



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

CARACTERIZACIÓN DE BIOTA ASOCIADA AL FITOTELMA DE *Tillandsia grandis*
EN ACANTILADOS DE LA ZONA ÁRIDA QUERETANO-HIDALGUENSE

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ ALAN HERRERA GARCÍA

DIRIGIDA POR

DRA. MAHINDA MARTINEZ Y DIAZ DE SALAS

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO 2019

RESUMEN

La disposición de las hojas en el género *Tillandsia* (Bromeliaceae) facilita la acumulación de agua. En ella se forma un hábitat llamado fitotelma que puede albergar bacterias, algas, protistas, insectos y hongos. *Tillandsia grandis* es una bromelia tipo tanque, saxícola y crece en la zona árida Queretano-Hidalguense. A pesar de que las bromelias tanque habitan en diferentes ecosistemas, la comunidad del fitotelma es poco conocida. La metagenómica permite obtener secuencias de ADN de múltiples organismos a partir de una muestra ambiental y conocer la composición de especies. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la biota asociada al fitotelma de *Tillandsia grandis*. Se colectó el agua de 10 individuos de *T. grandis*. Se extrajo ADN, se amplificaron las regiones 18S en eucariotas y 16S en bacterias. La secuenciación de ADN se ejecutó en la plataforma Ion Torrent PGM. Se obtuvieron 1.2 millones de secuencias correspondientes a eucariotas y 1.5 millones para bacterias. Las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU's) para conocer su identidad mediante BLAST en las bases de datos del NCBI y Greengenes. Se encontraron 452 géneros pertenecientes a 24 *phyla* de eucariontes. El 79% pertenecieron al reino Fungi, mientras que el 21% restante correspondió a los *phyla* Apicomplexa, Ciliophora, Dinoflagellata, Apusozoa, Myxomycota, Cercozoa, Hyphochytriomycota, Ochrophyta, Metamonada, Heterolobosea, Arthropoda, Platyhelminthes, Bacillariophyta, Oomycota, Bryophyta, Chlorophyta, Charophyta y Tracheophyta. Para bacterias se encontraron 23 *phyla*, 52 clases, 98 órdenes y 218 familias. Tres *phyla* comprenden el mayor porcentaje de la comunidad bacteriana, Proteobacteria representa el 37%, Actinobacteria 19% y Firmicutes el 15%. Los resultados indicaron que la luz, como fuente de energía, aportó poco a la composición de la biota del fitotelma. La poca luz y la materia orgánica favorecieron el crecimiento de saprófitos. Otros estudios encuentran una composición similar de organismos. Este trabajo representó el primer uso de la metagenómica para describir la composición del fitotelma de bromelias tanque en México.

Palabras clave: ADN ambiental, Bacterias, Bromelias, Microbiota, Protistas

ABSTRACT

Leaf arrangement in the genus *Tillandsia* (Bromeliaceae) facilitates water accumulation creating a unique habitat called phytotelma, which can harbor bacteria, algae, protists, insects and fungi. *Tillandsia grandis* is a saxicolous tank bromeliad that grows in the Queretaro-Hidalgoan arid zone. Metagenomics facilitates the obtention of DNA sequences of multiple organisms from environmental samples to know species composition. The aim of this work was to characterize the biota associated to the phytotelma of *T. grandis*. Water samples from 10 individuals of *T. grandis* were collected. We extracted DNA, amplified the 18S and 16S regions for eukaryotes and bacteria respectively. DNA sequencing was performed in the platform Ion Torrent PGM. 1.2 million sequences were obtained for eukaryotes and 1.5 million for bacteria. Sequences were grouped in Operational Taxonomic Units (OUT's) to identify them through BLAST using the NCBI and Greengenes database. 452 genera of 24 phyla of eukaryotes were identified. 79% belong to Fungi, the remaining 21% is represented by the *phyla* Apicomplexa, Ciliophora, Dinoflagellata, Apusozoa, Myxomycota, Cercozoa, Hyphochytriomycota, Ochrophyta, Metamonada, Heterolobosea, Arthropoda, Platyhelminthes, Bacillariophyta, Oomycota, Bryophyta, Chlorophyta, Charophyta and Tracheophyta. 23 phyla, 52 classes, 98 orders and 218 families were identified for bacteria. Three phyla represent the highest percentage of the bacterial community within the tank. Proteobacteria represents 37%, Actinobacteria 19% and Firmicutes 15%. The lack of light and the presence of organic matter favored the growth of saprobic organisms. Our results indicate that light, as an energy source is limited. This work represents the first use of metagenomics to describe phytotelma composition of tank bromeliads in Mexico.

Key words: eDNA, Bacteria, Bromeliads, Microbiota, Protists

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por mi formación académica y a todos los que formaron parte de ella.

A la Dra. Mahinda Martínez por su paciencia, comprensión, apoyo y por haber creído no solo en este proyecto, sino en mi capacidad para llevarlo a cabo. Por aguantarme en todas sus materias. Por aceptarme en su grupo de trabajo en el laboratorio de botánica. Confío en que sus consejos me ayudaran a ser mejor persona. Gracias

Al Dr. Luis Hernández, Dra. Ofelia Vargas Ponce y Dra. Monica Queijeiro, por sus valiosos aportes al escrito y aclaración de dudas que surgieron a lo largo de la tesis.

A la Dra. Pilar Zamora por su tiempo dedicado en laboratorio, por su paciencia al lidiar con este alumno hiperactivo.

A mis padres que incondicionalmente me apoyaron durante toda mi carrera. De alguna manera este logro también les pertenece.

A Noé y Marcy que no solo fueron mis amigos de secundaria y prepa sino que hasta la fecha hemos mantenido una gran amistad y que a pesar de sus críticas y burlas sobre mi carrera, siempre han tenido grandes expectativas y orgullo de mí.

A todos mis compañeros de generación.

A Diana, Lupita, Carla, David, Braulio, Gudiño, Ale, gracias por brindarme su amistad y tener siempre una buena expectativa hacia mi persona.

A Héctor y Damián, sin su ayuda para la colecta no hubiera podido realizar este trabajo.

A la M. en C. Martha Carranza, porque gracias a ella pude generar “manos” para laboratorio.

A todos mis maestros de la carrera, Tere Gasca por despertar en mí el interés por la bioquímica y biología molecular, a Kruskaia por su enseñanza sobre los microorganismos y su confianza para asistirle en sus prácticas de laboratorio durante los propedéuticos. A los ecólogos, Aurelio, Lupita, Israel, Humberto y Mónica que gracias a sus clases entendí la importancia de los números en la biología. A Óscar Rubio y Carlos López por sus conocimientos brindados sobre biología de la conservación y ecología, así como sus consejos amistosos sobre cómo ser un buen biólogo y conseguir recursos.

A la dirección de la Facultad de Ciencias Naturales, que siempre me apoyo en mis salidas de campo, cursos y congresos a los que pude asistir, a las Doctoras Elizabeth Elton y Tere Gasca por siempre recibirme con las puertas abiertas al realizar cada uno de mis trámites administrativos.

A todas las secretarías que me tuvieron que aguantar durante los nueve semestres de la carrera, gracias Addys, Gaby, Yola, Lucy, por agilizar mis trámites cuando era necesario. A todo el personal de la UAQ.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	6
ÍNDICE DE CUADROS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES	13
2.1 La familia Bromeliaceae	13
2.2 Ambientes acuáticos temporales	14
2.2.1 Fitotelma	14
2.3 <i>Tillandsia grandis</i> como bromelia tipo tanque	16
2.3.1 Diversidad de organismos asociados a bromelias tipo tanque	17
2.3.2 Importancia de la diversidad de organismos asociados a bromelias taque y sus interacciones tróficas.....	19
2.4 Zona árida Queretano-Hidalgense	21
2.5 Metagenómica.....	22
2.5.1. Aplicación de la metagenómica para caracterizar la biota asociada al fitotelma ...	23
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Colecta de muestra y procesamiento	26
5.2. Extracción de ADN.....	27
5.3. Eucariotas	28
5.3.1. Amplificación del ADN	28
5.3.2. Secuenciación	30
5.3.3. Asignación de categoría taxonómica.....	30
5.4 Bacterias.....	31
5.4.1 Amplificación del ADN	31
5.4.2 Secuenciación.....	32
5.4.3 Asignación de categoría taxonómica.....	32
5.4.4 Análisis de la composición de la diversidad bacteriana	32

5.5 Red trófica.....	33
5.6 Determinación de la Flora de la localidad.....	33
VI. RESULTADOS	34
6.1 Cantidad de lecturas obtenidas	34
6.2 Diversidad de eucariotas.....	34
6.3 Diversidad de bacterias.....	39
6.3.1 Diferencias en la composición de bacterias de bromelias en laderas con vegetación y sin vegetación.....	41
6.4 Estructura trófica del tanque de <i>Tillandsia grandis</i>	45
VII. DISCUSIÓN.....	48
7.1 Relación de lecturas generadas	48
7.2 Composición de la comunidad eucariota de <i>Tillandsia grandis</i>	48
7.3 Composición de la comunidad de bacterias de <i>Tillandsia grandis</i>	52
7.4 Diferencias en la comunidad bacteriana de <i>Tillandsia grandis</i> en acantilados con vegetación asociada y sin vegetación	53
7.5 Estructura trófica del tanque de <i>Tillandsia grandis</i>	55
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. REFERENCIAS.....	60
ANEXO I.....	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Relación de las muestras obtenidas de la extracción de ADN	29
2	Cebadores usados en el proceso de amplificación del material genético	29
3	Programa de amplificación de PCR para ADN de eucariontes	30
4	Programa de amplificación de PCR de ADN de bacterias	33
5	Relación de las lecturas obtenidas después de ser filtradas. Cantidad de OTU's totales por dominio	35
6	Flora asociada a los acantilados del cañón de las adjuntas. Los géneros del detritus fueron identificados mediante extracción de ADN. La flora del inventario florístico se realizó mediante colecta de ejemplares e identificación en el herbario.	39

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ejemplos de los principales tipos de fitotelma: A) hueco de árbol lleno de agua; B) hueco de raíz lleno de agua en el tocón de una palma; C) bromelia con agua en las hojas axilares y tanque central; D) <i>Nepenthes rafflesiana</i> ; E) entrenudo de bambú lleno de agua después de un corte en el tallo; F) brácteas de la inflorescencia de <i>Tapeinochilios ananassae</i> . Modificado de Kitching 2001.	16
2	Distribución de <i>Tillandsia grandis</i> en la región del Bajío y zonas adyacentes. Tomado de Espejo-Serna <i>et al.</i> , 2010.	18
3	Formas del fitotelma en Bromeliaceae. (A D) Cuatro arreglos del follaje que producen fitotelma de diferentes tipos. (E L) Diferentes formas vegetativas de bromelias tanque. M) Esquema de la comunidad del tanque de bromelias. Modificado de Benzing y Kitching, 2000.	19
4	Representaciones esquemáticas de las relaciones tróficas en el fitotelma de bromelias tanque. a) Estructura básica de las cadenas alimenticias en el fitotelma. b) Representación de la cadena alimenticia del detritus (bromelias en sotobosque) los números indican los grupos funcionales. 1 = heterotrófos, 2 = mixotróficos, 3 = autotrófos, 4 = filtradores, 5 = Colectores, 6 = depredadores. Modificado de Mogi, 2004 y Brouard, 2011.	22
5	Contenido del interior del tanque a) Temporada de seca, se observa hojarasca y depósitos de materia vegetal y b) Temporada de lluvias, hay presencia de agua formando el fitotelma.	27
6	Puntos de colecta seleccionados de acuerdo a la diferencia de la cobertura vegetal a) y b) presentan vegetación escasa o nula. c) y d) abundante vegetación circundante	28
7	Tamaño calculado de los amplicones obtenido en el Bioanalyzer. Las muestras están ennumeradas del 1 al 8. L= Marcador de pesos moleculares	30
8	Composición de eucariotas del tanque de <i>Tillandsia grandis</i> . Se muestra el porcentaje de géneros para cada phyla. Las secuencias analizadas muestran que el mayor porcentaje de los organismos habitantes del tanque pertenecen al reino Fungi.	36
9	Géneros representativos para cada <i>phylum</i> de eucariotas. a) Apicomplexa: <i>Plasmodium</i> , b) Ciliophora: <i>Neobalantidium</i> , c) Dinoflagellata: <i>Colponema</i> , d) Apusozoa: <i>Breviatea</i> , e) Myxomycota: <i>Entomophthoraceae</i> , f) Cercozoa: <i>Paracercomonas</i> , g) Hyphochytriomycota: <i>Hyphochytrium</i> , h) Chrophyta: <i>Nannochloropsis</i> , i) Metamonada: <i>Giardia</i> , j) Heterolobosea: <i>Tetramitus</i> , k) Ascomycota: <i>Podosphaera</i> , l) Basidiomycota: <i>Hannaella</i> , m) Chytridiomycota, n) Glomeromycota: <i>Glomus</i> , o) Mucoromycota: <i>Mucor</i> , p) Bacillariophyta: <i>Navicula</i> , q) Zoopagomycota: <i>Ramicandelaber</i> , r) Arthropoda: <i>Stilbum</i> , s) Arthropoda: <i>Agriocnemis</i> , t) Platyhelminthes: <i>Spirometra</i> , u) Oomycota: <i>Pythium</i> , v) Bryophyta: <i>Fontinalis</i> , w) Chlorophyta: <i>Chlorococcum</i> , x) Charophyta; <i>Staurostrum</i> , y) Tracheophyta: <i>Hauya</i>	37

10	Distribución taxonómica de bacterias contenidas dentro del tanque de <i>Tillandsia grandis</i> . Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes representan el 71% del total de familias identificadas.	41
11	Relación de la composición bacteriana del tanque de <i>Tillandsia grandis</i> ubicadas en los acantilados con vegetación. Se identificaron 19 phyla, 41 clases, 83 órdenes y 179 familias.	43
12	Relación de la composición bacteriana del tanque de <i>Tillandsia grandis</i> ubicadas en los acantilados sin vegetación. Se identificaron 20 phyla, 44 clases, 87 órdenes, y 188 familias	44
13	Diagrama de Venn donde se muestran los órdenes únicos dentro de cada sitio y los compartidos.	45
14	Órdenes presentes en ambos sitios con el mayor número de familias registradas. Se muestran 10 de los 98 presentes en la diversidad total de bacterias del tanque de <i>Tillandsia grandis</i> .	45
15	Porcentaje de géneros asociados a alguna función ecológica dentro del tanque de <i>Tillandsia grandis</i> . El mayor porcentaje de estos organismos corresponde al grupo de los Descomponedores, seguido del detritus de materia vegetal en el fondo del tanque.	46
16	Red trófica hipotética para el fitotelma de <i>Tillandsia grandis</i> . La dirección de las flechas indica el flujo de energía de un nivel a otro. Son los Recursos la fuente principal de nutrientes y los Depredadores de Superficie los depredadores tope del ecosistema.	47

I. INTRODUCCIÓN

La familia Bromeliaceae tiene 3590 especies, son monocotiledóneas de hojas arrosetadas, perennes, epifitas o saxícolas (Gouda *et al.* 2019). Se les encuentra en una gran variedad de hábitats, principalmente en zonas tropicales. La mayoría de estas plantas crecen donde hay déficit en nutrientes y minerales, lo cual resuelven con adaptaciones como tricomas absorbentes y la forma de roseta. Adaptaciones que les permiten soportar condiciones de aridez, manteniendo la humedad y llegando a crear ambientes acuáticos temporales en el interior de algunas especies conocido como fitotelma (Mogi, 2004, Ramírez-Morillo *et al.*, 2004; Rzedowski, 2006). La descripción de la comunidad biótica asociada al fitotelma de bromelias se tiene documentado en zonas tropicales, donde la disponibilidad de agua es constante, existen pocas fluctuaciones de temperatura y generalmente hay gran abundancia de epifitas (Kitching, 2000). Trabajos sobre el fitotelma de bromelias en zonas áridas no se han realizado, ya que estos lugares tienen menor disponibilidad de agua y por ello existe poca diversidad de plantas epifitas.

Dentro del territorio mexicano las zonas áridas ocupan cerca del 40% de la superficie, el matorral xerófito es el que está mejor representado (Rzedowski, 2006). La zona árida Queretano-Hidalgense es una región de la provincia florística del Desierto Chihuahuense, incluye localidades como el Valle del Mezquital en Hidalgo y la cuenca del río Extóraz en Querétaro (Hernandez & Gómez-Hinostrosa, 2005). Dentro de esta zona, el Cañón de las Adjuntas presenta una vegetación dominante de matorral xerofito con elementos de selva baja caducifolia (M. Martínez, comunicación personal, 2018), en esta localidad se distribuye *Tillandsia grandis*, una bromelia tanque que contrasta con la vegetación del lugar, por lo verde de sus hojas y la formación del fitotelma. Las especies del género *Tillandsia* se

caracterizan por habitar en zonas neotropicales, y pueden ser epífitas o saxícolas. En ambos casos, viven con poca agua y nutrientes, no hay presencia de suelo y el sustrato es discontinuo (Bennett, 1991). Las bromelias muestreadas en este trabajo habitan únicamente en acantilados. Lugares que son generalmente inaccesibles para las personas y pueden estar libres de disturbios. Estos lugares no albergan vegetación con alta productividad, la mayor parte de la vegetación es pequeña. Debido a estas características la atención de biólogos ha sido poca hacia el estudio de estos ecosistemas, además, se requiere de equipo especial para poder realizar colecta en estas áreas (Larson *et al.*, 2000).

