

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE© 2024. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con
orientación en Microbiología**

**Estructura, distribución y función de los protistas de la zona
eufótica de las aguas oceánicas del golfo de México**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Presenta:

Karla Sidón Ceseña

Ensenada, Baja California, México

2024

Tesis defendida por
Karla Sidón Ceseña

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. María Asunción Lago Lestón
Directora de tesis

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Dra. Lorena Patricia Linacre Rojas

Dr. Víctor Froylán Camacho Ibar

Dra. Laura Gómez Consarnau

Dr. Juan Carlos Herguera García



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Karla Sidón Ceseña** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología

Estructura, distribución y función de los protistas de la zona eufótica de las aguas oceánicas del golfo de México

Resumen aprobado por:

Dra. María Asunción Lago Lestón
Directora de tesis

Los protistas son un grupo de microorganismos muy diverso, que, en condiciones limitadas de nutrientes, presentan interacciones entre ellos muy complejas. Estos microorganismos tienen múltiples funciones en la red alimenticia ya que, además de ser fotosintéticos, pueden ser heterótrofos, mixotróficos, parásitos y saprófitos, y son un vínculo esencial de la comunidad microbiana con niveles tróficos superiores. En el golfo de México (GdM), la corriente de Lazo se intensifica en verano y suministra a la cuenca aguas cálidas y oligotróficas. Sin embargo, los remolinos de mesoescala de tipo ciclónico crean condiciones favorables para la productividad biológica al llevar agua rica en nutrientes a la capa subsuperficial desde capas más profundas. Este estudio tuvo como objetivos principales: 1) determinar la estructura, variabilidad espacial y roles ecológicos de los protistas en la capa de mezcla (ML, por sus siglas en inglés mixed layer) y el máximo de fluorescencia (DCM) en la región oceánica del GdM, en verano y finales de primavera; y 2) evaluar la comunidad de protistas metabólicamente activa (ARN) y su actividad metabólica relativa (ADNr:ARNr) en el 100% de luz (SUR), el 0.1% de luz (PAR0.1) y en el DCM (entre 10 al 1% de luz PAR superficial) a finales de invierno, además de su interacción con la comunidad bacteriana. Para ello se analizaron datos procedentes de la secuenciación masiva de regiones hipervariables de los genes del ARN ribosomal y su posterior análisis bioinformático y estadístico. Entre los principales hallazgos se encontró que la comunidad de la ML estaba influenciada por la variabilidad temporal, regional y, en menor medida, por las estructuras de mesoescala, debido a la fuerte estratificación de verano. En contraste, solo las estructuras de mesoescala tuvieron un efecto sobre la variabilidad de la comunidad en DCM, como consecuencia del efecto de éstas sobre la profundidad de la nutriclina. Esta variabilidad se reflejó en la composición de especies en ambas profundidades. Alveolata representó ~60% de las lecturas en ambas profundidades, seguido de picoeucariotas heterótrofos MAST y Haptofitas en la ML y *Pelagomonas* (picoeucariotas fotosintéticas) y Rhizaria en DCM. Particularmente llamó la atención el aumento de *Ostreococcus* con la somerización de la nutriclina. Por su parte, en invierno, la comunidad metabólicamente activa reflejó las condiciones de mezcla. SUR y PAR0.1 mostraron comunidades muy diferentes, mientras que el DCM presentó una mezcla de ambas profundidades. Se observó una mayor actividad metabólica relativa de los protistas fotosintéticos en el DCM y los heterótrofos aumentaron la actividad con la profundidad, indicando como ésta tiene un efecto directo sobre su función. La baja concentración de nutrientes en SUR y DCM y, la baja concentración de oxígeno y altos nutrientes en PAR0.1, se reflejó en la comunidad bacteriana, que cambió de ser dominada por cianobacterias a ser dominada por proteobacterias, con un importante rol de remineralización en la zona mesopelágica. Este estudio proporciona una primera línea de base de la comunidad de protistas en el sur del GdM y demuestra cómo esta comunidad responde a los factores ambientales y biológicos en un ecosistema altamente oligotrófico.

Palabras clave: Protistas, Golfo de México, 18S-ARNr, Ecosistema oligotrófico, Comunidad activa metabólicamente

Abstract of the thesis presented by **Karla Sidón Ceseña** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science with orientation in Microbiology

Structure, distribution and function of protists in the euphotic zone of the oceanic waters of the Gulf of Mexico

Abstract approved by:

Dra. María Asunción Lago Lestón
Thesis Director

Protists are a diverse group of microorganisms whose interactions are more complex under nutrient-limited conditions. They play multiple roles in the food web, in addition to being photosynthetic; they can also be heterotrophic, mixotrophic, parasitic, and saprophytic, and are an important link between the microbial community and higher trophic levels. In the Gulf of Mexico (GoM), the Loop Current intensifies in summer and supplies the Gulf with warm oligotrophic waters. However, mesoscale cyclonic eddies within the Gulf of Mexico create favorable conditions for biological productivity by bringing nutrient-rich water to the subsurface from deeper layers. The main objectives of this study were: 1) to determine the structure, variability, and ecological roles of protists in the mixing layer (ML) and the fluorescence maximum (DCM) in the oceanic region of the GoM during summer and late spring; and 2) to evaluate the metabolically active protist community (RNA) and its relative metabolic activity (rDNA:rRNA) in the 100% light (SUR), DCM (between 10 to 1% light), and 0.1% light (PAR0.1) in late winter, together with their interactions with the bacterial community. To this end, data from massive sequencing of hypervariable regions of ribosomal RNA genes were analyzed, followed by bioinformatic and statistical analysis. The results indicated that the ML community was influenced by temporal, regional, and, to a lesser extent, mesoscale structures, attributable to strong summer stratification. Conversely, only mesoscale structures exerted an effect on DCM community variability as a consequence of their impact on nutricline depth. This variability was reflected in the species composition at both depths. Alveolata constituted approximately 60% of the readings at both depths, followed by heterotrophic picoeukaryotes MAST and Haptophytes at ML and Pelagomonas (photosynthetic picoeukaryotes) and Rhizaria in DCM. Particularly remarkable was the increase in *Ostreococcus* with nutricline shallowing. On the other hand, during the winter season, the metabolically active community reflected the prevailing mixing conditions. SUR and PAR0.1 exhibited markedly distinct communities, while DCM presented a composition comprising elements from both depths. A higher relative metabolic activity of photosynthetic protists was observed in the DCM, whereas heterotrophs showed an increased activity with depth, indicating the direct influence of depth on their functional roles. The low nutrient concentrations in SUR and DCM, coupled with low oxygen concentration and high nutrient levels at PAR0.1, were reflected in the bacterial community composition. This community shifted from being dominated by cyanobacteria to being predominantly composed of proteobacteria, with the remineralization process playing a significant role in the mesopelagic zone. This study provides a first baseline of the protist community in the southern GoM and elucidates how this community responds to environmental and biological factors within a highly oligotrophic ecosystem.

Keywords: Protists, Gulf of Mexico, 18S-rRNA, Oligotrophic ecosystem, active community

Dedicatoria

A Esperanza y Camila

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por otorgarme la beca de manutención número 26154. Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al posgrado de ciencias de la vida por haberme aceptado como estudiante de doctorado.

Agradezco al Consorcio de Investigación del Golfo de México y al Fondo sectorial CONAHCYT-SENER-HIDROCARBUROS (proyecto 201441) por el financiamiento con el que se llevó a cabo este proyecto.

Al laboratorio de biogeoquímica de nutrientes del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO de la UABC) dirigido por el Dr. Víctor Camacho Ibar por colaborar con los análisis de nutrientes.

Un especial agradecimiento a mi directora de tesis Dra. Asunción Lago Lestón, por haberme dado la oportunidad primero de trabajar en su grupo de laboratorio en el proyecto CIGOM y después aceptarme como estudiante de doctorado. Son 9 años de trabajo y de mucho crecimiento a nivel académico y personal. Gracias por la paciencia, la enseñanza, los cuestionamientos y por ser comprensiva en los momentos difíciles.

A mi comité de tesis, Dra. Lorena Linacre, Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, Dra. Laura Gómez Consarnau, Dr. Víctor Camacho Ibar y Dr. Juan Carlo Herguera García. Gracias a cada uno por su apoyo, preguntas, artículo compartido, sin duda fueron una parte muy importante de este proyecto.

Al Dr. Miguel Martínez Mercado le debo un especial agradecimiento, me brindó su apoyo cuando más lo necesitaba, sin duda fuiste un gran mentor en el momento indicado. Gracias por ayudarme a aclarar ideas, orden en el manuscrito, dudas de R y bioinformática, pero sobre todo gracias por tu amistad.

A Marcela Padilla Calderón, la labor que lleva en CICESE es enorme, estoy muy agradecida con la guardería de CICESE es una joya que sin duda Marcela cuida con mucha dedicación. Poder dejar a mi bebé en la guardería con la confianza de que va a estar bien cuidada, alimentada y educada es un privilegio que agradecí mucho como estudiante.

A Jenny, Arlette, Eva y Yam, muchas gracias por su amistad, sin duda fueron una red de apoyo muy importante para mí. Aprecio mucho su amistad y extraño mucho las pláticas, las risas, de cada una me llevo algo que admiro. Nadie organiza baby showers más divertidos que ustedes.

Gracias por su amistad Citlali, Ivonne y Damaris, ustedes son mi familia extendida.

Benjamín desde que te conozco estoy haciendo tesis, gracias por tu apoyo incondicional. Tú y las niñas son lo mejor de mis días. También gracias, Benjamín por compartirme a tu familia que siempre están al pie del cañón apoyándonos siempre que lo hemos necesitado, principalmente Paty que ha viajado muchas veces solo para cuidar a las nietas, estoy infinitamente agradecida.

Este trabajo se lo dedico a mi mamá, que es pura fortaleza y mi lugar seguro siempre. Gracias por tu apoyo incondicional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción general	1
Capítulo 2. Estructura, distribución e inferencias funcionales de la comunidad de protistas en condiciones cálidas y oligotróficas, en la región oceánica del golfo de México	8
2.1 Introducción	8
2.2 Antecedentes	10
2.3 Justificación	11
2.4 Objetivos	11
2.4.1 Objetivo general.....	11
2.4.2 Objetivos específicos.....	11
2.5 Métodos	12
2.5.1 Colecta de muestras.....	12
2.5.2 Condiciones ambientales	13
2.5.3 Extracción de ADN, amplificación por PCR y preparación de las librerías de secuenciación.....	15
2.5.4 Procesamiento de las secuencias y asignación taxonómica	15
2.5.5 Análisis estadístico	16
2.6 Resultados	18
2.6.1 Condiciones ambientales	18
2.6.2 Patrones de distribución y diversidad en la región oceánica del GdM.....	19

2.6.1	Relación de las variables ambientales con la comunidad de microeucariotas	26
2.6.2	Análisis de co-ocurrencia	31
2.7	Discusión	33
2.7.1	Estructura de la comunidad de los eucariotas microbianos	33
2.7.2	La división de Alveolata es muy abundante en la zona eufótica	35
2.7.3	Picoeucariotas heterótrofas tienen una abundancia estable en la zona eufótica	36
2.7.4	Las picoeucariotas responden al aporte de nitrato en el DCM.....	38
2.7.5	Mixotróficos no constitutivos son abundantes en el DCM	40
2.7.6	Controles top-down tiene una fuerte influencia en la zona eufótica	41
2.8	Conclusiones.....	42
Capítulo 3. Distribución vertical y ciclo luz/oscuridad de la comunidad de protistas metabólicamente activa en el ecosistema del golfo de México.....		44
3.1	Introducción	44
3.2	Métodos	46
3.2.1	Colecta de muestras.....	46
3.2.2	Extracción ADN y ARN y síntesis de ADNc.....	46
3.2.3	Procesamiento de las secuencias y asignación taxonómica	48
3.2.4	Proxy de la actividad metabólica.....	48
3.2.5	Análisis estadísticos.....	48
3.3	Resultados	49
3.3.1	Condiciones ambientales	49
3.3.2	Diversidad alfa y composición de especies	51
3.3.3	Comparación de la composición de la comunidad obtenida a partir de ADN y ARN	52
3.3.4	Composición de la comunidad y respuesta a las condiciones ambientales de la comunidad de protistas activa	55
3.3.5	Cambios diarios (luz/oscuridad) y verticales de la actividad metabólica.....	58
3.3.6	Presas potenciales de los protistas: patrones de abundancia de las cianobacterias en condición de luz y oscuridad y patrones de co-ocurrencia con los protistas metabólicamente activos	60

3.4	Discusión	63
3.4.1	Diferencias entre la comunidad obtenida a partir de ADN y ARN	63
3.4.2	La comunidad metabólicamente activa tiene una distribución vertical asociada a la mezcla	64
3.4.3	La profundidad tiene un efecto claro sobre la actividad metabólica relativa y la función de los protistas.....	65
3.4.4	Los patrones de co-ocurrencia con los procariotas muestran nichos compartidos con la comunidad activa de los protistas	67
3.5	Conclusiones.....	68
	Literatura citada	70
	Anexos	91

Lista de figuras

Figura	Página
1. Modelo conceptual de como impacta el ambiente, la concentración de nutrientes en la estequiometria del fitoplancton y su impacto en la bomba biológica y en la bomba biológica microbiana del carbono, las flechas azules corresponden a la relación de C:N y C:P. POM: materia orgánica particulada, DOM: Materia orgánica disuelta, RDOM: materia orgánica disuelta recalcitrante, P: fotosintéticos, M: Mixotrofos, pZ: protistas heterótrofos, mZ: microzooplancton. (Tomado de Glibert & Mitra, 2022).....	3
2. Nuevo árbol de la vida de eucariotas, basado en un consenso de estudio filogenómicos recientes. Los supergrupos se marcan con colores. Las líneas discontinuas reflejan incertidumbre sobre la monofila de ciertos grupos (Tomado de Burki et al. (2020)).	5
3. Ubicación geográfica de las estaciones de colecta de agua de mar para el estudio de protistas durante los cruceros oceanográficos XIXIMI-04 (del 27 de agosto al 16 de septiembre de 2015), XIXIMI-05 (del 10 al 25 de junio de 2016), XIXIMI-06 (del 15 de agosto al 8 de septiembre de 2017) y XIXIMI-07 (del 9 de mayo al 2 de junio de 2019). Se indica en el mapa la división del área de muestreo en las regiones de la corriente del Lazo (LC; estaciones dentro de la LC y el canal de Yucatán), norte (al norte de la ZEEE; 25-23 ° N), centro (centro del GdM; 22-21 ° N) y sur (Bahía de Campeche; 20-19 ° N).	13
4. Mapas por crucero de la altura superficial del mar (cm) indicando las estaciones de colecta de las muestras de agua de mar para el análisis de metabarcoding de protistas. Los símbolos de cuadro rojo, azul y negro representan las muestras localizadas en un remolino anticiclónico (ACE), remolino ciclónico (CE) y sin remolino (NE) respectivamente.	14
5. Promedio de las condiciones ambientales observadas en el agua superficial (ML, capa de mezcla) y subsuperficial (DCM, máximo de fluorescencia) durante las cuatro campañas oceanográficas XIXIMIs realizadas en época cálida en la región oceánica del golfo de México. A) CM (m), B) temperatura (°C), C) salinidad absoluta (SA) (g kg ⁻¹), D) nitrato (μmol kg ⁻¹), E) ácido silícico (μmol kg ⁻¹), F) nutriclina (m, profundidad de distribución de la isopicna 25.5). En cada panel las muestras se agrupan en estaciones de la corriente en Lazo (CL, norte, centro y sur). Los diagramas de cajas y bigotes indican la mediana (línea horizontal dentro de la caja), rango intercuartil (caja), mínimos y máximos (bigotes verticales) y valores atípicos (puntos) de cada variable por región y en cada nivel de profundidad. Los colores verde y rosa representan los niveles del DCM y la ML, respectivamente.	20
6. Perfiles de temperatura potencial (Θ; °C; izquierda) y fluorescencia (RFU derecha) en condiciones ciclónicas (a y b) comparadas con condiciones anticiclónicas (c y d).	21
7. Gráfica de curvas de rarefacción por muestra agrupado por crucero: XIXIMI-4, XIXIMI-5, XIXIMI-6 y XIXIMI-7.	21
8. Índices basados en ASVs de (A) riqueza de especies e índice (B) de diversidad de Shannon en la capa de mezcla (ML, color rosa) y en el máximo de fluorescencia (DCM, color verde), en la región norte, centro, sur y las estaciones dentro de la corriente de Lazo y el Caribe (CL).	22

9. Proporción de lecturas por filo en las profundidades de estudio: ML y DCM..... 23
10. Abundancia relativa de los principales grupos de protistas, excluyendo Alveolata, en A) la capa de mezcla (ML) y B) el máximo de fluorescencia (DCM). Las estaciones de muestreo se ordenaron por regiones: estaciones dentro de la corriente de Lazo y canal de Yucatán (CL), norte (región al norte de la Zona Económica Exclusiva de México (ZEE), centro (centro del golfo de México GdM), y sur (bahía de Campeche). El mapa de calor en la parte inferior de cada grafica de barras representa la concentración de nitrato, el color gris indica la ausencia de datos. Las estaciones etiquetadas en azul se asocian a estructuras ciclónicas y las de color rojo con estructuras anticiclónicas. 24
11. A) Gráfico de bigotes de la abundancia promedio del género *Ostreococcus* comparando las variables categóricas remolino anticiclónico (ACE), remolino ciclónico y sin remolino (NE). B) Correlación de Spearman de la abundancia de *Ostreococcus* con la profundidad de la nutriclina. 25
12. Análisis de coordenadas principales basado en distancias de Aitchison agrupados por los estratos de profundidad. El color indica la profundidad (rosa ML y verde DCM) y la simbología en los puntos de datos indica el crucero. 26
13. Análisis de redundancia basado en distancias. A) Análisis de redundancia basado en distancias de la capa de mezcla (ML) y B) Análisis de redundancia basado en distancias de la profundidad del máximo de fluorescencia (DCM). Cada punto representa una estación y el color del punto indica el crucero y la forma indica el crucero. Las variables ambientales que se correlacionan significativamente con la comunidad están indicadas en negritas y marcadas con asterisco. 29
14. Mapa de calor de A) la correlación entre los microeucariotas, excluyendo Alveolata, y los parámetros ambientales. Se consideran altas correlaciones valores > 0.4 y < -0.4 . B) Abundancia diferencial de los principales microeucariotas (ASVs) expresada en fold-change (\log_2) con diferencias significativas entre la capa de mezcla (ML, valores positivos) y el máximo profundo de clorofila (DCM, valores negativos). 30
15. Red de asociaciones negativas de los protistas en A) la capa de mezcla (ML) y B) el máximo de fluorescencia (DCM). Las cintas representan la proporción de nodos/ASVs..... 31
16. Red de asociaciones positivas de los protistas en A) la capa de mezcla y B) el máximo de fluorescencia (DCM). Las cintas representan la proporción de nodos/ASVs..... 32
17. Mapa de las estaciones donde se colectaron muestras para el análisis ADN y ARN en la campaña oceanográfica Malla Fina-1. En el mapa se indica la altura superficial del mar (siglas en inglés de *sea surface height anomaly*, SSHA) en (cm) generado con datos de altimetría multisatélital de CCAR (*Colorado Center for Astrodinamics Research*) (Leben, 2005). 47
18. Perfil vertical de 0 a 150 m de la A) temperatura ($^{\circ}\text{C}$), B) salinidad , C) fluorescencia y D) oxígeno ($\mu\text{mol kg}^{-1}$). 50
19. Gráfica de rarefacción agrupada por ADN y ARN. El color indica la profundidad donde se colectó (rosa= superficie, verde= máximo de fluorescencia y morado= 0.1% de luz (PAR0.1)). El eje y indica el número de ASVs observado y el eje x la profundidad de secuenciación. 52

