org/10.7717/peerj.3098>

Ceballos G y García A. 2013. Challenges and Opportunities for Conservation of Mexican Biodiversity. *Conservation Biology: Voices from the Tropics*, (April 2018), 105–112. <https://doi.org/10.1002/9781118679838.ch13>

Ceja C. 2008. Degradación de los suelos y pobreza en México. *Economía Informa*, 1(1): 5. Recuperado de <http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/350/07ceja.pdf>

Chao A, Chiu CH y Jost L. 2014. Unifying Species Diversity, Phylogenetic Diversity, Functional Diversity, and Related Similarity and Differentiation Measures Through Hill Numbers. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45(1): 297–324. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091540>

Chávez-Romero Y, Navarro-Noya YE, Reynoso-Martínez SC, Sarria-Guzmán Y, Govaerts B, Verhulst N, ... Luna-Guido M. 2016. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. *Soil and Tillage Research*, 159: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.01.007>

Chen L, Xun W, Sun L, Zhang N, Shen Q y Zhang R. 2014. Effect of different long-term fertilization regimes on the viral community in an agricultural soil of Southern China. *European Journal of Soil Biology*, 62: 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.006>

Crowther TW, van den Hoogen J, Wan J, Mayes MA, Keiser AD, Mo L, ... Maynard DS. 2019. The global soil community and its influence on biogeochemistry. *Science*, 365(6455). <https://doi.org/10.1126/science.aav0550>

De Deyn GB y Van Der Putten WH. 2005. Linking aboveground and belowground diversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(11): 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.009>

Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Reich PB, Trivedi P, Osanai Y, Liu YR, ... Singh BK. 2016. Carbon content and climate variability drive global soil bacterial diversity patterns. *Ecological Monographs*, 86(3): 373–380. <https://doi.org/10.1002/ecm.1216/supinfo>

Deredjian A, Alliot N, Blanchard L, Brothier E, Anane M, Cambier P, ... Favre-Bonté S. 2016. Occurrence of *Stenotrophomonas maltophilia* in agricultural soils and antibiotic resistance



properties. *Research in Microbiology*, 167(4): 313–324.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.01.001>

Díaz S, Fargione J, Chapin FS y Tilman D. 2006. Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biology*, Vol. 4, pp. 1300–1305. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040277>

Ding GC, Radl V, Schloter-Hai B, Jechalke S, Heuer H, Smalla K y Schloter M. 2014. Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092958>

Dohrmann AB, Küting M, Jünemann S, Jaenicke S, Schlüter A y Tebbe CC. 2013. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt-and conventional maize varieties. *ISME Journal*, 7(1): 37–49. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.77>

Eilu G, Obua J, Tumuhairwe JK y Nkwine C. 2003. Traditional farming and plant species diversity in agricultural landscapes of south-western Uganda. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 99(1–3): 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00140-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00140-3)

Elgersma KJ, Ehrenfeld JG, Yu S y Vor T. 2011. Legacy effects overwhelm the short-term effects of exotic plant invasion and restoration on soil microbial community structure, enzyme activities, and nitrogen cycling. *Oecologia*, 167(3): 733–745. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2022-0>

Escobar-Zepeda A, De León AVP y Sanchez-Flores A. 2015. The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *Global Forest Resources Assessment 2020: key findings*. 16.

Fernandes AD, Macklaim JM, Linn TG, Reid G y Gloor GB. 2013. ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067019>

Fierer N, Leff JW, Adams BJ, Nielsen UN, Bates ST, Lauber CL ... Caporaso JG. 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(52): 21390–21395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215210110>

Fierer N. 2017. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10): 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>

Fierer N, y Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. 103(3).

Figuroa F y Sánchez-Cordero V. 2008. Effectiveness of natural protected areas to prevent land use and land cover change in Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 17(13): 3223–3240. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9423-3>

Fusaro C, Sarria-Guzmán Y, Chávez-Romero YA, Luna-Guido M, Muñoz-Arenas LC, Dendooven L, ... Navarro-Noya YE. 2019. Land use is the main driver of soil organic carbon spatial distribution in a high mountain ecosystem. *PeerJ*, 2019(11): 1–27. <https://doi.org/10.7717/peerj.7897>

Garbeva P, Van Elsas JD y Van Veen JA. 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil*, 302(1–2):19–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9432-0>

Gómez-Acata, E. S., Valencia-Becerril, I., Valenzuela-Encinas, C., Velásquez-Rodríguez, A. S., Navarro-Noya, Y. E., Montoya-Ciriaco, N., ... Dendooven, L. (2016). Deforestation and Cultivation with Maize ( *Zea mays* L.) has a Profound Effect on the Bacterial Community Structure in Soil. *Land Degradation y Development*, 27(4), 1122–1130. <https://doi.org/10.1002/ldr.2328>

Griffiths BS y Philippot L. 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2): 112–129. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>

- Goss-Souza D, Mendes LW, Borges CD, Baretta D, Tsai SM y Rodrigues JLM. 2017. Soil microbial community dynamics and assembly under long-term land use change. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(10): 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix109>
- Guo LB y Gifford RM. 2002. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology*, 8(4): 345–360. <https://doi.org/10.1046/j.1354-1013.2002.00486.x>
- Habel JC, Trusch R, Schmitt T, Ochse M y Ulrich W. 2019. Long-term large-scale decline in relative abundances of butterfly and burnet moth species across south-western Germany. *Scientific Reports*, 9(1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51424-1>
- Halffter G y Morrone JJ. 2017. An analytical review of Halffter’s Mexican transition zone, and its relevance for evolutionary biogeography, ecology and biogeographical regionalization. *Zootaxa*, 4226(1), 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4226.1.1>
- Hambäck PA, Summerville KS, Steffan-Dewenter I, Krauss J, Englund G y Crist TO. 2007. Habitat specialization, body size, and family identity explain lepidopteran density-area relationships in a cross-continental comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20): 8368–8373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611462104>
- Hooper DU, Adair EC, Cardinale BJ, Byrnes JEK, Hungate BA, Matulich KL, ... O’Connor MI. 2012. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature*, 486(7401): 105–108. <https://doi.org/10.1038/nature11118>
- Hosonuma N, Herold M, De Sy V, De Fries RS, Brockhaus M, Verchot L, ... Romijn E. 2012. An assessment of deforestation and forest degradation drivers in developing countries. *Environmental Research Letters*, 7(4). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/4/044009>
- Hurwitz BL, Westveld AH, Brum JR y Sullivan MB. 2014. Modeling ecological drivers in marine viral communities using comparative metagenomics and network analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29): 10714–10719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319778111>

- Huson DH. 2015. MEtaGenome ANalyzer (MEGAN): Metagenomic Expert Resource. In Encyclopedia of Metagenomics (pp. 383–389). [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7478-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7478-5_4)
- Ives AR, y Carpenter SR. 2007. Stability and diversity of ecosystems. *Science*, 317(5834): 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.1133258>
- Jiao S, Chen W, Wang J, Du N, Li Q y Wei G. 2018. Soil microbiomes with distinct assemblies through vertical soil profiles drive the cycling of multiple nutrients in reforested ecosystems. *Microbiome*, 6(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0526-0>
- Jones DL, Nguyen C y Finlay RD. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*, 321(1–2): 5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Jost L. 2006. Entropy and diversity. *Opinion*, 2, 363–375. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>
- Kallenbach CM y Grandy AS. 2015. Land-use legacies regulate decomposition dynamics following bioenergy crop conversion. *GCB Bioenergy*, 7(6): 1232–1244. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12218>
- Konstantinidis KT, y Tiedje JM. 2004. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9): 3160–3165. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308653100>
- Kooistra MJ y Pulleman MM. 2018. Features Related to Faunal Activity. In Interpretation of Micromorphological Features of Soils and Regoliths. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63522-8.00016-4>
- Kravchenko AN, Negassa WC, Guber AK, Hildebrandt B, Marsh TL y Rivers ML. 2014. Intra-aggregate Pore Structure Influences Phylogenetic Composition of Bacterial Community in Macroaggregates. *Soil Science Society of America Journal*, 78(6): 1924–1939. <https://doi.org/10.2136/sssaj2014.07.0308>
- Kroeger ME, Delmont TO, Eren AM, Meyer KM, Guo J, Khan K, ... Nüsslein K. 2018. New Biological Insights Into How Deforestation in Amazonia Affects Soil Microbial Communities

Using Metagenomics and Metagenome-Assembled Genomes. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01635>

Kuramae EE, Zhou JZ, Kowalchuk GA y van Veen JA. 2014. Soil-Borne Microbial Functional Structure across Different Land Uses. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/216071>

Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA y Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9): 2407–2415. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>

Lee-Cruz L, Edwards DP, Tripathi BM y Adams JM. 2013. Impact of logging and forest conversion to oil palm plantations on soil bacterial communities in borneo. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23): 7290–7297. <https://doi.org/10.1128/AEM.02541-13>

Li D, Luo R, Liu CM, Leung CM, Ting HF, Sadakane K, ... Lam TW. 2016. MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods*, 102, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.02.020>

Li X, Zhang Q, Ma J, Yang Y, Wang Y, y Fu C. 2020. Flooding irrigation weakens the molecular ecological network complexity of soil microbes during the process of dryland-to-paddy conversion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/ijerph17020561>

Lladó S, López-Mondéjar R y Baldrian P. 2017. Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(2): 1–27. <https://doi.org/10.1128/membr.00063-16>

Lovell D, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ, Marguerat S y Bähler J. 2015. Proportionality: A Valid Alternative to Correlation for Relative Data. *PLoS Computational Biology*, 11(3): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004075>

Loreau M, Downing A, Emmerson M, Gonzalez A, Hughes J, Inchausti P, Joshi J, Norberg J y Sala O. 2002. A new look at the relationship between diversity and stability. En *Biodiversity and Ecosystem Functioning Synthesis and Perspectives*. Loreau M, Naeem S y Inchausti P (Eds.) Editorial Oxford University Press. New York pp. 79-91.