Hay pocos estudios de metagenómica para describir la diversidad de organismos asociados a bromelias (Louca *et al.*, 2016; Rodriguez-Nuñez *et al.*, 2018; Simão *et al.*, 2017). La mayor parte de la descripción existente se ha realizado con características morfológicas, colectando y fijando muestras de agua para su identificación, principalmente de artrópodos y algunos protistas (Thomas *et al.*, 2012; Tres *et al.*, 2012). Las tecnologías de secuenciación de nueva generación nos permiten producir una gran cantidad de datos de secuencias a costos más bajos comparados con los métodos tradicionales. Implementar esta metodología nos permite describir las asociaciones planta-microorganismo. Ahora es posible caracterizar la microbiota asociada mediante la secuenciación de ADN ambiental, muy conveniente para identificar aquellos microorganismos que no pueden ser cultivados en laboratorio, además, es una técnica poco invasiva ya que sólo se requieren cantidades pequeñas de muestra (Knief, 2014).

II. ANTECEDENTES

2.1 La familia Bromeliaceae

La familia Bromeliaceae comprende 3590 especies que habitan en América tropical (Gouda *et al.* 2019) con solo una especie en el oeste de África (*Pitcairnia feliciana*). Son plantas monocotiledóneas de hojas arrosetadas, perennes, herbáceas y muchas de ellas conocidas por ser epífitas (Ramirez-Morillo *et al.*, 2004; Rzedowski, 2006). Habitan en diferentes tipos de vegetación, principalmente en los bosques mesófilos de montaña y bosques de *Quercus*. En México se tienen registradas 422 especies, entre los géneros más diversos y representativos se encuentran *Tillandsia*, *Hechtia* y *Pitcairnia*. Para los estados de Querétaro e Hidalgo se tienen 33 y 35 especies de bromelias respectivamente (Espejo-Serna & López-Ferrari, 2018). En esta familia se incluyen especies de importancia económica como el timbiriche (*Bromelia karatas*), la pita (*Aechmea magdalenae*), el heno (*Tillandsia usneoides*) o la piña (*Ananas sativus*), esta última siendo de alto valor económico para el estado de Veracruz. (CONABIO, 2011). Debido a su forma vegetativa que le permite existir sobre la copa de los árboles y sustratos rocosos y la belleza de la inflorescencia, las bromelias también destacan por su valor hortícola (Benzing, 2000).

La mayoría de estas plantas crecen en ambientes deficientes en nutrientes y minerales (Bernal *et al.*, 2006; Ramirez-Morillo *et al.*, 2004). Dos especializaciones presentes dentro de esta familia como la forma de roseta compacta y tricomas absorbentes, son características importantes para las plantas epífitas que les permiten soportar condiciones de aridez y esterilidad, manteniendo la humedad y permitiendo el depósito de sólidos ricos en nutrientes, creando el fitotelma en algunas especies (Benzing, 2000; Goffredi *et al.*, 2011). Las bromelias y plantas con preferencias similares de hábitats poseen mecanismos muy efectivos

para acumular minerales y utilizarlos con alta eficiencia. La presencia de estructuras capaces de retener humedad y detritus se ha registrado en diferentes familias de plantas, pero ninguna es tan efectiva al crear un sustituto de suelo o es tan importante para la supervivencia de la planta como el tanque de las bromelias (Benzing & Renfrow, 1974).

2.2 Ambientes acuáticos temporales

Los ambientes acuáticos temporales pueden ser encontrados ampliamente en todo el mundo, se definen como temporales ya que están sujetos a la temporada de sequías, algunos como el fitotelma de bromelias, están restringidos por factores climáticos. Las especies que habitan estos ecosistemas presentan adaptaciones para lidiar con la pérdida de agua como diapausa, formación de esporas, etc. Los insectos y crustáceos representan la fauna dominante, pero la comunidad completa está integrada por bacterias, protistas, hongos, plantas y algunos vertebrados. Estos microecosistemas pueden contribuir a nuestro entendimiento de la dinámica poblacional debido a su tamaño, son fáciles de manipular y pueden ser mimetizados para entender relaciones ecológicas (Williams, 2007).

Los cuerpos de agua temporales incrementan la biodiversidad en diferentes escalas; dentro del tanque hasta el ecosistema terrestre exterior. Al añadir el elemento agua, se puede tener biota adaptada a vivir en cuerpos de agua temporales, aumentando la diversidad de plantas y animales acuáticos facultativos (Calhoun *et al.*, 2017).

2.2.1 Fitotelma

La palabra fitotelma deriva del griego *phyton* planta y *telma* estanque. Son cuerpos de agua mantenidos por plantas terrestres. Estos ecosistemas se encuentran localizadas en bosques, desiertos, selvas o pantanos, pero están mejor representados en zonas tropicales. Son lénticos y efímeros (generalmente duran menos de tres meses), las comunidades de organismos asociados son constantemente reemplazadas y se han convertido en modelos para el estudio

de cadenas tróficas (Mogi, 2004). Una gran variedad de plantas son capaces de retener agua en sus estructuras externas, algunas familias como Poaceae, Pandanaceae, Arecaceae, Asparagaceae, Araceae, Musaceae, Cytinaceae, Nepenthaceae, Sarraceniaceae y Bromeliaceae presentan fitotelma. Se pueden diferenciar cinco tipos principales: bromelias tanque, plantas jarra, huecos en los árboles llenos de agua, entrenudos de bambús, y el agua colectada por hojas axilares, brácteas o pétalos, todos formados por alguna parte de la planta (Fig. 1) (Kitching, 2000; Williams, 2007).

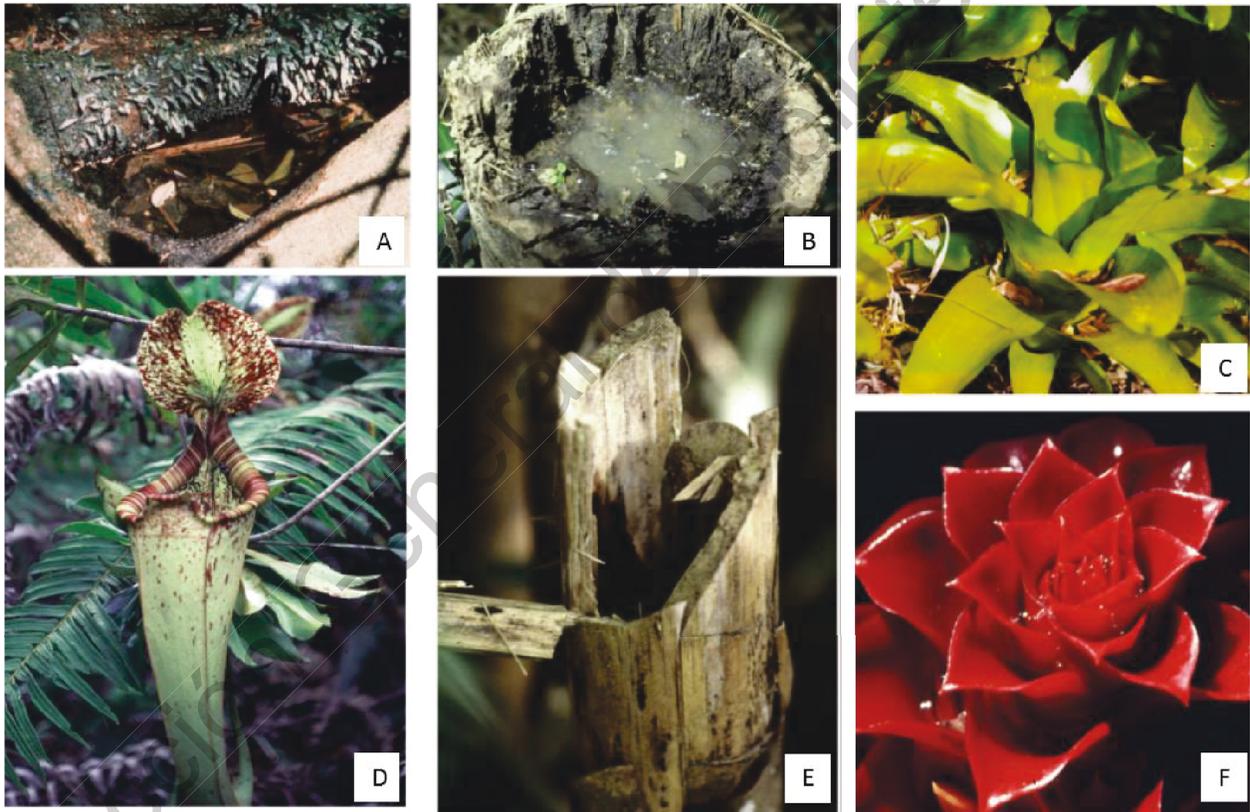


Figura 1. Ejemplos de los principales tipos de fitotelma: A) hueco de árbol lleno de agua; B) hueco de raíz lleno de agua en el tocón de una palma; C) bromelia con agua en las hojas axilares y tanque central; D) *Nepenthes rafflesiana*; E) entrenudo de bambú lleno de agua después de un corte en el tallo; F) brácteas de la inflorescencia de *Tapeinochilios ananassae*. Modificado de Kitching 2001.

2.3 *Tillandsia grandis* como bromelia tipo tanque

Las plantas epífitas y saxícolas son elementos importantes de muchos ecosistemas tropicales y resaltan por su abundancia. Su presencia en ecosistemas áridos y semiáridos también es común, a pesar de esto, el conocimiento acerca de estas plantas en estas zonas es escaso (Bernal *et al.*, 2006). Las especies del género *Tillandsia* son herbáceas, generalmente epífitas o saxícolas con hojas dispuestas en una roseta basal (Espejo-Serna *et al.*, 2010).

Tillandsia grandis Schltdl es una bromelia que logra alcanzar los 2.5 m de alto, de hábitos saxícolas, con una inflorescencia muy ramificada que está presente en los meses de marzo y abril. En la localidad de las Adjuntas en Hidalgo es conocida como tinaja, jarilla o soluche de agua, debido a su forma de tipo tanque que le permite almacenar agua en su interior. Esta especie prospera en los riscos y acantilados de los cañones de los principales ríos de la región noreste del Bajío. Debido a lo inaccesible que se encuentran sus poblaciones, no presenta problemas de conservación. Se encuentra en altitudes que van desde los 400 hasta los 1600 msnm. Se distribuye desde el Este de México (Gto., Qro., Hgo., Pue., Oax., Chis.) hasta Honduras, se considera endémica a Mega México II (Fig 2) (Espejo-Serna *et al.*, 2010; Rzedowski, 2006)

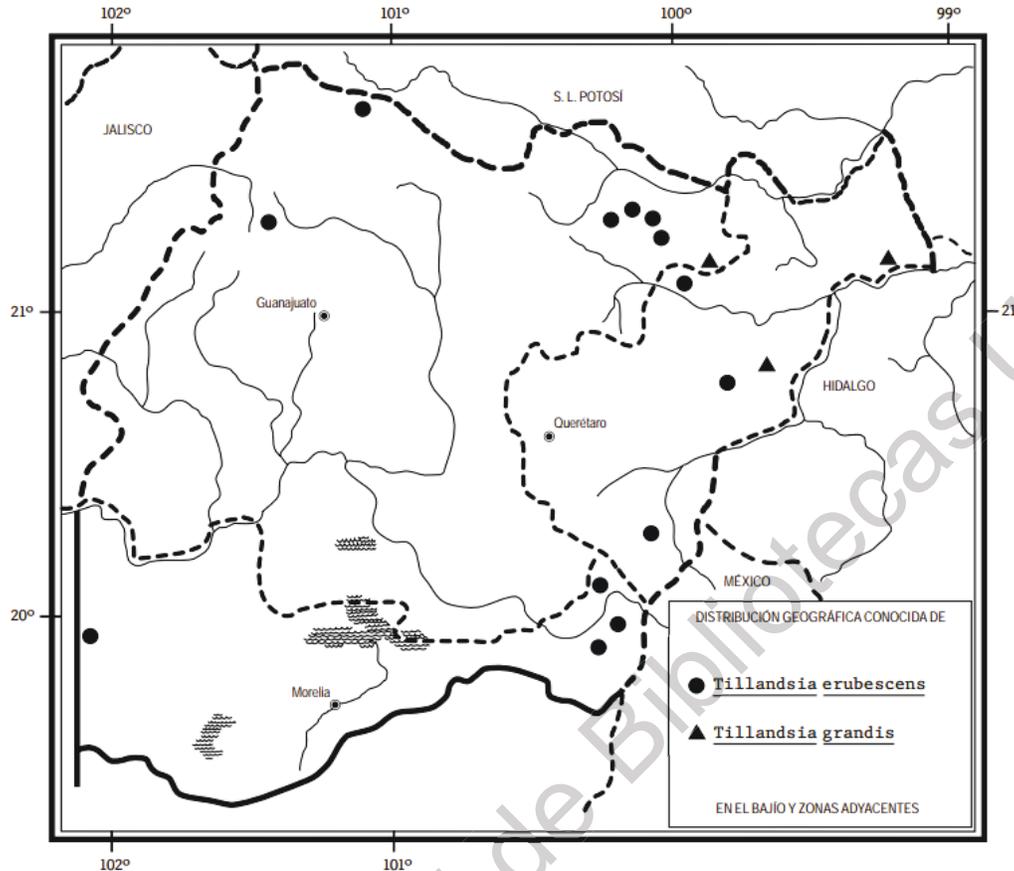


Figura 2. Distribución de *Tillandsia grandis* en la región del Bajío y zonas adyacentes. Tomado de Espejo-Serna *et al.*, 2010.

2.3.1 Diversidad de organismos asociados a bromelias tipo tanque

El grupo de las bromelias ha sido estudiado como plantas fitotelmáticas, los primeros trabajos relacionados al estudio del fitotelma en bromelias se realizaron por Picado (1911, 1913) quien los designó como ciénagas fragmentadas distribuidas a través de los bosques neotropicales, habitados por fauna abundante que requiere de refugio. Son considerados lugares de reproducción y recursos. La composición de la biota dependerá de la especie de planta, localización y circunstancias locales que afecten las condiciones del agua contenida (Benzing, 2000; Louca *et al.*, 2017, 2016; Males, 2016).

Las bromelias tanque forman cavidades herméticas, creando un pequeño estanque hacia su interior (Figura 3). Proveen de espacios vivos con la calidad necesaria para el desarrollo de diferentes organismos. Una bromelia tanque puede proveer alojamiento a biota acuática y terrestre (Benzing, 2000). El agua presente en los tanques forma un nicho único dentro del ecosistema, con condiciones anaeróbicas y de acidez completamente diferentes a las condiciones ambientales externas (Goffredi *et al.*, 2011).

Estos tanques representan un recurso de agua dulce y proveen hábitats para comunidades microbianas muy diversas (Goffredi *et al.*, 2011). Se tienen registros de musgos acuáticos, algas verdes, cianobacterias, diatomeas, protistas, hongos, insectos, anfibios, crustáceos, y diversos grupos de bacterias asociados a bromelias tanque (Figura 3, M) (Benzing, 2000; Brandt *et al.*, 2017; Kitching, 2001; Rodriguez-Núñez *et al.*, 2018).