20. Comparación de la diversidad alfa en relación con la profundidad y agrupado por ADN y RNA. A) Comparación de la riqueza (número de ASVs) entre profundidades, agrupado por ADN y ARN. B) Comparación de la diversidad de Shannon por profundidad y por moléculas de ADN y ARN. 52
21. Gráfica *upset* que representa el número de ASVs únicos (puntos), compartidos (puntos conectados) y total de ASVs obtenidos a partir de ADN y ARN (barras horizontales)..... 53
22. Gráfica *Upset* que representa el número de ASVs únicos (puntos), compartidos (puntos conectados) y total de ASVs obtenidos por profundidad (barras horizontales)..... 53
23. Abundancia relativa promedio de los principales ASVs (procedentes del ADN y ARN) en las profundidades de superficie (SUR), máximo de fluorescencia (DCM) y el 0.1% de luz (PAR0.1) . 55
24. Gráfica de burbujas representando la abundancia de los principales ASVs metabólicamente activos a nivel de orden..... 56
25. A) Análisis de redundancia basado en distancias (dbRDA), el color indica la profundidad y la forma representa la región. B) Porcentaje de variación (Adonis R²) de la composición de la comunidad activa de protistas explicada por las variables ambientales de fluorescencia, razón N:P, nitrato, salinidad, ácido silicio y temperatura..... 57
26. Comparación de la actividad metabólica relativa (ARNr:ADNr) a nivel taxonómico de clase. En eje x se muestran las estaciones que se colectaron durante el día (d) y durante la noche (n). En el eje y, se indica la actividad metabólica relativa..... 59
27. Número de lecturas por muestra de la comunidad de cianobacterias a nivel de género colectadas durante la campaña oceanográfica Malla Fina-1..... 61
28. Número de lecturas de las cianobacterias a nivel género en condición de luz (día) comparado con la condición de oscuridad (noche). 61
29. Abundancia relativa de la comunidad de bacterias y arqueas a nivel de filo de las muestras colectadas durante la campaña oceanográfica Malla Fina-1..... 62
30. Mapa de calor que muestra el patrón de co-ocurrencia entre los ASVs de protistas metabólicamente activos y las cianobacterias. 62
31. Gel de electroforesis obtenido por mediciones con chip de Bioanalyzer de las profundidades de superficie, máximo de fluorescencia y 0.1% de luz en las estaciones de serie de tiempo de la campaña Malla Fina-01. 99

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Análisis de varianza de los índices de diversidad de Shannon y de riqueza (ASVs observados) con respecto a las variables categóricas de profundidad, crucero y mesoescala.	27
2. Muestra el análisis de PERMANOVA de la comunidad en la ML y DCM con respecto a las variables categóricas crucero, región y profundidad.	27
3. Análisis ANOVA de la betadispersión por profundidad de A) capa de mezcla (ML) y B) máximo de fluorescencia (DCM) por variables categóricas.	27
4. Comparaciones pareadas de las variables categóricas A) crucero, B) región y C) mesoescala de la ML (999 repeticiones).	28
5. Comparaciones pareadas de la variable categórica Mesoescala del máximo de fluorescencia (DCM) (999 repeticiones).	29
6. Lista de especies clave con un alto <i>Degree</i> (>10) y un alto <i>Betweenness</i> (>700) con su anotación funcional de acuerdo con Ramond et al. (2021).	32
7. Valor discreto de la concentración de nutrientes de las estaciones y profundidades colectadas.	51
8. Número total de secuencias de los principales grupos taxonómicos a nivel de División y su porcentaje obtenido a partir de las moléculas de ADN y RNA	54
9. Abundancia promedio y desviación estándar de los ASVs con abundancia > 1% que se encontraron en la capa de mezcla (ML).	91
10. Abundancia promedio y desviación estándar de los ASVs con abundancia > 1% que se encontraron en el máximo de fluorescencia (DCM)	92
11. Asociaciones positivas y negativas entre protista-protista de la capa de mezcla, obtenidas con el análisis de co-ocurrencia.	93
12. Asociaciones positivas y negativas entre protista-protista de la capa de mezcla, obtenidas con el análisis de co-ocurrencia.	95
13. Concentración en ng/μl y cantidad de DNA en ng extraídos de las estaciones del crucero Malla Fina-1.	97
14. Concentración en ng/μl y cantidad de RNA en ng extraídos de las estaciones del crucero Malla -Fina -1 con el fluorómetro <i>Qubit</i> [®] y valores de integridad del RNA (RIN) medidos con un chip en <i>Bioanalyzer</i>	98

Capítulo 1. Introducción general

La ecología microbiana explora la diversidad, abundancia y distribución de los microorganismos, sus interacciones específicas y su función en el ecosistema (Gray & Head, 2008). Garret Hardin en 1960 propuso el principio de “exclusión competitiva”, donde planteó que cuando ocurren dos especies con el mismo nicho, la misma distribución geográfica y en la misma población, una de las especies crecerá más mientras que la otra eventualmente se extinguirá. Sin embargo, un gran número de especies coexisten en un ambiente limitado por recursos (principalmente luz y nutrientes). George Evelyn Hutchinson (1961) propuso “la paradoja del plancton”, en la que a partir de la observación de un alto número de especies dominantes (10 – 100 especies) en ambientes mesotróficos y oligotróficos, no se cumple con el principio de exclusión competitiva. Debido a esto, planteó que el océano no está en equilibrio y propuso que perturbaciones, como por ejemplo los acontecimientos discretos de mezcla, podrían reducir el estrés por competencia. Siguiendo con la idea de que la naturaleza raramente está en equilibrio surge la “hipótesis de perturbación intermedia” (Osman, 2018), en la que se considera que perturbaciones moderadas cambian las condiciones ambientales como la luz, temperatura, concentraciones nutrientes, pH, salinidad entre otros con lo cual se reduce el estrés por competencia y permite una alta diversidad de especies (Osman, 2018).

Las principales explicaciones de esta alta diversidad de protistas en el océano se encuentran en que: 1) las poblaciones más abundantes son reguladas por predación por parte del nano y micro-zooplancton (Sherr & Sherr, 1988), y recientemente se ha tomado en cuenta la infección por protistas parásitos (Chambouvet et al., 2008; Worden et al., 2015) y por virus (Gran-Stadniczeňko et al., 2019), que mantiene poblaciones con alta diversidad en bajas abundancias; 2) los pulsos de nutrientes que conducen a un desbalance de nutrientes; donde, por ejemplo, diferentes formas de nitrógeno conllevan a una estructura de la comunidad distinta (Rii et al., 2018), y 3), las interacciones mutualistas y de simbiosis que resultan en relaciones positivas donde se reduce el estrés por competencia o depredación (Not et al., 2016). Las interacciones de los protistas con las bacterias y otros protistas, acopladas con el consumo de nutrientes y la descomposición, modulan no solo la cantidad de materia orgánica e inorgánica disponible para el crecimiento de bacterias y fitoplancton, sino que también transfieren energía (Glibert & Mitra, 2022).

Los protistas son un componente importante incorporando, liberando y secuestrando CO₂ en los sedimentos en los océanos (bomba biológica). Por un lado, los protistas fotosintéticos absorben y

secuestran CO₂ atmosférico (De La Rocha & Passow, 2014). Al mismo tiempo los protistas heterótrofos liberan CO₂ por respiración, y grupos heterótrofos como radiolarios y ciliados exportan grandes cantidades de carbono por célula al fondo del océano (Duret et al., 2020; Worden et al., 2015).

El tamaño de célula del fitoplancton y su posición en la red alimenticia están directamente relacionados con algunas funciones biogeoquímicas como productores primarios y exportadores de carbono (Ward et al., 2012). Las células del picoplancton con tamaños de 2-3 µm juegan un papel crítico en la productividad primaria de las aguas oceánicas y oligotróficas (Shi et al., 2009). En contraste, las diatomeas (5- 200 µm) se consideran responsables de la producción a partir de nitrato que aflora de aguas profundas (producción primaria nueva) (Eppley & Peterson, 1979) y de contribuir con altas tasas de exportación de carbono principalmente en regiones de surgencias (Bibby & Moore, 2011). Cullen y colaboradores (2002) determinaron según los regímenes de turbulencia y nutrientes las tendencias de la estructura pelágica del fitoplancton basados en la mánkala de Margalef (1978). Estos autores reportaron que en condiciones de baja turbulencia y bajos nutrientes la estructura del ecosistema tiende a presentar células pequeñas, con altas tasas de renovación y alta competencia por nutrientes, condición en la que domina el bucle microbiano.

En el bucle microbiano la materia orgánica disuelta (MOD) liberada por el fitoplancton es la principal fuente de energía de las bacterias heterótrofas y arqueas, especialmente en regiones oligotróficas. En el bucle microbiano las bacterias son consumidoras y degradadoras de la MOD (Azam & Graf, 1983), y se ha observado que existe diferencia en la comunidad bacteriana dependiendo del tipo de exudados que libera el fitoplancton (Rinta-Kanto et al., 2012). Cuando la MOD proporcionada por el fitoplancton es suficiente para mantener densidades bacterianas de 5 a 10 x 10⁶ cél ml⁻¹, los nano flagelados se alimentan de cianobacterias y bacterias heterótrofas y a su vez el microzooplancton se alimenta de los nanoflagelados (Azam et al., 1983). En condiciones de altas temperaturas y limitadas de nutrientes aumenta la complejidad de las redes tróficas, donde los protistas poseen múltiples funciones en la red alimenticia ya que además de ser fotosintéticos también pueden ser heterótrofos, mixotróficos, parásitos, saprofitos o vivir en simbiosis (Caron et al., 2012; Worden et al., 2015). Como consecuencia de lo anterior la transferencia de carbono a niveles tróficos superiores es menos eficiente y la MOD que se transfiere a niveles tróficos superiores es reciclada o finalmente secuestrada al fondo marino en forma de carbono recalcitrante (Polimene et al., 2017).

La bomba del carbono microbiana (BCM) es impulsada por el bucle microbiano en condiciones de oligotrofia, la BCM no implica transporte vertical por gravedad de la materia orgánica particulada; sino

que sigue la ruta de degradación de la MOD lábil a formas de carbono recalcitrantes, en donde la deficiencia de nutrientes en la columna de agua genera un desbalance en la estequiometría del fitoplancton y resulta en MOD con una alta relación de C:N y C:P, lo que produce alimento de baja calidad para el zooplancton (Polimene et al., 2017).

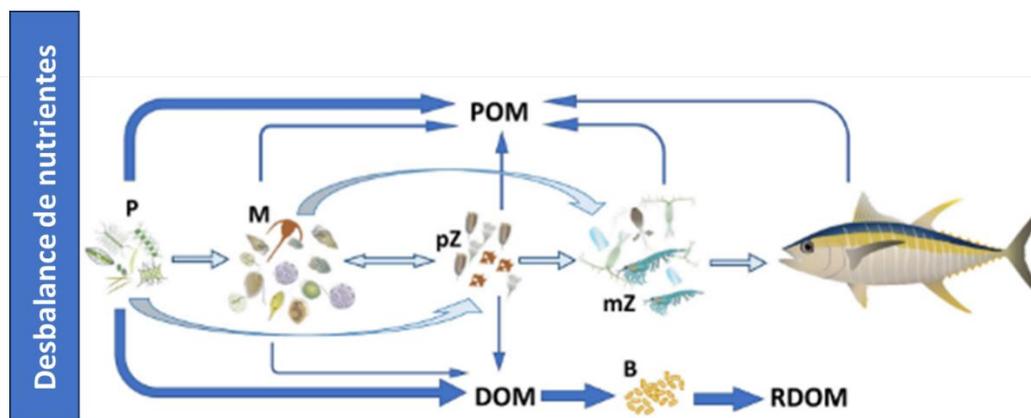


Figura 1. Modelo conceptual de cómo impacta el ambiente, la concentración de nutrientes en la estequiometría del fitoplancton y su impacto en la bomba biológica y en la bomba biológica microbiana del carbono, las flechas azules corresponden a la relación de C:N y C:P. POM: materia orgánica particulada, DOM: Materia orgánica disuelta, RDOM: materia orgánica disuelta recalcitrante, P: fotosintéticos, M: Mixotrofos, pZ: protistas heterótrofos, mZ: microzooplancton. (Tomado de Glibert & Mitra, 2022).

La tendencia de calentamiento en los océanos globales tiene como principales efectos la intensidad de la estratificación de la columna de agua y alteraciones en el suministro de nutrientes, y como consecuencia la comunidad de protistas reorganiza su estructura, ya que algunas especies se favorecerán y otras desplazarán su distribución o eventualmente tenderán a desaparecer (Henson et al., 2021). Se ha proyectado, con base en modelos predictivos, que las especies favorecidas en las regiones más cálidas (tropicales) son especies de picoplanton ($2\mu\text{m}$) como las cianobacterias y especies de nano plancton ($20\mu\text{m}$) como los cocolitofóridos que están adaptados a subsistir a muy bajas concentraciones de nutrientes (Agusti et al., 2019; Villiot et al., 2021). Este cambio en la comunidad resulta en cadenas tróficas menos productivas y un secuestro de carbono al fondo del océano menos efectivo (Agusti et al., 2019; Gregg & Rousseaux, 2019). Sin embargo, en los últimos 10 años surge una nueva paradoja, la “paradoja del mixoplancton”, pues se ha observado que en regiones cálidas y estratificadas los mixotróficos constitutivos (MC, tienen la capacidad inherente de fototrofia y fagotrofia) usan la fagotrofia para suplir la falta de nutrientes en aguas oligotróficas (Mitra et al., 2014). El mixoplancton constitutivo tiene la ventaja de que al optar por el modo fagótrofo obtiene C, N, P y micronutrientes por pastoreo y de esta forma también enriquece niveles tróficos superiores (Glibert & Mitra, 2022; Millette et al., 2023). Por el contrario, los

mixotróficos no constitutivos especialistas como Rhizaria, obtendrán carbono fijado por fotosíntesis de manera transitoria por la ingesta y adquisición de plástidos de microorganismos fotosintéticos (Figura 1, Leles et al., 2018).

Los protistas se clasifican en 7 supergrupos que contienen una gran diversidad de especies. De estos el supergrupo tSAR es el más abundante en el océano (Burki et al., 2020). Este clado incluye a Telonemia, Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria (Figura 2). El grupo de las Stramenopiles a su vez incluye a las diatomeas, pelagofitas y crysofitas. Las diatomeas son uno de los grupos de fitoplancton con mayor éxito en el océano pues tienen una amplia distribución espacial y se encuentran en distintos hábitats en el mundo (Malviya et al., 2016). En términos biogeoquímicos las diatomeas aportan aproximadamente el 20% de la productividad primaria nueva (PPN) del océano, y es el grupo que más carbono exporta a los sedimentos debido a su alta abundancia en regiones sumamente productivas (Falkowski et al., 2003, 2004). En la Antártida, por ejemplo, se ha encontrado que conforman más del 25% de la abundancia del total del fitoplancton a partir de análisis de la región hipervariable V9 del gen 18S rDNA (Benoiston et al., 2017; de Vargas et al., 2015).

Las pelagofitas son una clase relativamente nueva, reclasificada con base en el gen 18S del ARNr, donde se pasó a incluir al género *Pelagomonas* (Vaulot et al., 2008). Este género pertenece a la fracción de picoplancton (miden apenas entre 0.2 y 2 μm), aunque posee un genoma muy grande de 56 Mbp (Gobler et al., 2011). También se las conoce por ser responsables de florecimientos algales en Sudáfrica y al este de Estados Unidos conocidos como “mareas café” (Gobler et al., 2011; Rynearson & Palenik, 2011; Vaulot et al., 2008; Worden et al., 2012). Este grupo ha sido reportado como muy abundante en la corriente del Golfo (Worden et al., 2012).

El grupo Alveolata, incluye a los dinoflagelados, y es un grupo muy diverso pudiendo ser heterótrofos, autótrofos y mixotróficos. Estudios basados en filogenia molecular definieron tres grupos principales: oxirrhinales, sindiniales y dinoflagelados. Los dinoflagelados incluyen a la mayoría de las especies descritas en la literatura (Le Bescot et al., 2016). Mediante análisis metagenómicos se ha encontrado que una gran fracción de secuencias de los dinoflagelados, pertenecen al orden de las Gimnodiniales, algunas pocas al orden de Peridiniales y el resto presenta una afiliación poco clara (de Vargas et al., 2015; Le Bescot et al., 2016).

Las haptofitas conforman parte de la fracción pico y nanofitoplancton (5 – 20 μm), estas incluyen, entre otras, los coccolitofóridos y prymnesiofitas no cultivadas. Los coccolitofóridos presentan pequeñas placas de

carbonato de calcio llamadas cocolitos y, desde el punto de vista biogeoquímico, tienen un importante rol en la bomba biológica del carbono (Balch, 2018). Por su parte, estudios de metagenómica dirigida y citometría de flujo han encontrado que las pico-prymnesiofitas no cultivadas aportan, en promedio, la misma cantidad de productividad primaria que la cianobacteria *Prochlorococcus* (Liu et al., 2009). Además, se ha estimado que las pico-prymnesiofitas sin cultivar aportan el 25% de la biomasa fotosintética global con diferentes contribuciones que se distribuyen en cinco provincias biogeográficas (desde los trópicos hasta la zona subpolar) y asocian este éxito a la alta densidad de genes vinculados con el consumo de nutrientes (Cuvelier et al., 2010).

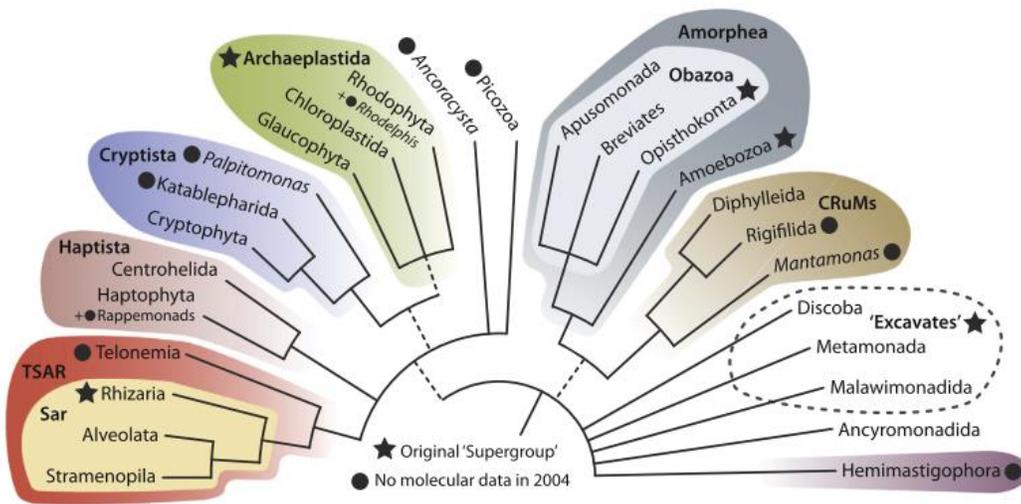


Figura 2. Nuevo árbol de la vida de eucariotas, basado en un consenso de estudio filogenómicos recientes. Los supergrupos se marcan con colores. Las líneas discontinuas reflejan incertidumbre sobre la monofilia de ciertos grupos (Tomado de Burki et al. (2020)).

El monitoreo de la biodiversidad a partir de las moléculas de ADN y ARN ambiental nos permiten realizar una evaluación directa de la composición de la comunidad a una mayor resolución taxonómica que técnicas más tradicionales. Por ejemplo, la identificación mediante microscopio permite caracterizar la comunidad de protistas hasta nivel de especie. Sin embargo, requiere un alto nivel de experiencia, consumo de tiempo y puede fallar en la identificación de especies crípticas y especies del picoplancton, debido a la falta de características morfológicas que permitan la distinción entre especies. Por otro lado, métodos como cromatografía de alta resolución (HPLC) y citometría de flujo pueden proporcionar abundancias celulares precisas, pero su resolución taxonómica es limitada (Johnson & Martiny, 2015; Lopes et al., 2022; Santi et al., 2021).