- Lu J, Breitwieser FP, Thielen P y Salzberg SL. 2017. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3, e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Luo Z, Ma J, Chen F, Li X, Zhang Q y Yang Y. 2020. Adaptive development of soil bacterial communities to ecological processes caused by mining activities in the Loess plateau, China. *Microorganisms*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040477>
- Ma J, Lu Y, Chen F, Li X, Xiao D y Wang H. 2020. Molecular ecological network complexity drives stand resilience of soil bacteria to mining disturbances among typical damaged ecosystems in China. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030433>
- Ma ZS y Li L. 2018. Measuring metagenome diversity and similarity with Hill numbers. *Molecular Ecology Resources*, 18(6): 1339–1355. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12923>
- Machovina B, Feeley KJ y Ripple WJ. 2015. Biodiversity conservation: The key is reducing meat consumption. *Science of the Total Environment*, 536: 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.022>
- Marschner P, Crowley D y Yang CH. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species , nutrition and soil type. 199–208.
- Martínez-Falcón AP, Zurita GA, Ortega-Martínez IJ y Moreno CE. 2018. Populations and assemblages living on the edge: dung beetles responses to forests-pasture ecotones. *PeerJ*, 6: e6148. <https://doi.org/10.7717/peerj.6148>
- Martínez-Núñez MA y Pérez-Rueda E. 2016. Do lifestyles influence the presence of promiscuous enzymes in bacteria and Archaea metabolism? *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0047-8>
- McKinley VL. 2019. Effects of Land Use and Restoration on Soil Microbial Communities BT - Understanding Terrestrial Microbial Communities (C. J. Hurst, Ed.). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10777-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10777-2_7)

Mendes LW, Tsai SM, Navarrete AA, de Hollander M, van Veen JA y Kuramae EE. 2015. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. *Microbial Ecology*, 70(1):255–265. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0559-2>

Mendes LW, de Lima Brossi MJ, Kuramae EE y Tsai SM. 2015. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. *Applied Soil Ecology*, 95: 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.005>

Mhete M, Eze PN, Rahube TO y Akinyemi FO. 2020. Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. *Scientific African*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00246>

Moissl-Eichinger C, Pausan M, Taffner J, Berg G, Bang C y Schmitz RA. 2018. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology*, 26(1): 70–85. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.004>

Moreno CE, Barragán F, Pineda E y Pavón NP. 2011. Reanalyzing alpha diversity: alternatives to understand and compare information about ecological communities. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4): 1249–1261. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-34532011000400019&lng=es&tylng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000400019&lng=es&tylng=es).

Mueller RC, Rodrigues JLM, Nüsslein K y Bohannan BJM. 2016. Land use change in the Amazon rain forest favours generalist fungi. *Functional Ecology*, 30(11): 1845–1853. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12651>

Mukumbuta I, Shimizu M y Hatano R. 2019. Short-term land-use change from grassland to cornfield increases soil organic carbon and reduces total soil respiration. *Soil and Tillage Research*, 186: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.09.010>

Murty D, Kirschbaum MUF, Mcmurtrie RE y Mcgilvray H. 2002. Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? A review of the literature. *Global Change Biology*, 8(2): 105–123. <https://doi.org/10.1046/j.1354-1013.2001.00459.x>

- Narr A, Nawaz A, Wick LY, Harms H y Chatzinotas A. 2017. Soil Viral Communities Vary Temporally and along a Land Use Transect as Revealed by Virus-Like Particle Counting and a Modified Community Fingerprinting Approach (fRAPD). *Frontiers in Microbiology*, 8: 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01975>
- Newbold T, Hudson LN, Arnell A, Contu S, De Palma A, Ferrier S, ... Purvis A. 2016. Has land use pushed terrestrial biodiversity beyond the planetary boundary? A global assessment. *Science*, 353(6296): 288–291. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2201>
- Newbold T, Hudson LN, Hill SLL, Contu S, Lysenko I, Senior RA, ... Purvis A. 2015. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature*, 520(7545): 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature14324>
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'hara R, ... Wagner H. 2018. Package ‘vegan’ community ecology package.
- Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang H, Cohoon M, ... Vonstein V. 2005. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. 33(17): 5691–5702. <https://doi.org/10.1093/nar/gki866>
- Owuor SO, Butterbach-Bahl K, Guzha AC, Jacobs S, Merbold L, Rufino MC, ... Breuer L. 2018. Conversion of natural forest results in a significant degradation of soil hydraulic properties in the highlands of Kenya. *Soil and Tillage Research*, 176:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.still.2017.10.003>
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B y Ideker T. 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. *Genome Research*, 13(22): 426. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303.metabolite>
- Pearson K y Henrici OMFE. 1896. VII. Mathematical contributions to the theory of evolution.y#x2014;III. Regression, heredity, and panmixia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character*, 187: 253–318. <https://doi.org/10.1098/rsta.1896.0007>



Petersen R y Calvin L. 1986. Sampling. In A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 1- Physical and Mineralogical Methods* (Second, pp. 33–53). Madison Wisconsin: American Society for Agronomy Inc, Soil Science Society of America Inc.

Poole P, Ramachandran V y Terpolilli J. 2018. *Rhizobia: from saprophytes to*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>

Quinn TP, Richardson MF, Lovell D y Crowley TM. 2017. Propr: An R-package for Identifying Proportionally Abundant Features Using Compositional Data Analysis. *Scientific Reports*, 7(1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16520-0>

Ripple WJ, Dirzo R, Hayward MW, Kerley GIH, Van Valkenburgh B, Newsome TM, ... Sandom CJ 2015. Collapse of the world's largest herbivores. *Science Advances*, 1(4): 1–12. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400103>

Roesch LFW, Camargo FAO, Bento FM y Triplett EW. 2008. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant and Soil*, 302(1–2):91–104. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9458-3>

Russel J, Røder HL, Madsen JS, Burmølle M y Sørensen SJ. 2017. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40): 10684–10688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706016114>

Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, ... Dow JM. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7): 514–525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>

Sala OE, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, ..., Wall DH. 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287(5459): 1770–1774.

Sánchez-Colón S, Flores-Martínez A, Cruz-Leyva IA y Velázquez A. 2009. Estado y transformación de los ecosistemas terrestres. In J. Sarukhán, P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, y J. . . . J. Llorente-Bousquets (Eds.), *Capital Natural de México Volumen II: Estado de Conservación y Tendencias de Cambio: Vol. II* (pp. 75–129). CONABIO.

Schlatter DC, Bakker MG, Bradeen JM y Kinkel LL. 2018. Plant community richness and microbial interactions structure bacterial communities in soil. *Ecological Society of Americ.* 96(1): 134–142

Schneider D, Engelhaupt M, Allen K, Kurniawan S, Krashevskaya V, Heinemann M, ... Daniel R. 2015. Impact of lowland rainforest transformation on diversity and composition of soil prokaryotic communities in sumatra (Indonesia). *Frontiers in Microbiology*, 6: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01339>

Shi S, Nuccio EE, Shi ZJ, He Z, Zhou J y Firestone MK. 2016. The interconnected rhizosphere: High network complexity dominates rhizosphere assemblages. *Ecology Letters*, 19(8): 926–936. <https://doi.org/10.1111/ele.12630>

Siles JA y Margesin R. 2016. Abundance and Diversity of Bacterial, Archaeal, and Fungal Communities Along an Altitudinal Gradient in Alpine Forest Soils: What Are the Driving Factors? *Microbial Ecology*, 72(1): 207–220. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0748-2>

Slezák M y Axmanová I. 2016. Patterns of plant species richness and composition in deciduous oak forests in relation to environmental drivers. *Community Ecology*, 17(1): 61–70. <https://doi.org/10.1556/168.2016.17.1.8>

Tardy V, Mathieu O, Lévêque J, Terrat S, Chabbi A, Lemanceau P, ... Maron PA. 2014. Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 6(2): 173–183. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12126>

Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M y Michel G. 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2: 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>

Tian J, He N, Kong W, Deng Y, Feng K, Green SM, ... Yu G. 2018. Deforestation decreases spatial turnover and alters the network interactions in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 123: 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.007>

- Trivedi P, Delgado-Baquerizo M, Anderson IC y Singh BK. 2016. Response of Soil Properties and Microbial Communities to Agriculture: Implications for Primary Productivity and Soil Health Indicators. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00990>
- Trumbore S, Brando P y Hartmann H. 2015. Forest health and global change. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6250): 814–818. <https://doi.org/10.1126/science.aac6759>
- Tsiafouli MA, Thébault E, Sgardelis SP, de Ruiter PC, van der Putten WH, Birkhofer K, ... Hedlund K. 2015. Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe. *Global Change Biology*, 21(2): 973–985. <https://doi.org/10.1111/gcb.12752>
- Tyrrell ML, Ross J y Kelty M. 2012. Carbon Dynamics in the Temperate Forest. In M. S. Ashton, M. L. Tyrrell, D. Spalding, y B. Gentry (Eds.), *Managing Forest Carbon in a Changing Climate* (pp. 1–414). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2232-3>
- Vaninsberghe D, Maas KR, Cardenas E, Strachan CR, Hallam SJ y Mohn WW. 2015. Non-symbiotic Bradyrhizobium ecotypes dominate North American forest soils. 9(11): 2435–2441. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.54>
- Wittebolle L, Marzorati M, Clement L, Balloi A, Daffonchio D, Heylen K, ... Boon N. 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*, 458: 623. <https://doi.org/10.1038/nature07840>
- Wolińska A, Kuźniar A, Zielenkiewicz U, Izak D, Szafranek-Nakonieczna A, Banach A y Błaszczuk M. 2017. Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. *Applied Soil Ecology*, 119: 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.009>
- Wood DE y Salzberg SL. 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3), R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
- Xu S, Xing Y, Liu S, Huang Q y Chen W. 2019. Role of novel bacterial *Raoultella* sp. strain X13 in plant growth promotion and cadmium bioremediation in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9): 3887–3897. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09700-7>

Zeng Q, An S y Liu Y. 2017. Soil bacterial community response to vegetation succession after fencing in the grassland of China. *Science of the Total Environment*, 609: 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.102>