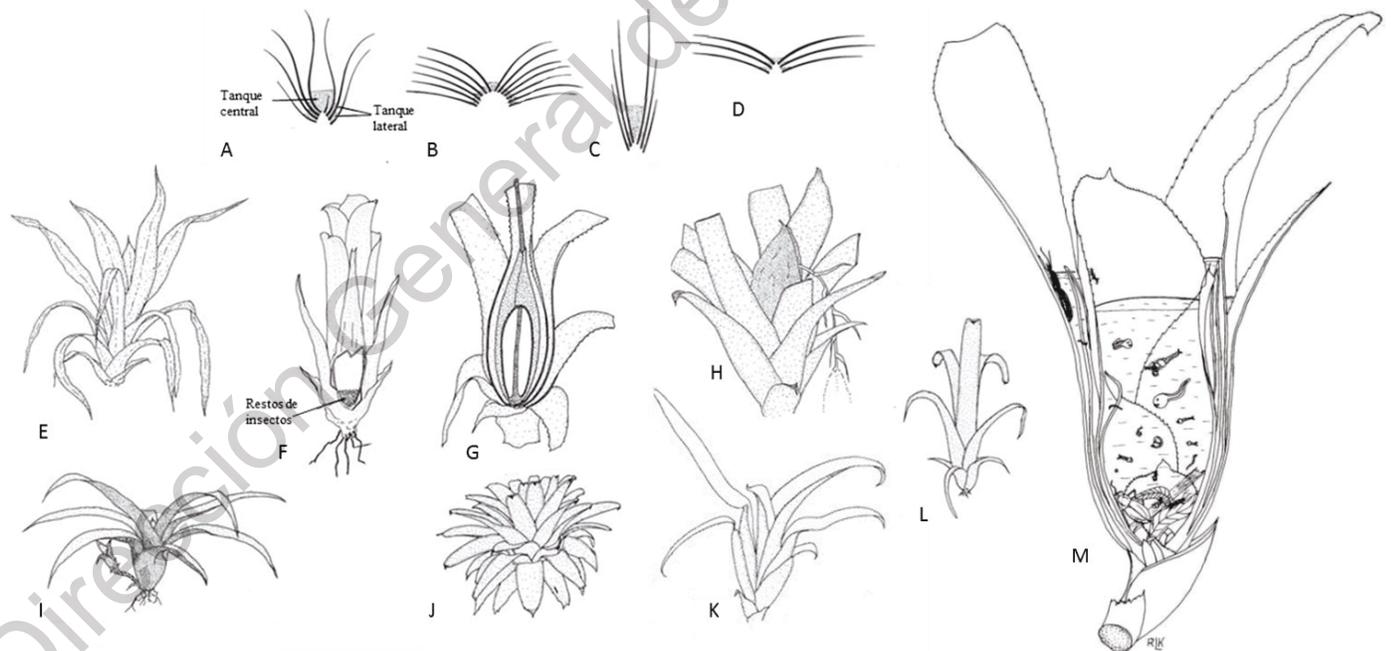


Figura 3 Formas del fitotelma en Bromeliaceae. (A D) Cuatro arreglos del follaje que producen fitotelma de diferentes tipos. (E L) Diferentes formas vegetativas de bromelias tanque. M) Esquema de la comunidad del tanque de bromelias. Modificado de Benzing y Kitching, 2000

2.3.2 Importancia de la diversidad de organismos asociados a bromelias taque y sus interacciones tróficas

Las especies formadoras de tanque acumulan grandes cantidades de elementos minerales esenciales en las bases de sus hojas, como detritus, siendo éste la principal fuente de nitrógeno que, además de ser fuente de nutrientes para la planta misma, permite el desarrollo de comunidades de microorganismos que lo habitan (Kitching, 2001). Las actividades enzimáticas relacionadas con la asimilación de nutrientes como el nitrógeno (nitrógeno reductasa) son mayores en las hojas internas del tanque que en las hojas más externas y raíces de las bromelias. La parte interna es donde se asimila la mayor cantidad de nutrientes a través de tricomas. Estas plantas están adaptadas para almacenarlos y metabolizarlos gradualmente en periodos de sequía. La presencia de organismos detritívoros y depredadores, está relacionada con la concentración de nitrógeno en las hojas, la presencia de depredadores incrementa el flujo de nutrientes provenientes de la descomposición de hojarasca hacia la bromelia (Benzing & Renfrow, 1974; Ngai & Srivastava, 2006; Nievola *et al.*, 2001; Takahashi & Mercier, 2011)

Gomes *et al.*, (2015) caracterizaron la actividad enzimática de la comunidad fúngica dentro del tanque de bromelias en Brasil. Mediante técnicas convencionales, con medios de cultivo lograron identificar únicamente 36 especies, 22 de Basidiomycota y 14 de Ascomycota. Detectaron que los géneros más relevantes fueron *Cryptococcus*, *Candida* y *Aureobasidium*. Estos organismos presentan enzimas como proteasas, amilasas, celulasas, xilanasas y pectinasas, enzimas necesarias para la degradación de materia vegetal. Al igual que los hongos, otros organismos presentes contribuyen a la red trófica dentro del fitotelma. Los insectos facilitan la ingesta de nutrientes para la planta.(Ngai & Srivastava, 2006). Un

ejemplo son las larvas de odonatos, las cuales ingieren microorganismos detritívoros y contribuyen a la cadena de nitrógeno dentro del tanque al defecar los restos, los cuales pueden ser utilizados por otros microbios o lixiviados directamente para liberar N en una forma disponible para la bromelia (Benzing & Renfrow, 1974)

A diferencia de muchos ambientes terrestres y comunidades acuáticas donde las plantas y algas fotosintéticas son el recurso principal, en el fitotelma el recurso principal es el detritus de hojarasca y restos de invertebrados. Dentro de las redes tróficas hipotéticas descritas para el fitotelma, las bacterias y los hongos son los principales micro-descomponedores que obtienen energía directamente del detritus. Protistas y rotíferos son micro-depredadores pero también consumen partículas orgánicas. Los macro invertebrados pueden alimentarse del detritus, ser filtradores, depredadores acuáticos y depredadores de superficie. (Mogi, 2004)

Se han realizado trabajos que intentan explicar las interacciones tróficas en el fitotelma, Mogi (2004) realizó un diagrama sobre la estructura básica de las cadenas alimenticias en este sistema, designando funciones ecológicas que deben de ser ocupadas por los diferentes organismos que lo habitan. Brouard (2012) en su trabajo sobre la función de la diversidad de los ecosistemas de bromelias tanque en el sotobosque generó diagramas que representaban la cadena trófica del detritus dentro del fitotelma. Ambos se observan en la figura 4.

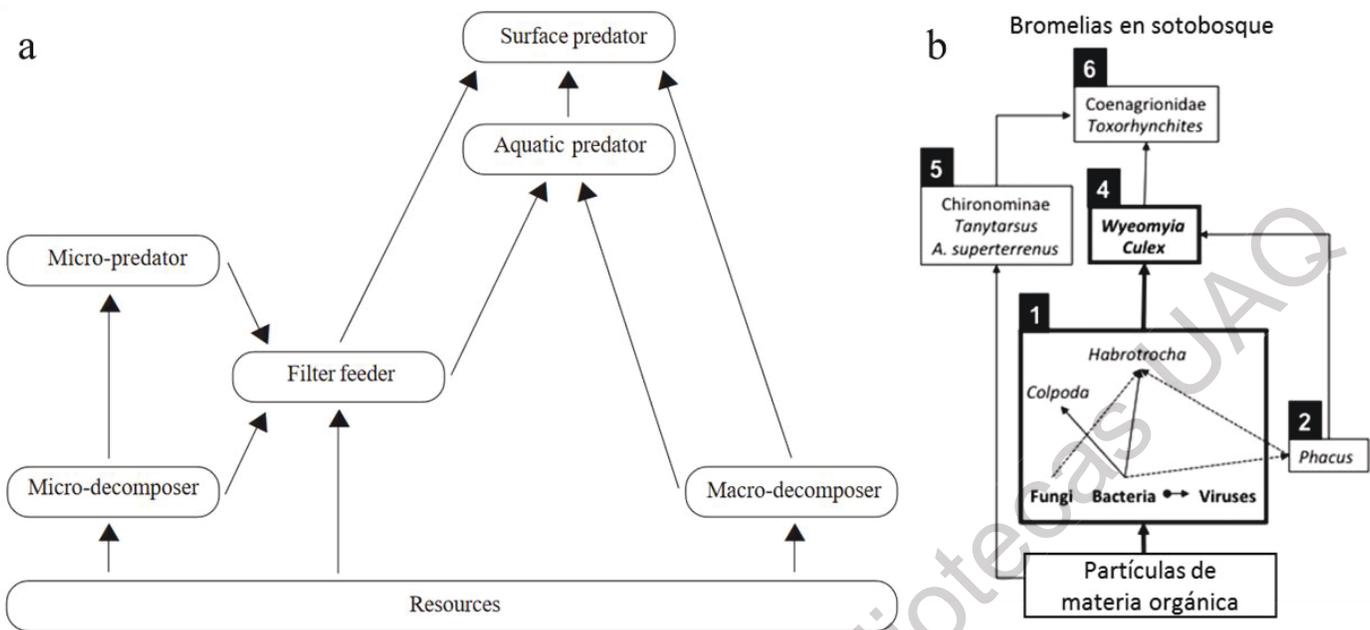


Figura 4 Representaciones esquemáticas de las relaciones tróficas en el fitotelma de bromelias tanque. a) Estructura básica de las cadenas alimenticias en el fitotelma. b) Representación de la cadena alimenticia del detritus (bromelias en sotobosque) los números indican los grupos funcionales. 1 = heterótrofos, 2 = mixotróficos, 3 = autótrofos, 4 = filtradores, 5 = Colectores, 6 = depredadores. Modificado de Mogi, 2004 y Brouard, 2011.

2.4 Zona árida Queretano-Hidalguense

Las zonas áridas y semiáridas ocupan aproximadamente 40% de la superficie del país, siendo el matorral xerófito el tipo de vegetación mejor representado en México (Rzedowski, 2006). Diversos estudios han señalado a la zona árida Queretano-Hidalguense como un área con alta diversidad y endemismos (Hernández-Magaña *et al.*, 2017; Hernandez & Barcenas, 1995; Rojas *et al.*, 2013).

La zona árida Queretano-Hidalguense es considerada una región submeridional de la provincia florística del Desierto Chihuahuense. Consiste principalmente en depresiones y valles áridos discontinuos rodeados por montañas, la Sierra Madre Oriental y Occidental representan los límites este-oeste respectivamente. Está geográfica y climáticamente separada del Desierto Chihuahuense, e incluye localidades bien conocidas como el Valle del

Mezquital, el Valle de Actopan en Hidalgo y la cuenca del río Extóraz en Querétaro. (Hernandez & Gómez-Hinostrosa, 2005). Esta región provee un punto de referencia ecológico para el estudio de diferentes *taxa*, particularmente aquellos cuyas distribuciones no se limitan al desierto, sino que se extienden hasta áreas del ecotono.

2.5 Metagenómica

La metagenómica es el análisis directo de genomas contenidos en una muestra ambiental (Thomas *et al.*, 2012). El uso de esta técnica ha permitido identificar microorganismos sin necesidad de su aislamiento en medios de cultivo (Rodríguez-Núñez *et al.*, 2018). Las muestras que pueden ser procesadas son agua (Cabral *et al.*, 2018; Jacob *et al.*, 2017), suelo (Gupta & Chikara, 2015), aire (Serrano-Silva & Calderón-Ezquerro, 2018), incluso alimentos (Sternes *et al.*, 2017). Esta técnica representa un avance importante en el campo de la biología y biotecnología, es poco invasiva y no requiere de grandes cantidades de muestra para lograr obtener buenos resultados, además de poder generar grandes números de secuencias a partir de muestras únicas.

Los análisis metagenómicos han sido utilizados para caracterizar comunidades microbianas especialmente de bacterias (Gupta & Chikara, 2015). El uso de esta técnica para tratar de identificar la diversidad total de los organismos dentro de una muestra es escaso, debido a la especificidad de los cebadores utilizados y la pregunta de investigación que se quiere responder, la mayoría buscan identificar la estructura funcional basados en genes que codifican para proteínas (Louca *et al.*, 2017, 2016), en lugar de diversidad biológica.

2.5.1. Aplicación de la metagenómica para caracterizar la biota asociada al fitotelma

Existe una gran cantidad de usos y formas en la que la metagenómica puede ser aplicada. Sin embargo la caracterización de diversidad microbiana en el fitotelma de bromelias tanque no ha sido explorada con esta técnica. Los trabajos existentes están enfocados en conocer la diversidad de grupos específicos como ciliados, vertebrados o bacterias (Brozio *et al.*, 2017; Louca *et al.*, 2017; Rodriguez-Nuñez *et al.*, 2018; Simão *et al.*, 2017). En otras plantas formadoras de fitotelma como las plantas de jarro se ha utilizado la metagenómica para conocer la diversidad de organismos tanto eucariotas como procariotas presentes en este micro hábitat pero un trabajo similar no se ha realizado para el fitotelma de bromelias (Grothjan & Young, 2019).

Trabajos realizados para determinar la función enzimática de los hongos presentes en el fitotelma de *Vriesea minarum* mediante técnicas dependientes de cultivo, resultó en la identificación de 36 especies (Gomes *et al.*, 2015) . Un numero bajo comparado, con el número de especies de bacterias logradas identificar con metagenómica por otros autores en tanques de bromelias del mismo género (*Vriesea platynema*) donde el número de especies es de 450 (Goffredi *et al.*, 2015) La identificación de especies por métodos convencionales resulta compleja, llegando a identificarse una cantidad muy baja de estos organismos, lo que lleva a subestimar la diversidad total contenida en el tanque.

Para caracterizar la biota asociada, se requiere identificar las regiones dentro de la secuencia que sean conservadas, que los cebadores sean de carácter universal, es decir que estén presentes en un amplio grupo de organismos (phyla, reino, dominio). Además de tener bases de datos disponibles para realizar la comparación de los resultados obtenidos como las del NCBI o GreenGenes (Thomas *et al.*, 2012).

III. HIPÓTESIS

Las características morfológicas de *Tillandsia grandis* le permiten almacenar agua en su interior creando un fitotelma. Estos cuerpos de agua temporales propician el desarrollo de diferentes comunidades de microorganismos. Se espera encontrar una alta diversidad de organismos asociados al tanque de *T. grandis*, además de encontrar la presencia de organismos acuáticos incapaces de desarrollarse en una zona árida.

Otros organismos asociados al fitotelma son las bacterias, su composición está relacionada con la presencia de materia orgánica. Se espera encontrar diferencias de la composición de la comunidad bacteriana entre bromelias con vegetación asociada y las aisladas en los acantilados.

IV. OBJETIVOS

Caracterizar la biota asociada al fitotelma de *Tillandsia grandis*, aportando información básica sobre la composición de organismos y estructura trófica del tanque.

Objetivos particulares

1. Determinar la diversidad total de organismos del tanque de *Tillandsia grandis*.
2. Comparar la composición bacteriana entre bromelias con vegetación asociada y aisladas.
3. Conocer las redes tróficas hipotéticas de la biota contenida en el fitotelma

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Colecta de muestra y procesamiento

Se colectó el agua del tanque de 10 individuos de *Tillandsia grandis* en la temporada de lluvias de 2018. En visitas previas, durante la temporada de estiaje, no se observó agua en el interior de las bromelias (figura 5). Se seleccionaron las plantas que tuvieran los siguientes criterios: (1) tamaño mayor a los 50 cm de diámetro suponiendo que habría mayor posibilidad de contener agua y (2) aquellas a las que el acceso fuera más sencillo.

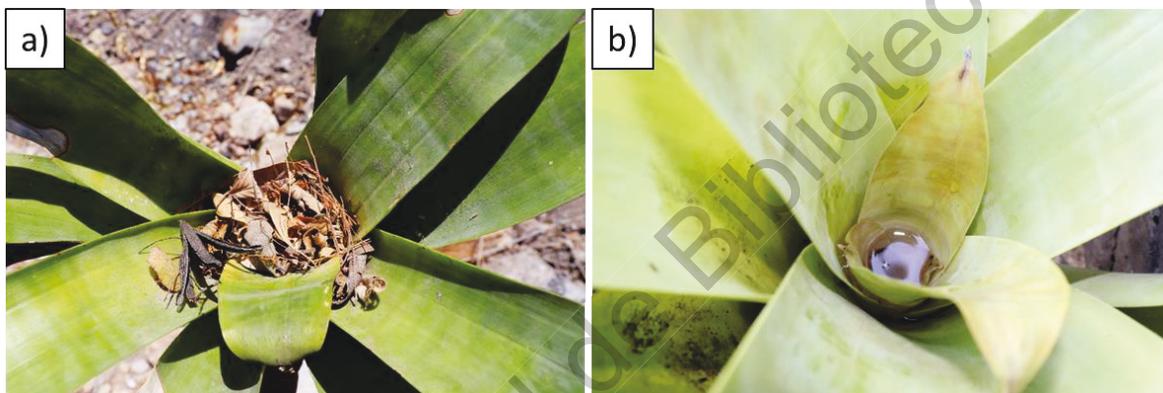


Figura 5 Contenido del interior del tanque a) Temporada de seca, se observa hojarasca y depósitos de materia vegetal y b) Temporada de lluvias, hay presencia de agua formando el fitotelma.

Se establecieron dos puntos de colecta dependiendo de la presencia de vegetación. Se muestrearon cinco individuos en acantilados con abundante vegetación circundante y cinco con vegetación escasa o nula (figura 6). Debido a la poca accesibilidad para colectar el agua de algunas bromelias, se realizaron técnicas de progresión vertical (ascensos y descensos) con equipo de escalada y rápel para alcanzar a los individuos aislados en las paredes.



Figura 6 Puntos de colecta seleccionados de acuerdo a la diferencia de la cobertura vegetal a) y b) presentan vegetación escasa o nula. c) y d) abundante vegetación circundante

Utilizando raspadores celulares Nest® se talló el interior del tanque de cada bromelia, agitando vigorosamente para lograr una mezcla homogénea. Con pipetas serológicas estériles de 10 ml se colectaron entre 50 y 100 ml del líquido del fitotelma. Se depositaron en tubos cónicos de 50 ml Falcon®. Las muestras se transportaron en hielo seco al laboratorio donde fueron almacenadas a -79°C hasta su procesamiento. Para prevenir la contaminación de las muestras, todo el material utilizado era estéril y se utilizaron guantes y cubre bocas diferentes al realizar la colecta de cada muestra.

5.2. Extracción de ADN

Las muestras de las bromelias del acantilado con vegetación se mezclaron. Se filtraron 200 ml del líquido utilizando una membrana de $0.22\ \mu\text{m}$ de nitrocelulosa Millipore® para cada 100 ml. Las membranas se congelaron y maceraron en nitrógeno líquido, el polvo resultante se colocó en tres tubos de 1.5 ml para realizar la extracción de ADN. Se utilizó el kit QIAamp

DNA extraction® utilizando dos métodos diferentes, el de extracción de sangre y de extracción de tejido (cuadro 1). La cantidad y calidad del ADN se evaluaron por espectrofotometría en NanoDrop®. Se aplicaron las mismas condiciones para las muestras de bromelias sin vegetación.