Las nuevas técnicas de secuenciación de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) han venido a contribuir a mejorar la caracterización de la comunidad de protistas, permitiendo identificar unidades taxonómicas, genes funcionales o secuenciación de genomas de microorganismos completos. Uno de los métodos más usados que se beneficia de la HTS es el llamado *metabarcoding*. Este método se basa en la amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de marcadores genéticos con información taxonómica o funcional. Para la identificación de protistas, uno de los marcadores más utilizados es la región hipervariable V9 (aprox. 150 pb de longitud) de la subunidad 18S de gen del ARN ribosomal (Amaral-Zettler et al., 2009). Este es un gen altamente conservado, pero con suficiente variación que permite distinguir entre taxones (Stoeck et al., 2010). Una vez obtenidos los amplicones (fragmento/secuencia de ADN amplificado por PCR), éstos se secuencian. El procesamiento de las secuencias crudas, con el uso de herramientas y programas bioinformáticos, agrupa aquellas que son muy similares y se definen como unidades taxonómicas que se llaman, dependiendo del método de agrupamiento, como OTUs (unidades taxonómicas operacionales) o ASV (variantes de secuencias de amplicones). Este tipo de análisis nos permite obtener un proxy de la abundancia relativa que aporta cada unidad taxonómica, descritas como OTU/ASVs anotados (Lopes dos Santos et al., 2021; Santoferrara et al., 2020; Santoferrara, 2019). Sin embargo, debemos de tener en cuenta que este método también puede presentar la desventaja de un gran número de copias del gen ARN ribosomal en particular para protistas, Este es el caso de algunos grupos (por ejemplo, Alveolata), que conlleva a una sobrerrepresentación de taxones en los sets de datos. Sin embargo, el número de especies del que se conoce su número de copias es muy bajo, lo que implica que este sesgo sea casi imposible de corregir (Lopes dos Santos et al., 2021).

El área de estudio de este trabajo se centra en la región oceánica del Golfo de México (GdM), la cual es una zona poco explorada comparada con la región costera (Durán-Campos et al., 2017; Hernández-becerril et al., 2008, 2012; Licea et al., 2011; Linacre et al., 2021, 2024; Parra-Toriz et al., 2011; Rodríguez-Gómez et al., 2022) y la región al norte, en Estados Unidos (Selph et al., 2021; Snyder et al., 2021; Brannock et al., 2016; Countway et al., 2007). El GdM es una cuenca semicerrada subtropical, que se llena con aguas cálidas y oligotróficas de la corriente de Lazo (Biggs, 1992; Biggs et al., 1996). Además, en su interior del GdM se generan unas estructuras de mesoescala cuyas dinámicas redistribuyen la disponibilidad de nutrientes (Lee-Sánchez et al., 2022), impactando directamente el ensamblaje de las comunidades de fitoplancton y otros protistas (Linacre, et al., 2015; Rodríguez-Gómez et al., 2022). Estas comunidades son la base alimenticia que sostiene, por mencionar un ejemplo, a larvas de peces de importancia comercial como el Atún de aleta azul (Stukel et al., 2022).

Bajo el argumento de que el golfo está enriquecido de agua oligotrófica por la corriente de Lazo y los remolinos de mesoescala propician condiciones favorables para la productividad primaria en la columna de agua, en este trabajo se plantean las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es la estructura de la comunidad de los protistas en la zona oceánica del GdM?
- ¿Cómo se distribuye espacial y temporalmente la comunidad de protistas?
- ¿Cuál es la función en términos de flujo de energía (ej. predación, parasitismo, simbiosis) de la comunidad de protistas en el ecosistema oceánico del GdM?
- ¿Cómo es la estructura de la comunidad metabólicamente activa?
- ¿Cómo responde la comunidad de protistas a condiciones naturales de luz/oscuridad?
- ¿Qué potenciales funciones metabólicas presentan y como se relacionan con su función ecológica?

Capítulo 2. Estructura, distribución e inferencias funcionales de la comunidad de protistas en condiciones cálidas y oligotróficas, en la región oceánica del golfo de México

2.1 Introducción

Los protistas juegan un papel esencial en los ecosistemas oligotróficos, donde además de ser productores primarios también desempeñan funciones como mixotróficos, heterótrofos, saprófitos, parásitos y relaciones de simbiosis. Todas estas funciones influyen directamente en los ciclos biogeoquímicos y el flujo de energía en el océano (Caron et al., 2012; Worden et al., 2015).

La estructura vertical de la zona fótica en las regiones oceánicas muestra un fuerte gradiente de temperatura y densidad en verano que se extiende desde la base de la capa de mezcla hasta la base del máximo de fluorescencia (DCM, por sus siglas en inglés de *Deep Chlorophyll Maximum*). El perfil vertical de la capa de mezcla (CM) se caracteriza por presentar valores casi homogéneos de temperatura, salinidad y densidad, que son el resultado de una mezcla turbulenta inducida por el viento (de Boyer Montégut et al., 2004; Huang et al., 2018). Dentro de la capa de ML, las aguas superficiales son cálidas y están bien iluminadas. Sin embargo, la baja disponibilidad de nutrientes es un factor que limita la producción primaria (Sigman et al., 2012). Por otro lado, la biomasa de fitoplancton tiende a aumentar en el DCM junto con el suministro de nutrientes, no obstante, es la disponibilidad de luz es el factor limitante de la producción primaria en esta capa, que a su vez limita la producción primaria (Eppley & Cullen, 1981; Sigman et al., 2012).

El golfo de México (GdM) es una cuenca subtropical semicerrada que es alimentada por la corriente de Lazo (CL) con agua cálida y salina proveniente del mar Caribe que entra por el canal de Yucatán y sale por el estrecho de Florida (Biggs, 1992; Biggs & Ressler, 2001). El agua superficial oligotrófica que entra a la cuenca a través de la CL no fertiliza el GdM. Sin embargo, existen otras condiciones y mecanismos dentro del GdM que promueven la productividad primaria a través de procesos advectivos como los remolinos anticiclónicos (ACE, por sus siglas en inglés de anticyclonic eddy) y sus efectos de borde, los remolinos ciclónicos (CE, por sus siglas en inglés de cyclonic eddy) y las interacciones entre los ACE y CE que se forman en la periferia (Biggs, 1992; Salmerón-García & Zavala-Hidalgo, 2011; Toner et al., 2003).

Las principales estructuras de mesoescala dentro del GdM son los remolinos anticiclónicos que se desprenden de la CL (LCEs, por sus siglas en inglés *Loop Current Eddies*). Estos remolinos son de gran tamaño (> 200 km de diámetro) y viajan hacia el oeste hasta la plataforma de Tamaulipas-Veracruz donde se disipan a lo largo de la pendiente continental. Otras estructuras de mesoescala presentes son los CE que se forman alrededor del CL y el remolino ciclónico semipermanente de la hahía de Campeche en el sur del GdM (Hamilton et al., 2018; Pérez-Brunius et al., 2013; Zavala-Hidalgo, 2003).

Las principales fuentes de variabilidad temporal de la clorofila dentro del GdM son el resultado del cambio de la disponibilidad de nutrientes entre las condiciones de mezcla de la columna de agua durante el invierno y las condiciones de estratificación en la columna de agua en verano (Damien et al., 2018; Muller-Karger et al., 2015; Pasqueron de Fommervault et al., 2017), se suma a los anterior, el cambio en la intensidad de intrusión de la CL, que tiende a presentar una mayor intensidad en verano (Delgado et al., 2019). Otro factor que influye en el aporte de nutrientes dentro de la columna de agua es la surgencia costera que existe durante todo el año en la región de la plataforma de Yucatán y que se intensifica en verano al igual que CL (Kurczyn et al., 2021). Las otras fuentes de enriquecimiento de nutrientes incluyen la descarga fluvial del río Mississippi en el norte del GdM (Wawrik & Paul, 2004), el sistema fluvial Grijalva-Usumacinta y los escurrimientos de la plataforma Veracruz-Tamaulipas (Martínez-López & Zavala-Hidalgo, 2009).

La región oceánica del GdM es un ecosistema oligotrófico que puede servir como un excelente laboratorio natural para estudiar los efectos del calentamiento del océano, debido a que se propician las condiciones en las que se proyecta la tendencia de la disminución de la biomasa fotosintética, con un mayor éxito del piko y nanoplancton (2 -20 μm) (Agusti et al., 2019; Gregg & Rousseaux, 2019; Henson et al., 2021).

Entre las condiciones que lo hacen adecuado para estudiar los efectos del calentamiento de la superficie del océano se encuentran la alta temperatura superficial de agua en verano (28 - 30 °C), la baja concentración de clorofila a superficial (< 0,15 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$), los cambios temporales en la capa de mezcla (< 40 m en verano a > 100 m en invierno) y las bajas concentraciones de nitrato en la capa superficial (0.2 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ – 1.2 $\mu\text{mol kg}^{-1}$) del GdM (Damien et al., 2018; Muller-Karger et al., 2015b; Pasqueron de Fommervault et al., 2017).

2.2 Antecedentes

La mayoría de los estudios realizados sobre micro eucariotas en la Zona Económica Exclusiva (ZEE) del GdM se han centrado en las comunidades fitoplanctónicas y han empleado análisis de microscopía (Hernández-Becerril et al., 2008; Hernández-Becerril & Flores Granados, 1998; Licea et al., 2004, 2011, 2016; Linacre et al., 2021, 2024; Merino-Virgilio et al., 2013; Okolodkov, 2003; Parra-Toriz et al., 2011); citometría de flujo para detectar *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, bacterias heterótrofas y piceucariotas (Linacre, et al., 2015; 2019; 2024); y análisis moleculares como FISH-TSA para detectar piceucariotas como la especie *Micromonas pusilla* (Hernández-Becerril et al., 2012). Por el contrario, los análisis de metabarcoding son escasos y se han centrado en evaluar la composición bacteriana de la columna de agua (Raggi et al., 2020) y las comunidades de zooplancton (Martínez et al., 2021). De hecho, aún no se han realizado evaluaciones que empleen técnicas de secuenciación masiva como el metabarcoding para evaluar toda la comunidad de protistas en las aguas oceánicas de la ZEE del GdM. La secuenciación de alto rendimiento del gen ARN V9-18S permite estudiar las comunidades con alta resolución taxonómica. A partir de este enfoque se pueden identificar especies no cultivadas (Johnson & Martiny, 2015), especies de picoplancton que carecen de estructuras morfológicas distintivas (Caron et al., 2012; Massana, 2011a; Santi et al., 2021) y también permite detectar diferencias espaciales y temporales de las comunidades (Santoferrara, 2019).

En el área oligotrófica alrededor de la isla de Cozumel, Rodríguez-Gómez y colaboradores (2022) encontraron que los desplazamientos verticales de la nutriclina en la capa subsuperficial y de la ML fueron los principales factores que moldearon la comunidad fitoplanctónica, la cual contenía una baja abundancia de diatomeas. Estudios a partir de citometría de flujo han reportado que las especies de *Prochlorococcus* dominan la capa de mezcla en la región oligotrófica del sur del GdM, y la población se distribuye de acuerdo con las estructuras de mesoescala, con una mayor abundancia en remolinos anticiclónicos tanto en invierno como en verano (Linacre et al., 2019; 2015). Además, cerca de la nutriclina se han identificado ecotipos de *Prochlorococcus* que están asociados a condiciones de baja luz y que podrían ser transportados hacia el interior del GdM por los remolinos que se desprenden de la CL (Linacre et al., 2019). Por otro lado, utilizando hibridación fluorescente in situ acoplada con amplificación de señal de tiramida (FISH-TSA), (Hernández-Becerril et al., 2012) sugirieron que durante el invierno la piceucariota *Micromonas pusilla* juega un papel como productor primario y exportador de carbono similar que los grupos de diatomeas yocolitofóridos en la región de Campeche.

2.3 Justificación

Diferentes modelos de cambio climático global predicen que la superficie en el océano abierto se calentará y como consecuencia provocará una fuerte estratificación en la capa de mezcla, disminuyendo la intensidad y la frecuencia del bombeo subsuperficial de agua rica en nutrientes hacia los estratos iluminados de la columna de agua, aunado a estresores como la acidificación y la desoxigenación del océano (Henson et al., 2021). Estos cambios tendrán un efecto directo sobre los ciclos biogeoquímicos y las redes alimenticias. Dado que los protistas se encuentran en la base de las redes alimenticias y son el vínculo con los niveles superiores (Worden et al., 2015), es de suma importancia el conocimiento sobre estas comunidades, las consecuencias que generan los cambios ambientales en la base de las redes alimenticias marinas. En particular, este conocimiento es todavía muy escaso en las regiones oceánicas y oligotróficas como del GdM. Por lo anterior, este estudio tiene como propósito establecer una línea base la estructura la función de los protistas que habitan la región de aguas profundas del GdM. Esta información ayudará en la evaluación de los cambios futuros en el ecosistema.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue evaluar la estructura de la comunidad de los protistas y su función en la región oceánica del GdM, y establecer una línea base para contribuir a un mejor conocimiento que pueda ser útil para evaluar futuros cambios en la comunidad.

2.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la estructura de la comunidad y la variabilidad espacial y temporal de los protistas en la ML y el DCM en la región oceánica del GdM
- Evaluar qué factores ambientales tienen efecto en la estructura de la comunidad en la ML y el DCM

- Evaluar qué tipos de relación protista-protista pueden moldear la comunidad, con base en análisis de co-ocurrencia.

2.5 Métodos

2.5.1 Colecta de muestras

Se colectaron muestras de agua de mar desde la zona eufótica durante la temporada cálida en la región oceánica del golfo de México (GdM), en cuatro campañas oceanográficas llamadas XIXIMIs: XIXIMI-04 (del 27 de agosto al 16 de septiembre de 2015), XIXIMI-05 (del 10 al 25 de junio de 2016), XIXIMI-06 (del 15 de agosto al 8 de septiembre de 2017) y XIXIMI-07 (del 9 de mayo al 2 de junio de 2019) (Figura 3). Las muestras fueron obtenidas 44 estaciones (Fig. 3), tomando agua a dos niveles de profundidad: dentro de la capa de mezcla (ML, 5 m) y en el máximo de fluorescencia (DCM, en un rango de 50 - 120 m, dependiendo de la profundidad del máximo de fluorescencia en cada estación).

En total, se tomaron 92 muestras utilizando botellas Niskin de 20 L montadas en un carrusel SBE32 con 12 posiciones, y acopladas a un CTD SBE 911plus equipado con un sensor de fluorescencia Seapoint (*Seapoint sensor inc. Exenter, NH, USA*) y un sensor de oxígeno disuelto SBE43 (*Sea-Bird Electronics Inc.*).

Para cada muestra, se pre-filtraron 6 L de agua de mar a través de una malla *Nitex* de 200 μm , para minimizar la presencia de eucariotas multicelulares, y la muestra se dividió en dos submuestras de 3 L para su filtración. Cada muestra se filtró al vacío usando una bomba EYELA 100S sobre filtros de policarbonato *Whatman® Nuclepore™ track-etched* con un tamaño de poro de 0.8 μm y de 47 mm de diámetro, para obtener la fracción entre 200 y 0.8 μm , la cual es la fracción enriquecida con protistas.

Cada membrana se guardó en un criotubo de 2 mL y todas las muestras se congelaron directamente en nitrógeno líquido y en el laboratorio se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

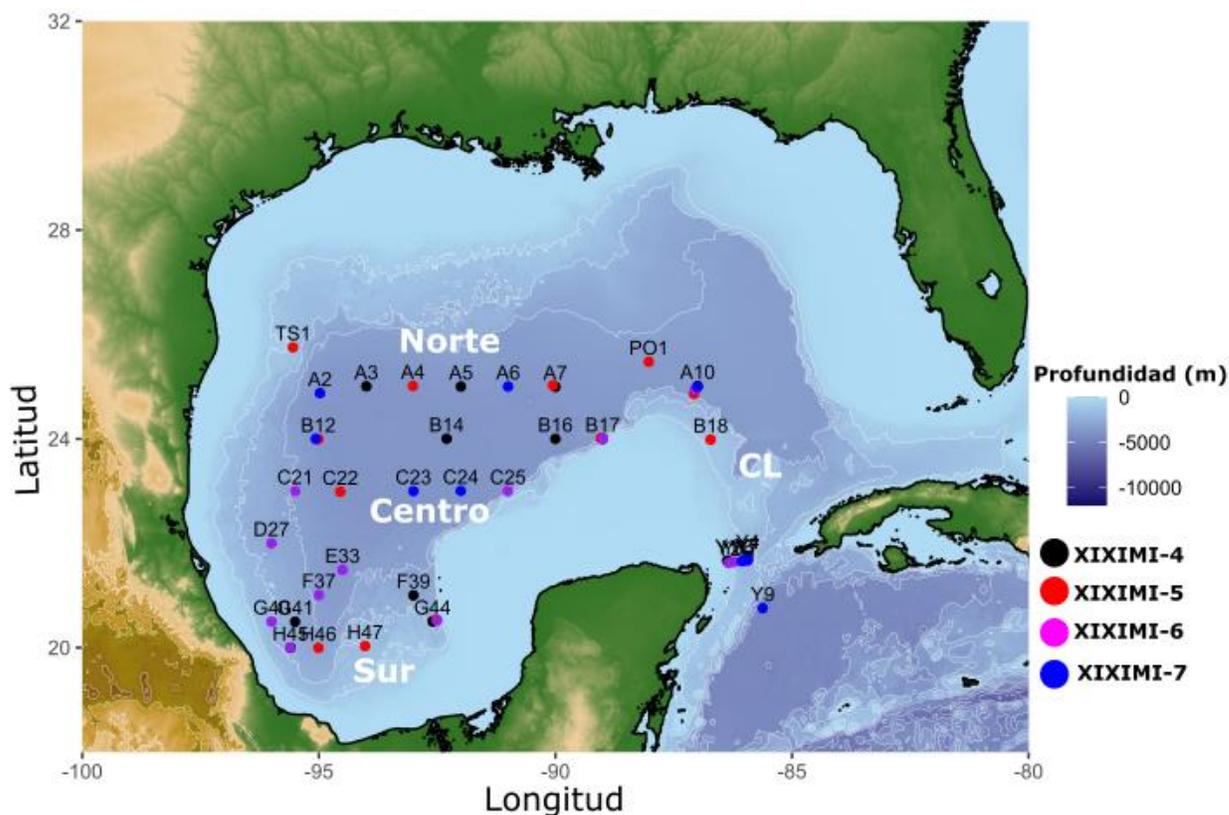


Figura 3. Ubicación geográfica de las estaciones de colecta de agua de mar para el estudio de protistas durante los cruces oceanográficos XIXIMI-04 (del 27 de agosto al 16 de septiembre de 2015), XIXIMI-05 (del 10 al 25 de junio de 2016), XIXIMI-06 (del 15 de agosto al 8 de septiembre de 2017) y XIXIMI-07 (del 9 de mayo al 2 de junio de 2019). Se indica en el mapa la división del área de muestreo en las regiones de la corriente del Lazo (LC; estaciones dentro de la LC y el canal de Yucatán), norte (al norte de la ZEEE; 25-23 ° N), centro (centro del GdM; 22-21 ° N) y sur (Bahía de Campeche; 20-19 ° N).

2.5.2 Condiciones ambientales

La profundidad de la capa mezcla (ML) se estimó mediante el método de Huang et al. (2018) por perfil de densidad individual, el cual proporciona un índice de calidad (QI) adaptado por Lorbacher et al. (2006). Además, se determinó la frecuencia Brunt-väisälä (N^2) como *proxy* de la estabilidad de la columna de agua (Millard et al., 1990). Para organizar las muestras de acuerdo con las estructuras de mesoescala se utilizó la isopícnica de los $25.5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ como *proxy* de la profundidad de la nutriclina (Pasqueron de Fommervault et al., 2017). Mediante mapas de la anomalía de la altura superficial del mar (SSH, por sus siglas en inglés *Sea Surface Height Anomaly* provenientes de datos de altimetría multisatélital de CCAR (Colorado Center for Astrodinamics Research (Leben, 2005), se identificó si las muestras se encontraban dentro de una estructura de mesoescala (Figura 4). Las estaciones se clasificaron con base en la profundidad de la isoterma de los 20°C como provenientes de: remolino anticiclónico (ACE, $> 150 \text{ m}$), remolino ciclónico (CE,

< 110 m) y sin remolino (NE, 110-150 m) según la metodología propuesta por Velásquez-Aristizábal et al. (2022).