Zhang Q, Wu J, Yang F, Lei Y, Zhang Q y Cheng X. 2016. Alterations in soil microbial community composition and biomass following agricultural land use change. *Scientific Reports*, 6: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep36587>

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

DNA Ácido Desoxirribonucleico

ZTM Zona de Transición Mexicana

POF Pine-oak forest-Bosque de Pino-Encino

OF Oak forest-Bosque de encino

POFtA Pine-oak forest converted to Arable land- Bosque de Pino-Encino convertido a suelo de cultivo

OFtA Oak-forest converted to Arable land-Bosque de Encino convertido a suelo de cultivo

OTUs Unidades taxonómicas operativas

## ANEXOS

*Tabla Suplementaria 1 Coordenadas de los sitios de muestreo.*

No. de muestra	Ecosistema	N	O
1	POFtA_1	19°14'35.43"N	98°07'09.23"O
2	POFtA_2	19°14'21.50"N	98°07'18.10"O
3	POFtA_3	19°14'13.20"N	98°07'07.30"O
4	POF_1	19°12'54.10"N	98°07'15.68"O
5	POF_2	19°13'16.50"N	98°07'21.40"O
6	POF_3	19°13'06.10"N	98°07'22.40"O
7	OF_1	19°19'20.50"N	98°03'26.70"O
8	OF_2	19°19'34.70"N	98°03'11.50"O
9	OF_3	19°19'38.60"N	98°03'07.50"O
10	OFtA_1	19°19'20.40"N	98°03'27.70"O
11	OFtA_2	19°19'40.10"N	98°02'59.50"O
12	OFtA_3	19°19'37.60"N	98°02'46.30"O

Tabla Suplementaria 2 Coeficiente de correlación de Pearson entre la diversidad funcional del subsistema 1 de la clasificación SEED y la diversidad taxonómica (Archaea, Bacteria y Virus) a diferentes órdenes q.

Subsistema 1 q=0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	Archaea 0	Bacteria 0	Virus 0	Archaea 1	Bacteria 1	Virus 1	Archaea 2	Bacteria 2	Virus 2	Archaea 3	Bacteria 3	Virus 3
<b>r</b>	-0.11	-0.60	-0.25	-0.68	0.36	-0.36	-0.64	0.39	-0.39	-0.57	0.42	-0.37
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.64 to 0.49	-0.87 to 0.05	-0.72 to 0.37	-0.90 to 0.18	-0.26 to 0.77	-0.77 to 0.26	-0.88 to 0.10	-0.23 to 0.79	-0.79 to 0.22	-0.86 to 0.01	-0.20 to 0.80	-0.78 to 0.25
<b>R cuadrada</b>	0.01	0.37	0.06	0.47	0.13	0.13	0.41	0.15	0.15	0.33	0.17	0.14
<b>P (two-tailed)</b>	0.72	0.03	0.41	0.01	0.23	0.24	0.02	0.20	0.20	0.04	0.17	0.22
<b>P value</b>	ns	*	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Subsistema 1 q=1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	Archaea 0	Bacteria 0	Virus 0	Archaea 1	Bacteria 1	Virus 1	Archaea 2	Bacteria 2	Virus 2	Archaea 3	Bacteria 3	Virus 3
<b>r</b>	-0.49	-0.36	-0.29	-0.26	0.64	-0.22	-0.35	0.58	-0.086	-0.40	0.56	-0.01
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.83 to 0.10	-0.77 to 0.26	-0.74 to 0.33	-0.72 to 0.36	0.11 to 0.89	-0.70 to 0.40	-0.77 to 0.27	0.02 to 0.86	-0.62 to 0.51	-0.79 to 0.22	-0.01 to 0.86	-0.57 to 0.56
<b>R cuadrada</b>	0.24	0.13	0.08	0.07	0.41	0.04	0.12	0.34	0.01	0.16	0.32	0.00
<b>P (two-tailed)</b>	0.10	0.24	0.35	0.40	0.02	0.48	0.25	0.05	0.78	0.19	0.05	0.98
<b>P value</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Subsistema 1 q=2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	Archaea 0	Bacteria 0	Virus0	Archaea 1	Bacteria 1	Virus1	Archaea 2	Bacteria 2	Virus2	Archaea 3	Bacteria 3	Virus3
<b>r</b>	-0.49	-0.37	-0.27	-0.28	0.64	-0.20	-0.36	0.58	-0.07	-0.41	0.55	0.05
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.83 to 0.11	-0.77 to 0.25	-0.73 to 0.35	-0.73 to 0.35	0.10 to 0.88	-0.69 to 0.42	-0.77 to 0.26	0.01 to 0.86	-0.61 to 0.52	-0.79 to 0.20	-0.02 to 0.85	-0.57 to 0.57
<b>R cuadrada</b>	0.24	0.13	0.07	0.07	0.41	0.04	0.13	0.33	0.00	0.17	0.31	0.00
<b>P (two-tailed)</b>	0.10	0.23	0.39	0.37	0.02	0.52	0.24	0.04	0.82	0.18	0.05	0.98
<b>P value</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Subsistema 1 q=3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	Archaea 0	Bacteria 0	Virus0	Archaea 1	Bacteria 1	Virus1	Archaea 2	Bacteria 2	Virus2	Archaea 3	Bacteria 3	Virus3
<b>r</b>	-0.49	-0.37	-0.26	-0.28	0.64	-0.20	-0.37	0.58	-0.06	-0.41	0.55	0.00
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.83 to 0.11	-0.78 to 0.25	-0.73 to 0.36	-0.73 to 0.34	0.10 to 0.88	-0.69 to 0.42	-0.77 to 0.25	0.01 to 0.86	-0.61 to 0.52	-0.80 to 0.20	-0.02 to 0.85	-0.56 to 0.57
<b>R cuadrada</b>	0.24	0.14	0.07	0.08	0.41	0.04	0.13	0.33	0.00	0.17	0.31	0.00
<b>p (two-tailed)</b>	0.10	0.22	0.39	0.36	0.02	0.53	0.23	0.04	0.83	0.17	0.05	0.98
<b>p value</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns

Tabla Suplementaria 3 Coeficiente de correlación de Pearson entre la diversidad funcional del subsistema 2 de la clasificación SEED y la diversidad taxonómica (Archaea, Bacteria y Virus) a diferentes órdenes q.

<b>Subsistema 2 q=0</b>	<b>0 vs. Archa ea0</b>	<b>0 vs. Bacte ria0</b>	<b>0 vs. Virus 0</b>	<b>0 vs. Archa ea1</b>	<b>0 vs. Bacte ria1</b>	<b>0 vs. Virus 1</b>	<b>0 vs. Archa ea2</b>	<b>0 vs. Bacte ria2</b>	<b>0 vs. Virus 2</b>	<b>0 vs. Archa ea3</b>	<b>0 vs. Bacte ria3</b>	<b>0 vs. Virus 3</b>
<b>r</b>	0.45	0.09	-0.48	-0.57	-0.12	-0.36	-0.60	-0.20	-0.12	-0.55	-0.19	0.00
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.15 to 0.81	-0.50 to 0.63	-0.82 to 0.12	-0.86 to 0.00	-0.65 to 0.48	-0.77 to 0.26	-0.87 to 0.04	-0.69 to 0.41	-0.65 to 0.48	-0.85 to 0.03	-0.69 to 0.42	-0.57 to 0.57
<b>R cuadrada</b>	0.21	0.01	0.23	0.33	0.01	0.13	0.36	0.04	0.01	0.30	0.03	0.00
<b>P (two-tailed)</b>	0.13	0.76	0.10	0.05	0.70	0.24	0.03	0.51	0.69	0.06	0.53	0.98
<b>P value</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Subsistema 2 q=1</b>	<b>1 vs. Archa ea0</b>	<b>1 vs. Bacte ria0</b>	<b>1 vs. Virus 0</b>	<b>1 vs. Archa ea1</b>	<b>1 vs. Bacte ria1</b>	<b>1 vs. Virus 1</b>	<b>1 vs. Archa ea2</b>	<b>1 vs. Bacte ria2</b>	<b>1 vs. Virus 2</b>	<b>1 vs. Archa ea3</b>	<b>1 vs. Bacte ria3</b>	<b>1 vs. Virus 3</b>
<b>r</b>	-0.46	-0.35	-0.27	-0.25	0.63	-0.20	-0.34	0.57	-0.06	-0.39	0.55	0.00
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.82 to 0.14	-0.77 to 0.27	-0.73 to 0.35	-0.72 to 0.37	0.10 to 0.88	-0.69 to 0.42	-0.76 to 0.28	0.00 to 0.86	-0.61 to 0.52	-0.78 to 0.23	-0.03 to 0.85	-0.57 to 0.57
<b>R cuadrada</b>	0.21	0.12	0.07	0.06	0.40	0.04	0.11	0.33	0.00	0.15	0.30	0.00
<b>P (two-tailed)</b>	0.12	0.25	0.39	0.42	0.02	0.53	0.27	0.04	0.83	0.20	0.06	0.98
<b>P value</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
<b>Subsistema 2 q=2</b>	<b>2 vs. Archa ea0</b>	<b>2 vs. Bacte ria0</b>	<b>2 vs. Virus 0</b>	<b>2 vs. Archa ea1</b>	<b>2 vs. Bacte ria1</b>	<b>2 vs. Virus 1</b>	<b>2 vs. Archa ea2</b>	<b>2 vs. Bacte ria2</b>	<b>2 vs. Virus 2</b>	<b>2 vs. Archa ea3</b>	<b>2 vs. Bacte ria3</b>	<b>2 vs. Virus 3</b>
<b>r</b>	-0.48	-0.37	-0.25	-0.27	0.64	-0.19	-0.36	0.57	-0.06	-0.41	0.55	0.01
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.82 to 0.12	-0.78 to 0.25	-0.72 to 0.36	-0.73 to 0.35	0.10 to 0.88	-0.68 to 0.42	-0.77 to 0.26	0.01 to 0.86	-0.61 to 0.53	-0.79 to 0.21	-0.02 to 0.85	-0.56 to 0.58
<b>R cuadrada</b>	0.23	0.14	0.06	0.07	0.41	0.03	0.13	0.33	0.00	0.16	0.30	0.00
<b>P (two-tailed)</b>	0.10	0.23	0.41	0.38	0.02	0.55	0.24	0.04	0.84	0.18	0.06	0.97
<b>P value</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
<b>Subsistema 2 q=3</b>	<b>3 vs. Archa ea0</b>	<b>3 vs. Bacte ria0</b>	<b>3 vs. Virus 0</b>	<b>3 vs. Archa ea1</b>	<b>3 vs. Bacte ria1</b>	<b>3 vs. Virus 1</b>	<b>3 vs. Archa ea2</b>	<b>3 vs. Bacte ria2</b>	<b>3 vs. Virus 2</b>	<b>3 vs. Archa ea3</b>	<b>3 vs. Bacte ria3</b>	<b>3 vs. Virus 3</b>