Cuadro 1 Relación de las muestras obtenidas de la extracción de ADN

Membrana	Tubo	Método	Tipo	Concentración (ng/μl)	Pureza (A260/A280)
1	1	S	SV	22.6	1.53
	2	S	SV	25.6	1.51
	3	S	SV	16.7	1.55
2	4	T	SV	30.1	1.42
	5	T	SV	36.9	1.43
	6	T	SV	47.6	1.42
3	7	T	CV	31.3	1.72
	8	T	CV	19.4	1.81
	9	T	CV	34.1	1.69
4	10	S	CV	24.5	1.59
	11	S	CV	31.8	1.48
	12	S	CV	26.8	1.59

S= Sangre, T= Tejido, SV= Sin vegetación, CV= Con vegetación

5.3. Eucariotas

5.3.1. Amplificación del ADN

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se amplificaron regiones conservadas en eucariotas del espaciador transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés) para lograr determinar *phyla* con cebadores universales descritos por White *et al.* 1990 (Cuadro 2)

Cuadro 2 Cebadores usados en el proceso de amplificación del material genético

Categoría	Nombre	Secuencia	longitud (pb)	Especificidad
18S (forward)	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	Universal
5.8S (reverse)	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	20	Universal

La PCR se cargó en un volumen final de 25 μ l, de los cuales 14 μ l fueron de H₂O, 0.5 μ l de dNTP's, 0.5 μ l de cada cebador, 1 μ l de DMSO, 1 μ l de BSA, 1.25 μ l de MgCl₂, 3 μ l de Buffer, 0.25 μ l de Taq Platinum y 3 μ l de ADN. Las condiciones del termociclador se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3 Programa de amplificación de PCR para ADN de eucariontes

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 min
30 ciclos	Desnaturalización	95°C
	Hibridación	52°C
	Extensión	72°C
Extensión Final	72°C	5 min

Se corrieron geles de agarosa al 1.2% y se utilizó el equipo Bioanalyzer High Sensitivity DNA assay para observar la presencia y conocer el tamaño de los productos de PCR. A partir del tamaño de estos fragmentos se pudo determinar el tamaño de Chip y protocolo adecuado para la secuenciación (Figura 7).

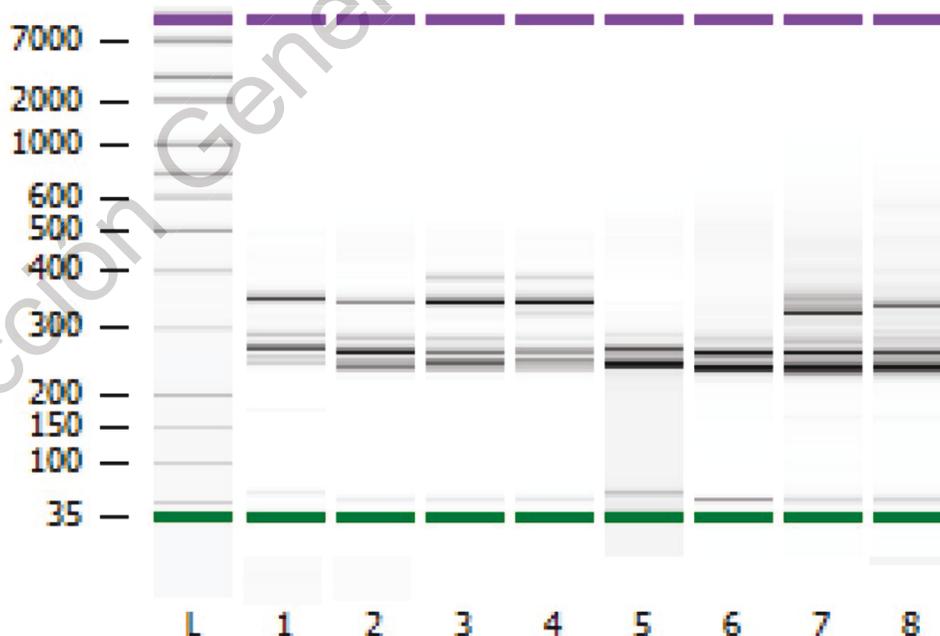


Figura 7 Tamaño calculado de los amplicones obtenido en el Bioanalyzer. Las muestras están enumeradas del 1 al 8. L= Marcador de pesos moleculares.

5.3.2. Secuenciación

Una vez obtenidos los amplicones se siguió el protocolo de metagenómica para el equipo Ion Torrent PGM que consiste en tres pasos: construcción de librerías, preparación del templado y secuenciación. Para construir las librerías se siguió el protocolo del Ion Plus Fragment library kit. Se determinó el tamaño de los fragmentos en el Agilent 2100 Bioanalyzer utilizando el kit High Sensitivity DNA (Agilent). Las librerías se cuantificaron mediante PCR en tiempo real con el fin de obtener un factor de dilución equimolar. El templado se preparó mediante una PCR en emulsión en el sistema Ion One Touch 2 System (Life Technologies) y se cuantificó por fluorometría en Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Por último, el templado se cargó en el chip PGM 318™ utilizando el kit de secuenciación fragmentos de 400 pares de bases siguiendo el protocolo para la plataforma Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing.

5.3.3. Asignación de categoría taxonómica

Se evaluó la calidad de las secuencias con el programa FASTQC. Se filtraron de acuerdo al valor de calidad Phred>20 (valor de medición del error en los pares de bases generados por la secuenciación >20 es aceptable, empleando el 99% de validez contra 1% de error) conservando el 85% de estas con el comando `fastq_quality_filter` del programa FASTXTOOLS. En la plataforma CLC Workbench v. 11.01 (QIAGEN Bioinformatics, Aarhus, Denmark) se seleccionaron las secuencias mayores a 100 pares de bases. En el módulo de Microbial Genomics con la aplicación Metagenómica, se hizo un análisis con base en amplicones para agrupar las secuencias en Unidades Taxonómicas Operativas (OTU's por sus siglas en inglés) empleando el 99% de similitud entre ellas. Se eliminaron las lecturas únicas y las quimeras, posteriormente se buscó la identidad de las secuencias mediante BLAST en la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

Debido a que el resultado del BLAST solo provee de identificación a nivel de género y especie, se utilizó el programa MEGAN Community Edition V. 6.17.0 para asignar jerárquicamente a las lecturas en los clados correspondientes de Reino, Filo, Clase, Orden, Familia y Género. Para esto se cargó el resultado del BLAST utilizando el algoritmo de asignación del ancestro en común más basal LCA por sus siglas en inglés (Lowest Common Ancestor). Este enfoque se basa en la taxonomía del NCBI y muestra el resultado como un árbol filogenético, permitiendo observar la diversidad de grupos taxonómicos de manera sencilla (Huson *et al.*, 2016). Para corroborar la asignación taxonómica se utilizó la propuesta de clasificación de Plant Systematics para plantas y de Tree of Life para los demás organismos eucariotas.

Las OTU's identificadas a nivel de género se utilizaron para definir la diversidad alfa entre los diferentes grupos de eucariotas. La diversidad alfa indica cuantos géneros únicos existen dentro de la muestra. Para determinar el porcentaje de géneros relacionados a cada Reino y *Phylum* se realizaron gráficas dinámicas utilizando KronaTools. Esta herramienta permite explorar datos ordenados jerárquicamente haciendo acercamientos dentro de una gráfica de pastel con capas múltiples (Ondov *et al.*, 2011).

5.4 Bacterias

5.4.1 Amplificación del ADN

Los amplicones de siete regiones hipervariables de la región 16S se obtuvieron mediante PCR siguiendo el protocolo en el 16S Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific). Debido a la corta distancia entre las regiones es necesario amplificar las regiones en dos partes. La primera incluye las regiones V2, V4 y V8. La segunda amplifica a V3, V6-7 y V9. Los volúmenes utilizados en las PCR fueron de 30 μ l, de los cuales 15 μ l fueron Environmental

Master Mix, 3 µl del cebador, 10 µl de H₂O y 2 µl de ADN. Las condiciones de amplificación se muestran en el cuadro 4. Los amplicones se purificaron con perlas Agencourt® AMPure® XP.

Cuadro 4 Programa de amplificación de PCR de ADN de bacterias

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 min
Desnaturalización	95°C	30 s
25 ciclos Hibridación	58°C	30 s
Extensión	72°C	20 s
Extensión Final	72°C	7 min

5.4.2 Secuenciación

La secuenciación se ejecutó con las mismas condiciones que para eucariontes descritas en el apartado 5.3.2.

5.4.3 Asignación de categoría taxonómica

La asignación taxonómica se llevó a cabo dentro de la plataforma de Ion Reporter™. Se diseñó un flujo de trabajo para analizar los resultados de la secuenciación, utilizando la aplicación de metagenómica para grupos múltiples y teniendo como referencia la base de datos de Greengenes v13.5. Se identificaron los cebadores utilizados en la amplificación y se definió el mínimo de longitud de las secuencias en 100 pb. El porcentaje de cobertura de cada secuencia para ser asignado a nivel de familia, género y especie se mantuvo con valores predeterminados.

5.4.4 Análisis de la composición de la diversidad bacteriana

Se realizaron gráficas dinámicas utilizando KronaTools para ordenar jerárquicamente a las familias de bacterias por cada sitio. También se elaboró una gráfica de la diversidad alfa de comunidad bacteriana presente en el fitotelma. Con la finalidad de conocer si la deposición de materia vegetal influye sobre la composición de la comunidad bacteriana, se compararon

ambos sitios de colecta. Se elaboraron tablas de presencia y ausencia de los diferentes órdenes taxonómicos. Con el paquete estadístico R v3.6.1 se comparó la diversidad de ambos sitios mediante el índice de Sørensen y se elaboró un diagrama de Venn para representar los diferentes grupos compartidos y excluyentes.

5.5 Red trófica

Para construir la red trófica hipotética dentro del tanque de *T. grandis* se determinó la función ecológica de cada género de eucariotas encontrados. Se designaron cinco categorías: descomponedores, depredadores acuáticos, depredadores de superficie, fotosintéticos y detritus. Los organismos descomponedores están conformados por hongos saprobios y degradadores de materia vegetal. Los depredadores se dividieron en acuáticos y de superficie. Acuáticos son aquellos organismos que se encuentran en la columna de agua del tanque y que se alimentan principalmente de algas y bacterias. En cambio, los de superficie, son organismos que no se desplazan por toda la columna de agua, sino que están restringidos a la parte más externa del tanque y que se alimentan de protistas, bacterias y algas. Los organismos fotosintéticos son aquellos que requieren de la luz del sol y sirven como alimento de los depredadores. Por último, los organismos dentro de la categoría detritus, son plantas que conforman la hojarasca y materia vegetal en descomposición, sirviendo como recurso principal de la red trófica.

5.6 Determinación de la Flora de la localidad

Con el fin de conocer la flora presente en el Cañón de las Adjuntas, se realizó un inventario florístico para identificar la vegetación asociada a los acantilados y determinar los géneros de plantas dentro del cañón. Estas representan la principal fuente de recursos dentro del tanque. Las plantas se colectaron, depositaron y determinaron en el herbario QMEX.

VI. RESULTADOS

6.1 Cantidad de lecturas obtenidas

Todas las plantas muestreadas presentaron agua en el interior del tanque. El volumen de líquido extraído varió entre 50 y 150 ml. Para eucariotas solo se secuenció el ADN de los individuos del sitio con vegetación asociada, para bacterias se secuenciaron ambos sitios. Se obtuvieron un total de 8, 687,834 lecturas de las cuales 3, 276,538 corresponden a eucariotas y 5, 411,296 a bacterias. Después del filtrado por calidad y tamaño, el número total de lecturas está representado en el cuadro 5, así como el número total de Unidades Taxonómicas Operativas (OTU's por sus siglas en inglés) identificadas para cada dominio.

Cuadro 5 Relación de las lecturas y cantidad de OTU's totales por dominio

Filtrados	Eucariotas	Bacterias
Phred >20	1,284,998	1,499,606
>100 pares de bases	1,203,712	N/A
OTU's	23,948	208,306

6.2 Diversidad de eucariotas

La comunidad de eucariotas dentro del tanque de *Tillandsia grandis* está conformada por 452 géneros que corresponden a 24 *phyla* diferentes. La composición del tanque está dominada por el reino Fungi el cual es el mejor representado con el 79% de los géneros identificados pertenecientes a los *phyla* Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Mucoromycota y Zoopagomycota. El 21% restante está representado por los *phyla* Apicomplexa, Ciliophora, Dinoflagellata, Apusozoa, Myxomycota, Cercozoa, Hyphochytriomycota, Ochrophyta, Metamonada, Heterolobosea, Arthropoda,

Platyhelminthes, Bacillariophyta, Oomycota, Bryophyta, Chlorophyta, Charophyta y Tracheophyta. El porcentaje correspondiente a cada *phyla* se muestra en la figura 8.

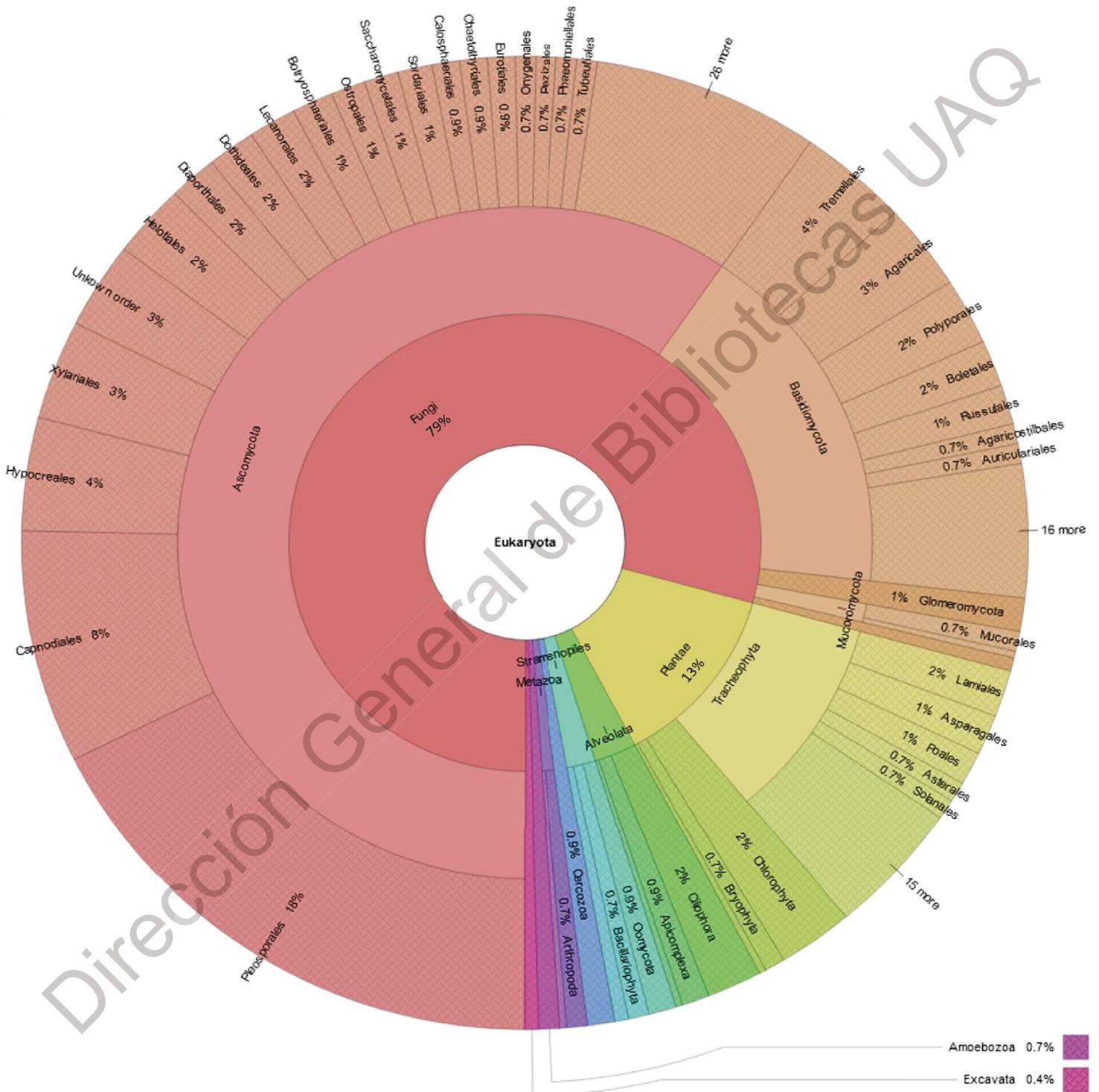


Figura 8 Composición de eucariotas del tanque de *Tillandsia grandis*. Se muestra el porcentaje de géneros para cada *phyla*. Las secuencias analizadas muestran que el mayor porcentaje de los organismos habitantes del tanque pertenecen al reino Fungi.