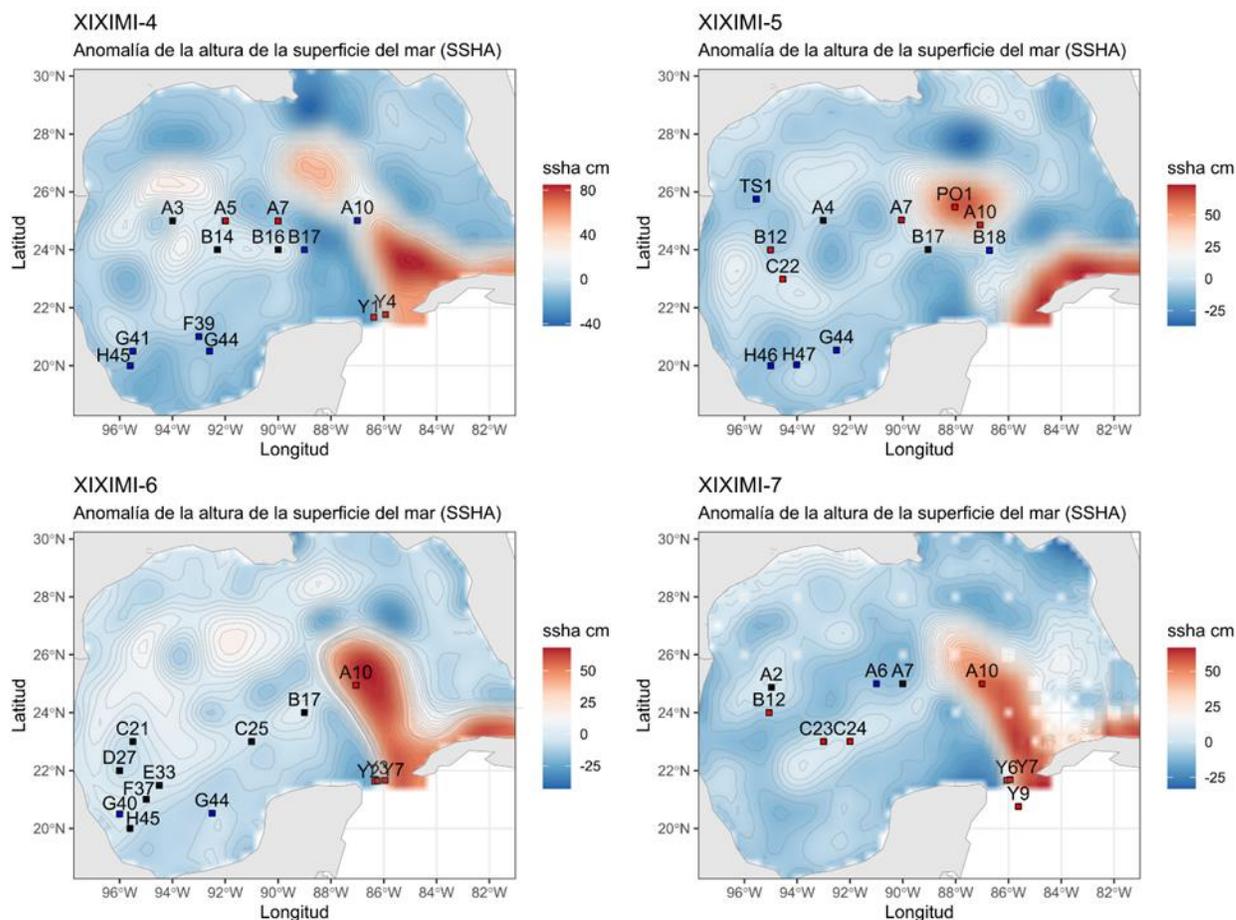


Figura 4. Mapas por crucero de la altura superficial del mar (cm) indicando las estaciones de colecta de las muestras de agua de mar para el análisis de metabarcoding de protistas. Los símbolos de cuadro rojo, azul y negro representan las muestras localizadas en un remolino anticiclónico (ACE), remolino ciclónico (CE) y sin remolino (NE) respectivamente.

El análisis de los nutrientes de las profundidades ML y DCM se realizó en el laboratorio de biogeoquímica de nutrientes del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO de la UABC) con un analizador de nutrientes automatizado AA3-HR (*Seal Analytical*) siguiendo el protocolo descrito en el *Repeat Hydrography Manual GO-SHIP* (Hydes et al., 2010). El nitrato+nitrito y el ácido silícico se determinaron según una modificación del procedimiento de Armstrong et al., (1967). Los materiales de referencia para nutrientes de agua de mar (RMNS), lote CC y lote CD desarrollados por *The General Environmental Technos Co.* (Kanso Technos), Japón (Hydes et al., 2010), se analizaron repetidamente durante las pruebas para evaluar la exactitud y la precisión. El límite de detección para la concentración de nitrato+nitrito y ácido silícico fue de 0-02 y 0-04 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, respectivamente.

2.5.3 Extracción de ADN, amplificación por PCR y preparación de las librerías de secuenciación

El ADN total se extrajo de las membranas de 0.8 μm Nucleopore con el kit DNeasy Power Water (Qiagen, Hilden, Alemania). Para aumentar el rendimiento de la extracción del ADN total se añadieron 200 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) durante el proceso de lisis celular. Una vez obtenido el ADN, este se cuantificó por espectrofotometría en un Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific) y la calidad fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Las bibliotecas de secuenciación se generaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*) amplificando la región V9 del gen 18S rRNA, utilizando los cebadores 1389F (5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG -3') y 1510R (5'-GCCTTGCCAGCCCCTCAG -3') (Amaral-Zettler et al., 2009), y de acuerdo con el método de Kozich et al. (2013). El método descrito por de Kozich et al. (2013) permite generar las librerías con doble indexado en un solo paso de amplificación, dado que se utilizan unos oligos compuestos que contienen el primer taxonómicamente informativo, los índices para la identificación de las muestras y los adaptadores para la ligación a la *flowcell*. Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado para cada muestra utilizando 10 ng de ADN. Para la reacción de la PCR se utilizó una concentración final de 1X *Mix My Taq™* (Bioline, Londres, Reino Unido) 0.4 μL de cada cebador *forward* y *reverse*, 0.6 μL de *MyTaq™ DNA polymerase* (Bioline), en un volumen total de 20 μL . Las condiciones térmicas fueron: una desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 min, seguida de 32 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 15s, 72 °C durante 5 min, y finalmente una extensión final de 72 °C durante 7 min. Se utilizó un control negativo para verificar ausencia de contaminación. Este control no produjo amplificación. Los productos PCR se limpiaron y se seleccionaron por tamaño de fragmento con *SequalPrep™* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos normalizados se cuantificaron utilizando un fluorómetro Qubit 3.0 con kit de ensayo de dsDNA de alta sensibilidad (ThermoFisher Scientific). Finalmente, los productos PCR se agruparon hasta alcanzar una concentración equimolar y se secuenciaron utilizando el kit *MiSeq Reagent V2® paired-end sequenced* (2 x 151) en la plataforma Illumina *MiSeq* en las instalaciones del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

2.5.4 Procesamiento de las secuencias y asignación taxonómica

La secuenciación de los amplicones se realizó en dos eventos de secuenciación. El primero incluyó 48 muestras de los cruceros XIXIMI-5 y XIXIMI-6 de las profundidades ML (n=25) y DCM (n=23), mientras que

el segundo incluyó 44 muestras de los cruceros XIXIMI-4 y XIXIMI-7 de las profundidades ML (n=21) y DCM (n=23). Los datos de cada secuenciación se procesaron de forma independiente. Los cebadores V9 y los adaptadores universales de Illumina fueron eliminados con Cutadapt v.2.5 (Martin, 2011). Este proceso también incluyó el descarte de lecturas con homopolímeros > 10 bases y con una longitud menor a 70 pb.

Posteriormente, las secuencias prefiltradas fueron procesadas siguiendo el pipeline de DADA2 v 1.8 (Callahan et al., 2016) (https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial_1_8.html) para eliminar nucleótidos indeterminados (*denoised*), con los parámetros *minLen* 80 (longitud menor a 80 pb), *maxEE* 2, 2, *truncQ* 10 (número máximo de errores esperados) y los parámetros de *merging* de *minOver* 10 y *maxMM* 0 y obtener las variantes de secuencias de amplicones los ASVs (*Amplicon Sequence Variant*), todo realizado en el ambiente de R v. 3.5.0 (R Core Team, 2017). Los ASVs obtenidos de los dos conjuntos de datos se fusionaron en una única tabla de secuencias y finalmente se eliminaron las quimeras con el método de consenso. Para ello, a partir de una tabla de secuencias se comprueban independientemente los ASVs en busca de bimeras, y finalmente se toma una decisión consensuada sobre cada ASV por alineamiento de las secuencias (Callahan et al., 2016).

Las asignaciones taxonómicas se realizaron con la base de datos especializada y curada para *protistas* *Protist Ribosomal Reference* (PR2) v.4.12 (Guillou et al., 2012) con el método de clasificación bayesiano ingenuo y utilizando la función *assignTaxonomy* (bootstrap > 80) de DADA2. Posteriormente los ASVs asociados al Supergrupo Opisthokonta y los ASVs no asignados (NA) en el rango taxonómico de División fueron eliminados del análisis por no ser objeto de este estudio.

Los resultados se manejaron como “objetos phyloseq” el cual contiene las secuencias, la taxonomía y el conteo de las lecturas obtenidas para cada muestra para el análisis ecológico (McMurdie & Holmes, 2013) para el análisis ecológico. El análisis de diversidad alfa (Shannon y Chao1) se realizó con el paquete R *microbiome* utilizando la función global.

2.5.5 Análisis estadístico

Debido a la naturaleza composicional de los datos, las lecturas obtenidas de la secuenciación de ADN se normalizaron mediante la transformación de la relación logarítmica centrada (clr), con el fin de corregir el diferente número de secuencias obtenidas por muestras (Gloor et al., 2017). Los parámetros ambientales se normalizaron mediante *Z-score* para el análisis multivariante.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) fue basado en las distancias de Aitchinson, calculadas a partir de las distancias euclidianas de los datos de abundancia normalizados con logaritmo centrado (clr) con el paquete de Vegan v.2.5. en R (Oksanen et al., 2020). El análisis de similitud ANOSIM se realizó con 999 permutaciones a partir de una matriz de distancias de Aitchinson para probar la disimilitud de la comunidad entre los grupos de muestras.

Se utilizó la función *adonis* para el análisis multivariante permutado de varianza *PERMANOVA* (con 999 permutaciones y matriz de distancias de Aitchinson) para probar la diferencia significativa entre las variables categóricas: región, crucero y estructuras de mesoescala (ACE, CE y NE).

Para determinar qué factores ambientales tendrían un efecto y qué porcentaje de variación podría explicar la composición de la comunidad de microeucariotas, se utilizó el análisis de redundancia basado en distancias (db-RDA) (Legendre & Anderson, 1999), con distancias de Aitchinson y datos ambientales normalizados con *z-score*.

Los datos ambientales se seleccionaron cuando el factor de inflación de la varianza (VIF) fue inferior a cuatro y se seleccionaron las variables ambientales de temperatura (°C), nitrato (NO₃) μmol/kg, oxígeno (μmol/kg), latitud, fluorescencia (unidades relativas), salinidad absoluta, ácido silícico (Si) y carbono orgánico disuelto (DOC, por sus siglas en inglés) (μmol/kg). Además, se comprobó la significancia del modelo de db-RDA y mediante una prueba de permutación *ANOVA-like* analizamos qué variables ambientales contribuyeron significativamente a la variación de la composición de la comunidad (Legendre et al., 2011).

Para predecir la abundancia de los principales taxones de microeucariotas a partir de las variables ambientales, se analizó la correlación entre las abundancias de los 35 taxones abundantes (> 1%) y las variables ambientales con un modelo de regresión *sPLS* (mínimos cuadrados parciales) con la función *spls* () del paquete 'Mixomics' en R (Rohart et al., 2017). La técnica no se limita a variables no correlacionadas y puede utilizar variables ruidosas, colineales (correlacionadas) o ausentes, con este método se puede predecir un grupo de variables a partir de otro grupo de variables (Lê Cao et al., 2008).

Las diferencias significativas de abundancia entre los 35 microeucariotas con respecto a las estructuras de mesoescala se evaluaron con un análisis no paramétrico de diferencia de rangos Wilcoxon a partir de las comparaciones pareadas de las estructuras ciclónicas (CE), anticiclónicas (ACE) y sin remolino (NE).

Además, se utilizó *Deseq2* (análisis de abundancia diferencial) basado en una distribución binomial negativa (Love et al., 2014) para evaluar si la abundancia de ASV difería significativamente entre el ML y el DCM, la significancia de los ASV fue ajustada un valor $p < 0.01$.

Finalmente, se realizó un análisis de redes de co-ocurrencia utilizando *SPIEC-EASI* (por sus siglas en inglés de: *sparse inverse covariance estimation for ecological association inference*) v. 1.1.0 (Kurtz et al., 2015) con el método de vecindad "mb" (Meinshausen-Buhlmann), 50 repeticiones y ASVs con la taxonomía agrupada al rango taxonómico más bajo. Las especies clave se detectaron con un valor de *degree* > 10 (es decir, el número de asociaciones/*edges* conectados por nodo/ASV) y *betweenness* > 1000 (el número total de caminos aleatorios más cortos entre nodos).

Por último, se filtraron las asociaciones/*edges* positivos y negativos (> 0,02) de la red con las 80 ASV más prevalentes en cada profundidad. La estadística de la red se realizó con el paquete de R 'igraph' (Csárdi & Nepusz, 2006), y las asociaciones de la red se visualizaron con *chord diagram* utilizando el paquete de R 'CircIize' (Gu et al., 2014).

2.6 Resultados

2.6.1 Condiciones ambientales

Durante el muestreo, la columna de agua se presentó muy estratificada (Figura 5A), lo cual fue evidente por los valores promedios de la ML < 40 m en cada uno de los cruceros (XIXIMI-4 = 31 m, XIXIMI-5 = 22 m, XIXIMI-6 = 28 m y XIXIMI-7 = 40 m).

La ML se caracterizó por altas temperaturas (27.2 a 30.6 °C) (Figura 4B), un amplio rango de valores de salinidad (34.4 a 36.6 g kg⁻¹) (Figura 5C), bajas concentraciones de nitrato de 0.54 μmol kg⁻¹ hasta por debajo del límite de detección (en 0.02 μmol kg⁻¹; Figura. 5D), que contrastaron con los altos valores de ácido silícico (~ 1-2 μmol kg⁻¹) que fue especialmente altos sólo en la región sur (> 2 μmol kg⁻¹, Figura 5E). Por otro lado, el DCM se caracterizó por bajos valores de fluorescencia cuando este nivel fue profundo (90-120 m, 0.42 RFU) y altos valores cuando el máximo de fluorescencia se encontró entre entre los 50 a 75 m, con 1.34 RFU en promedio (Fig. 6B y 6D).

En el DCM la temperatura se ubicó en un rango de 20.5 a 27.7 °C, mientras que la salinidad osciló entre 36 y 36.6 g kg⁻¹, y la concentración máxima de nitrato entre 5-2 µmol kg⁻¹ hasta por debajo del límite de detección (Figura 5B y Figura 5E). La nutriclina (Figura 5F), fue menos profunda durante XIXIMI-4 (87 m) que durante XIXIMI-5 (89 m), XIXIMI-6 (120 m), y XIXIMI-7 (112 m). Durante crucero XIXIMI-5 se colectó la estación PO1, situada en el núcleo de un remolino anticiclónico recientemente desprendido de la CL llamado Poseidón (*Horizon Marine Group*, www.horizonmarine.com/loop-current-eddies), y fue la estación con mayor profundidad de nutriclina (255 m) del conjunto de datos.

Otras estaciones con valores de nutriclina profundos fueron A10 (XIXIMI-5 = 167 m; XIXIMI-6 = 217 m; y XIXIMI-7 = 238 m) situada en la CL y las estaciones Y7 (XIXIMI-7 = 157 m) y Y9 (XIXIMI-7 = 244 m) ubicadas en la región del Caribe (Figura 3). Desde un punto de vista regional, el área asociada al remolino ciclónico de la Bahía de Campeche fue la más estratificada (ML = 21.4 m, nutriclina = 73 m; Figura 5A y Figura 5F), mientras que las estaciones dentro de la CL, y las regiones norte y central del golfo fueron las menos estratificadas (ML promedio de 40 m, nutriclina promedio de 167 m de profundidad, Figura. 5A y Figura 5F). La concentración media de nitrato en el sur del golfo exhibió valores bajos de nitrato sólo en el ML (promedio de 0.1 µmol kg⁻¹) y valores más altos en el DCM (promedio de 1.2 µmol kg⁻¹; Figura 5D), en contraste con las estaciones CL que fueron bajas (0.1 µmol kg⁻¹) en ambas profundidades (ML y DCM) (Figura. 5D).

2.6.2 Patrones de distribución y diversidad en la región oceánica del GdM

De las 92 muestras se obtuvieron un total de 4 524 956 lecturas, con un promedio de 49 184 lecturas por muestra que generaron un total de 4 679 ASVs únicos, con un promedio fueron 453 ASVs observados por muestra. La estación A10 (ML, XIXIMI-7) fue la que presentó un mayor número de ASVs (871) y la estación A4 (DCM, XIXIMI-5) el mínimo con ASVs observados (87).

A partir del análisis de rarefacción se obtuvo que la profundidad de secuenciación fue suficiente para representar a la comunidad de protistas en ambas profundidades (Figura 7). El valor máximo del índice de diversidad de Shannon fue de 5.7 en la ML de la estación A10 de la campaña XIXIMI-7, y el mínimo fue de 4 en el DCM de la estación A4 del crucero XIXIMI-5. A partir del análisis de normalidad Shapiro-Wilk, se observó que la distribución de la diversidad de Shannon fue normal ($p=0.136$), al igual que la riqueza ($p=0.107$), lo que permitió realizar el análisis de varianza (ANOVA) para cada categoría.

El ANOVA mostró que las variables categóricas de crucero ($p= 0.000^{***}$) y región ($p= 0.011^*$) presentaron diferencias significativas (Tabla. 1). La riqueza también presentó diferencias significativas en ambas variables categóricas (crucero, $p= 0.000^{***}$ y región $p=0.045^*$). Por otro lado, no se obtuvieron diferencias significativas en las variables categóricas de profundidad y mesoescala con respecto a la diversidad de Shannon y la riqueza de especies.

Con la prueba *a posteriori* TukeyHSD se obtuvieron diferencias significativas del crucero XIXIMI-5 con respecto a los demás cruceros y las estaciones dentro de la CL con respecto a la región norte y sur (Tabla. 1). Además, respecto a la riqueza y diversidad de Shannon por región, los valores más altos se encontraron en la zona del Caribe y la CL (Figura 8).