<b>r</b>	-0.48	-0.37	-0.26	-0.28	0.64	-0.19	-0.37	0.58	-0.06	-0.41	0.55	0.00
<b>95% intervalo de confianza</b>	-0.83 to 0.11	-0.78 to 0.25	-0.72 to 0.36	-0.73 to 0.34	0.10 to 0.88	-0.69 to 0.42	-0.77 to 0.25	0.01 to 0.86	-0.61 to 0.52	-0.80 to 0.20	-0.02 to 0.85	-0.56 to 0.57
<b>R cuadrada</b>	0.24	0.14	0.07	0.08	0.41	0.03	0.13	0.33	0.00	0.17	0.31	0.00
<b>P (two-tailed)</b>	0.10	0.22	0.40	0.36	0.02	0.53	0.23	0.04	0.83	0.17	0.05	0.98
<b>P value</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns

Tabla Suplementaria 4 Abundancia relativa de los phyla con mayor efecto sobre  $^qD_a$


<b>Abundancia relativa (%)</b>	<b>OF</b>	<b>OFtA</b>	<b>POF</b>	<b>POFtA</b>
<i>Proteobacteria</i>	69.5 ±1.6	67.9 ±3.9	76.5 ±1.2	82.8 ±1.1
<i>Actinobacteria</i>	17.8 ±0.6	20.8 ±3.8	13.1 ±0.8	11.5 ±0.8
<i>Firmicutes</i>	5.4 ±1.3	7.4 ±0.4	5.2 ±1.0	2.8 ±0.1
<i>Bacteroidetes</i>	2.5 ±0.4	0.7 ±0.1	2.1 ±0.1	0.8 ±0.1



## PUBLICACIONES

## EMIR - Brief report

# Soil microbial diversity drops with land-use change in a high mountain temperate forest: a metagenomics survey

Ligia C. Muñoz-Arenas,<sup>1,2</sup> Carmine Fusaro,<sup>1</sup>  
Mario Hernández-Guzmán,<sup>3</sup> Luc Dendooven,<sup>3</sup>  
Arturo Estrada-Torres<sup>4</sup> and Yendi E. Navarro-Noya <sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala de Xicohténcatl, Tlaxcala, Mexico.

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Ambiental, UPAEP Universidad, Puebla, Mexico.

<sup>3</sup>Laboratory of Soil Ecology, ABACUS-Cinvestav, Ciudad de México, México.

<sup>4</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala de Xicohténcatl, Tlaxcala, México.

<sup>5</sup>Cátedras Conacyt-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala de Xicohténcatl, Tlaxcala, México.

## Summary

Land-use change has been identified as the most severe threat to biodiversity. Soils are important biodiversity reservoirs, but to what extent conversion of high-altitude temperate forest to arable land affects taxonomic and functional soil biodiversity is still largely unknown. Shotgun metagenomics was used to determine the taxonomic and functional diversity of bacteria, archaea and DNA virus in terms of effective number of species in high-altitude temperate oak and pine-oak forest and arable soils from Mexico. Generally, the soil ecosystem maintained its microbial species richness notwithstanding land-use change. Archaea diversity was not affected by land-use change, but the bacterial diversity decreased with 45–55% when the oak forest was converted to arable land and 65–75% when the pine-oak forest was. Loss in bacterial diversity as a result of land-use change was positively correlated ( $R^2 = 0.41$ ) with the 10–25% loss in functional diversity. The archaeal communities were even more than the bacterial ones,

which might explain their different response to land-use change. We expected a decrease in DNA viral communities as the bacterial diversity decreased, i.e. their potential hosts. However, a higher viral diversity was found in the arable than in the forest soils. It was found that converting high altitude oak and pine-oak forests to arable land more than halved the bacterial diversity, but did not affect the archaeal and even increased the viral diversity.

Land-use change has been identified as the most severe threat to biodiversity (Sala *et al.*, 2000; Tsiafouli *et al.*, 2015). Some regions are especially important for biodiversity, and they occur typically along environmental gradients and in regions of ecological transitions (Brooks *et al.*, 2001). For example, the Transition Neartic-Neotropical or Mexican transition zone (MTZ) corresponds to the biogeographic transition of the Neartic and Neotropical regions. The MTZ is one of the most biologically diverse regions in the world as the different evolutionary histories of the Neartic and Neotropical biotas converge in this area (Halffter and Morrone, 2017), but also because of its geology and geography. There is a gradient of different climates and 20% of its vertebrate species are endemic to the region (Ceballos and García, 2013; Martínez-Falcón *et al.*, 2018). The fauna and flora in the MTZ is extraordinary diverse (Halffter and Morrone, 2017; Martínez-Falcón *et al.*, 2018). Not only the aboveground diversity of an ecosystem is important, but also the belowground microbiota as they play a crucial role in organic material decomposition, nutrient cycling and plant productivity. Although, the size of the soil microbial biomass, i.e.  $>1000 \text{ kg C ha}^{-1}$ , is often comparable with the aboveground biomass, little is known about its diversity (Fierer, 2017). The measurement of biodiversity in a given ecosystem, besides its intrinsic value, is a valuable ecological indicator as biodiversity plays a key role in supporting ecosystem services that benefit human societies and economies (Díaz *et al.*, 2006). Biodiversity supports the resilience and function of ecosystems, i.e. their capacity to sustain such services over time and in the face of various

\*For correspondence. E-mail ynavarrono@conacyt.mx; nyendi@hotmail.com; Tel. +52 55 3915 5679 Fax. +52 24 6465 2700.

disturbances. High-mountain forests of MTZ have been converted to arable land causing a drop in organic C stocks, altering soil properties and soil microbial communities (Bravo-Espinosa *et al.*, 2014; Gómez-Acata *et al.*, 2016; Fusaro *et al.*, 2019).

Land-use change causes a long-term perturbation of a soil ecosystem. A decrease in plant species richness might induce a loss in belowground microorganism diversity as specialist microbial species have a narrow range of nutrients to metabolize or organisms to feed on (De Deyn and Van der Putten, 2005). Also, belowground biodiversity loss is very likely to have negative effects both on the environment and on the sustainability of agricultural production as microbial functions will be altered (Tardy *et al.*, 2014). Recently, metagenomic approaches have investigated the impact on the composition and structure of soil microbiome of converting semi-deciduous Amazonian rainforest and natural grasslands to arable soils (Mendes *et al.*, 2015; Castañeda and Barbosa, 2017; Goss-Souza *et al.*, 2017; Kroeger *et al.*, 2018). These studies found that arable soils were similar or more diverse than the original ecosystem and that functional redundancy overcomes the ecosystem transformation. Most studies, however, have determined Shannon and Simpson indices and they did not report on the magnitude of the changes (Mendes *et al.*, 2015; Castañeda and Barbosa, 2017; Goss-Souza *et al.*, 2017; Jiao *et al.*, 2018). However, the effect on soil biodiversity of conversion of high-altitude temperate forest to arable land has not yet been investigated and as the vegetation and environmental conditions are different, it is difficult to predict what the effect might be.

Here, we used shotgun metagenomics to determine the true taxonomic and functional microbial diversity in soil of two types of high-altitude temperate forests and how the conversion of these ecosystems to arable soil affected the microbial community. We determined the effective numbers of archaea, bacteria and DNA virus, i.e. the number of equally abundant species that are needed to reach the observed value of a diversity index (Chao *et al.*, 2014).

Soil was sampled at the National Park “La Malinche” (NPLM) located in the east central area of México, which is part of the MTZ. The ecosystems in the NPLM are high-altitude temperate forest with different plant cover:

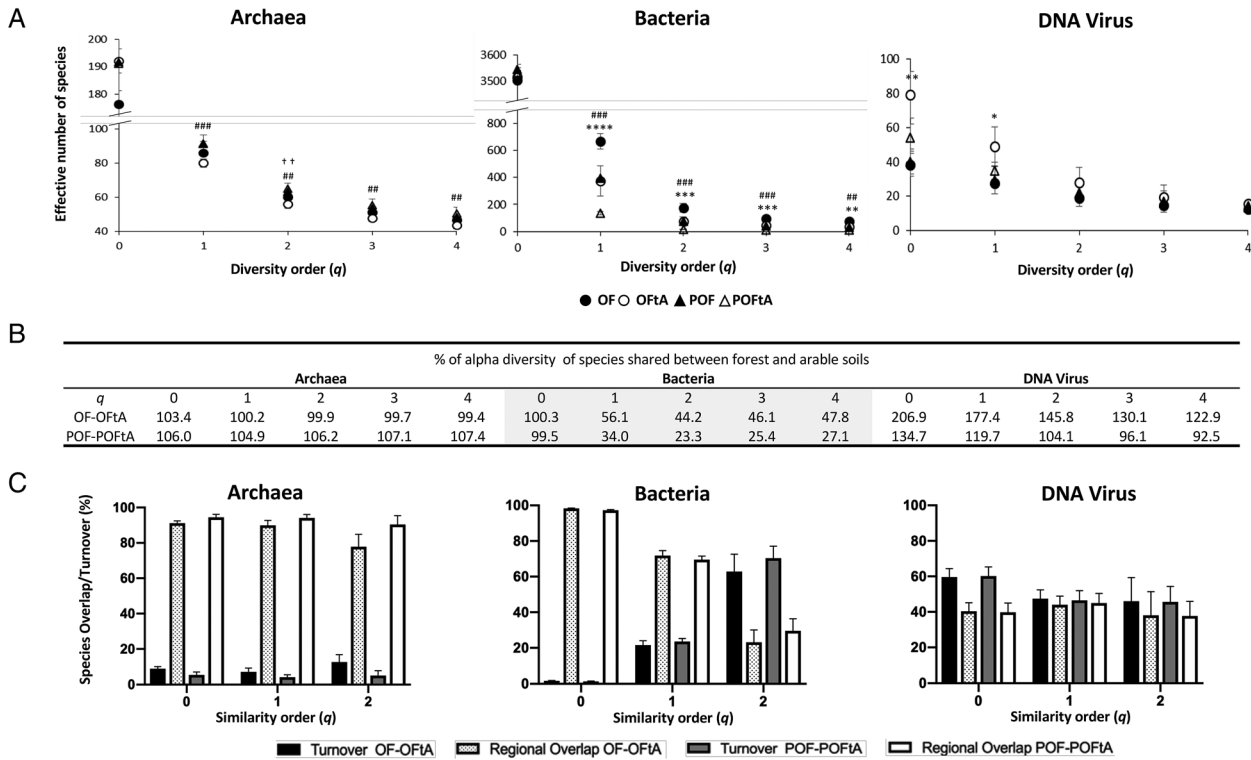
pine (*Pine* L.), fir (*Abies* Mill.), oak (*Quercus* L.), and pine-oak forest. Although the NPLM is a protected natural area, almost the 60% of its surface is affected by anthropogenic activities, such as agriculture and logging (Arriaga *et al.*, 2000). The NPLM is a suitable model to study the effect of land-use change on soil taxonomical and functional diversity, as it preserves conserved forest nearby agriculture areas so that the effect of land-use change can be determined.

Four different sites and four ecosystems at NPLM were sampled, i.e. oak forest (OF), pine-oak forest (POF), oak forest converted to arable soil (OFtA) and pine-oak forest converted to arable soil (POFtA) (Table 1). The cambisol soil was sampled in November 2016. At the time of sampling, all arable soils were cultivated with maize (*Zea mays* L.). A systematic sampling of the 0–20 cm top soil layer was done as suggested by Petersen and Calvin (1986) and each ecosystem was sampled in triplicate ( $n = 3$ ). The field-based sampling was maintained in the laboratory analysis.

Thirty grams of each soil sample ( $N = 12$ ) was extracted for its metagenomic DNA as described previously (Chávez-Romero *et al.*, 2016). Sequencing was done with a HiSeq 4000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) by MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea) and a total of 117.48 Gb was yielded. The raw sequences were trimmed based on quality scores with Trimmomatic v 0.36 (Bolger *et al.*, 2014), i.e. length > 36 nt and Q score > 23. Good quality paired-end reads were analysed with the Kraken Taxonomic Sequence Classification System version 2.0 (Wood and Salzberg, 2014) using the standard Kraken database. The abundance at different taxonomic levels was determined with Bracken version 2.0 (Lu *et al.*, 2017). Good quality paired-end reads were *de novo* assembled with MEGAHIT v1.1.3 for functional analysis (Li *et al.*, 2016). The assembled contigs were compared with BLASTX against the RefSeq non-redundants proteins database with the sequence aligner DIAMOND (Buchfink *et al.*, 2014). The annotation was done with MEGAN v6.13.1 using SEED classification for functional analysis. SEED hierarchical categorization of functions is organized in five levels of subsystems. Each subsystem groups functional roles that make up a metabolic pathway, a complex, or a class of proteins (Overbeek *et al.*, 2005).

**Table 1.** Information of the soil sampling location.

Ecosystem	OF	OFtA	POF	POFtA
Geographic Coordinates	19° 19'33.8"N 98° 03'06.6"W	19° 19'41.2"N 98° 02'59.2"W	19° 13'16.50"N 98° 07'21.40"W	19° 14'22.3"N 98° 07'11.0"W
Altitude (m a.s.l)	2699	2677	2708	2700
Annual average precipitation (mm)	721–857			
Mean annual temperature (°C)	6.4–7.2			
Köppen climate classification	Cb'(w2)			
Soil classification	Cambisol			



**Fig. 1.** Effect on taxonomic microbial diversity of conversion of forest to arable soils of “Parque Nacional La Malinche”, Mexico. **A.** Alpha diversity profile at different  $q$  orders, for archaea, bacteria and DNA virus with significant effect of land-use  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ , vegetation  $\#p \leq 0.05$ ,  $\#\#p \leq 0.01$ ,  $\#\#\#p \leq 0.001$ , and the interaction between land-use and vegetation  $\dagger p \leq 0.05$ ,  $\dagger\dagger p \leq 0.01$ ,  $\dagger\dagger\dagger p \leq 0.001$ . **B.** Percentages of alpha diversity shared in magnitude at different  $q$  orders between forest and arable soil, 0% means that forest soils were 100% more diverse than arable soils, 100% means that they were equally diverse and values greater than 100% indicates that arable soils were more diverse than the forest soil. **C.** Percentages of turnover and regional overlap between forest and arable soil, 100% turnover indicates totally different diversity communities while 100% of regional overlap indicates equally diverse communities.

The equivalent Hill numbers were calculated with the metagenomic taxonomic species classification and metagenome functional subsystems 1 and 2 using the metagenome gene and contig abundances (Jost, 2007; Chao *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2014). The percentages of overlap and turnover of species or functions were determined through the multiplicative partition of beta-diversity. The alpha diversity profile at  $q = 0, 1, 2, 3$  and 4 of soil communities, and the overlap and turnover rate at  $q = 0, 1$  and 2 between communities were obtained with MetagenomeDiversity script in R (Ma and Li, 2018). The percentages of diversity shared between soils were calculated as described by Moreno *et al.* (2011). A two-way analysis of variance (2-way ANOVA) was used to test the effects of vegetation, land-use change and the interaction between both on the alpha diversity. Pearson’s coefficient was calculated to determine the correlation of taxonomic and functional diversity at  $q = 0, 1, 2$  and 3. As diversity of bacteria was the most affected, a constrained analysis of principal coordinates analysis (CAP) with the relative abundance of the bacterial phyla and taxonomic diversity at  $q = 0, 1, 2, 3$  and 4 was done with the package vegan v.2.5 (Oksanen

*et al.*, 2018). Considering the average of effective species at  $q = 2$  diversity order in all soils, i.e. 79, the 79 most abundant bacterial species at each soil were selected. As such, the effect of land-use change and land-use change considering the original vegetation on 124 species was determined with linear mixed effects models (lme4) with permutational analysis based on 1000 Monte-Carlo samplings using the nlme package (Pinheiro *et al.*, 2019). The heat-map was constructed with the pheatmap package (Kolde, 2015).

The shape of the diversity profiles curves indicated that the assemblage of archaea and DNA virus communities were moderately uneven, while the steep decline of the curve of bacteria indicated highly uneven communities (Fig. 1A). In general, the effective numbers of order  $q = 0$  ( ${}^0D_\alpha$ ) of archaea, bacteria and DNA virus soil communities remained the same independently of vegetation, i.e. pine-oak and oak forest, land-use, i.e. forest or arable soil or the interaction of vegetation and land-use (Table 2).  ${}^0D_\alpha$  can be defined as species richness as it does not count the relative abundances of the species (Chao *et al.*, 2014). The effective numbers of order  $q = 1$  ( ${}^1D_\alpha$ ), which consider the ‘typical species’, indicated that vegetation

had a profound effect on the archaeal and bacterial communities, while land-use only on the bacterial communities. The same was found when  $q \geq 2$  ( $^{2,3,4}D_{\alpha}$ ), which weights heavily the most common species.

Shared diversity of the archaeal communities in the forest and their corresponding arable soil is almost 100% for all  $q$  orders independent of vegetation (Fig. 1B and C). This indicated that the same species were present in all soils with a similar abundance. However, different results were obtained considering the bacterial communities. The same bacterial species were found in forest and arable soils, but the abundance of the most abundant species was affected as the alpha diversity decreased 45%–55% when the oak forest was converted to arable land and 65%–75% when the oak-pine forest was converted.

Vegetation affected functional richness considering the subsystem 1 of the SEED classification, but not land-use

(Fig. 2A and Table 3).  $^1D_{\alpha}$  and  $^{2,3,4}D_{\alpha}$  were affected by land-use as  $D_{\alpha}$  decreased between 10% and 25%. The turnover rate was 18%–30% higher and functions that overlapped were lower in the oak forest soils converted to arable soil than in the converted pine-oak soils. Functional redundancy can occur for more general functions as several genes can have the same function. In the soils studied here, however, this was not observed and a higher functional diversity loss was found (10%–45%) when the subsystem 2 of the SEED classification was used.

The archaeal communities did not change when the vegetation was removed, so the loss of functional diversity due to land-use change was the result of the loss of bacterial communities. Pearson correlation showed that functional diversity ( $q = 1, 2, 3$ ) was positively correlated with bacteria diversity ( $q = 1, 2$ ), but not with archaea diversity (Table 4 and Supporting Information Tables S1 and S2).

**Table 2.** Two-way ANOVA comparing the percentage of variation of taxonomic diversity as a function of land-use and type of vegetation.

Effect	% Total variation of taxonomic diversity											
	Archaea				Bacteria				DNA virus			
	$q = 0$	$q = 1$	$q = 2$	$q = 3$	$q = 0$	$q = 1$	$q = 2$	$q = 3$	$q = 0$	$q = 1$	$q = 2$	$q = 3$
Land-use–vegetation	19.42	8.63	15.29*	15.78	8.85	0.17	2.57	2.36	12.29	11.82	8.28	6.37
Vegetation	14.96	63.91***	59.25**	55.14**	31.78	43.17***	43.81***	44.28***	8.91	7.40	1.92	0.28
Land-use	16.38	7.43	3.07	1.10	0.54	49.73****	44.08***	40.79***	51.00**	35.86*	12.41	3.53

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**Table 3.** Two-way ANOVA comparing the percentage of variation of functional diversity as a function of land-use and type of vegetation.