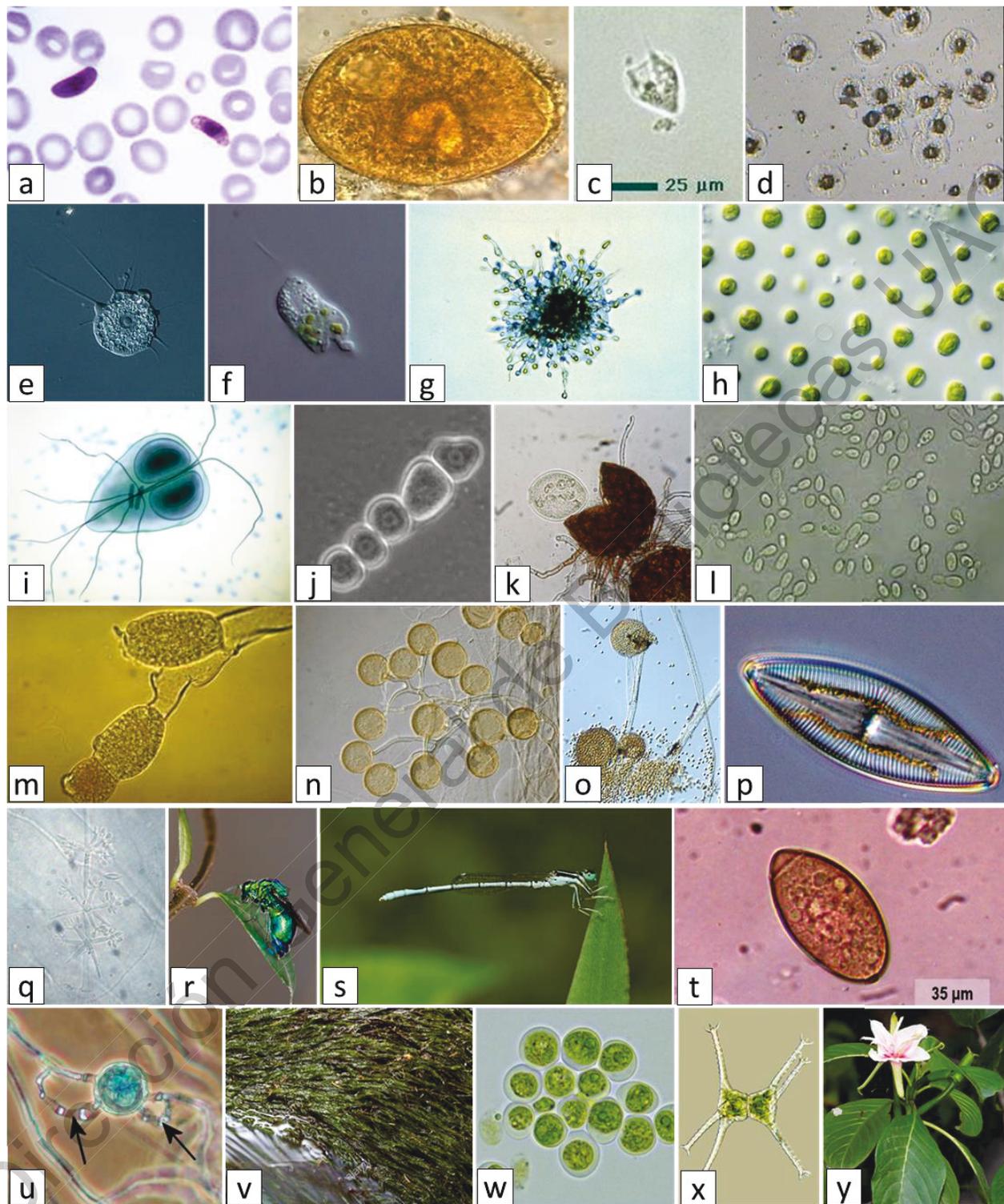


Figura 9. Géneros representativos para cada *phylum* de eucariotas. a) Apicomplexa: *Plasmodium*, b) Ciliophora: *Neobalantidium*, c) Dinoflagellata: *Colponema*, d) Apusozoa: *Breviatea*, e) Myxomycota: *Entomophthoraceae*, f) Cercozoa: *Paracercomonas*, g) Hyphochytriomycota: *Hyphochytrium*, h) Chrophyta: *Nannochloropsis*, i) Metamonada: *Giardia*, j) Heterolobosea: *Tetramitus*, k) Ascomycota: *Podosphaera*, l) Basidiomycota: *Hannaella*, m) Chytridiomycota, n) Glomeromycota: *Glomus*, o) Mucoromycota: *Mucor*, p) Bacillariophyta: *Navicula*, q) Zoopagomycota: *Ramicaldelaber*, r) Arthropoda: *Stilbum*, s) Arthropoda: *Agriocnemis*, t) Platyhelminthes: *Spirometra*, u) Oomycota: *Pythium*, v) Bryophyta: *Fontinalis*, w) Chlorophyta: *Chlorococcum*, x) Charophyta: *Staurastrum*, y) Tracheophyta: *Hauya*. Imágenes tomadas de Tree of Life Web Project, 2019.

La acumulación de materia vegetal representa una gran cantidad de volumen dentro del tanque (figura 5a), impidiendo el paso de la luz hacia el interior, a pesar de esto, se encontraron 16 géneros de organismos fotosintéticos de los *phyla* Chlorophyta, Charophyta, Ochrophyta y Bacillariophyta, los cuales junto con los *phyla* Ciliophora, Dinoflagellata, Metamonada, Cercozoa y Heterolobosea son considerados protistas, un grupo artificial que no pertenece a ningún sistema de clasificación actual, para este grupo se identificaron 31 géneros, de diferentes reinos.

Dentro de los géneros de protistas encontrados cuatro resaltan por ser de importancia médica en humanos; *Plasmodium* (Apicomplexa) causante del paludismo, *Giardia* (Metamonada) causante de giardiasis, *Neobalantidium* (Ciliophora) causa balantidiosis y *Spirometra* (Plathelmyntes) causante de esparganosis. Se identificaron tres géneros de la división Bryophyta, uno de ellos, *Fontinalis* corresponde a musgos acuáticos. Dentro de los géneros de Arthropoda dos corresponden a odonatos *Agriocnemis* e *Ischnura* y uno a un himenoptero, *Stilbum* (Figura 9).

Para el *phylum* Tracheophyta se lograron identificar 43 géneros, los cuales se observan en el cuadro 6. Debido su posición en las laderas del cañón, los individuos de *T. grandis* están expuestos a la caída de hojarasca, misma que queda atrapada en el interior del tanque (figura 6c y d). Esta hojarasca comprende a las plantas vasculares, siendo el segundo grupo mejor representado con el 9.5% de los géneros identificados. El listado completo de géneros identificados se observa en el Anexo 1

Cuadro 6 Flora asociada a los acantilados del Cañón de las Adjuntas. Los géneros del detritus fueron identificados mediante extracción de ADN. La flora del inventario florístico se realizó mediante colecta de ejemplares e identificación en el herbario.

Detritus		Inventario Florístico	
Familia	Género	Familia	Género
Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	Amaryllidaceae	<i>Zephyranthes</i>
Annonaceae	<i>Annona</i>	Apocynaceae	<i>Asclepias</i>
Arecaceae	<i>Chamaeropsis</i>		<i>Vallesia</i>
Asparagaceae	<i>Agave</i>	Asparagaceae	<i>Dasyllirion</i>
	<i>Furcraea</i>		<i>Yucca</i>
Asteraceae	<i>Calyptocarpus</i>	Asteraceae	<i>Cirsium</i>
	<i>Fleischmannia</i>	Boraginaceae	<i>Cordia</i>
Bignoniaceae	<i>Pithecoctenium</i>	Bromeliaceae	<i>Hechtia</i>
	<i>Spathodea</i>		<i>Tillandsia</i>
	<i>Stereospermum</i>	Burseraceae	<i>Bursera</i>
Cannabaceae	<i>Trema</i>	Cactaceae	<i>Coryphantha</i>
Cucurbitaceae	<i>Cucumis</i>		<i>Cylindropuntia</i>
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea</i>		<i>Echinocactus</i>
Euphorbiaceae	<i>Acalypha</i>		<i>Mammillaria</i>
Fabaceae	<i>Calliandra</i>		<i>Opuntia</i>
	<i>Medicago</i>		<i>Stenocereus</i>
Iridaceae	<i>Cardiostigma</i>		<i>Strombocactus</i>
	<i>Gelasine</i>	Cannabaceae	<i>Celtis</i>
	<i>Rigidella</i>	Capparaceae	<i>Capparis</i>
Lamiaceae	<i>Leonurus</i>	Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i>
	<i>Tectona</i>	Crassulaceae	<i>Echeveria</i>
Malvaceae	<i>Reevesia</i>	Euphorbiaceae	<i>Acalypha</i>
Menyanthaceae	<i>Nymphoides</i>		<i>Cnidocolus</i>
Musaceae	<i>Musa</i>		<i>Jatropha</i>
Oleaceae	<i>Fraxinus</i>	Fabaceae	<i>Acacia</i>
Onagraceae	<i>Hauya</i>		<i>Bauhinia</i>
Passifloraceae	<i>Passiflora</i>		<i>Mimosa</i>
Paulowniaceae	<i>Paulownia</i>		<i>Pithecellobium</i>
Persicariaceae	<i>Persicaria</i>		<i>Prosopis</i>
Platanaceae	<i>Platanus</i>	Fouquieriaceae	<i>Fouquieria</i>
Poaceae	<i>Arundinaria</i>	Gentianaceae	<i>Eustoma</i>
	<i>Cenchrus</i>	Lythraceae	<i>Heimia</i>
	<i>Cynodon</i>	Malpighiaceae	<i>Mascagnia</i>
	<i>Eragrostis</i>	Onagraceae	<i>Hauya</i>
Polygonaceae	<i>Polygonum</i>	Platanaceae	<i>Platanus</i>
Rutaceae	<i>Citrus</i>	Primulaceae	<i>Samolus</i>
Sapindaceae	<i>Urvillea</i>	Rhamnaceae	<i>Karwinskia</i>
Selaginellaceae	<i>Selaginella</i>	Salicaceae	<i>Neopringlea</i>
Solanaceae	<i>Physalis</i>	Sapindaceae	<i>Sapindus</i>
	<i>Solanum</i>		<i>Serjania</i>
	<i>Withania</i>	Selaginellaceae	<i>Selaginella</i>
Urticaceae	<i>Urera</i>	Solanaceae	<i>Nicotiana</i>
Vitaceae	<i>Tetragium</i>		<i>Physalis</i>
		Zygophyllaceae	<i>Morkillia</i>
Total	30	43	27
			44

6.3 Diversidad de bacterias

Al analizar los datos combinados de las bromelias con vegetación y sin vegetación para el dominio Bacteria, se encontraron 23 *phyla*, 52 clases, 98 órdenes y 218 familias y 297 géneros. Tres *phyla* comprenden el mayor porcentaje de la comunidad bacteriana, Proteobacteria representa el 37%, Actinobacteria 19% y Firmicutes el 15%. El 29% restante lo contienen los *phyla* Acidobacteria, Aquificae, Armatimonadetes, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Ignavibacteriae, Lentisphaerae, Nitrospinae, Nitrospirae, Planctomycetes, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes y Verrucomicrobia. El porcentaje correspondiente a cada *phyla* se muestra en la figura 10.

6.3.1 Diferencias en la composición de bacterias de bromelias en laderas con vegetación y sin vegetación.

Dados los puntos de colecta establecidos, se lograron identificar para el sitio con vegetación 19 *phyla*, 41 clases, 83 órdenes y 179 familias. Para el sitio sin vegetación, 20 *phyla*, 44 clases, 87 órdenes, y 188 familias. La diversidad de cada sitio se puede observar en las figuras 11 y 12. Al comparar tomando en cuenta los diferentes órdenes con el índice de Sørensen, se tiene 84.7% de similitud entre los sitios.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Figura 12 Relación de la composición bacteriana del tanque de *Tillandsia grandis* ubicadas en los acantilados sin vegetación. Se identificaron 20 phyla, 44 clases, 87 órdenes, y 188 familias

De los 98 órdenes encontrados en la diversidad total del fitotelma de *Tillandsia grandis* 72 son compartidos por ambos sitios. Para el sitio donde *T. grandis* se encuentra aislada se encontraron 87, mientras que el sitio que presenta cobertura vegetal contiene 83 órdenes. Los órdenes no compartidos se muestran en la figura 13. Los órdenes con mayor número de familias para ambos sitios se muestran en la figura 14.



Figura 13 Diagrama de Venn donde se muestran los órdenes únicos dentro de cada sitio y los compartidos.

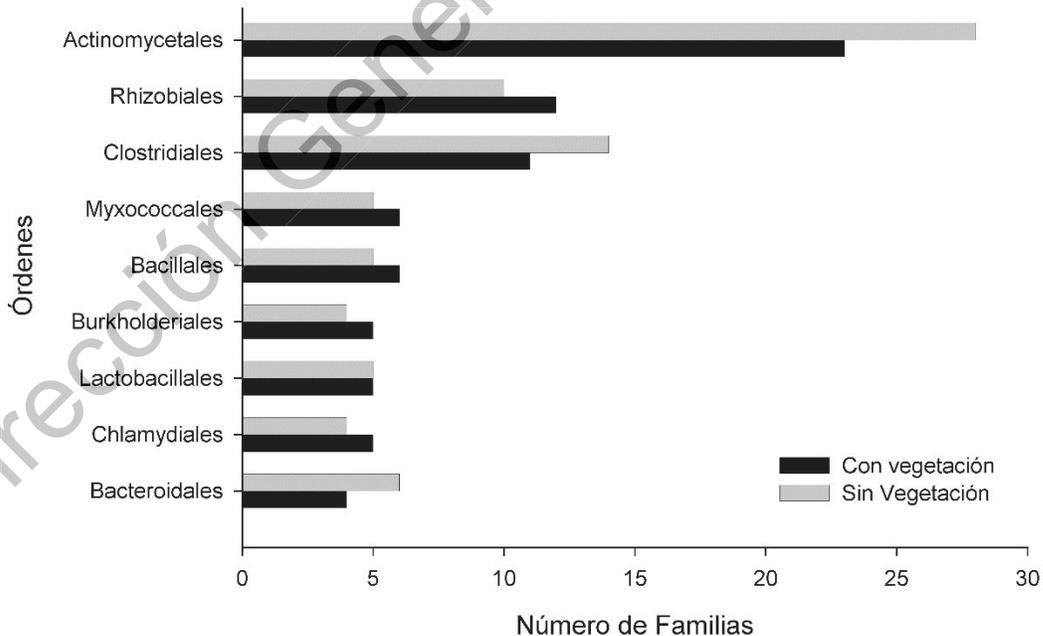


Figura 14. Órdenes presentes en ambos sitios con el mayor número de familias registradas. Se muestran 10 de los 98 presentes en la diversidad total de bacterias del tanque de *Tillandsia grandis*.

6.4 Estructura trófica del tanque de *Tillandsia grandis*

En la figura 15 se puede observar el porcentaje de géneros para cada función ecológica de eucariotas. El 78% de los organismos encontrados son descomponedores, y cerca del 8% cumplen con alguna función de depredación, el grupo de los organismos fotosintéticos es el que está menormente representado con el 3.7%, el porcentaje restante corresponde a géneros de plantas vasculares que forman el detritus.

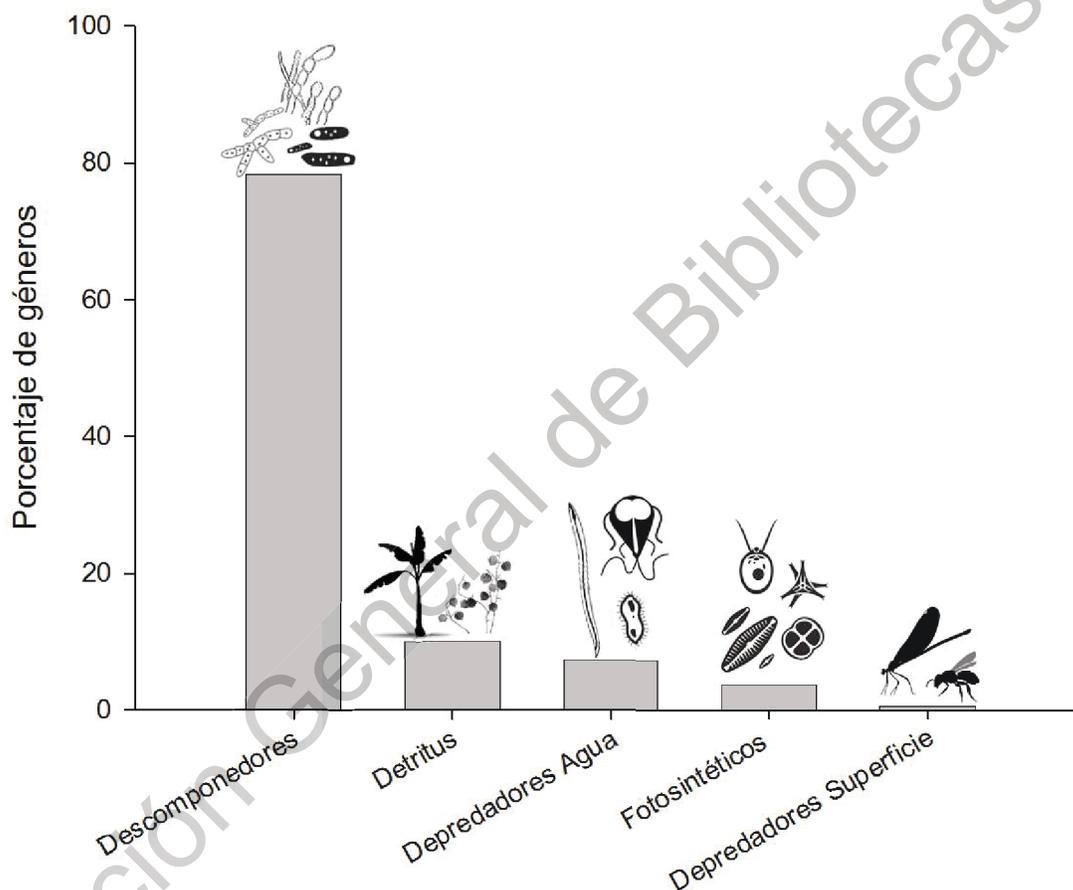


Figura 15 Porcentaje de géneros asociados a alguna función ecológica dentro del tanque de *Tillandsia grandis*. El mayor porcentaje de estos organismos corresponde al grupo de los Descomponedores, seguido del detritus de materia vegetal en el fondo del tanque.