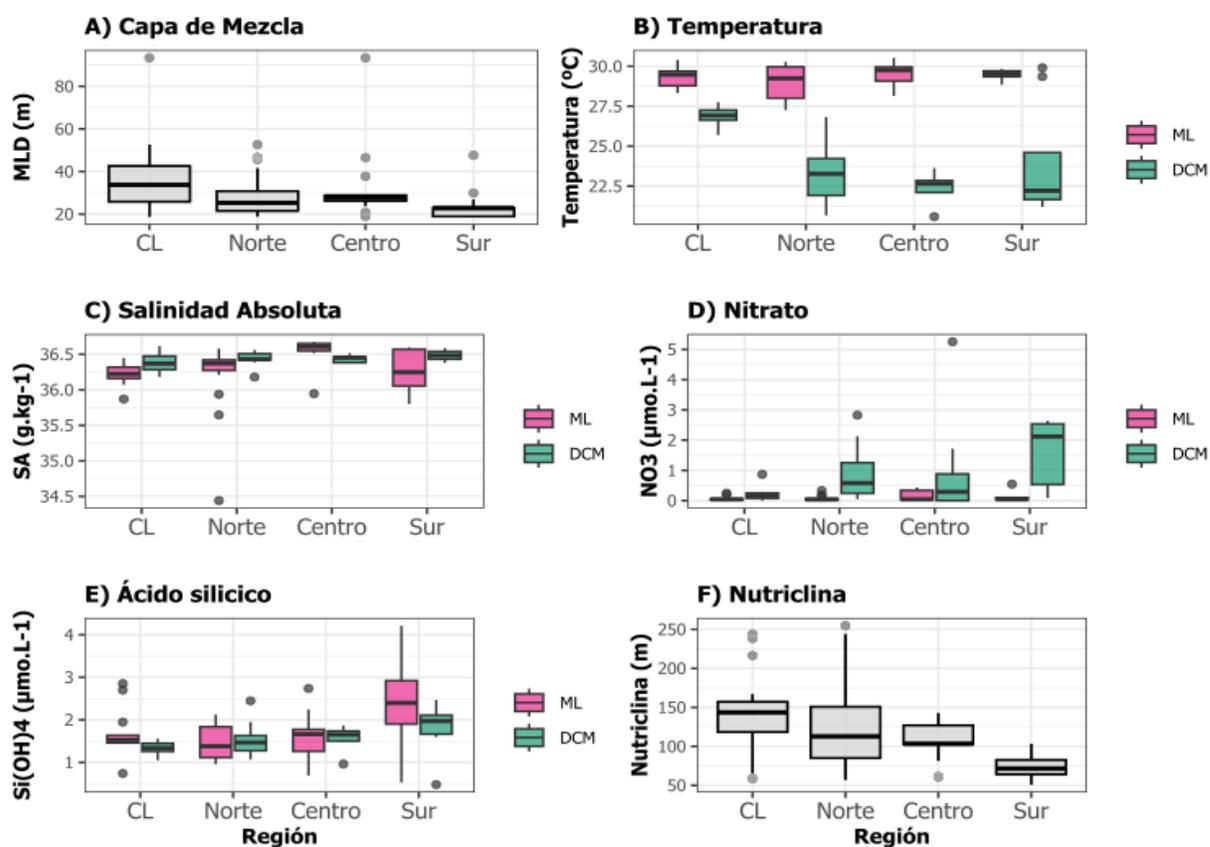


Figura 5. Promedio de las condiciones ambientales observadas en el agua superficial (ML, capa de mezcla) y subsuperficial (DCM, máximo de fluorescencia) durante las cuatro campañas oceanográficas XIXIMI realizadas en época cálida en la región oceánica del golfo de México. A) CM (m), B) temperatura (°C), C) salinidad absoluta (SA) (g kg⁻¹), D) nitrato (μmol kg⁻¹), E) ácido silícico (μmol kg⁻¹), F) nutriclina (m, profundidad de distribución de la isopícnica 25.5). En cada panel las muestras se agrupan en estaciones de la corriente en Lazo (CL, norte, centro y sur). Los diagramas de cajas y bigotes indican la mediana (línea horizontal dentro de la caja), rango intercuartil (caja), mínimos y máximos (bigotes verticales) y valores atípicos (puntos) de cada variable por región y en cada nivel de profundidad. Los colores verde y rosa representan los niveles del DCM y la ML, respectivamente.

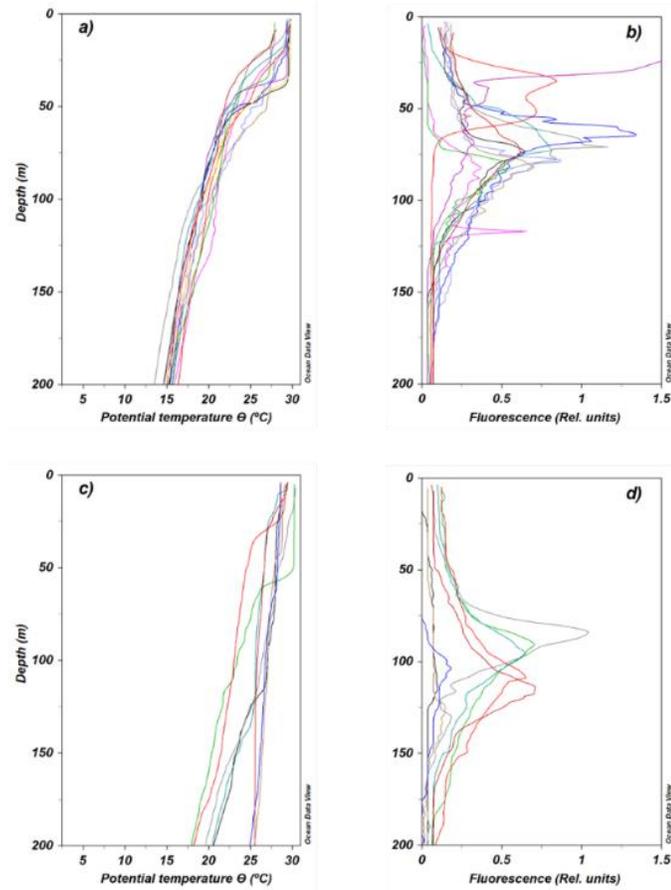


Figura 6. Perfiles de temperatura potencial (Θ ; °C; izquierda) y fluorescencia (RFU derecha) en condiciones ciclónicas (a y b) comparadas con condiciones anticiclónicas (c y d).

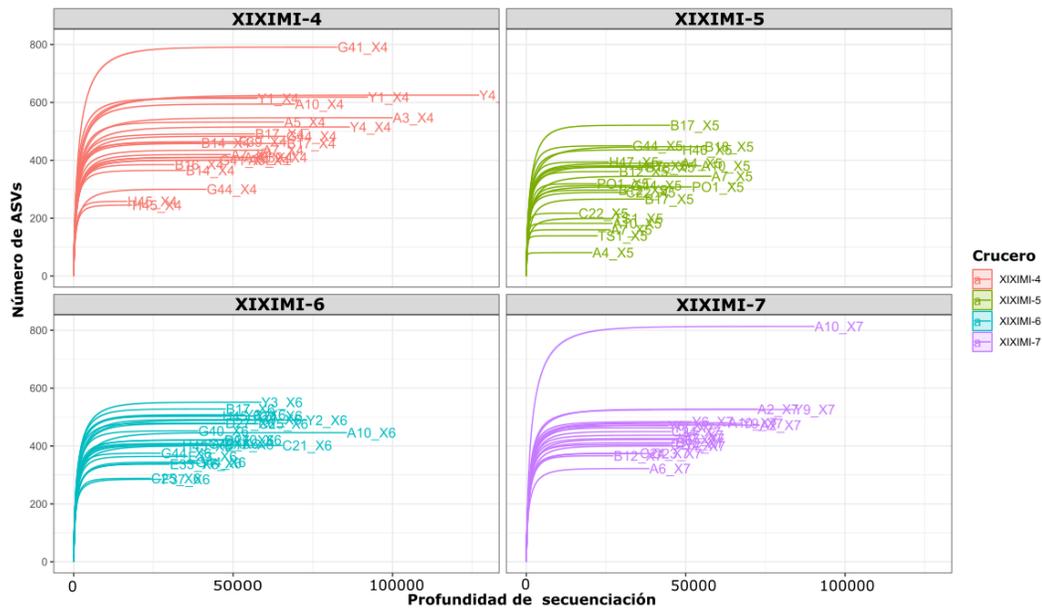


Figura 7. Gráfica de curvas de rarefacción por muestra agrupado por cruce: XIXIMI-4, XIXIMI-5, XIXIMI-6 y XIXIMI-7.

Tabla 1. Análisis de varianza de los índices de diversidad de Shannon y de riqueza (ASVs observados) con respecto a las variables categóricas de profundidad, crucero y mesoescala.

Análisis de varianza ANOVA			
	df	F-value	p-value
Shannon - profundidad	1	0.062	0.804
Shannon - Crucero	3	8.702	0.000***
Shannon-Región	3	3.908	0.011*
Shannon-Mesoescala	2	1.138	0.325
Riqueza- Crucero	3	8.702	0.000***
Riqueza-Región	2	2.782	0.045*
Riqueza-Mesoescala	2	0.51	0.602

(Significancia: $p < 0$ ***; $p < 0.001$ **; $p < 0.01$ *)

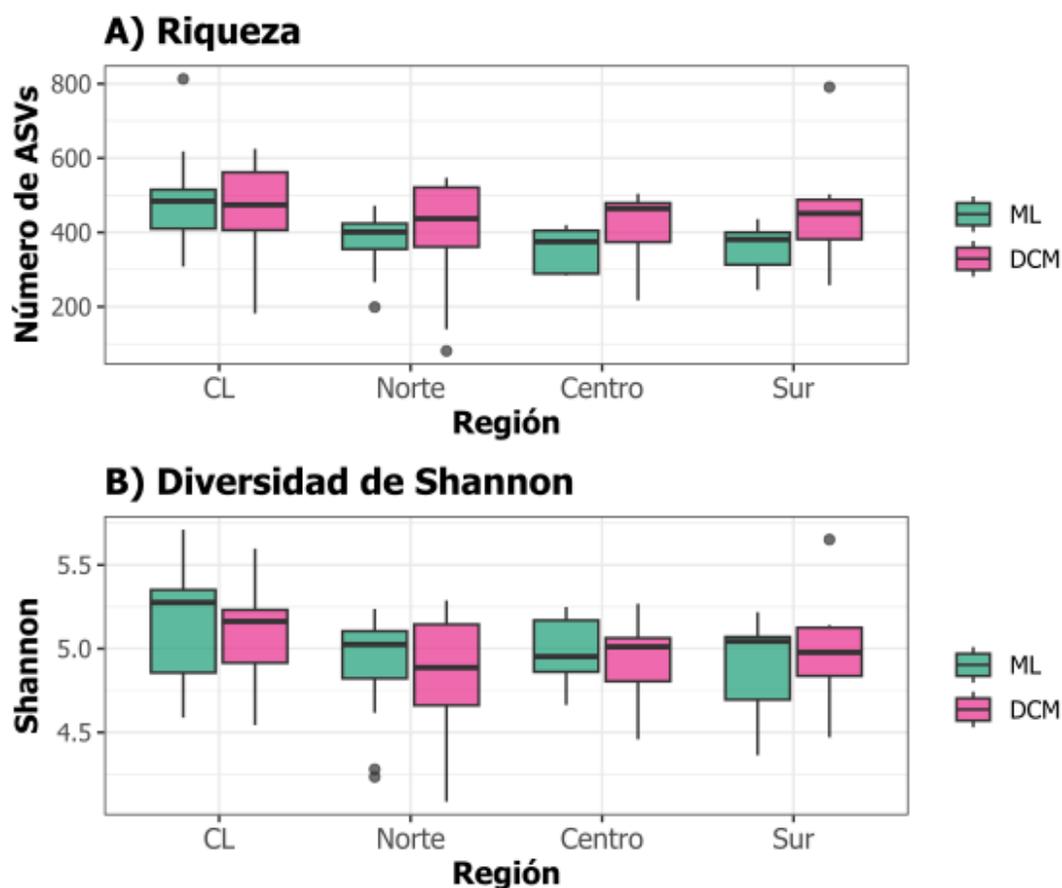


Figura 8. Índices basados en ASVs de (A) riqueza de especies e índice (B) de diversidad de Shannon en la capa de mezcla (ML, color rosa) y en el máximo de fluorescencia (DCM, color verde), en la región norte, centro, sur y las estaciones dentro de la corriente de Lazo y el Caribe (CL).

El patrón de abundancia fue distinto entre ML y DCM, aunque, en ambas profundidades, el supergrupo Alveolata fue el más abundante con un total de 1 581 626 lecturas (70%) en la ML y 1 224 638 (54%) en DCM (Figura 9). En la ML el supergrupo Stramenopiles conformó el 14% del total de las lecturas seguido del supergrupo Hacrobia con un 10%.

En DCM, el patrón de abundancia relativa cambió, ya que después de Alveolata, Rhizaria (20 %) fue el supergrupo con mayor número de lecturas, seguido de Stramenopiles (13%). El supergrupo Hacrobia disminuyó a un 7% el número de lecturas en esta profundidad.

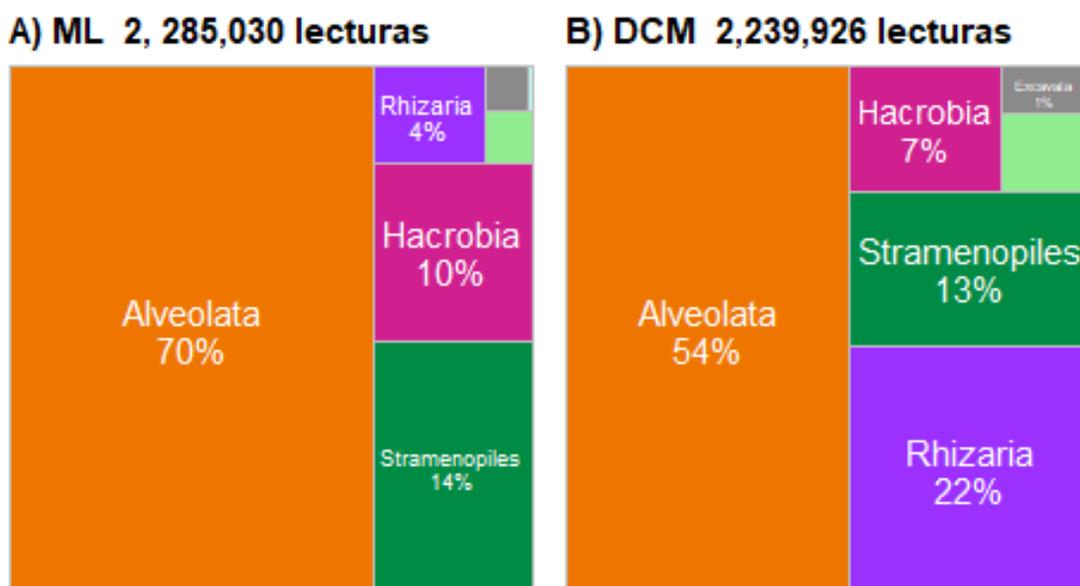


Figura 9. Proporción de lecturas por filo en las profundidades de estudio: ML y DCM.

Excluyendo Alveolata, la diversidad en la ML fue dominada por MAST (Marine Stramenopiles) (Figura 10a). Dentro de este grupo, MAST-1D (13% en promedio) fue el que presentó un mayor porcentaje, con valores máximos de 25 y 26% en las estaciones G40 del crucero XIXIMI-6 y Y7 del crucero XIXIMI-7, seguido de los géneros MAST-1C (4%), MAST-4B (5%), MAST-3E (5%) y MOCH-5(6%). El segundo grupo con mayor abundancia relativa en la ML fue el super grupo Hacrobia, observándose una mayor proporción Prymnesiaceae (Familia) (13% en promedio) con un máximo de 25% en la estación A10 del crucero XIXIMI-5 y, en menor proporción, los géneros *Chrysochromulina* (5%), *Braarudosphaera* (4%) y *Gephyrocapsa* (2%).

Con respecto a las diatomeas (Figura 10A), el orden Bacillariophyta y la familia Raphid-Pennate tendieron a presentar bajas abundancias, presentaron en promedio de 3 y 4% en la ML. Sin embargo, los ASVs asignados como Bacillariophyta presentaron altas abundancias en las estaciones G41, G44 y H45 del crucero XIXIMI-4 en la región sur (estaciones asociadas a estructuras ciclónicas) con abundancias de 40%, 26% y 53% respectivamente. Por otro lado, los ASVs asignados a la familia Raphid-Pennate presentaron una abundancia máxima de 45% en la estación TS-1 del crucero XIXIMI-5 (Figura 10^a), Esta localidad estuvo asociado a un CE y las condiciones oceanográficas mostraron influencia costera en la columna de agua.

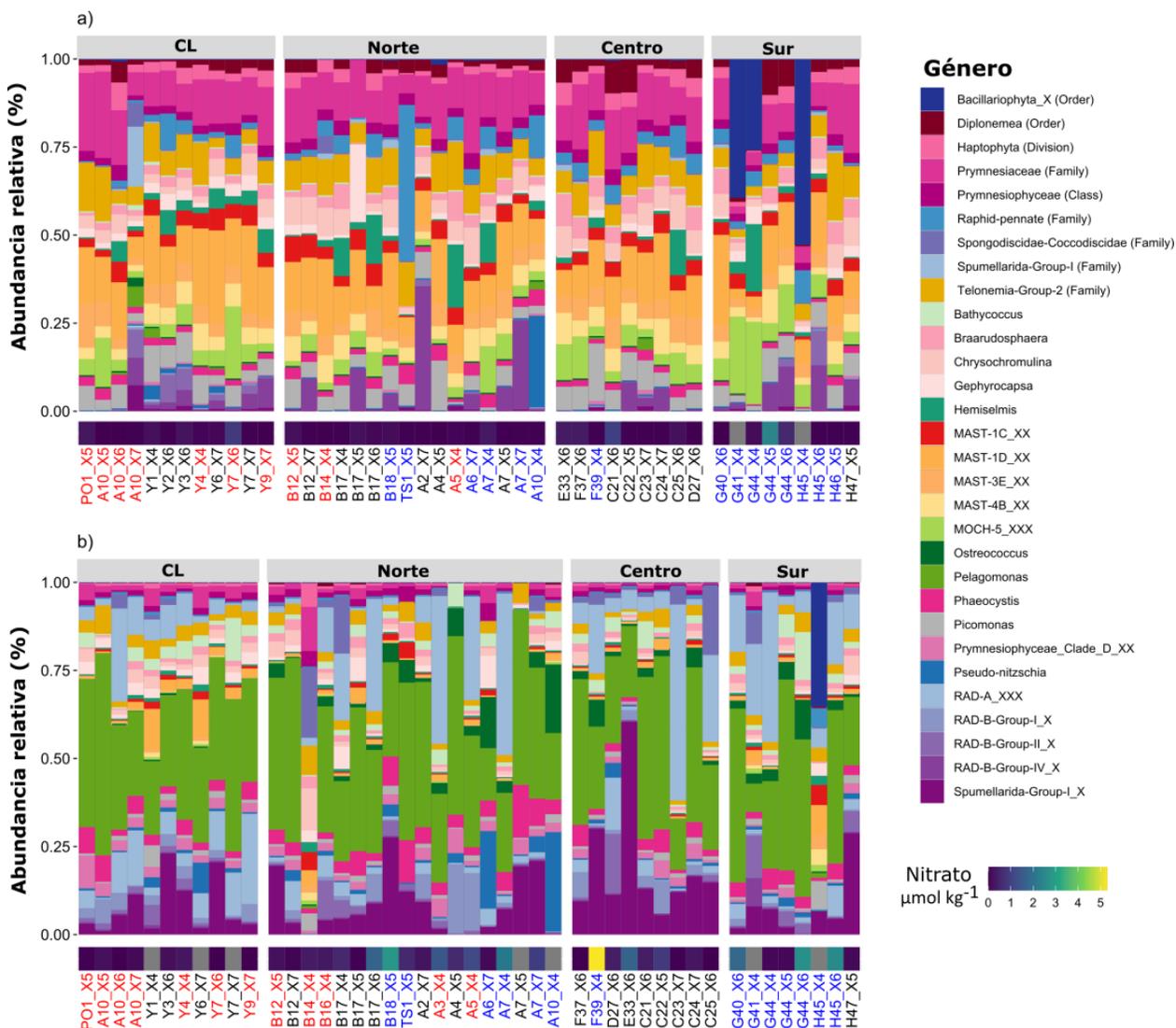


Figura 10. Abundancia relativa de los principales grupos de protistas, excluyendo Alveolata, en A) la capa de mezcla (ML) y B) el máximo de fluorescencia (DCM). Las estaciones de muestreo se ordenaron por regiones: estaciones dentro de la corriente de Lazo y canal de Yucatán (CL), norte (región al norte de la Zona Económica Exclusiva de México (ZEE), centro (centro del golfo de México GdM), y sur (bahía de Campeche). El mapa de calor en la parte inferior de cada grafica de barras representa la concentración de nitrato, el color gris indica la ausencia de datos. Las estaciones etiquetadas en azul se asocian a estructuras ciclónicas y las de color rojo con estructuras anticiclónicas.

En contraste, la abundancia en el DCM, sin incluir Alveolata (Figura 10b), fue dominado por el género *Pelagomonas* con una abundancia promedio de 33% y un máximo de 58% en la estación A10 del crucero XIXIMI-5. En segundo lugar, el ASV Spumellarida-Group-I presentó una abundancia promedio de 12% y un máximo de 61% en la estación E33 del crucero XIXIMI-6. En menor porcentaje se presentaron abundancias relativas promedio los radiolarios de los clados ambientales RAD-A (4.4%), RAD-B- Group-II (2.2%), RAD-B-Group-I (2.7%). En esta profundidad del DCM se observó un aumento de la abundancia relativa promedio del género *Phaeocystis* (4.2%) comparado con superficie.