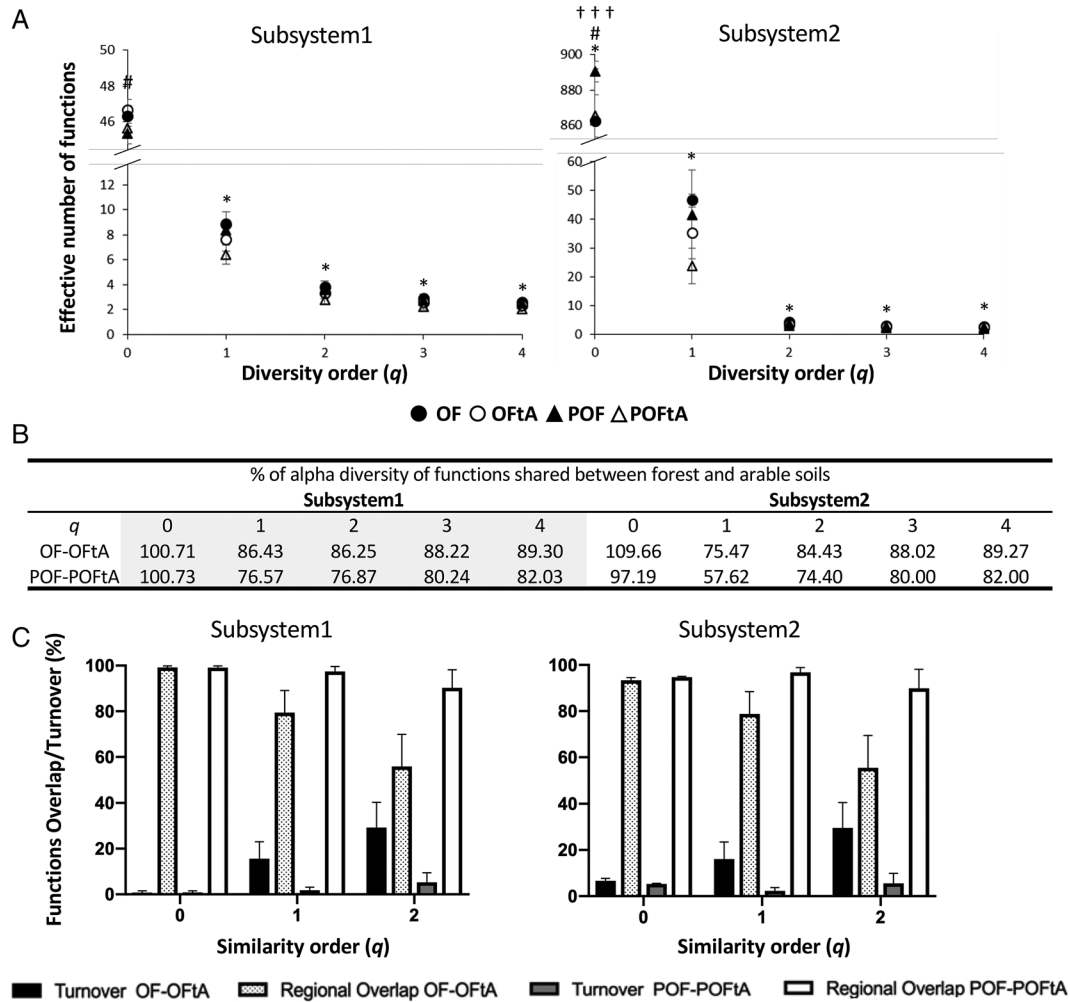
Effect	% Total variation in functional diversity							
	Subsystem level 1				Subsystem level 2			
	$q = 0$	$q = 1$	$q = 2$	$q = 3$	$q = 0$	$q = 1$	$q = 2$	$q = 3$
Land-use–vegetation	0.00	2.61	2.14	2.17	56.32***	1.94	1.80	2.11
Vegetation	50.00*	14.80	15.74	15.92	13.14*	14.74	15.90	15.96
Land-use	5.55	46.10*	43.72*	43.17*	16.33*	44.19*	43.08*	43.07*

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Table 4.** Significant Pearson correlation coefficients ( $R^2$ ) between diversity of SEED subsystems 1 and 2 and taxonomic diversity.

Taxonomic diversity $q$ order $D_{\alpha}$ -Domain	$^0D_{\alpha}$	$^1D_{\alpha}$	$^2D_{\alpha}$	$^3D_{\alpha}$	$^4D_{\alpha}$
Functional diversity of SEED subsystem 1					
$^0D_{\alpha}$ -Bacteria	(-) 0.37*				
$^1D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.47*				
$^2D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.41*				
$^3D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.33*				
$^1D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.41*	(+) 0.41*	(+) 0.41*	(+) 0.41*
$^2D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.34*	(+) 0.33*	(+) 0.33*	(+) 0.33*
Functional diversity of SEED subsystem 2					
$^0D_{\alpha}$ -DNA Virus	(+) 0.47*				
$^2D_{\alpha}$ -Archaea	(-) 0.36*				
$^1D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.40*	(+) 0.41*	(+) 0.41*	(+) 0.41*
$^2D_{\alpha}$ -Bacteria		(+) 0.33*	(+) 0.33*	(+) 0.33*	(+) 0.33*

The sign between parentheses indicates the type of correlation. \* $p < 0.05$ .



**Fig. 2.** Effect on functional microbial diversity of conversion of forest to arable soils of “Parque Nacional La Malinche”, Mexico. A. Alpha diversity profile at different  $q$  orders for subsystems 1 and 2 of SEED, with significant effect of land-use  $^*p \leq 0.05$ ,  $^{**}p \leq 0.01$ ,  $^{***}p \leq 0.001$ , vegetation  $^{\#}p \leq 0.05$ ,  $^{\#\#}p \leq 0.01$ ,  $^{\#\#\#}p \leq 0.001$ , and the interaction between land-use and vegetation  $^{\dagger}p \leq 0.05$ ,  $^{\dagger\dagger}p \leq 0.01$ ,  $^{\dagger\dagger\dagger}p \leq 0.001$ . B. Percentages of alpha diversity shared in magnitude at different  $q$  orders between forest and arable soils, 0% means that forest soils were 100% more diverse than arable soils, 100% means that were equally diverse and values greater than 100% indicates that arable soils were more diverse than that of forest. C. Percentages of turnover and regional overlap between forest soil and arable soil, 100% turnover indicates totally different diversity communities while 100% of regional overlap indicates equally diverse communities.

Archaea were regarded as rare microorganisms that played a limited role in biogeochemical cycles in non-extreme environments (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018). Recently, however, archaea have been found to be distributed widely and comprise a broad diversity of gene repertoires and lifestyles (Martínez-Núñez and Pérez-Rueda, 2016). The  $D_{\alpha}$  of archaea was maintained and even increased when the pine-oak forest was converted to arable land. Martínez-Núñez and Pérez-Rueda (2016) suggested that archaea contain more promiscuous enzymes providing an enzymatic repertoire that allow them to face multiple ecological variables in fluctuating environments. Archaea communities in arable soils reforested for > 20 y in the Tibetan Plateau were equally diverse and showed high similarity

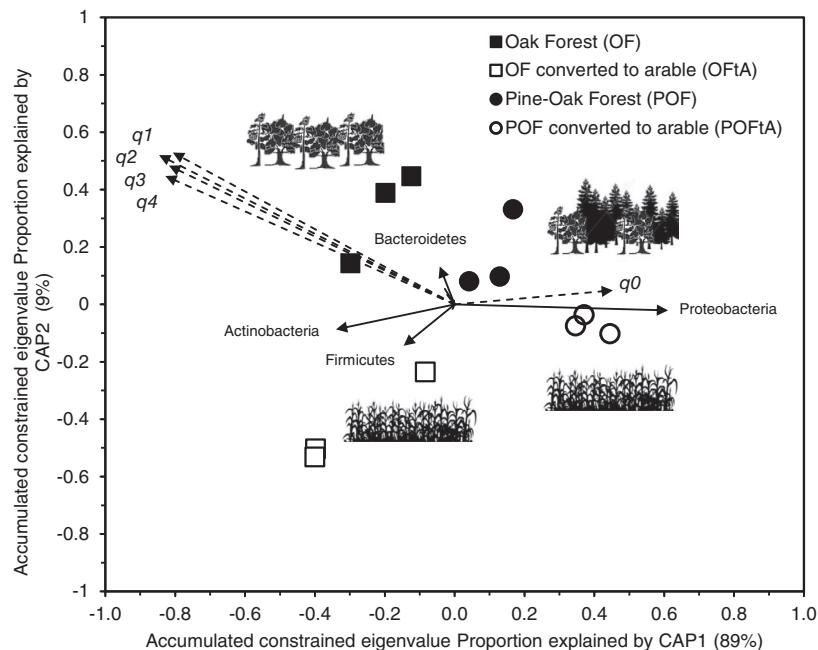
between soils (Jiao *et al.*, 2018). Archaeal communities were even more diverse than bacterial ones, which might explain why the effect of land-use change on bacteria diversity was different than that on archaea. Wittebolle *et al.* (2009) demonstrated that initial community evenness is a key factor in preserving the functional stability of an ecosystem under environmental stress. Loss in bacterial diversity is likely to result in a reduction of the ecosystem services in a soil system. Some studies have argued that any loss in microbial diversity will impact negatively ecosystem functionality and the provision of ecosystem services (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016).