Como se observa en la figura 15, el mayor porcentaje de los organismos eucariotas presentes en el tanque *T. grandis* cumplen con la función de descomposición. Al identificar la función ecológica de cada género, se realizó una red trófica hipotética dentro del fitotelma (figura 16). Esta red está integrada por todos los *phyla* eucariotas y los tres *phyla* que comprenden el mayor porcentaje de bacterias.

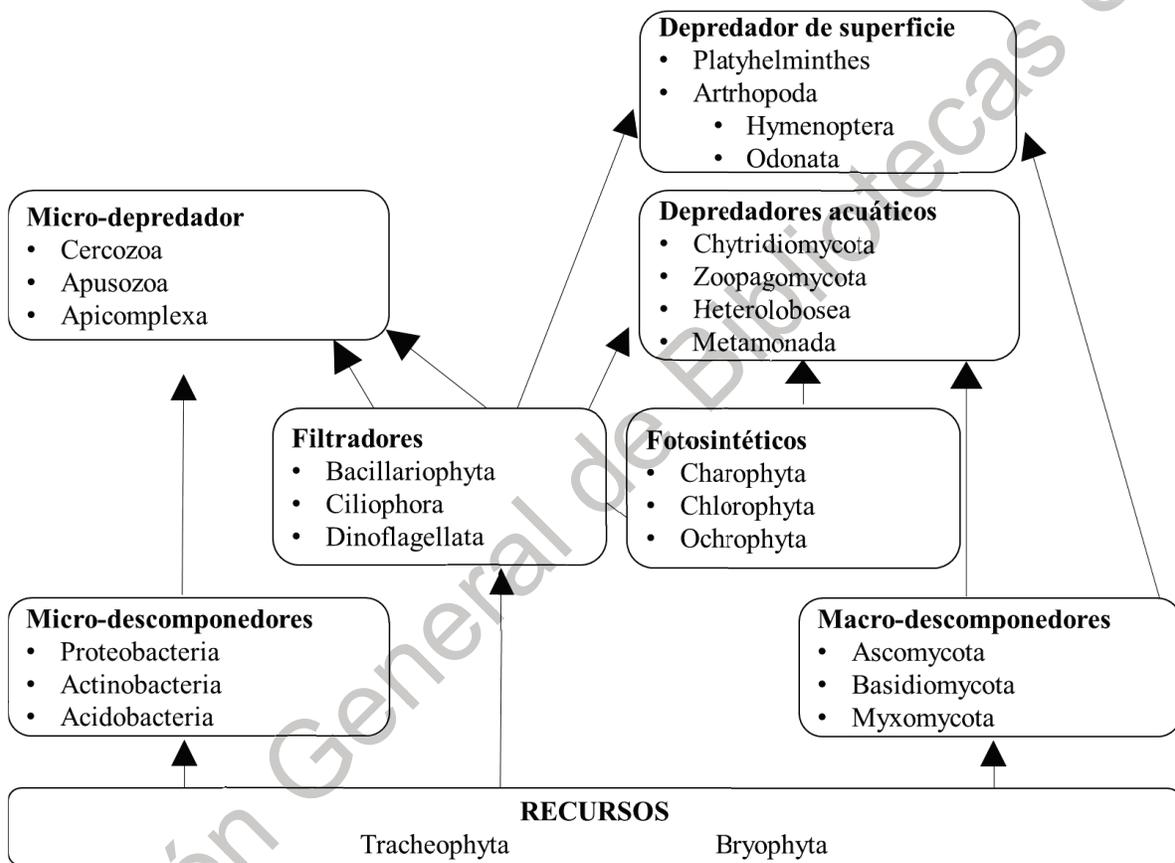


Figura 16 Red trófica hipotética para el fitotelma de *Tillandsia grandis*. La dirección de las flechas indica el flujo de energía de un nivel a otro. Son los recursos la fuente principal de nutrientes y los depredadores de superficie los depredadores tope del ecosistema.

En la red trófica de *Tillandsia grandis* la categoría de recursos está conformada por los *phyla* Tracheophyta y Bryophyta representando la materia vegetal en descomposición, la cual es utilizada por los micro-descomponedores, macro-descomponedores y organismos filtradores.

Los *phyla* de Cercozoa, Apusozoa y Apicomplexa son considerados micro-depredadores al ser consumidores de algunos organismos fotosintéticos, filtradores y micro-descomponedores. Los organismos filtradores (Bacillariophyta, Ciliophora y Dinoflagellata) degradan la materia vegetal y estos a su vez son consumidos por los depredadores acuáticos y de superficie. Los depredadores acuáticos conformados por algunos hongos (Chytridiomycota y Zoopagomycota) y excavados (Heterolobosea y Metamonada) pueden utilizar a los organismos filtradores, fotosintéticos y macro-descomponedores como recurso. Los artrópodos y platelmintos están en la categoría superior de la red, pero estos pasaran a formar parte de los recursos del tanque, siendo sus esqueletos o heces depositados en el fitotelma los que contribuyan al ciclado de nutrientes en este microecosistema.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Relación de lecturas generadas

La cantidad de lecturas obtenidas en este trabajo concuerda con estudios similares de metagenómica donde después de filtrar por calidad y tamaño se conserva menos del 30% de los datos (Mysara *et al.*, 2017; Rute *et al.*, 2016). Esto sucede ya que durante las técnicas de amplificación del ADN los cebadores pueden unirse entre sí, formando secuencias que no corresponden a un organismo y porque se eliminaron las quimeras y lecturas únicas. Para eucariotas se seleccionaron secuencias cuya longitud fuera mayor a 100 pares de bases debido al tamaño de los cebadores que miden de 39 pb y al tamaño de las ampliaciones que iban desde 100 hasta 400 pb.

El número de Unidades Taxonómicas Operativas es mucho mayor que la cantidad de géneros y familias identificados, esto es porque muchas veces más de una OTU corresponde al mismo género, o a diferentes especies, variedades, etc. (Mysara *et al.*, 2017).

7.2 Composición de la comunidad eucariota de *Tillandsia grandis*

La abundancia de hongos en el tanque de *T. grandis* está ligada a su función dentro de las redes tróficas, ya que los hongos son el grupo de organismos más importante en la degradación, descomposición y reciclado de nutrientes a partir de materia vegetal en suelos de bosques, ecosistemas acuáticos e incluso en el fitotelma (Costa & Gusmão, 2015; Grossart *et al.*, 2019; Grothjan & Young, 2019).

Los hongos llevan a cabo múltiples funciones dentro de la red de interacciones en ambientes acuáticos, propiciando relaciones antagonistas y simbióticas con los miembros de la comunidad acuática. Pueden ser depredadores/parásitos o presas de protistas heterótrofos. Algunos pueden utilizar materia orgánica como polen o carcasas de zooplancton

(Zoopagomycota, Chytridiomycota). El papel de estos organismos en la descomposición de materia vegetal lo cual mejora la calidad del detritus para los detritívoros, degradando mediante acciones enzimáticas polisacáridos vegetales en monosacáridos que son fácilmente digeridos por los microorganismos (Krauss *et al.*, 2011). Trabajos que detallen las interacciones de hongos y protistas sobre la transformación de materia vegetal son escasos. Se desconocen las relaciones simbióticas y son difíciles de estudiar debido a la escala microscópica en que ocurren (Grossart *et al.*, 2019).

Dentro del tanque de *T. grandis* se encontraron los mismos géneros que Gomes *et al.*, (2015) describen con actividades enzimáticas específicas para la degradación de materia vegetal (*Cryptococcus*, *Candida* y *Aureobasidium*), sugiriendo que las reacciones de degradación por estos organismos son frecuentes en el fitotelma de bromelias. Comparado con este trabajo, dentro del fitotelma de *T. grandis* mediante metagenómica, se logró identificar 10 veces más géneros de hongos asociados al tanque.

En total se identificaron 31 géneros de protistas. La presencia de nutrición mixotrófica en algunos grupos de estos organismos les permite obtener energía de manera fotótrofa y heterótrofa dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentren (Jones, 2000). La comunidad de protistas dependerá de la relación de las fuentes de energía disponibles. En ambientes acuáticos donde hay mayor disponibilidad de luz y pocas cantidades de carbono orgánico disuelto (COD), existe una mejor representación de organismos fotosintéticos. Sin embargo cuando la disponibilidad de luz es limitante y la cantidad de COD es mayor, se favorece el desarrollo de organismos heterótrofos (Jones, 2000); dichas condiciones se presentan en el tanque de *T. grandis*.

El desarrollo de protistas fotosintéticos se ve poco favorecido, ya que aunado a la falta de luz, el incremento de la comunidad bacteriana provoca la competencia entre estos dos grupos por algunos elementos orgánicos como el fósforo (Brouard *et al.*, 2012). La luz facilita el crecimiento de algas afectando la composición de la comunidad microbiana, el tanque de *T. grandis* al estar cubierto de materia vegetal, no permite el paso de luz, creando una ventaja para el crecimiento de hongos y otros organismos descomponedores (Grossart *et al.*, 2019a; Kitching, 2000). Los organismos heterótrofos complementan su nutrición con la ingesta de bacterias presentes en el tanque las cuales brindan nutrientes necesarios para permitir su crecimiento en el fitotelma (Jones, 2000).

La composición de la comunidad eucariota identificada a través de ADN ambiental comparada con estudios descriptivos en el fitotelma, no corresponde con los resultados obtenidos. Mediante ADN ambiental se ha registrado la presencia de anfibios (Brozio *et al.*, 2017) y ciliados (Simão *et al.*, 2017). Mediante observación directa y colecta de muestras se han identificado diferentes grupos de invertebrados como dípteros, odonatos, oligoquetos, ostrácodos, coleópteros, copépodos, pseudoescorpiones, escorpiones, isópodos, lepidópteros, hemípteros, homópteros, ortópteros y arácnidos (Marino, Srivastava, & Farjalla, 2013; Tres *et al.*, 2012). Para los trabajos de ADN ambiental donde identificaron anfibios y ciliados, utilizaron cebadores específicos para esos *taxa* en particular, además de que ambos trabajos fueron realizados en zonas con mayor humedad y disponibilidad de agua. A pesar de no haber encontrado tantos grupos de artrópodos como se podría esperar en un estudio de muestreo manual, se lograron identificar 2 géneros de libélulas y uno de avispas.

Según el trabajo de Brouard *et al.*, 2012 en un bosque lluvioso en la Guayana Francesa, la poca disponibilidad de luz afecta la composición de la comunidad biótica de las bromelias

tanque. Según sus resultados, las bromelias expuestas a la luz de sol directamente en las copas de los árboles, contenían una mayor incidencia de algas, rotíferos y artrópodos que aquellas bromelias con cobertura vegetal en el sotobosque que limitaba el paso de la luz. Estos autores detectan un incremento en organismos mixotróficos y hongos dentro de las bromelias en sitios con sombra. Dado el lugar donde se realizó este trabajo comparado con la zona árida donde se encuentra *T. grandis* es de esperarse una menor concentración de organismos, debido a la cantidad de agua disponible. En el Cañón de las Adjuntas la precipitación anual es de 391 mm por año, el fitotelma existe únicamente durante el periodo de lluvias de mayo a junio (INAFED, 2012). En la Guayana Francesa la precipitación anual es de 3000 mm y las lluvias son más comunes con 280 días de lluvia, condiciones que permiten una mayor duración del fitotelma (Brouard *et al.*, 2012).

A pesar de la aridez característica de la zona, haber encontrado secuencias asociadas a *Plasmodium*, que es un parásito causante de enfermedades en humanos y cuyo vector principal son los mosquitos del género *Aedes*, indica que en algún momento de la duración del fitotelma de *T. grandis* el mosquito tiene contacto con el agua, completando así el ciclo de vida del parásito (Williams, 2007).

En cuanto a la presencia de metazoarios, solo se encontraron tres géneros de invertebrados y ningún vertebrado fue identificado en las secuencias obtenidas. Mogi (2004) atribuye la falta de vertebrados como una característica de las comunidades fitotelmáticas, a excepción de renacuajos en algunas bromelias de bosques lluviosos.

La poca representatividad de otros grupos de organismos podría deberse, además de las condiciones limitantes de la zona, a que los cebadores ITS se desarrollaron para identificar hongos (White *et al.*, 1990). Otra desventaja es que las bases de datos de ADN han ido incrementando con secuencias sin que se genere información morfológica o funcional asociadas a ellas, por lo que la secuencia obtenida no está ligada al organismo que pertenece (Grossart *et al.*, 2019). De las 23948 OTU's agrupadas, 762 no fueron identificadas, lo cual indica que no se sabe a qué organismo pertenecen o que tal vez esa secuencia aún no ha sido identificada en las bases de datos del NCBI. El uso del código de barras y la secuenciación de organismos es nuevo, se requiere de más estudios que lleven a cabo técnicas de identificación molecular y curaciones de bases de datos para tener certeza cuando se utilicen métodos como la metagenómica para caracterizar la biota de un lugar.

7.3 Composición de la comunidad de bacterias de *Tillandsia grandis*

La composición bacteriana dentro del fitotelma está dominada por los *phyla* Proteobacteria y Actinobacteria, estos resultados son similares a estudios de metagenómica en el fitotelma de plantas carnívoras de jarro y bromelias tanque, donde dichos grupos son los que están mejor representados y los *phyla* de Firmicutes y Bacteroidetes son comunes (Giongo *et al.*, 2019; Grothjan & Young, 2019; Rodriguez-Nuñez *et al.*, 2018). De las 218 familias identificadas, solo 106 tuvieron algún género asociado, las familias restantes no presentan una clasificación inferior, debido a la magnitud del grupo de bacterias y a la poca información genética existente para ellas.

El trabajo realizado por Louca *et al.*, (2016), caracteriza la funcionalidad de la comunidad bacteriana dentro del fitotelma de bromelias tanque y encuentran que la principal función de las bacterias es la degradación de compuestos orgánicos complejos a partir de la materia

orgánica capturada dentro de la bromelia. La mayor parte de los organismos que se encuentran dentro del *phylum* Actinobacteria son saprófitos importantes que participan activamente en el proceso de descomposición, siendo capaces de degradar un amplio espectro de restos de plantas y animales (Zhang *et al.*, 2017). Este grupo también se caracteriza por crecer en ambientes hostiles o contaminados y pueden ser aisladas de ambientes terrestres y acuáticos (Rosenberg *et al.*, 2014).

En estudios realizados para caracterizar la biota de suelos, los *phyla* con mayor abundancia son Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes, lo cual coincide con los resultados encontrados en el tanque de *T. grandis*. El grupo de las Proteobacterias ha sido reconocido como el grupo dominante en la composición de la comunidad microbiana de suelos y del fitotelma de bromelias. Dichos resultados indican que, dentro del tanque de *T. grandis*, se lleva a cabo un proceso de reciclado de nutrientes que sirve como recurso para la biota asociada y la planta misma (Zhang *et al.*, 2017).

7.4 Diferencias en la comunidad bacteriana de *Tillandsia grandis* en acantilados con vegetación asociada y sin vegetación

La composición bacteriana no muestra una diferencia significativa entre sitios. Según el índice de Sørensen existe un 84% de similitud entre ambas laderas. El 16% de lo que no es compartido por los sitios corresponde a órdenes únicos contenidos en cada fitotelma. En la comunidad bacteriana del fitotelma en laderas con vegetación se observan ordenes como: Thermales, representado por la familia Thermaceae, bacterias que resisten altas temperaturas y condiciones de pH ácido (Da Costa *et al.*, 2006) ; Deinococcales representados por el género *Deinococcus*, bacterias resistentes a altos niveles de radiación (Cox & Battista, 2005); Nitrosomonadales, presentes en ambientes acuáticos con una gran cantidad de materia orgánica encargadas de llevar a cabo procesos de nitrificación (Ye *et al.*, 2011);

Mycoplasmatales, comprende bacterias que pueden ser patógenas para animales incluyendo al humano, que son capaces de fermentar glucosa e hidrolizar compuestos nitrogenados además de crecer en lugares anaeróbicos (Razin, 2006); Desulfurobacteriales, son organismos anaeróbicos, quimilitótrofos, que utilizan hidrógeno y nitratos como su principal fuente de energía en ambientes con pH ácido (Gupta & Lali, 2013).