La abundancia relativa promedio de *Ostreococcus* fue baja (3%), presentó máximos de 20% en la estación A10 del crucero XIXIMI-4 y 15% en la estación A6 de XIXIMI-7 (estaciones asociadas a estructuras ciclónicas y frentes). Además, *Ostreococcus* (Figura 11A) fue el único género que mostró un aumento significativo de la abundancia en las estructuras ciclónicas además de mostrar diferencias significativas entre las estructuras ciclónicas vs anticiclónicas ($p=0.00069$) (Figura. 11A). También la abundancia relativa del género *Ostreococcus* (perteneciente a las Mamiellales) tendió a aumentar significativamente cuando la nutriclina fue somera ($r_s = -0.47$, $p = 0.00099$, Figura 11B).

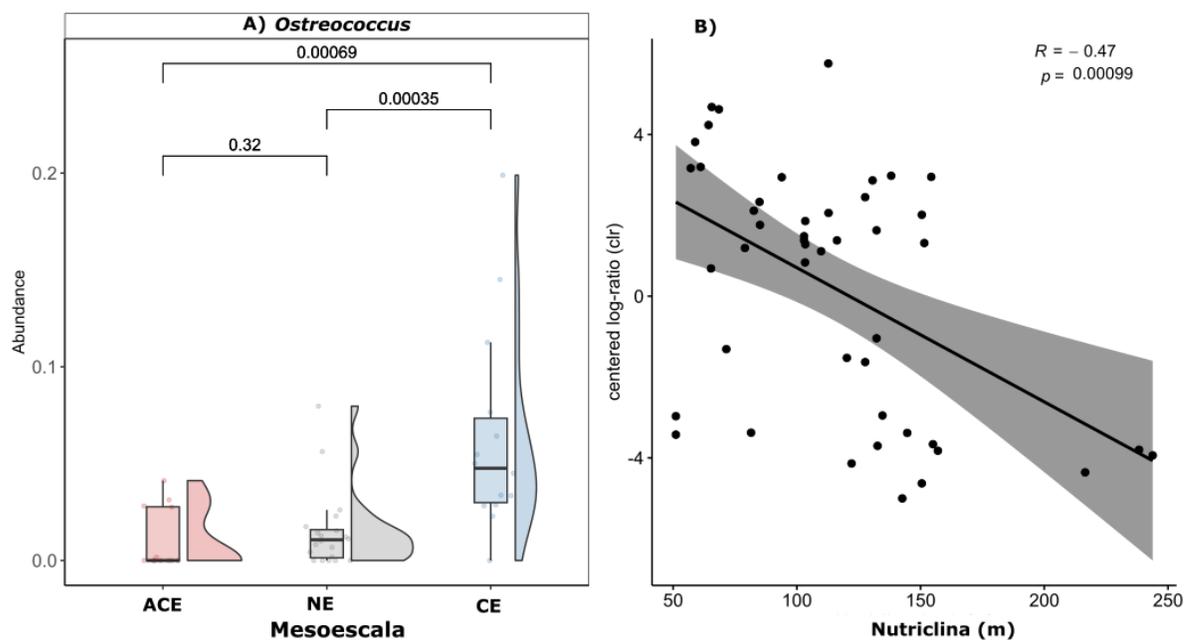


Figura 11. A) Gráfico de bigotes de la abundancia promedio del género *Ostreococcus* comparando las variables categóricas remolino anticiclónico (ACE), remolino ciclónico y sin remolino (NE). B) Correlación de Spearman de la abundancia de *Ostreococcus* con la profundidad de la nutriclina.

2.6.1 Relación de las variables ambientales con la comunidad de microeucariotas

En el análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en distancias de Aitchison mostró que la comunidad de microeucariotas se agrupó principalmente en relación con la profundidad (Figura 12). Las muestras de la ML formaron un grupo con mayor similitud comparado con DCM que presentaron una distribución más dispersa.

El resultado se robustece con el análisis de PERMANOVA con el cual se obtuvieron las mayores diferencias significativas con respecto a la profundidad, indicando que esta fue la variable que explica la mayor variabilidad de la composición de especies (PERMANOVA, $R^2 = 0.38$, $p = 0.001^{**}$, Tabla 2).

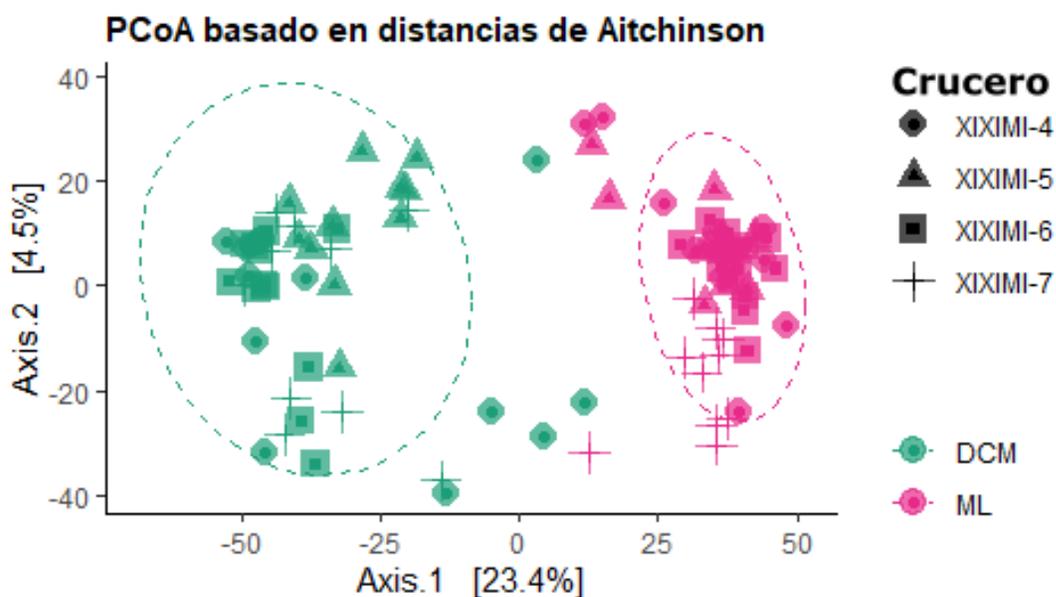


Figura 12. Análisis de coordenadas principales basado en distancias de Aitchinson agrupados por los estratos de profundidad. El color indica la profundidad (rosa ML y verde DCM) y la simbología en los puntos de datos indica el crucero.

Al observar que la comunidad se separaba por profundidades (Figura 12), se analizaron las muestras de la ML y DCM independientemente y con relación a las variables categóricas: crucero, región y mesoescala. En la ML los resultados del PERMANOVA (Tabla. 2) mostraron que la comunidad fue significativamente distinta entre cruceros ($p = 0.001$, $R^2 = 0.18$, $F = 3$), y entre regiones ($p = 0.001$, $R^2 = 0.12$, $F = 1.8$).

La variable mesoescala también fue significativa, aunque explica con un porcentaje menor la variabilidad de la comunidad ($p=0.002$, $R^2=0.07$, $F=1.7$). Al realizar el análisis por pares de la variable crucero y región se observó que el crucero XIXIMI-5 y la región de la corriente de Lazo y el caribe (LCs) fueron las que aportaron las diferencias significativas en la ML (Tabla. 4).

En el DCM, el análisis de betadispersión mostró que las variables crucero y región no cumplieron con el supuesto de homogeneidad, ya que la betadispersión fue significativa en ambas variables. Sólo la variable mesoescala cumplió con el supuesto de homogeneidad. La mesoescala explicó el 11% de la variabilidad (Tabla 3 y 5).

Tabla 2. Muestra el análisis de PERMANOVA de la comunidad en la ML y DCM con respecto a las variables categóricas crucero, región y profundidad.

	R^2	F	p
ML - Crucero	0.18	3.0	0.001 ***
ML - Región	0.12	1.8	0.001 ***
ML- Mesoescala	0.07	1.7	0.002**
DCM - Crucero	0.12	1.6	0.001 ***
DCM - Región	0.14	1.9	0.001 ***
DCM - Mesoescala	0.11	2.2	0.001 ***

(Significancia: $p < 0$ ***; $p < 0.001$ **; $p < 0.01$ *)

Tabla 3. Análisis ANOVA de la betadispersión por profundidad de A) capa de mezcla (ML) y B) máximo de fluorescencia (DCM) por variables categóricas.

A) ANOVA BETADISPER ML		
	F	p
Crucero	1.4388	0.23
Región	1.7604	0.173
Mesoescala	1.6954	0.183
B) ANOVA BETADISPER DCM		
	F	p
Crucero	3.0909	0.035 *
Región	3.9424	0.016 *
Mesoescala	0.1568	0.85

(Significancia: $p < 0$ ***; $p < 0.001$ **; $p < 0.01$ *)

Tabla 4. Comparaciones pareadas de las variables categóricas A) crucero, B) región y C) mesoescala de la ML (999 repeticiones).

A) Comparación cruceros	R²	p	p. ajustado
XIXIMI-5 vs XIXIMI-6	0.10	0.001	0.006*
XIXIMI-5 vs XIXIMI-4	0.12	0.001	0.006*
XIXIMI-5 vs XIXIMI-7	0.15	0.001	0.006*
XIXIMI-6 vs XIXIMI-4	0.07	0.024	0.144
XIXIMI-6 vs XIXIMI-7	0.16	0.001	0.006*
XIXIMI-4 vs XIXIMI-7	0.21	0.001	0.006*
B) Comparación región	R²	p	p. ajustado
CL vs Norte	0.08	0.001	0.006*
CL vs Centro	0.10	0.001	0.006*
CL vs Sur	0.13	0.001	0.006*
Norte vs Centro	0.05	0.298	1
Norte vs Sur	0.06	0.092	0.552
Ccentro vs Sur	0.08	0.249	1
C) Comparación mesoescala	R²	p	p. ajustado
ACE vs NE	0.05	0.039	0.117
ACE vs CE	0.10	0.001	0.003*
NE vs CE	0.04	0.068	0.003*

(Significancia: $p < 0$ ***; $p < 0.001$ **; $p < 0.01$ *)

Tabla 5. Comparaciones pareadas de la variable categórica Mesoescala del máximo de fluorescencia (DCM) (999 repeticiones).

Comparación Mesoescala	R ²	p	p. ajustado
ACE vs NE	0.07	0.002	0.006*
ACE vs CE	0.06	0.001	0.003*
NE vs CE	0.17	0.001	0.003*

(Significancia: $p < 0$ ***; $p < 0.001$ **; $p < 0.01$ *)

Con el análisis de dbRDA se observó que en la ML las variables de silicio, temperatura, oxígeno, latitud y salinidad tuvieron un efecto significativo ($p=0.001$) sobre la variabilidad explicada de la comunidad, aunque, solo explicó el 15% de esta variabilidad (Figura 13a). Para DCM, el modelo de dbRDA también fue significativo ($p= 0.001$), sin embargo, en este caso solo las variables de nitrato y temperatura tuvieron un efecto significativo sobre la variabilidad de la comunidad de microeucariotas, no obstante, solo explicó un 10.6% de la variabilidad (Figura 13b).

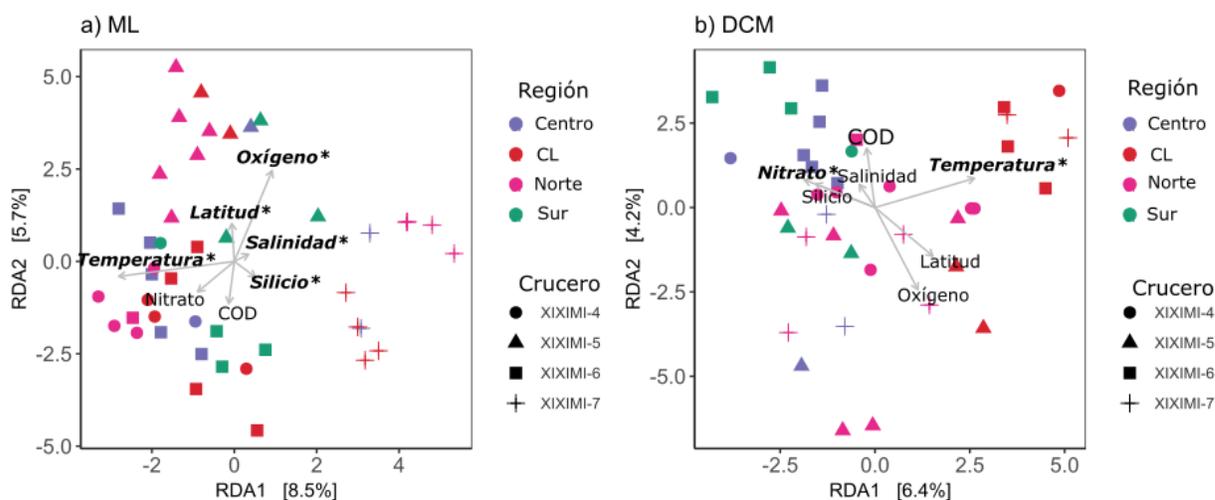


Figura 13. Análisis de redundancia basado en distancias. A) Análisis de redundancia basado en distancias de la capa de mezcla (ML) y B) Análisis de redundancia basado en distancias de la profundidad del máximo de fluorescencia (DCM). Cada punto representa una estación y el color del punto indica el crucero y la forma indica el crucero. Las variables ambientales que se correlacionan significativamente con la comunidad están indicadas en negritas y marcadas con asterisco.

Del análisis de sPLS de cada uno de los principales grupos de microeucariotas con respecto a los

parámetros ambientales, se encontró que la comunidad se separó en dos grandes grupos con un patrón opuesto de correlación (Figura 14). El primer grupo representado por *Ostreococcus*, *Pelagomonas*, *Bathycoccus*, RAD-B-Group-II, RAD-A y Spumellarida presentaron una correlación negativa con la temperatura (-0.75) y una correlación positiva con el nitrato (0.45 - 0.50). El segundo grupo, presentó una correlación positiva con la temperatura (0.75 - 0.60) y negativa con el nitrato (-0.45) y estuvo compuesto por Diplonemea, MOCH-5, MAST-4B, MAST-3E, MAST-1D, Raphid-pennate, *Picomonas* y Prymnesiaceae. Las microeucariotas como Bacillariophyta, Gephyrocapsa, Braarudosphaera, Crysochromulina, Hemiselmis y Haptophyta presentaron valores bajos de correlación (< 0.40) con respecto a las variables ambientales. Por otro lado, los ASVs con mayor abundancia en la ML (Figura. 14b) fueron MAST-3, MAST-4, MOCH-5, RAD-D-Group IV y Raphid pennate (diatomeas) y en el DCM los ASVs con mayor abundancia diferencial fue *Ostreococcus*, *Phaeocystis*, *Bathycoccus*, *Pelagomonas* y RAD-A.

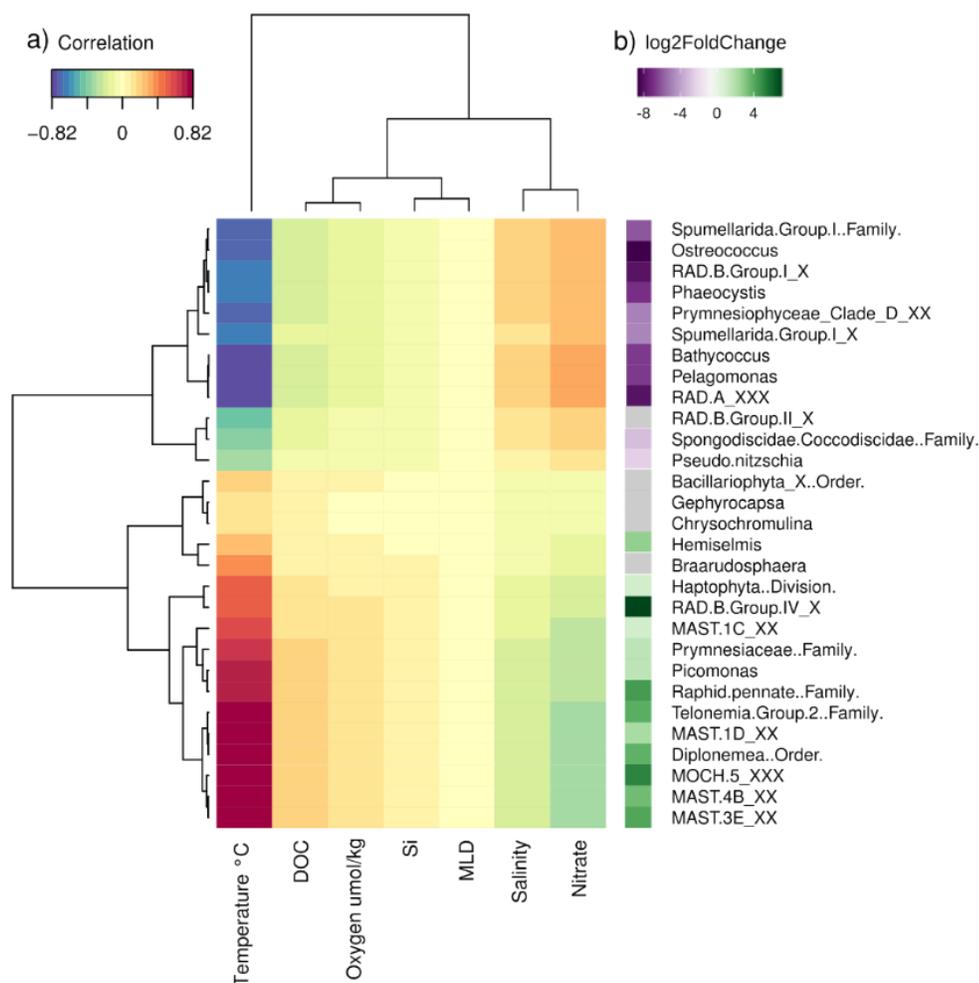


Figura 14. Mapa de calor de A) la correlación entre los microeucariotas, excluyendo Alveolata, y los parámetros ambientales. Se consideran altas correlaciones valores > 0.4 y < -0.4. B) Abundancia diferencial de los principales microeucariotas (ASVs) expresada en fold-change (log2) con diferencias significativas entre la capa de mezcla (ML, valores positivos) y el máximo profundo de clorofila (DCM, valores negativos).

2.6.2 Análisis de co-ocurrencia

Se realizó un análisis de co-ocurrencia para ambas profundidades (ML y DCM) con la finalidad de identificar las potenciales asociaciones entre taxones, o entre grupos de taxones (nichos), a partir de un análisis composicional con un modelo de inferencia gráfico. En la ML se obtuvieron un total de 817 interacciones/bordes a partir de 237 nodos/ASVs, con un total de 571 interacciones positivas y 246 negativas y modularidad de 0.49 indicando que la red es dispersa. Las especies clave (*hub species*) se obtuvieron para la profundidad de ML, a partir de un umbral de *degree* de 10 y *closeness* de 700. La métrica de *degree* indica que entre mayor es el número de interacciones/bordes contenga un nodo/ASV mayor es el *degree*. La métrica *closeness* indica que tan central es el nodo/ASV, y es la distancia media más corta de cada nodo/ASV a otro nodo/ASV. Para la profundidad de DCM se obtuvieron un total de 829 interacciones/bordes a partir de 319 nodos/ASVs (Figura 14b), con un total de 514 interacciones positivas y 315 interacciones negativas y un modularidad de 0.48 con un total de 9 subredes formadas, de las cuales solo 2 conformaron el 17.5% de los nodos, el 11.7% de las interacciones y 5 de 9 especies clave. En ambas profundidades la mayor proporción de relaciones negativas y positivas probablemente se deba a predación por parte de los dinoflagelados (Figura 15 y 16), seguida del parasitismo (Figura 15). Aunque el ASV varió con respecto a la profundidad, en la capa de mezcla el ASV con mayor proporción y función de parasitismo fue MAST-3 y en el DCM fueron los Syndiniales (Figura 15). Las especies clave principalmente (Tabla 6) fueron mixotrófico, heterótrofo y parasitismo.