Deciduous oak forest can contain up to 200 plant species (Slezák and Axmanová, 2016) compared with only 20 in maize cropland (Eilu *et al.*, 2003). The amount and

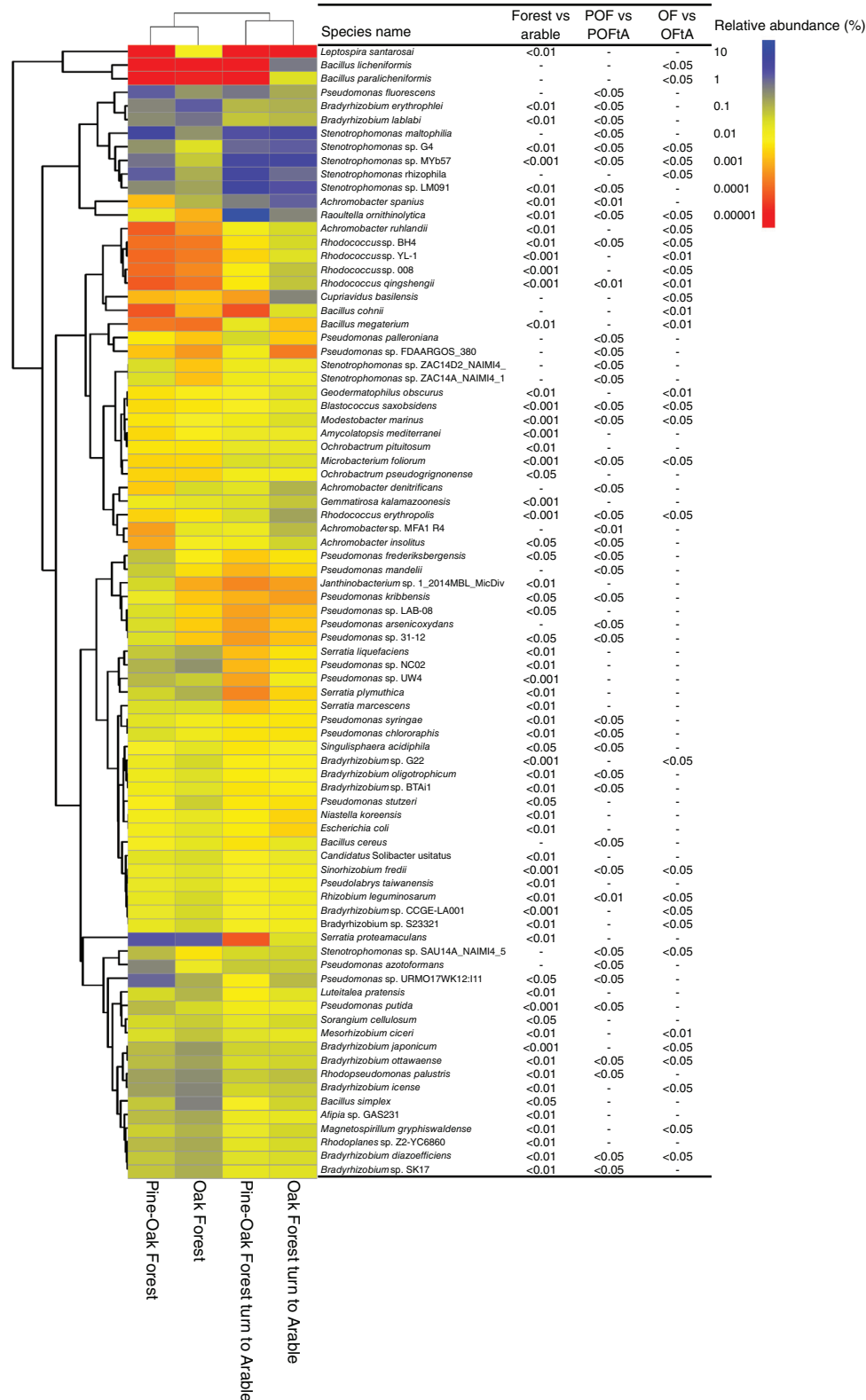
composition of the plant residues and the organic compounds in the rhizosphere of a forest soil are, consequently, much higher and richer than in arable soils. In addition, plant-associated microorganisms contribute substantially to the microbial diversity (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016), which further increases the effect of vegetation on the microbial community structure.

The CAP showed that the bacterial phyla with a major effect on bacterial diversity were Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria (Fig. 3). Proteobacteria was the most abundant phylum in all soils and drove the  ${}^0D_{\alpha}$  as it contained 1731 of a total of 3652 species detected (Supporting Information Table S3). The CAP showed that Actinobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes affected  ${}^{1,2,3,4}D_{\alpha}$ . The relative abundance of Bacteroidetes decreased with deforestation, probably because they are degraders of polymeric organic matter, such as polysaccharides and proteins. The fraction of polymeric organic matter is larger in a forest soil than in arable soils (Thomas *et al.*, 2011). Any changes in this fraction of the soil organic material will have a direct effect on diversity. The relative abundance of Actinobacteria and Firmicutes decreased in the OF soils when land-use changed, but not in the POF soils. The arable soils had a lower number of dominant species, i.e.  ${}^{2,3,4}D_{\alpha\text{arable}} < {}^{2,3,4}D_{\alpha\text{forest}}$ , which suggest less even bacterial communities. Of the 124 most abundant bacterial species, 68 were affected by land-use change, 15 species by land-use change depending on the original vegetation and 41 were not affected (Fig. 4). *Stenotrophomonas* sp. G4 and

*Stenotrophomonas* sp. MYb57, *Raoultella ornithinolytica*, *Rhodococcus* BH4, *R. quingshengii* and *R. erythropolis* were more abundant in the arable than forest soils. *Stenotrophomonas* spp. have been found worldwide in soils, but their occurrence is strongly related to arable soils amended with animal manure (Ding *et al.*, 2014; Deredjian *et al.*, 2016). In this area, application of farmyard manure is not a common practice, but cattle often roam the fields (Arriaga-Cabrera *et al.*, 2009). The enrichment of a limited number of bacterial species generates uneven communities and contributes to a decrease in biodiversity. It is possible that maize roots exudates stimulated some bacterial species in the arable soils. For instance, members of *Raoultella*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, and *Klebsiella* have been found as the most abundant genera in the rhizosphere, roots and stem of maize (Roesch *et al.*, 2008). *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium ottawaense* and *B. diazoefficiens* were more abundant in forest soils. Rhizobiales have been studied mostly for their symbiotic association with legumes (Poole *et al.*, 2018). It has been found however, that members of *Bradyrhizobium* are more often free-living than symbiotic (Vaninsberghe *et al.*, 2015). Rhizobiales are very abundant generally in forest soils and their occurrence has been associated with their capacity to decompose cellulose (Lladó *et al.*, 2017). In different pine forest soils in North America, Rhizobiales were among the bacterial groups that most accumulated cellulose-derived C (Eichorst and Kuske, 2012).



**Fig. 3.** Constrained analysis of principal coordinates (CAPs) with the relative abundance of the bacterial phyla and taxonomic diversity at different  $q$  orders, i.e.  $q = 0, 1, 2, 3$  and  $4$ , of forest and arable soils of "Parque Nacional La Malinche", Mexico.



**Fig. 4.** Heat-map with the relative abundance of the most abundant species of forest and arable soils of “Parque Nacional La Malinche”, Mexico. Linear mixed effects models with 1000 Monte-Carlo permutations was used to determine the effect of land-use change and land-use change depending on the original vegetation on the relative abundance of the bacterial species. Dendrograms represents hierarchical cluster analysis with Bray–Curtis distances.



We found that a loss in bacterial diversity correlated with a loss in functional diversity. Bacterial communities are known to have high genetic and metabolic redundancies that allow them to cope with shifting environmental pressures. However, land-use change combined with intensive agricultural practices has a profound effect on the soil system. For example, intensive tillage induces soil degradation and the type of crop planted can affect the microbial community structure. Converting tropical forest to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) (Mendes *et al.*, 2015) or forests to vineyards (Castañeda and Barbosa, 2017) had no effect on functional diversity, but maize did.

In general, we found that soil ecosystem maintained its species richness notwithstanding land-use change. Ecosystem legacies have been reported to regulate several soil functions, such as organic matter decomposition or N<sub>2</sub>O emissions (Kallenbach and Stuart Grandy, 2015; Abraha *et al.*, 2018). It is likely that this pool of microbial species serve as a reservoir of different functions that is then found as a legacy effect. Castañeda and Barbosa (2017) suggested that the shared diversity before and after land-use change is more a dispersal effect as a result of the nearness of the ecosystems. Likewise, the similar species richness in the forest and in the arable soils in this study is very likely the consequence of the vicinity of both ecosystems.

Soil-borne viruses are of great importance as they may influence the soil biodiversity and ecology. For example, viruses can transfer genes from host to host and viral infection can shape microbial communities. This affects indirectly global geochemical cycles and the turnover of nutrients. We expected that shifts in the bacterial diversity affected viral communities as found previously (Hurwitz *et al.*, 2014). However, a higher viral diversity was observed in the arable than in the forest soils, and a similar species turnover rate and regional overlap (Fig. 1A and B). Other microbial taxonomic groups not investigated in this study, e.g. fungi and invertebrates, might change the viral diversity. It is still unclear how soil characteristics and ecosystem management practices affect viral communities. Fertilizer application has been reported to increase the abundance of viruses (Chen *et al.*, 2014) and temporal variability in forest and arable soils (Narr *et al.*, 2017). Viral communities are very dynamic as viruses have extreme evolutionary capacities and high genetic diversity that have allowed them to parasitize all known groups of organisms and to rapidly adapt to numerous host species.

### Acknowledgements

This research was funded by the project 'Infraestructura 253217', 'Ciencia Básica 256096' and 'Cátedras CONACyT 883' from 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología'

(CONACyT, Mexico). L.C. M.-A., C. F. and M. H.-G. received a grant-aided from CONACyT. Authors thank La Malinche Scientific Station for logistical support and ABACUS super-computer for computing resources.