Los órdenes presentes únicamente en el fitotelma de bromelias sin vegetación destacan: Chlorobiales, microorganismos que solo existen en ambientes acuáticos con luz y sedimentos, su papel es la transformación de compuestos de carbono y azufre (Bacter, 2006); Saprospirales, bacterias acuáticas que crecen en ambientes con disponibilidad de luz y están frecuentemente asociadas a cianobacterias y algas (Reichenbach, 2006); Erysipelotrichales, son quimioorganótrofos con metabolismo aeróbico y fermentadores facultativos (Stackebrandt *et al.*, 2006); Methylophiliales, bacterias que crecen en ambientes con poco carbono orgánico disuelto, utilizando CO₂ como fuente principal de energía (Lidstrom, 2006); Fusobacteriales, presentes en ambientes con poca disponibilidad de oxígeno, utilizan carbohidratos como principal fuente de energía (Ingar, 2014); Brocadiales, microorganismos quimilitótrofos realizando la oxidación del amonio (NH₄⁺) y nitritos (NO₂) para formar gas nitrógeno (N₂) de forma muy eficaz en el ciclo del nitrógeno (Noha & Elshahed, 2014); Nautiliales, quimioautótrofos que tienen la habilidad crecer anaeróbicamente utilizando H₂ como fuente de energía participando activamente en el ciclo del hidrógeno y nitrógeno (Nakagawa & Takai, 2014); Armatimonadales y Chthonomonadales constituyen ordenes de bacterias presentes en sedimento y cuerpos de agua dulce, se encuentran con mayor abundancia en áreas dominadas por bacterias o eucariotas fotosintéticos, por lo que se les

adjudica un papel de recolectores de los productos desechados por estos organismos (Lee *et al.*, 2014).

Los órdenes no compartidos entre las muestras con y sin vegetación, dan un panorama sobre las condiciones fisicoquímicas del fitotelma en cada sitio. Por un lado aquellas bromelias expuestas en las paredes del cañón exhiben órdenes asociados a organismos fotosintéticos, poca disponibilidad de carbono y oxígeno, y que pueden ser autótrofos utilizando compuestos nitrogenados inorgánicos así como compuestos de azufre depositados por los sedimentos de las laderas. La comunidad bacteriana del fitotelma de bromelias con cobertura vegetal presenta órdenes cuyo hábitat debe tener un pH ácido y contener altos niveles de nutrientes como compuestos de carbono y nitrógeno orgánico.

En la figura 13 se observan los órdenes con mayor número de familias para cada sitio, siendo los Actinomycetales y Rhizobiales los que tienen la mayor cantidad de familias. Estos dos órdenes actúan como degradadores de materia vegetal e incluso presentan géneros que tienen relaciones simbióticas con plantas (*Sreptomycetes*, *Rhizobium*, etc), lo cual justifica su presencia en el fitotelma de *Tillandsia grandis*, ayudando como degradadores y simbioses de la planta, fomentando su crecimiento, así como el mantenimiento del ecosistema formado en el interior de la bromelia.

7.5 Estructura trófica del tanque de *Tillandsia grandis*

En las bromelias tanque, el detritus es la principal fuente de nutrientes para la red trófica. Los depredadores acuáticos procesan la hojarasca produciendo partículas pequeñas de materia orgánica, incluyendo desechos de los mismos organismos. Estas partículas son almacenadas en el fitotelma donde serán procesadas por los invertebrados y protistas filtradores. Los organismos muertos, heces y hojarasca que quedan en la base del tanque son utilizados por

bacterias y otros microorganismos como los hongos, para asimilar nutrientes (Brouard *et al.*, 2012). En la figura 4 se observan redes tróficas descritas para bromelias. A partir de los datos obtenidos en este trabajo de la biota asociada a *Tillandsia grandis* se propone una red trófica más completa, utilizando los grupos taxonómicos al nivel de *phyla* divididos en ocho categorías. Al comparar los diagramas de Mogi (2004) y Brouard *et al.* (2011) con el diagrama resultante para *T. grandis* hay, al menos 2 categorías más dentro de las funciones ecológicas, y un mayor número de organismos para cada una. Brouard *et al.* reconocen como recursos a la materia orgánica, sin embargo no mencionan que organismos son los que aportan dicha materia. En los esquemas tróficos la categoría de depredadores de superficie está integrada por insectos, Brouard *et al.* incluyen a la familia de odonatos Coenagrionidae, misma familia a la que pertenecen los 2 géneros de libélulas identificados en *T. grandis* (*Ischnura* y *Agriocnemis*), para la categoría de filtradores en ambas las redes de Brouard *et al.* (2011) y la propuesta para *T. grandis* se identificaron grupos de ciliados. Para los microorganismos heterotróficos descomponedores los autores no identificaron a nivel de familia o género, se limitan en denominarlos bacterias y hongos. En *Tillandsia grandis* los microorganismos descomponedores corresponden a bacterias de los *phyla* Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, y hongos de los *phyla* Ascomycota, Basidiomycota y Myxomycota.

VIII. CONCLUSIONES

La composición de la biota del fitotelma de *Tillandsia grandis* está representada por 452 géneros de eucariotas y 218 familias de bacterias. Los eucariotas están constituidos principalmente por hongos, para los cuales se identificaron 359 géneros, mientras que hay 44 géneros de plantas vasculares, 31 protistas, 13 algas verdes y 4 metazoarios. En cuanto a la función ecológica dentro del tanque, la mayor parte de los organismos son descomponedores (79%), seguido por organismos con alguna función de depredación (8%), y solo una pequeña porción es fotosintético (3.7%). Para el dominio Bacteria, tres *phyla* comprenden el 71% de las familias de bacterias identificadas: Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes. A pesar de haber utilizado cebadores de siete regiones hipervariables, solo 106 familias de las 218 están asociados a géneros, las restantes solo están identificadas a familia.

La diversidad encontrada dentro del fitotelma de *Tillandsia grandis* superó nuestras expectativas, tener 452 géneros de eucariotas y 297 de bacterias contenidos en un cuerpo de agua tan pequeño habla sobre la plasticidad que presentan los organismos habitantes del tanque, al estar adaptados a condiciones de sequías prolongadas y poder desarrollarse durante la corta temporalidad del fitotelma.

Dentro de la zona de estudio, las características físicas de dos poblaciones de *T. grandis* son contrastantes, la presencia de vegetación asociada. Por un lado, una ladera exhibe una mayor exposición y nula vegetación circundante, por lo que aquí se esperaba encontrar una mejor representación de organismos fotosintéticos. Cuando la exposición a la luz del sol no se ve afectada por la cobertura vegetal, se observa la presencia de bacterias asociadas a eucariotas fotosintéticos, e incluso grupos de bacterias autótrofas que obtienen sus nutrientes a partir de sedimentos o elementos depositados por el aire hacia el interior del tanque. Cuando la

vegetación circundante cubre a la bromelia, los microorganismos encontrados se caracterizan por desarrollarse en lugares con altas concentraciones de materia orgánica, obteniendo energía a partir de su degradación. Con estas características, el fitotelma de *T. grandis* está conformado principalmente por hongos y bacterias con enzimas especializadas en la degradación de material vegetal.

Dadas las diferencias en los órdenes únicos de bacterias para cada sitio, se puede suponer que, cuando el fitotelma está descubierto, la biota en su mayoría será autótrofa, llegando a utilizar la deposición de sedimentos de la ladera (quimio autótrofos) y la luz solar (fotótrofos) para realizar sus funciones metabólicas.

Es más sencillo conocer la diversidad de organismos dentro del tanque de *Tillandsia grandis* que comprender las asociaciones entre los organismos que lo habitan. Esta red hipotética formada a partir de los datos obtenidos es una representación de las interacciones que se llevan a cabo dentro del tanque por sus habitantes. Todos los organismos procariotas llevan a cabo funciones de descomposición de materia orgánica, siendo los eucariotas los que llevan a cabo funciones diferentes en las redes tróficas del fitotelma. La cantidad de materia orgánica observada *in situ* durante la temporada de estiaje comprende al segundo grupo mejor representado, las plantas vasculares. Esta materia vegetal es la principal fuente de recursos para toda la comunidad biótica del fitotelma.

A pesar de que los cebadores ITS utilizados para amplificar el ADN ambiental no son empleados con frecuencia en otros grupos taxonómicos además de los hongos, al identificar todas las OTU's, se encontraron géneros pertenecientes a ocho grandes grupos taxonómicos: Alveolata, Amoebozoa, Excavata, Fungi, Metazoa, Plantae, Rhizaria y Stramenopiles. Solo el 3.2% de OTU's no fue identificado, pero conforme los trabajos de identificación y

descripciones moleculares incrementen, es posible que más adelante se puedan asociar estas secuencias a algún organismo.

Para emplear la metagenómica, se debe de tener buena calidad y cantidad de ADN, es una técnica poco invasiva para la planta, pero no para los microorganismos que habitan el fitotelma, ya que estos serán filtrados, congelados y macerados con el fin de obtener la mayor cantidad de ADN posible. Las principales limitantes, son (1) que no existen técnicas estándar para realizar metagenómica para toda la biota eucariota, se requiere de la evaluación de otro tipo de cebadores para poder hacer comparaciones y detectar cual es la mejor manera de llevarla a cabo, (2) las bases de datos de referencia son actualizadas continuamente, y a pesar de que hoy en día las descripciones de especies incluyen secuencias de ADN, no hay los mismos tipos de secuencia para todos los organismos. La mayor parte de estas secuencias están asociadas a genes codificantes para proteínas que varían poco en diferentes niveles taxonómicos. Comparado con estudios de observación directa y colecta de material, con esta técnica se puede conocer aquellos seres vivos que no pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio, además de ser más rápida en cuanto a la identificación del material mediante bases de datos que por medio del uso de claves taxonómicas. No se requieren conocimientos avanzados en taxonomía, únicamente bases en bioinformática para poder trabajar con las bases de datos y la limpieza de las secuencias obtenidas.

IX. REFERENCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bacter, O. (2006). The Family Chlorobiaceae. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes* 359–378. Springer, New York, NY.
- Benzing, D. H., & Renfrow, A. (1974). The mineral nutrition of Bromeliaceae. *Botanical Gazette*, 135(4), 281–288.
- Benzing, D. H. (2000). *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press.
- Bernal, R., Valverde, T., & Hernández-Rosas, L. (2006). Habitat preference of the epiphyte *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae) in a semi-desert environment in Central Mexico. *Canadian Journal of Botany*, 83(10), 1238–1247. <https://doi.org/10.1139/b05-076>
- Brandt, F. B., Martinson, G. O., & Conrad, R. (2017). Bromeliad tanks are unique habitats for microbial communities involved in methane turnover. *Plant and Soil*, 410(1–2), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2988-9>
- Brouard, O., Céréghino, R., Corbara, B., Leroy, C., Pelozuelo, L., Dejean, A., & Carrias, J. F. (2012). Understorey environments influence functional diversity in tank-bromeliad ecosystems. *Freshwater Biology*, 57(4), 815–823. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02749.x>
- Brozio, S., Manson, C., Gourevitch, E., Burns, T. J., Greener, M. S., Downie, J. R., & Hoskisson, P. A. (2017). Development and application of an eDNA method to detect the critically endangered Trinidad golden tree frog (*Phytotriades auratus*) in bromeliad phytotelmata. *PLoS ONE*, 12(2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170619>
- Cabral, B. C. A., Hoffmann, L., Budowle, B., Ürményi, T. P., Moura-Neto, R. S., Azevedo, S. M. F. O., & Silva, R. (2018). Planktonic microbial profiling in water samples from a Brazilian Amazonian reservoir. *Microbiology Open*, 7(2), 1–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.523>
- Calhoun, A. J. K., Mushet, D. M., Bell, K. P., Boix, D., Fitzsimons, J. A., & Isselin-Nondedeu, F. (2017). Temporary wetlands: challenges and solutions to conserving a “disappearing” ecosystem. *Biological Conservation*, 211, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.11.024>
- CONABIO. (2011). *La biodiversidad en Veracruz: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología A.C. México.
- Costa, L. A., & Gusmão, L. F. P. (2015). Characterization saprobic fungi on leaf litter of two species of trees in the Atlantic Forest, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1027–1035. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140548>
- Costa, M. S. D., Rainey, F. a., & Nobre, M. F. (2006). The Genus *Thermus* and Relatives. In:

- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes* 797–812. Springer, New York, NY
- Cox, M. M., & Battista, J. R. (2005). *Deinococcus radiodurans* - The consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 882–892. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1264>
- Espejo-Serna, A., & López-Ferrari, A. R. (2018). La familia Bromeliaceae en México. *Botanical Sciences*, 96(3), 533–554. <https://doi.org/10.17129/botsoci.1918>
- Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A., & Ramírez-Morillo, I. (2010). Bromeliaceae. *Flora Del Bajío y Regiones Adyacentes*, 165(1), 1–82. Recuperado de http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora_92.pdf
- Giongo, A., Medina-Silva, R., Astarita, L. V., Borges, L. G. dos A., Oliveira, R. R., Simão, T. L. L., ... Eizirik, E. (2019). Seasonal Physiological Parameters and Phytotelmata Bacterial Diversity of Two Bromeliad Species (*Aechmea gamosepala* and *Vriesea platynema*) from the Atlantic Forest of Southern Brazil. *Diversity*, 11(7), 111. <https://doi.org/10.3390/d11070111>
- Goffredi, S. K., Jang, G. E., & Haroon, M. F. (2015). Transcriptomics in the tropics: Total RNA-based profiling of Costa Rican bromeliad-associated communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.12.001>
- Goffredi, S. K., Kantor, A. H., & Woodside, W. T. (2011). Aquatic Microbial Habitats Within a Neotropical Rainforest: Bromeliads and pH-Associated Trends in Bacterial Diversity and Composition. *Microbial Ecology*, 61(3), 529–542. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9781-8>
- Gomes, F. C. O., Safar, S. V. B., Marques, A. R., Medeiros, A. O., Santos, A. R. O., Carvalho, C., ... Rosa, C. A. (2015). The diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from water tanks of *Vriesea minarum*, an endangered bromeliad species in Brazil, and the description of *Occultifur brasiliensis* f.a., sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(2), 597–611. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0356-4>
- Gouda, E.J., Butcher, D. & Gouda, C. . (2019). *Encyclopaedia of Bromeliads*, Version 4. Botanic Gardens, Utrecht website: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>
- Grossart, H. P., Van den Wyngaert, S., Kagami, M., Wurzbacher, C., Cunliffe, M., & Rojas-Jimenez, K. (2019). Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 339–354. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0175-8>
- Grothjan, J. J., & Young, E. B. (2019). Diverse microbial communities hosted by the model carnivorous pitcher plant *Sarracenia purpurea*: Analysis of both bacterial and eukaryotic composition across distinct host plant populations. *PeerJ*, 2019(2). <https://doi.org/10.7717/peerj.6392>
- Gupta, R. S., & Lali, R. (2013). Molecular signatures for the phylum Aquificae and its different clades: Proposal for division of the phylum Aquificae into the emended order Aquificales, containing the families Aquificaceae and Hydrogenothermaceae, and a new

- order Desulfurobacteriales ord. nov., containing the family Desulfobacteriaceae *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 104(3), 349–368. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9957-6>
- Gupta, S., & Chikara, S. K. (2015). Metagenomics Analysis Of Eukaryotic Community In Soil Using 18S and 28S rRNA Gene High Throughput Sequencing. *International Journal of Genetics*, 7(1), 161–164.
- Hernandez, H. M., & Barcenas, R. T. (1995). Endangered Cacti in the Chihuahuan Desert: I. Biogeography and Conservation. *Conservation Biology*, 9(5), 1176–1188.
- Hernández-Magaña, R., Hernández-Oria, J. G., & Chávez, R. (2017). Datos para la conservación florística en función de la amplitud geográfica de las especies en el Semidesierto Queretano, México. *Acta Botanica Mexicana*, 140(99), 105. <https://doi.org/10.21829/abm99.2012.22>
- Hernández, H. M., & Gómez-Hinostrosa, C. (2005). Cactus diversity and endemism in the Chihuahuan Desert Region. *Biodiversity, ecosystems and conservation in Northern Mexico, JL Cartron, G. Ceballos and R. Felger (eds.). Oxford University Press, New York*, 264-275
- Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., ... Tappu, R. (2016). MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology*, 12(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>
- INAFED. (2012). Zimapán. Enciclopedia de los municipios y Delegaciones de México. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. website: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM13hidalgo/municipios/13084a.html>
- Ingar, O. (2014). The Family Fusobacteriaceae. In F. Rosenberg, E., DeLong, E. F., & Thompson (Ed.), *The Prokaryotes, Firmicutes* (4th ed., pp. 109–132). Springer, New York, NY.
- Jacob, J. H., Hussein, E. I., Shakhathreh, M. A. K., & Cornelison, C. T. (2017). Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *MicrobiologyOpen*, 6(5), 1–6. <https://doi.org/10.1002/mbo3.500>
- Jones, R. I. (2000). Mixotrophy in planktonic protists: An overview. *Freshwater Biology*, 45(2), 219–226. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00672.x>
- Kitching, R. (2000). *Food Webs and Container Habitats: The natural history and ecology of phytotelma*. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542107>
- Kitching, R. L. (2001). Food webs in phytotelmata: “Bottom-Up” and “Top-Down” Explanations for Community Structure. *Annual Review of Entomology*, 46(107), 729–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151120>
- Krauss, G. J., Solé, M., Krauss, G., Schlosser, D., Wesenberg, D., & Bärlocher, F. (2011). Fungi in freshwaters: Ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS*