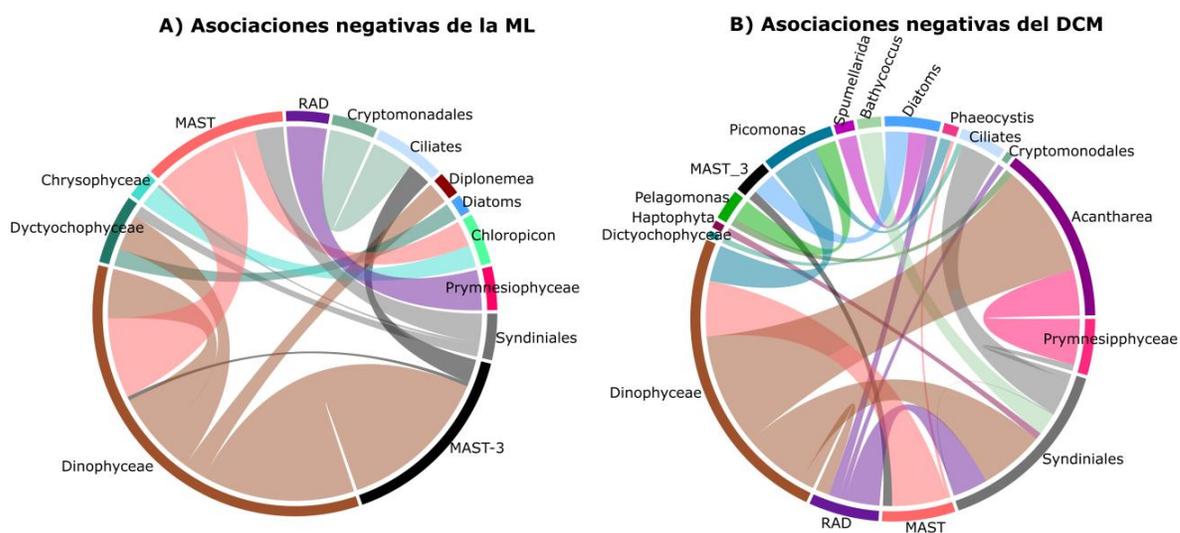


Figura 15. Red de asociaciones negativas de los protistas en A) la capa de mezcla (ML) y B) el máximo de fluorescencia (DCM). Las cintas representan la proporción de nodos/ASVs.

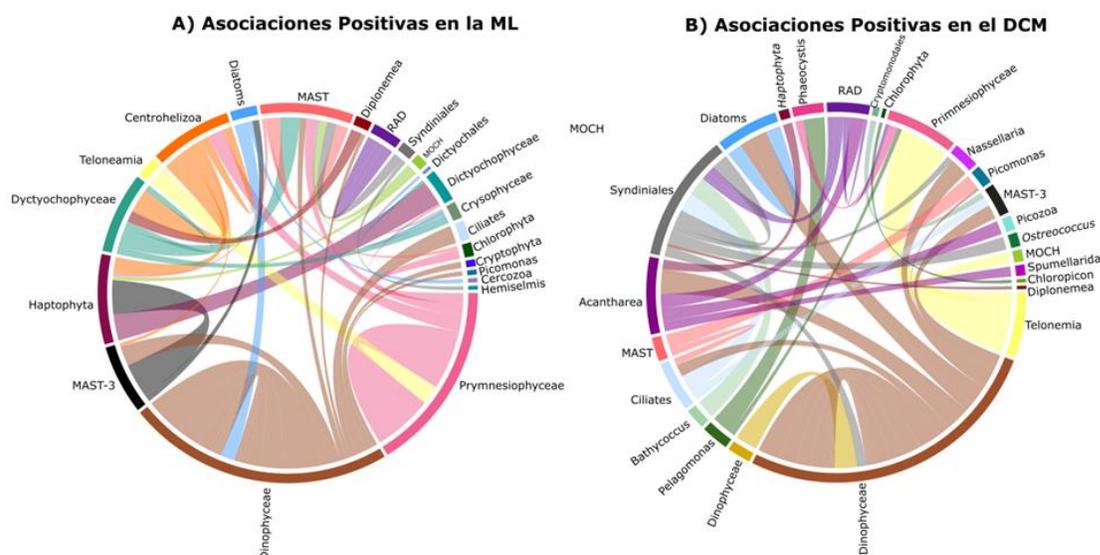


Figura 16. Red de asociaciones positivas de los protistas en A) la capa de mezcla y B) el máximo de fluorescencia (DCM). Las cintas representan la proporción de nodos/ASVs.

Tabla 6. Lista de especies clave con un alto *Degree* (>10) y un alto *Betweenness* (>700) con su anotación funcional de acuerdo con Ramond et al. (2021).

ML				
TaxID	Degree	Betweenness	Función	
ASV_00439:Chrysophyceae_Clade-H_X	15	1906	Fotótrofo	
ASV_00308:Pedinellales_X	14	944	Mixótrofo	
ASV_00298:Dictyochales_X	12	1205	Mixótrofo	
ASV_00425:MAST-3I_XX	12	1768	Parásito	
ASV_00754:MAST-8B_XX	12	825	Heterótrofo	
ASV_00039:g_Gymnodiniaceae	11	1241	Mixótrofo	
ASV_00131:MAST-3E_XX	11	1130	Parásito	
ASV_00215:f_Diplonemea	11	1132	Heterótrofo	
ASV_00987:Chlorarachnion	11	1557	Mixótrofo	
ASV_01050:Dino-Group-II-Clade-7_X	11	1543	Parásito	
ASV_02051:Tiarina	11	1468	Heterótrofo	
DCM				
TaxID	Degree	Betweenness	Función	
ASV_00233:MAST-3A_XX	17	2614	Parásito	
ASV_02714:Bacteriastrium	13	1956	Fotótrofo	
ASV_00150:RAD-B-Group-I_X	12	1661	Heterótrofo	
ASV_00897:g_Chlorarachnida_X	12	1075	Mixótrofo	
ASV_00008:Pelagomonas	11	1221	Fotótrofo	
ASV_00308:Pedinellales_X	11	1228	Mixótrofo	
ASV_00538:MAST-4A_XX	11	1657	Heterótrofo	

2.7 Discusión

Este trabajo es uno de los primeros esfuerzos por caracterizar la estructura de la comunidad de los microeucariotas del GdM y entender qué factores ambientales modulan la comunidad de protistas marinos. Esta investigación se realizó mediante la secuenciación de una región taxonómicamente informativa de ADN ambiental o metabarcoding con muestras obtenidas a dos niveles de profundidad (ML y DCM). El trabajo se realizó durante la época cálida, en la región oceánica del sur del GdM, y en dos profundidades. Los resultados mostraron una comunidad muy distinta entre la ML y el DCM asociado a la fuerte estratificación en verano. Sin tomar en cuenta a Dinoflagellata, dominaron los picoeucariotas heterótrofos MAST en la ML, y los picoeucariotas fotosintéticos en el DCM. Además, las asociaciones potenciales con mayor porcentaje fueron las de predación y parasitismo.

2.7.1 Estructura de la comunidad de los eucariotas microbianos

Los valores altos de diversidad (índice de Shannon) en promedio se registraron en la región dentro de la CL en ambas profundidades, coincidiendo con valores altos de temperatura (29 °C), salinidad superficial (36 g kg⁻¹) y una capa de mezcla promedio de 30 m. A escala global la diversidad de los protistas tiende a aumentar de los polos hacia la zona subtropical impulsada principalmente por la temperatura (Ibarbalz et al., 2019). Aunque las condiciones oceanográficas y la baja productividad primaria también tienen un efecto importante sobre la comunidad a escala global (Raes et al., 2018). Los resultados obtenidos coinciden con los patrones previamente descritos para la región del mar de Sargazos, donde se ha observado un aumento de la diversidad y riqueza de estas comunidades durante las condiciones cálidas y oligotróficas de verano (Blanco-Bercial et al., 2022). También ha sido observado una alta diversidad y riqueza en la columna de agua de la corriente del golfo (*Gulf Stream*, nombre que se da a la corriente del Lazo en aguas estadounidenses) (Countway et al., 2007), el cual es una corriente que transporta agua cálida y muy oligotrófica.

Las diferencias significativas que observamos en la variable categórica “región” en la ML se debieron a la alta diversidad que se encontró dentro de la CL, comparado con las regiones más interiores del golfo, donde no se encontraron diferencias significativas. Esto podría deberse a que en la superficie del océano la alta variabilidad de las condiciones ambientales como luz, corrientes, vientos entre otros, crean un ambiente heterogéneo asociado a cambios en las condiciones locales en superficie (Junger et al., 2022; Sun et al., 2023). Por ejemplo, la composición distinta entre las masas de agua dentro de la corriente de

lazo (principalmente CSW, *Caribbean Surface Waters*, 0-150 m de profundidad, isopícnica superficial de 23.5-25 kg m⁻³) con respecto a la composición de las masas de agua dentro del GdM (GCW, Gulf Common Water, 0-150m, isopícnica 25-26 kg m⁻³) en la porción superficial/subsuperficial (Portela et al., 2018). Los cambios entre mezcla en invierno en la columna de agua dentro del GdM, generan una mezcla de masas de agua que pueden aflorar a la superficie por efecto del viento (por ejemplo GCW) con agua que entra al golfo en forma de remolino anticiclónico (masa de agua CSW). Esta agua podría quedar “atrapadas” en la capa de mezcla durante el periodo de estratificación, por lo que se pueden generar condiciones más homogéneas dentro del GoM, comparado con la corriente de lazo que llega enriquecida de la masa de agua CSW en superficie (Cervantes-Díaz et al., 2022). Por lo tanto, la variabilidad regional de la comunidad ve reflejado en una comunidad homogénea dentro GoM y significativamente distinta a la composición dentro de la CL.

Por otro lado, encontramos un vínculo significativo entre la comunidad de protistas y la variable categórica crucero, que puede deberse a variabilidad estacional ya que las muestras se colectaron durante verano y a finales de primavera. En el GdM las principales fuentes de variación estacional se deben cambio de alta estratificación en verano a condiciones de mezcla en invierno (Damien et al., 2018; Muller-Karger et al., 2015), y la variabilidad de la intensidad de intrusión de la CL (Delgado et al., 2019). Los cruceros XIXIMI-5 y XIXIMI-7 marcaron diferencias significativas al analizar las muestras pareadas. La presencia en bajas abundancias (< 3%) de los picoeucariotas *Pelagomonas* y *Ostreococcus* en la ML durante el crucero XIXIMI-7 (finales de primavera) puede ser indicador de la reminiscencia de la mezcla de invierno, comparado con los cruceros realizados en verano, donde estas especies se encontraron solo en DCM.

El análisis de NMDS mostró que la comunidad se separaba por profundidad y que las muestras de la ML presentaron una mayor similitud entre sí. La profundidad es un factor importante que influye en la estructura de la comunidad, que ha sido reportado en diferentes regiones oceánicas en el Atlántico y Pacífico (Bolaños et al., 2021; Giner et al., 2020; Mars Brisbin et al., 2020; Ollison et al., 2021) y a escala global (de Vargas et al., 2015; Ibarbalz et al., 2019; Pierella Karlusich et al., 2020). Las condiciones opuestas de luz y nutrientes entre la ML y el DCM propician la disimilitud entre ambas profundidades. Sin embargo, cuando se analiza la estructura de la comunidad restringido a las condiciones ambientales con el análisis de RDA, estos solo explican el 15.8 % de la variabilidad en la ML. En contraste, en el DCM se observó que sólo la mesoescala tuvo efecto sobre la comunidad. Esto indican que la comunidad en el DCM responde a la profundidad de la de la nutriclina en DCM debido a que solo el nitrato y las temperaturas fueron las variables que influyeron significativamente a la comunidad en el DCM.

El bajo porcentaje de la variabilidad explicada en ambas profundidades, indican que el control “top-down” como el pastoreo por microzooplancton, mixotrófia, infección por virus, simbiosis u otras interacciones son un componente importante que también están moldeando la estructura de la comunidad en ambas profundidades (Calbet and Landry, 2004; Caron et al., 2016; Lima-Mendez et al., 2015; Worden et al., 2015).

2.7.2 La división de Alveolata es muy abundante en la zona eufótica

Alveolata es un componente importante del microzooplancton y que presenta una alta diversidad trófica (Massana, 2011a; E. Sherr & Sherr, 1988). En este estudio, Alveolata representó el 70 % del total de las lecturas en la ML. La clase Dinophyceae fue muy abundante y diversa (1 313 ASVs) tanto en la ML como en el DCM. Si bien, el mejor marcador para Dinoflagellata es la región V2 (Ki, 2012), el marcador de la región V9 tiene una mayor representación en las bases de datos y nos permite una identificación más amplia (de Vargas et al., 2015; Geisen et al., 2019; Le Bescot et al., 2016). Además, es un marcador sensible a la biosfera rara lo que permite detectar una mayor riqueza a niveles taxonómicos como familia y género (Choi & Park, 2020). A nivel género *Gymnodinium sp.* fue el más abundante en ambas profundidades, coincidiendo con lo reportado para la región oceánica subtropical con el marcador V9 (de Vargas et al., 2015; Le Bescot et al., 2016). Aunque se espera una sobre estimación de la abundancia por el alto número de copias del gen rRNA, las abundancias relativas de las lecturas se correlacionan con el biovolumen y biomasa en términos de contenido de carbono (Gong et al., 2013; Y. Liu et al., 2021; Zhu et al., 2005). Los datos obtenidos a partir de mediciones al microscopio en la región oceánica del GdM reportan que *Gymnodinium* conforma el 55 % de la biomasa en verano con tamaños de células < 20 µm (Linacre et al., 2021). Es un género heterótrofo que se asocia a la mortalidad por pastoreo del fitoplancton al norte del GdM y en regiones oligotróficas del Atlántico subtropical (Quevedo & Anadón, 2001; Strom & Strom, 1996).

En contraste, la clase de Alveolata que corresponde a los Syndiniales, presentó bajas abundancias. Estos microorganismos son parásitos que infectan a otros protistas y copépodos y forman parte del picoplancton (Guillou et al., 2008). En regiones oceánicas éstos tienden a aumentar su abundancia a medida que aumenta la profundidad (Giner et al., 2019; Ollison et al., 2021). A pesar de la baja abundancia detectada, el análisis de co-ocurrencia mostró que el ASV_01050:Dino-Group-II-Clade-7_X fue una especie clave que se localiza en la zona fótica (Guillou et al., 2008). Al norte del GdM, la abundancia de Syndiniales se correlaciona positivamente con el aumento de la abundancia de copépodos, los cuales han sido

documentados como huésped de este grupo de zooplancton (Brannock et al., 2016). Durante la campaña XIXIMI-5, se ha reportado la dominancia la familia Calanidae (copépodos), uno de los principales hospederos de Syndiniales (Martinez et al., 2021). Aunque los detectamos en baja abundancia, los Syndiniales son un grupo altamente prevalente y diverso (270 ASVs), con importantes funciones para el ecosistema debido a que incorporan materia orgánica disuelta y particulada al bucle microbiano derivado de la lisis del huésped (Anderson & Harvey, 2020; Salomon et al., 2009).

2.7.3 Picoeucariotas heterótrofas tienen una abundancia estable en la zona eufótica

Después de Alveolata, los Marine Stramenopiles (MAST) fueron el grupo con mayor proporción de lecturas en la ML. Este grupo de picoeucariotas sin cultivar y heterótrofos consumen bacterias y picofitoplancton (Massana et al., 2014; Orsi et al., 2018). Comúnmente se han registrado con mayor abundancia en aguas superficiales (Giner et al., 2020; Obiol et al., 2020) y recientemente se ha reportado que requieren de luz para procesos metabólicos asociados a la heterotrofia, debido a la presencia de rodopsinas (Latorre et al., 2021). Los ASVs asociados a MAST-1D fueron los de mayor abundancia promedio y se correlacionaron positivamente con la temperatura. Además, presentaron una mayor abundancia diferencial (log2fold) en la ML, lo que sugiere su afinidad a ambientes cálidos y bien iluminados. Por otro lado, el ASV_00425:MAST-3I fue detectado como una especie clave y aunque fue poco abundante era muy diverso (27 ASVs). Este clado ambiental no cultivado se asocia al género *Solenicola*, parásito de la diatomea *Leptocylindrus* (Gómez et al., 2011) el cual es un clado ambiental abundante en regiones oligotróficas (Lin et al., 2021). Además, se ha documentado que *Prochlorococcus* es una de las principales presas de los linajes de MAST (Wilken et al., 2023), que MAST-4 consume *Synechococcus* (Lin et al., 2012) y que la principal función de MAST es el pastoreo de picofitoplancton (Jürgens & Massana, 2008; Massana, 2011). Por lo tanto, los datos sugieren que la presencia en el área de estudio de estos flagelados heterótrofos podrían mantener estables las poblaciones de bacterias y picoplancton en la ML de la región oceánica del GdM.

Las Haptofitas presentaron una mayor abundancia en la ML y una composición de especies distinta entre la ML y el DCM. Éstas son muy diversas y abundantes en las regiones oceánicas subtropicales (Cortés et al., 2001; Haidar & Thierstein, 2001; Liu et al., 2009). Al sur del GdM en la región de Campeche se ha observado mediante microscopía que las especies *Emiliana huxleyi* y *Gephyrocapsa oceánica* son un componente de igual o mayor importancia que las diatomeas en primavera (Durán-Campos et al., 2017; Hernández-Becerril et al., 2008), donde los cocolitofóridos presentan un ensamble de la comunidad muy distinto entre la superficie y la zona eufótica profunda (Baumann & Boeckel, 2013). Además, los análisis

de pigmentos fotosintéticos en la región profunda del GdM, han detectado a las Prymnesiophytas como el grupo más abundante en la zona eufótica después de *Prochlorococcus* (Selph et al., 2021). Desde el punto de vista biogeoquímico los cocolitofóridos, junto con los foraminíferos, forman los sedimentos biogénicos de carbonato de calcio, que representan entre un 25-50% en la región profunda del GdM (Ward, 2017). Esto los convierte en un componente esencial de la bomba biológica del carbono de este ecosistema (Balch, 2018).

En el presente estudio la mayoría de los ASVs se asignaron hasta nivel de división Haptophyta y familia Prymnesiaceae y esto puede deberse a que el marcador V9 no es el óptimo para la detección de Haptofitas comparado con otros como la región D1-D2 del gen 28S, que da una mejor resolución a nivel género, permitiendo detectar una mayor diversidad (Gran-Stadniczeňko et al., 2017). Los ASVs identificados como el género de *Gephyrocapsa* se encontraron presentes en ambas profundidades, pero los ASVs identificados como *Braarudosphaera* y *Chrysochromulina* mostraron bajas abundancias en la CM. Se conoce que ambos géneros forman simbiosis con las cianobacterias diazotróficas UCYN-A (Endo et al., 2018; Gérikas Ribeiro et al., 2018; Hagino et al., 2013). Por otro lado, *Chrysochromulina* fue un género muy diverso en la ML (se detectaron 64 ASVs). Este género es mixotrófico y suele optar por el pastoreo de bacterias en condiciones de altas irradiancias y limitación de fósforo (Hansen & Hjorth, 2002; Unrein et al., 2013). En contraste la prymnesiofita no calcificada *Phaeocystis*, presentó una alta abundancia diferencial (log2fold) en el DCM y se correlacionó positivamente con el nitrato y negativamente con la temperatura, lo que indica preferencia a condiciones afines al DCM (Sow et al., 2020; Sun et al., 2022). Las Haptofitas en la región oceánica del GdM podrían tener un rol importante regulando poblaciones de bacterias y otros protistas en la ML, como ocurre en otras regiones oligotróficas (Endo et al., 2018; Frias-Lopez et al., 2009) y estarían contribuyendo, probablemente, a la productividad primaria nueva en la ML por fotosimbiosis con cianobacterias diazotróficas (Krupke et al., 2015).

La abundancia relativa de las diatomeas tendió a ser baja en ambas profundidades y contraria a los patrones de distribución y abundancia típicos de regiones frías y ricas en nutrientes, en los que las diatomeas son muy abundantes y diversas (Ramond et al., 2021; Trefault et al., 2021). Se observó un aumento de abundancia en condiciones estratificadas y oligotróficas como en las estaciones G41, G44 y H45, que, aunque estuvieron asociadas a estructuras de mesoescala de tipo ciclónico, la capa de mezcla presentó una alta estratificación (Lee-Sánchez et al., 2022a; Linacre et al., 2019). Este patrón se ha detectado en regiones oceánicas, con una alta diversidad de los ribotipos de diatomeas (18S-V9) y se ha asociado a la adaptación a condiciones de alta estratificación (Malviya et al., 2016). En nuestro caso las adaptaciones que podrían darse en la ML son: extraer nutrientes de la nutriclina y migrar a niveles de luz

más altos regulando la flotabilidad, almacenamiento de nitrato en vacuolas o la simbiosis de diatomeas con cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, como ocurre en los géneros de diatomeas *Rhisozolenia* y *Hemiallus* asociados a la cianobacteria *Richellia* (Gómez et al., 2005; Kemp & Villareal, 2013, 2018; Villareal et al., 2014).