### References

- Abraha, M., Gelfand, I., Hamilton, S.K., Chen, J., and Robertson, G.P. (2018) Legacy effects of land use on soil nitrous oxide emissions in annual crop and perennial grassland ecosystems. *Ecol Appl* **28**: 1362–1369.
- Arriaga, L., Espinoza, J., Aguilar, C., Martínez, E., Gómez, L., and Loa, E. (2000) La Malinche. Anexo I. Fichas de información técnica. In *Regiones terrestres prioritarias de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad México, pp. 424–426.
- Arriaga-Cabrera, L., Aguilar, V., Espinoza, J.M., Galindo, C., Herrmann, H., Santana, E., *et al.* (2009) Regiones prioritarias y planeación para la conservación de la biodiversidad. *Capital Natural de México* **2**: 433–457.
- Barberan, A., Bates, S.T., Casamayor, E.O., and Fierer, N. (2012) Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J* **6**: 343–351.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.
- Bravo-Espinosa, M., Mendoza, M.E., Carlón Allende, T., Medina, L., Sáenz-Reyes, J.T., and Páez, R. (2014) Effects of converting forest to avocado orchards on topsoil properties in the Trans-Mexican volcanic system, Mexico. *Land Degrad Dev* **25**: 452–467.
- Brooks, T., Hannah, L., Da Fonseca, G.A.B., and Mittermeier, R.A. (2001) Prioritizing hotspots, representing transitions [2]. *Trends Ecol Evol* **16**: 673.
- Buchfink, B., Xie, C., and Huson, D.H. (2014) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* **12**: 59.
- Castañeda, L.E., and Barbosa, O. (2017) Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ* **5**: e3098.
- Ceballos, G., and García, A. (2013) Challenges and opportunities for conservation of Mexican biodiversity. In *Conservation Biology: Voices From the Tropics*. Raven, P.H., Sodhi, N.S., and Gibson, L. (eds). London: Wiley and Sons, pp. 105–112.
- Chao, A., Chiu, C.-H., and Jost, L. (2014) Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and Related Similarity and Differentiation Measures Through Hill Numbers. *Annu Rev Ecol Syst* **45**: 297–324.
- Chao, A., Chiu, C.-H., Hsieh, T.C., and Inouye, B.D. (2012) Proposing a resolution to debates on diversity partitioning. *Ecology* **93**: 2037–2051.
- Chávez-Romero, Y., Navarro-Noya, Y.E., Reynoso-Martínez, S.C., Sarria-Guzmán, Y., Govaerts, B., Verhulst, N., *et al.* (2016) 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. *Soil Tillage Res* **159**: 1–8.

- Chen, L., Xun, W., Sun, L., Zhang, N., Shen, Q., and Zhang, R. (2014) Effect of different long-term fertilization regimes on the viral community in an agricultural soil of Southern China. *Eur J Soil Biol* **62**: 121–126.
- Chiu, C.H., Jost, L., and Chao, A. (2014) Phylogenetic beta diversity, similarity, and differentiation measures based on Hill numbers. *Ecol Monogr* **84**: 21–44.
- De Deyn, G.B., and Van Der Putten, W.H. (2005) Linking aboveground and belowground diversity. *Trends Ecol Evol* **20**: 625–633.
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D., *et al.* (2016) Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nat Commun* **7**: 1–8.
- Deredjian, A., Alliot, N., Blanchard, L., Brothier, E., Anane, M., Cambier, P., *et al.* (2016) Occurrence of *Stenotrophomonas maltophilia* in agricultural soils and antibiotic resistance properties. *Res Microbiol* **167**: 313–324.
- Díaz, S., Fargione, J., Chapin, F.S., and Tilman, D. (2006) Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biol* **4**: 1300–1305.
- Ding, G.C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K., and Schloter, M. (2014) Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLoS One* **9**: e92958.
- Eichorst, S.A., and Kuske, C.R. (2012) Identification of cellulose-responsive bacterial and fungal communities in geographically and edaphically different soils by using stable isotope probing. *Appl Environ Microbiol* **78**: 2316–2327.
- Eilu, G., Obua, J., Tumuhairwe, J.K., and Nkwine, C. (2003) Traditional farming and plant species diversity in agricultural landscapes of south-western Uganda. *Agric Ecosyst Environ* **99**: 125–134.
- Fierer, N. (2017) Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* **15**: 579–590.
- Fusaro, C., Sarria-Guzmán, Y., Chávez-Romero, Y.A., Luna-Guido, M., Muñoz-Arenas, L.C., Dendooven, L., *et al.* (2019) Land use is the main driver of soil organic carbon spatial distribution in a high mountain ecosystem. *PeerJ* **7**: e7897.
- Gómez-Acata, E.S., Valencia-Becerril, I., Valenzuela-Encinas, C., Velásquez-Rodríguez, A.S., Navarro-Noya, Y.E., Montoya-Ciriaco, N., *et al.* (2016) Deforestation and cultivation with maize (*Zea mays* L.) has a profound effect on the bacterial community structure in soil. *Land Degrad Dev* **27**: 1122–1130.
- Goss-Souza, D., Mendes, L.W., Borges, C.D., Baretta, D., Tsai, S.M., and Rodrigues, J.L.M. (2017) Soil microbial community dynamics and assembly under long-term land use change. *FEMS Microbiol Ecol* **93**: 1–13.
- Halffter, G., and Morrone, J.J. (2017) An analytical review of Halffter's Mexican transition zone, and its relevance for evolutionary biogeography, ecology and biogeographical regionalization. *Zootaxa* **4226**: 1–46.
- Hurwitz, B.L., Westveld, A.H., Brum, J.R., and Sullivan, M.B. (2014) Modeling ecological drivers in marine viral communities using comparative metagenomics and network analyses. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 10714–10719.
- Jiao, S., Chen, W., Wang, J., Du, N., Li, Q., and Wei, G. (2018) Soil microbiomes with distinct assemblages through vertical soil profiles drive the cycling of multiple nutrients in reforested ecosystems. *Microbiome* **6**: 1–13.
- Jost, L. (2007) Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* **88**: 2427–2439.
- Kallenbach, C.M., and Stuart Grandy, A. (2015) Land-use legacies regulate decomposition dynamics following bio-energy crop conversion. *GCB Bioenergy* **7**: 1232–1244.
- Kolde, K.R. (2015) Maintainer Raivo. Package 'pheatmap'. R package version 1:0.8.
- Kroeger, M.E., Delmont, T.O., Eren, A.M., Meyer, K.M., Guo, J., Khan, K., *et al.* (2018) New biological insights into how deforestation in Amazonia affects soil microbial communities using metagenomics and metagenome-assembled genomes. *Front Microbiol* **9**: 1–13.
- Li, D., Luo, R., Liu, C.M., Leung, C.M., Ting, H.F., Sadakane, K., *et al.* (2016) MEGAHIT v1.0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods* **102**: 3–11.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., and Baldrian, P. (2017) Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes and response to global change. *Microbiol Mol Biol Rev* **81**: e00063–e00016.
- Lu, J., Breitwieser, F.P., Thielen, P., and Salzberg, S.L. (2017) Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput Sci* **3**: e104.
- Martínez-Falcón, A.P., Zurita, G.A., Ortega-Martínez, I.J., and Moreno, C.E. (2018) Populations and assemblages living on the edge: dung beetles responses to forests-pasture ecotones. *PeerJ* **6**: e6148.
- Martínez-Núñez, M.A., and Pérez-Rueda, E. (2016) Do lifestyles influence the presence of promiscuous enzymes in bacteria and Archaea metabolism? *Sustain Chem Process* **4**: 3.
- Mendes, L.W., Tsai, S.M., Navarrete, A.A., de Hollander, M., van Veen, J.A., and Kuramae, E.E. (2015) Soil-borne microbiome: linking diversity to function. *Microb Ecol* **70**: 255–265.
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C., and Schmitz, R.A. (2018) Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends Microbiol* **26**: 70–85.
- Moreno, C.E., Barragán, F., Pineda, E., and Pavón, N.P. (2011) Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Rev Mex Biodivers* **82**: 1249–1261.
- Narr, A., Nawaz, A., Wick, L.Y., Harms, H., and Chatzinotas, A. (2017) Soil viral communities vary temporally and along a land use transect as revealed by Virus-like particle counting and a modified community fingerprinting approach (fRAPD). *Front Microbiol* **8**: 1–14.
- Oksanen, J., Blanchet, G.F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., *et al.* (2018) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J.V., Chuang, H., Cohoon, M., *et al.* (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* **33**: 5691–5702.

- Petersen, R., and Calvin, L. (1986) Sampling. In *Methods of Soil Analysis. Part 1-Physical and Mineralogical Methods*. Klute, A. (ed). Madison, Wisconsin: American Society for Agronomy Inc, Soil Science Society of America Inc, pp. 33–53.
- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J. (2018) Rhizobia : from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* **6**: 291–303.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., and Sarkar, D. (2019) R Core Team 'nlme': Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-142.
- Roesch, L.F.W., Camargo, F.A.O., Bento, F.M., and Triplett, E.W. (2008) Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil* **302**: 91–104.
- Sala, O.E., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., et al. (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science (80-)* **287**: 1770–1774.
- Slezák, M., and Axmanová, I. (2016) Patterns of plant species richness and composition in deciduous oak forests in relation to environmental drivers. *Community Ecol* **17**: 61–70.
- Tardy, V., Mathieu, O., Lévêque, J., Terrat, S., Chabbi, A., Lemanceau, P., et al. (2014) Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environ Microbiol Rep* **6**: 173–183.
- Thomas, F., Hehemann, J.H., Rebuffet, E., Czejek, M., and Michel, G. (2011) Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol* **2**: 1–16.
- Tsiafouli, M.A., Thébault, E., Sgardelis, S.P., de Ruiter, P.C., van der Putten, W.H., Birkhofer, K., et al. (2015) Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe. *Glob Chang Biol* **21**: 973–985.
- Vaninsberghe, D., Maas, K.R., Cardenas, E., Strachan, C. R., Hallam, S.J., and Mohn, W.W. (2015) Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *ISME J* **9**: 2435–2441.
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., et al. (2009) Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* **458**: 623.
- Wood, D.E., and Salzberg, S.L. (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol* **15**: R46.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Supplementary Table 1.** Pearson's correlation coefficient between functional diversity at subsystem 1 and taxonomic diversity (Archaea, Bacteria, and DNA Virus) at different  $q$  orders.

**Supplementary Table 2.** Pearson's correlation coefficient between functional diversity at subsystem 2 and taxonomic diversity (Archaea, Bacteria, and DNA Virus) at different  $q$  orders.

**Supplementary Table 3.** Relative abundance of the bacterial phyla with a major effect on  ${}^qD_{\alpha}$ .