Microbiology Reviews, 35(4), 620–651. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00266.x>

- Lee, K., Dunfield, P., & Stoot, M. (2014). The Phylum Armatimonadetes. In F. Rosenberg, E., Delong, E. F., & Thompson (Ed.), *The Prokaryotes, Other major lineages of Bacteria and the Archaea* (4th ed., pp. 447–458). Springer, New York, NY.
- Lidstrom, M. (2006). Aerobic Methylophilic Prokaryotes. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes* 283–308. Springer, New York, NY.
- Louca, S., Jacques, S. M. S., Pires, A. P. F., Leal, J. S., González, A. L., Doebeli, M., & Farjalla, V. F. (2017). Functional structure of the bromeliad tank microbiome is strongly shaped by local geochemical conditions. *Environmental Microbiology*, 19(8), 3132–3151. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13788>
- Louca, S., Jacques, S. M. S., Pires, A. P. F., Leal, J. S., Srivastava, D. S., Parfrey, L. W., ... Doebeli, M. (2016). High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities. *Nature Ecology & Evolution*, 1(1), 0015. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0015>
- Males, J. (2016). Think tank: water relations of Bromeliaceae in their evolutionary context. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(3), 415–440. <https://doi.org/10.1111/boj.12423>
- Marino, N. A. C., Srivastava, D. S., & Farjalla, V. F. (2013). Aquatic macroinvertebrate community composition in tank-bromeliads is determined by bromeliad species and its constrained characteristics. *Insect Conservation and Diversity*, 6(3), 372–380. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2012.00224.x>
- Mogi, M. (2004). Phytotelmata: hidden freshwater habitats supporting unique faunas. *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region. Academy of Sciences, Malaysia*, 13–22.
- Mysara, M., Vandamme, P., Props, R., Kerckhof, F. M., Leys, N., Boon, N., ... Monsieurs, P. (2017). Reconciliation between operational taxonomic units and species boundaries. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(4), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix029>
- Nakagawa, S., & Takai, K. (2014). The Family Nautiliaceae: The Genera *Caminibacter*, *Lebetimonas*, and *Nautilia*. In F. Rosenberg, E., Delong, E. F., & Thompson (Ed.), *The Prokaryotes, Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (4th ed., pp. 393–399). Springer, New York, NY.
- Ngai, J. T., & Srivastava, D. S. (2006). Predators accelerate nutrient cycling in a bromeliad ecosystem. *Science*, 314(5801), 963. <https://doi.org/10.1126/science.1132598>
- Nievola, C. C., Mercier, H., & Majerowicz, N. (2001). Levels of Nitrogen Assimilation in Bromeliads. *Journal of Plant Nutrition*, 24(9), 1387–1398.
- Noha, H. Y., & Elshaded, M. (2014). The Phylum Planctomycetes. In F. Rosenberg, E., Delong, E. F., & Thompson (Ed.), *The Prokaryotes, Other major lineages of Bacteria and the Archaea* (4th ed., pp. 759–805). Springer, New York, NY.

- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser: *BMC Bioinformatics* 12:3850. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Ramirez-Morillo, I., Carnevali-Fernández, G., & Chi-May, F. (2004). *Guía Ilustrada de las Bromeliaceae de la porción mexicana de la Península de Yucatán*. Mexico.
- Razin, S. (2006). The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes). In *The Prokaryotes*. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_29
- Reichenbach, H. (2006). The Genus *Saprospira*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes* 591–601. Springer, New York, NY.
- Rodriguez-Nuñez, K. M., Rullan-Cardece, J. M., & Rios-Velazquez, C. (2018). The metagenome of bromeliads phytotelma in Puerto Rico. *Data in Brief*, 16, 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.10.065>
- Rojas, S., Castillejos-Cruz, C., & Solano, E. (2013). Florística y relaciones fitogeográficas del matorral xerófilo en el valle de tecozautla, hidalgo, México. *Botanical Sciences*, 91(3), 273–294.
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., & Thompson, F. (2014). The phylum Actinobacteria. *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes (Fourth; E. Rosenberg, E. F. DeLong, & F. Thompson, eds.)*. New York: Springer.
- Rute, R., Albrechtsen, A., Espregueira, G., Ramos-madrigal, J., Andreas, J., Maretty, L., ... Pereira, R. J. (2016). Marine Genomics Next-generation biology : Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms. *Marine Genomics*, 30, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.012>
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Serrano-Silva, N., & Calderón-Ezquerro, M. C. (2018). Metagenomic survey of bacterial diversity in the atmosphere of Mexico City using different sampling methods. *Environmental Pollution*, 235, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.035>
- Simão, T. L. L., Borges, A. G., Gano, K. A., Davis-Richardson, A. G., Brown, C. T., Fagen, J. R., ... Utz, L. R. P. (2017). Characterization of ciliate diversity in bromeliad tank waters from the Brazilian Atlantic Forest. *European Journal of Protistology*, 61, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.05.005>
- Stackebrandt, E., Reboli, A. C., & Farrar, W. E. (2006). The Genus *Erysipelothrix*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes* 492–510. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_13
- Sternes, P. R., Lee, D., Kutyna, D. R., & Borneman, A. R. (2017). A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience*, 6(7), 1–10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix040>

- Takahashi, C. A., & Mercier, H. (2011). Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *Journal of Plant Physiology*, 168(11), 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.008>
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tres, I. D. E., Quintana, S. D. E., & Ortiz-león, P. H. J. (2012). La artrópodofauna asociada a *Tillandsia fasciculata* en bajos inundados de tres sitios de Quintana Roo, México. 576–581.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*, (January), 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Williams, D. D. (2007). Other Temporary Water Habitats. *The Biology of Temporary Waters*, 1–352. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198528128.001.0001>
- Ye, L., Shao, M. F., Zhang, T., Tong, A. H. Y., & Lok, S. (2011). Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing. *Water Research*, 45(15), 4390–4398. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.028>
- Zhang, Z., Qu, Y., Li, S., Feng, K., Wang, S., Cai, W., ... Deng, Y. (2017). Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05260-w>

ANEXO I

ALVEOLATA

Apicomplexa

Eucoccidiorida

Eimeria

Eugregarinorida

Ascogregarina

Monocystis

Haemosporida

Plasmodium

Ciliophora

Chlamyodontida

Chilodonella

Haptorida

Arcuospathidium

Enchelyodon

Euplotes

Trachelophyllum

Sporadotrichida

Trachelostyla

Urostylida

Pseudokeronopsis

Vestibuliferida

Neobalantidium

Dinoflagellata

Unkown order

Colponema

AMOEBOZOA

Apusozoa

Rigifilida

Micronuclearia

Unkown order

Breviatea

Myxomycota

Entomophthorales

Entomophthoraceae

EXCAVATA

Heterolobosea

Unkown order

Tetramitus

Metamonada

Diplomonadida

Giardia

FUNGI

Ascomycota

Acarosporales

Sarcogyne

Amphisphaeriales

Truncatella

Arthoniales

Arthonia

Bezerromycetales

Xiliomyces

Botryosphaeriales

Aplosporella

Dothiorella

Lasiodiplodia

Neofusicoccum

Phyllosticta

Spencermartinsia

Caliciales

Physcia

Calosphaeriales

Calosphaeria

Erostella

Jattaea

Togninia

Capnodiales

Amycosphaerella

Camarosporula

Cercospora

Cercosporidium

Cladosporium

Collarispora

Davidiella

Devriesia

Dothistroma

Exutisphaerella

Lecanosticta

Madagascaromyces

Mycosphaerella

Neophaeothecoidea

a

Pantospora

Paramycosphaerella

Paramycovellosiella

Parateratosphaeria

Passalora

Phaeophleospora

Pleopassalora

Pseudocercospora

Pseudocercosporella

Rachicladosporium

Ragnhildiana

Ramularia

Readeriella

Septoria

Sirosporium

Sphaerulina

Teratosphaeria

Toxicocladosporium

m

Xenoconiothyrium

Xenophacidiella

Zymoseptoria

Chaetosphaeriales

Dendrophoma

Dinemasporium

Chaetothyriales

Cladophialophora

Exophiala

Strelitziana

Veronaea

Coniochaetales

Coniochaeta

Lecythophora

Conioscypha

Coronophorales

Pseudocatenomyces

Diaporthales

Coniella

Cytospora

Diaporthe

Phaeoacremonium

Phomopsis

Pilidiella

Stilbospora

Dothideales

Aureobasidium

Biatrispora

Cenococcum

Dothiora

Hormonema

Pteridiospora

Shiraia

Erysiphales

Podosphaera

Eurotiales

Amorphotheca

Aspergillus

Emericella

Penicillium

Glomerellales

Colletotrichum

Lectera

Helotiales

Chaetomella

Claussenomyces

Hyalodendriella

Patinella

Phacidiella

Phialocephala

Roseodiscus

Trochila viburnicola

Tympanis

Vibrissea
Xenopolyscytalum
Acremonium
Beauveria
Cordyceps
Cosmospora
Eucasphaeria
Fusarium
Isaria
Metarhizium
Myrothecium
Nectria
Neothyronectria
Polynema
Protocrea
Sarocladium
Trichoderma
Volutella
Xepicula
Hysteriales
Gloniopsis
Hysterobrevium
Lecanorales
Cladonia
Corticifraga
Fellhanera
Phyllopsora
Psora
Stereocaulon
Xanthoparmelia
Lichenostigmatales
Phaeococcomyces
Lichinales
Lichinella
Microascales
Pseudallescheria
Scopulariopsis
Mytilinidiales
Lepidopterella
Onygenales
Lophophyton
Microsporium
Nannizziopsis
Ophiostomatales
Ophiostoma
Orbiliales
Gamsylella
Orbilina
Ostropales
Acarosporina
Cyanodermella
Gyalecta
Schizoxylon
Stictis
Peltigerales
Peltigera
Pezizales
Gyromitra
Lamprospora
Pachyella
Phaeomoniellales
Celerioriella
Neophaeomoniella
Phaeomoniella
Phyllachorales
Phyllachora
Pleosporales
Acrocalymma
Allophoma
Alternaria
Bipolaris
Boeremia
Calophoma
Camarographium
Camarosporidiella
Camarosporium
Coniothyrium
Corynespora
Cumuliphoma
Curreya
Curvularia
Dendryphon
Didymella
Diederichomyces
Dimorphosporicola
Drechslera
Ectophoma
Edenia
Epicoccum
Forliomyces
Gregarithecium
Herpotrichia
Leptosphaerulina
Lophiostoma
Macrodiplodiopsis
Macroventuria
Magnibotryascoma
Microsphaeropsis
Monodictys
Montagnula
Moristroma
Murilentithecium
Neascochyta
Neocucurbitaria
Neodidymelliopsis
Neoplatysporoides
Neosulcatispora
Nothophoma
Ochrocladosporium
Paracamarosporium
Paraconiothyrium
Paraphaeosphaeria
Parastagonospora
Periconia
Peyronellaea
Phaeoseptum
Phaeosphaeria
Phaeosphaeriopsis
Phoma
Piniphoma
Platychora
Polyschema
Populocrescentia
Preussia
Pseudoascochyta
Pseudocoleophoma
Pseudorobillarda
Pyrenochaeta
Pyrenochaetopsis
Remotididymella
Rousoella
Sclerostagonospora
Septoriella
Setophaeosphaeria
Setophoma
Sparticola
Splanchnonema
Stagonospora
Stagonosporopsis
Staurosphaeria
Stemphylium
Teichospora
Thyridariella
Torula
Verrucoconiothyrium
Vrystaatia
Xenodidymella
Pleurotheciales
Pleurotheciella
Pyrenulales
Massaria
Rhytismatales
Lophodermium
Propolis
Saccharomycetales
Candida
Galactomyces
Geotrichum
Kluyveromyces
Yarrowia
Sordariales
Chaetomium

Humicola
Monosporascus
Phialemonium
Podospora
Taphrinales
Taphrina
Trapeliales
Placopsis
Tubeufiales
Helicoma
Letendraea
Tubeufia
Umbilicariales
Boreoplaca
Unkown order
Aporospora
Eremomyces
Fumagopsis
Lauriomyces
Lecanicillium
Myrmecridium
Phialemoniopsis
Pseudoacrodictys
Pseudoseptoria
Ramimonilia
Repetophragma
Rhynchostoma
Scolecobasidium
Xylariales
Bartalinia
Biscogniauxia
Circinotrichum
Delonicicola
Diatrype
Diatrypella
Eutypella
Hyalotiella
Hymenopleella
Hypoxylon
Liberomyces
Nemania
Nigrospora
Pestalotiopsis
Xylaria
Basidiomycota
Agaricales
Amanita
Clavaria
Clavicornia
Conocybe
Cortinarius
Crinipellis
Deconica
Hygrocybe
Inocybe
Phyllostopsis
Psathyrella
Schizophyllum
Tricholomopsis
Agaricostilbales
Kondoa
Ruinenia
Sterigmatomyces
Auriculariales
Exidia
Heterochaete
Heteroradulum
Boletales
Chalciporus
Octaviania
Paxillus
Rossbeevera
Scleroderma
Turmalinea
Tylopilus
Buckleyzymales
Buckleyzyma
Cantharellales
Rhizoctonia
Sistotrema
Cystobasidiales
Occultifur
Cystofilobasidiales
Cystofilobasidium
Dacrymycetales
Dacrymyces
Erythrobasidiales
Erythrobasidium
Gastrales
Geastrum
Gomphales
Gautieria
Kriegeriales
Kriegeria
Leucosporidiales
Leucosporidium
Microbotryales
Chrysozyma
Curvibasidium
Polyporales
Dacryobolus
Flammeopellis
Ganoderma
Hexagonia
Hyphoderma
Irpex
Phanerodontia
Phlebia
Phlebiopsis
Trametes
Russulales
Echinodontium
Lachnocladium
Peniophora
Russula
Scytinostromella
Vararia
Septobasidiales
Septobasidium
Spiculogloeales
Mycogloea
Sporidiobolales
Rhodosporeidiobolus
Rhodotorula
Tremellales
Bullera
Bulleribasidium
Carlosrosaea
Cryptococcus
Dimennazyma
Dioszegia
Fibulobasidium
Filobasidium
Genolevuria
Hannaella
Kwoniella
Papiliotrema
Saitozyma
Tremella
Tsuchiyaea
Vishniacozyma
Trichosporonales
Cutaneotrichosporon
Trichosporon
Unkown order
Symmetrospora
Chytridiomycota
Unkown order
Chytridiomycota
Glomeromycota
Archaeosporales
Archaeospora
Diversisporales
Gigaspora
Scutellospora
Glomerale
Claroideoglomus
Glomus
Mucoromycota
Mortierellales
Mortierella

Mucorales
Circinella
Cunninghamella
Mucor
Zoopagomycota
Ramicaldelaberales
Ramicaldelaber

METAZOA

Arthropoda

Hymenoptera
Stilbum
Odonata
Agriocnemis
Ischnura

Platyhelminthes

Cestoda
Spirometra

PLANTAE

Bryophyta

Hypnales
Leskea
Thuidium
Fontinalis

Charophyta

Desmidiiales
Staurastrum

Chlorophyta

Chlamydomonadales
Chlorococcum
Chlorellales
Didymogenes
Meyerella
Dolichomastigales
Dolichomastix
Mamiellales
Bathycoccus
Sphaeropleales
Mychonastes
Trebouxiales
Trebouxia
Ulotrichales
Chamaetrichon
Hazenia
Unkown order
Chloroidium
Pleurastrum

Tracheophyta

Arecales
Chamaerops
Asparagales
Agave
Allium
Cardiostigma
Furcraea

Gelasine
Rigidella
Asterales
Calyptocarpus
Fleischmannia
Nymphoides
Caryophyllales
Persicaria
Polygonum
Cucurbitales
Cucumis
Dioscoreales
Dioscorea
Fabales
Calliandra
Medicago
Lamiales
Fraxinus
Leonurus
Paulownia
Pithecoctenium
Spathodea
Stereospermum
Tectona
Magnoliales
Annona
Malpighiales
Acalypha
Passiflora
Malvales
Reevesia
Myrtales
Hauya
Poales
Arundinaria
Cenchrus
Cynodon
Eragrostis
Proteales
Platanus
Rosales
Trema
Urera
Sapindales
Citrus
Urvillea
Selaginellales
Selaginella
Solanales
Physalis
Solanum
Withania
Vitales
Tetrastigma

Zingiberales
Musa

RHIZARIA

Cercozoa

Cercomonadida
Paracercomonas
Thaumatomonadida
Allas
Scutellomonas
Thaumatomonas

STRAMENOPILES

Bacillariophyta

Bacillariales
Pseudo-nitzschia
Naviculales
Navicula
Thalassiosirales
Stephanodiscus

Hyphochytriomycota

Unkown order
Hyphochytrium

Ochromytha

Eustigmatales
Nannochloropsis

Oomycota

Pythiales
Ovatisporangium
Phytopythium
Pythiogeton
Pythium