Los ASVs asignados como Raphid-Pennate aumentaron su abundancia en las estaciones A10-X4 y TS-1-X5, y presentaron una alta abundancia diferencial y una correlación positiva con la temperatura y negativa con el nitrato. Estas diatomeas penadas están adaptadas a vivir en los sedimentos y columna de agua, con una amplia tolerancia a las condiciones ambientales como luz y salinidad, con alto potencial de dispersión (Grippio et al., 2010; Kooistra et al., 2007; Piredda et al., 2018). En este caso, la comunidad probablemente podría haber sido transportada por ríos o por efectos de surgencias, como ocurre con la estación A10-X4 situada en el borde de la CL, y que podría estar influenciada por la pluma del río Mississippi que introduce agua con baja salinidad y rica en nutrientes hasta la región oceánica del GdM en el verano (Morey et al., 2003; Wawrik & Paul, 2004). Esto también se observó en la estación TS-1, la cual presentó baja salinidad ya que está influenciada por la descarga de los ríos en la plataforma de Veracruz y Tamaulipas (Martínez-López & Zavala-Hidalgo, 2009).

2.7.4 Las picoeucariotas responden al aporte de nitrato en el DCM

Excluyendo Alveolata, el género *Pelagomonas* fue de los ASVs más abundantes en el DCM asignado a nivel de especie, como *P. calceolata* (la única especie descrita para este género a la fecha). Esta especie presentó una alta abundancia diferencial (log₂fold) en DCM y se correlacionó positivamente con el nitrato y negativamente con la temperatura. Comúnmente se ha reportado este género mediante análisis de pigmentos, de amplicones y de genomas del cloroplasto en el DCM en regiones oceánicas y oligotróficas (Selph et al., 2021; Latasa et al., 2017; Wang et al., 2019; Worden et al., 2012) y en la superficie en condiciones de mezcla vertical (Choi et al., 2020; Rii et al., 2018). Su éxito ha sido atribuido a su capacidad para adaptarse a condiciones limitadas de hierro (Timmermans et al., 2005), bajas irradiancias (Dimier et al., 2009; Kang et al., 2021), y a su pequeño tamaño celular (1-3 μm) (Andersen et al., 1993). Su mayor relación de superficie-área-volumen les permite tomar rápido los nutrientes del ambiente (Marañón, 2015; Ward et al., 2012). En DCM el nitrato presentó un rango amplio de concentración, con valores máximos de 5 μmol kg⁻¹ hasta concentraciones por debajo del límite de detección. Por otro lado, si bien el hierro puede ser un micronutriente limitante, el DCM se puede enriquecer de Fe disuelto por advección de agua profunda a la superficie (Hawco et al., 2021). Además, con análisis de metatranscriptómica se ha

asociado a las *Pelagomonas* con la asimilación del nitrato en el DCM (Dupont et al., 2015), y sugerido que podrían regular los niveles de expresión de ferredoxina y flavodoxina dependiendo la concentración de hierro (Guérin et al., 2021).

Por otro lado, el ASV asignado a nivel de género a *Ostreococcus*, presentó, en promedio, bajas abundancias. No obstante, aumentó significativamente su abundancia en las estaciones asociadas a estructuras de mesoescala de tipo ciclónico, cuando la profundidad de la nutriclina fue somera, como es el caso de la estación A10-X4, la cual se colectó dentro de un CE de frontera ubicado entre la LC y un remolino que se desprende de la corriente de Lazo (LCE) llamado Olympus. La profundidad de la nutriclina fue de 59 m y la abundancia de *Ostreococcus* sp. en esta estación aumentó hasta un 27%. Además, *Ostreococcus* fue el único género que presentó diferencias significativas de la abundancia promedio, entre la condición CE vs ACE y CE vs NE en la profundidad del DCM, y fue el género con mayor abundancia diferencial ($\log_2\text{fold}$) en el DCM, y, al igual que las *Pelagomonas*, se correlacionó positivamente con el nitrato y negativamente con la temperatura. *Ostreococcus* sp. es un género que se ha reportado comúnmente muy abundante en zonas ricas en nutrientes como la región costera (Tragin & Vaultot, 2018; Worden, 2006), dominante en regiones de frontera subpolar en el Pacífico norte y sur y el Atlántico norte (Bolaños et al., 2020; Clayton et al., 2017; Gutierrez-Rodriguez et al., 2021), y con mayor abundancia en el DCM en la corriente del Golfo (Demir-Hilton et al., 2011). Por otro lado, *Ostreococcus*, al igual que *Prochlorococcus*, presenta diferenciación de nicho, con ecotipos adaptados a condiciones de alta y baja luz (Johnson et al., 2006; Moore & Chisholm, 1999). El ecotipo *Ostreococcus OI* se asocia a condiciones mesotróficas costeras y el ecotipo *Ostreococcus OII* es abundante en el DCM de regiones oligotróficas (Demir-Hilton et al., 2011; Simmons et al., 2016). En este caso, la región V9 del gen 18S rRNA no nos aportó la resolución necesaria para discernir entre ecotipos (Monier et al., 2016). Sin embargo, que la abundancia de *Ostreococcus* se restrinja al DCM podría indicar que se trata del ecotipo OII. Además, los resultados nos dan una clara señal de que el género *Ostreococcus* sp. aumentó su abundancia en el DCM cuando hubo un levantamiento de la nutriclina.

Los datos sugieren que en temporada de verano en el DCM los principales géneros que contribuyen a la producción primaria nueva son *Pelagomonas*, *Ostreococcus*, *Bathiococcus* y la haptophyta *Phaeocystis* junto con los ecotipos de baja luz de *Prochlorococcus* previamente reportados (Linacre et al., 2019), restringidos al DCM y adaptados a condiciones de poca luz y respondiendo a la concentración de nutrientes.

Debido al proceso de estratificación en verano, los nutrientes no penetraron a la ML en el GdM, durante los 4 cruceros, sugiriendo una dominancia del bucle microbiano en este estrato superficial y oligotrófico. El efecto de las estructuras de mesoescala se observó en el DCM (Lee-Sánchez et al., 2022) donde dominaron las picoeucariotas fotosintéticas, sin embargo, la abundancia de las diatomeas fue muy baja, a diferencia de lo registrado en condiciones similares en el Pacífico y el Atlántico, de alta estratificación en verano donde han reportado dentro de un CE y un ACE que interacciona con el viento y se genera levantamiento de la isopícnas en el centro del remolino (*Eddy/wind interaction*), se ha reportado una capa de mezcla dominada por el bucle microbiano en la ML y en el DCM florecimientos de diatomeas grandes debido al enriquecimiento de macro y micronutrientes en la región sub-superficial (Brown et al., 2008; McGillicuddy et al., 2007). En este trabajo la principal diferencia de la comunidad en el DCM se observó por el aumento de la abundancia de *Ostreococcus* sp cuando la nutriclina fue somera. Esto podría permitiría usar a *Ostreococcus* como un género indicador de la somerización de la nutriclina en temporada de verano, debido a que el valor discreto del nitrato puede ser muy bajo en la columna de agua ya que puede ser removido rápidamente por el picoplancton. Otro punto para considerar es el flujo difusivo de nitrato, el cual estiman es muy bajo en la región profunda del GdM en verano (Damien et al., 2021; Kelly et al., 2021), este flujo suministra nitrato nuevo al fitoplancton y dado que es muy bajo podría darle ventajas al picofitoplancton frente a las diatomeas (Marañón et al., 2001; Villamaña et al., 2019).

2.7.5 Mixotróficos no constitutivos son abundantes en el DCM

Otro grupo que fue muy abundante en el DCM fue Rhizaria. Sin embargo, fue posible una sobrestimación de la abundancia debido al sesgo del marcador taxonómico usado en el análisis de metabarcoding, debido, al igual que Alveolata, tiene un alto número de copias del gen ADNr (Biard et al., 2017; de Vargas et al., 2015). Este grupo se asocia con una alta exportación de carbono y silicio (Biard et al., 2016), tienden a aumentar su abundancia en la región mesopelágica (Countway et al., 2007; Georges et al., 2014; Giner et al., 2020) y los han reportado muy dominantes en trampas de sedimentos (Duret et al., 2020; Gutierrez-Rodriguez et al., 2019). El ASV Spumellaria-Group-I (Family) presentó una alta abundancia diferencial en el DCM. Son mixotróficos no constitutivos, se definen como protistas que adquieren fotoautótrofia por consumo (a través de fagotrofia) de presas fototróficas (Flynn et al., 2019) y se han asociado a diferentes especies fotosintéticas como Chlorophytas, Haptofitas y Prasinophytas (Biard, 2022). El análisis de co-ocurrencia Spumellaria-Group-I (Familia), mostró una asociación negativa con MAST-3I, lo cual indica una relación de autoexclusión. MAST-3I fue identificada en nuestro análisis como una especie clave y se ha reportado como parásito de diatomeas (Gómez et al., 2011), por lo que la asociación podría darse de forma indirecta, como por ejemplo por consumo de una diatomea parasitada. Por otro lado, el orden Toxopodida

presentó un patrón opuesto de distribución de las secuencias ambientales entre la ML y DCM, donde el ASV RAD-B-group-IV mostró una alta abundancia diferencial en la ML y RAD-B-group-I y RAD-A una alta abundancia diferencial en el DCM. El orden Toxopodia no presenta asociaciones simbióticas y se sabe muy poco sobre su ecología (Biard, 2022). Se ha registrado a RAD-A con una alta actividad metabólica en el DCM y RAD-B aumenta su actividad con la profundidad (Obiol et al., 2020), asociando a RAD-B con la región mesopelágica y vinculados a partículas (Duret et al., 2020; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2022). El análisis de co-ocurrencia también encontró la asociación positiva entre *Ostreococcus*-RAD-A y *Ostreococcus*-RAD-B-group-I, lo cual podría indicar comensalismo/simbiosis donde RAD-A y RAD-B consumen la MOD producida por *Ostreococcus* (Azam et al., 1983).

2.7.6 Controles top-down tiene una fuerte influencia en la zona eufótica

Los resultados sugieren que factores abióticos como temperatura y nutrientes tienen poco efecto sobre la comunidad y que factores biológicos como controles de tipo *top-down* tienen un gran impacto moldeando la estructura de la comunidad en ambas profundidades (Anderson et al., 2024; Xu et al., 2022).

Las redes de co-ocurrencia nos permiten encontrar asociaciones potenciales y generar hipótesis para futuros esfuerzos de caracterización de las interacciones entre los protistas (Anderson et al., 2024; Xu et al., 2022). En nuestro trabajo, con el uso de estas redes obtuvimos una alta proporción de asociaciones positivas entre la clase Dinophyceae con otros dinoflagelados, diatomeas y ciliados en el ML y DCM, por ejemplo, *Gymnodinium-Torodinium* y *Gymnodiaceae-Ciliophora*. Sin embargo, las asociaciones putativas de depredador y presa (*Karlodinium-Picomonas*) y parásito y hospedador (*Syndiniales-Hemiselmis*) sugieren que la copresencia de estas relaciones podría no afectar a la mortalidad (Faust & Raes, 2012; Fuhrman et al., 2015). Esta copresencia puede estar asociada a una comunidad estable ensamblada a lo largo del tiempo, es decir, coevolución (Mougi e Iwasa, 2011), con presión selectiva recíproca y adaptación rápida (S. Liu et al., 2022), lo que indicaría relaciones positivas entre especies residentes (por ejemplo, *Gymnodiniales*) que exhiben una biomasa elevada durante todo el año (> 40%, (Linacre et al., 2021). Las asociaciones negativas (autoexclusión) de la clase Dinophyceae sugieren que los dinoflagelados principalmente transfieren carbono a niveles tróficos superiores por heterotrofia en la región oceánica del GdM (Linacre et al., 2021; Sherr & Sherr, 2007). Por otro lado, el ASV asignado como MAST-3, fue una especie clave que además presentó una alta proporción de asociaciones negativas en la ML. En este caso, sólo podemos concluir que es un predador potencial del picoplancton (Wilken et al., 2023). No obstante,

Solenicola es un clado ambiental afiliado a MAST-3 caracterizado como epiparásito de diatomeas (Gómez et al., 2011).

Nuestro análisis de co-ocurrencia refleja solo una parte de las relaciones de estas comunidades microbianas pues falta capturar las interacciones protista-bacteria, protista-virus y bacteria-bacteria. El estudio de todas estas interacciones nos daría una visión más amplia del flujo de materia y energía del GdM. Sin embargo, las especies clave fueron predominantemente protistas mixótrofos y heterótrofos en ambas profundidades y con un alto número de conexiones con otras especies de protistas en el ecosistema. Esto sugiere que los protistas son componentes clave de las redes tróficas y ciclos biogeoquímicos en el ecosistema oceánico del GdM.

2.8 Conclusiones

En este capítulo exploramos la composición de la comunidad de protistas durante la época cálida en la región de aguas profundas del GdM. Nuestros resultados indicaron que en la ML la variabilidad temporal, regional y las estructuras de mesoescala tuvieron un efecto significativo sobre la estructura de la comunidad de protistas. En cambio, en el DCM solo las estructuras de mesoescala tuvieron un efecto significativo, principalmente asociado a los cambios de profundidad de la nutriclina. Además, se evidenció en la ML una dominancia de picoeucariotas mixótrofos y heterótrofos, en contraste a una comunidad autótrofa escasamente representada. Por el contrario, el DCM mostró una comunidad dominada por picoeucariotas fotosintéticos (tras excluir los alveolados). Además, *Ostreococcus* fue el único género que tendió a aumentar de forma significativa en abundancia cuando la nutriclina era poco profunda. Sin embargo, el control *top-down*, como el parasitismo, la competencia y la depredación, podrían estar ejerciendo una fuerte influencia sobre la abundancia de protistas en ambas profundidades.

Sin embargo, para una mejor comprensión de la respuesta de esta comunidad al suministro de macro y micronutrientes y sus funciones dominantes en a ambas profundidades, recomendamos explorar las funciones de la comunidad de protistas utilizando un enfoque metatranscriptómico. Igualmente, recomendamos un análisis de redes que incluya la fracción procariota, ya que esto podría proporcionar información valiosa del flujo de energía de toda la comunidad microbiana.

Los resultados de este estudio proporcionan una línea de base sobre la composición de la comunidad protista en el sur del Golfo de México y evidencian la respuesta de esta comunidad a los factores ambientales y biológicos dentro de un ecosistema cálido y oligotrófico.

Capítulo 3. Distribución vertical y ciclo luz/oscuridad de la comunidad de protistas metabólicamente activa en el ecosistema del golfo de México.

3.1 Introducción

El estudio del ciclo de 24 horas de luz y oscuridad (“diel cycle”) permite conocer cómo las especies optimizan su fisiología en torno a su función. Se ha observado que los protistas tienen patrones bien diferenciados de luz y oscuridad dependiendo de si funcionan como autótrofos, mixótrofos o heterótrofos (Coesel et al., 2021; Groussman et al., 2021). Esto se ha visto en la serie de tiempo en la estación ALOHA donde encontraron que los protistas fotosintéticos tenían 2 picos de actividad metabólica (reportado como relación RNA: DNA) uno alrededor del mediodía, asociado a la fotosíntesis, y otro entre las 22:00 pm y las 2:00 am. Estos últimos cambios los relacionaron con los procesos de respiración en ausencia de luz, almacenamiento de carbono o adquisición de nutrientes (Hu, et al., 2018). También se ha observado que los mixótrofos tienden a cambiar de autótrofo a modo heterótrofo con respecto al cambio de luz y oscuridad (Groussman et al., 2021; Hu, et al., 2018a). Por ejemplo, usando análisis metatranscriptómicos encontraron que los dinoflagelados aumentaban la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis en superficie y este patrón cambiaba por debajo de los 150 m, observándose una mayor abundancia del gen altamente conservado *V-type ATPasa*, un gen asociado a la digestión debido a que disminuye el pH en las vacuolas de protistas heterótrofos (Hu, et al., 2018).

Por otro lado, en especies de cianobacterias fotosintéticas como *Prochlorococcus* y *Synechococcus* de regiones oligotróficas se ha reportado un patrón bien marcado, donde estas dos especies aumentan su abundancia y biomasa, pero disminuyen su tamaño de célula por aumento de la división celular en el transcurso del día (Li et al., 2022; Vaulot & Marie, 1999). Esto estaba asociado a la disponibilidad de luz y nutrientes, y acoplado a los patrones de pastoreo del nano y microzooplancton y a la infección por virus (Beckett et al., 2023). Por otro lado, las bacterias heterótrofas presentaban un patrón que está acoplado a la MOD producida por el fitoplancton (Ottesen et al., 2014).

En trabajos recientes ha aumentado la tendencia a estudiar la comunidad de protistas a partir de ARN total, principalmente por que los cambios en la abundancia y en la relación de ARNr:ADNr proporcionan

información sobre los protistas que se encuentran metabólicamente activos en la columna de agua (Blazewicz et al., 2013). La molécula de ARN es más sensible a los cambios ambientales que la de ADN (Giner et al., 2020; Hu et al., 2016; Kong et al., 2023; Xu et al., 2017). Los estudios de la comunidad de protistas basados en ADN ribosomal generan información sobre las secuencias (OTUs/ASVs) presentes en una muestra, pero no se puede discernir si los microorganismos, al momento de la colecta, se encontraban vivos, en estado de quiste, metabólicamente inactivos o era parte del ADN disuelto en el agua (Not et al., 2009). Por el contrario, cuando la comunidad de protistas se analiza a partir de la síntesis de ADN complementario (ADNc), obtenido mediante la retrotranscripción del ARN total, se obtiene la comunidad metabólicamente activa, pudiendo inferir la comunidad con potencial para la síntesis de proteínas (Blazewicz et al., 2013; Massana et al., 2015). Este método permite contrastar los cambios de la abundancia relativa, eliminando la distorsión por las diferencias del número de copias del gen 18S ARNr entre taxones (Charvet et al., 2014). Además, la relación ARNr:ADNr se puede utilizar como un *proxy* de la actividad metabólica (Logares et al., 2014; Massana et al., 2015). Aunque, como cualquier otra técnica tiene sus desventajas, por ejemplo, el ARN es una molécula más inestable comparada con el ADN, la cual resiste más a la degradación. Por otro lado, no existe una correlación clara entre las tasas de crecimiento y la actividad en los ribosomas que puede ser distinta ente taxones(Blazewicz et al., 2013).

En el golfo de México los trabajos que han usado análisis moleculares para el estudio *in situ* de comunidades de protistas en aguas oceánicas son escasos. Hasta ahora el esfuerzo del estudio de comunidades microbianas en la ZEE a partir de datos genómicos se han enfocado, mayoritariamente, en procariontes y arqueas en columna de agua y sedimentos (Sánchez-Soto et al., 2018; Guerrero et al., 2022; Raggi et al., 2020), y solo el trabajo de Sidón-Ceseña et al (2023) ha descrito la comunidad de microeucariotas usando el marcador V9 de la subunidad del gen ARN ribosomal.

Este trabajo es el primero que 1) examina las variaciones en el ciclo de 24 horas a partir de ADNr y ARNr, 2) proporciona información sobre las comunidades de protistas activas metabólicamente, 3) describe qué grupos taxonómicos presentan una mayor/menor actividad metabólica por profundidad en términos de porcentaje de extinción de luz (100 %, DCM y 01 % de luz) y, 4) evalúa los patrones de co-ocurrencia entre los protistas y las bacterias en la región oceánica. Conociendo la comunidad metabólicamente activa se puede adquirir información sobre la función de la comunidad, sobre quienes se están encargando del reciclado de materia orgánica y quienes potencialmente exportan carbono a los sedimentos (Carradec et al., 2018) de las regiones de Perdido y Coatzacoalcos en el sur del GdM, ambas vulnerables a presiones antropogénicas y naturales con una hidrografía contrastante (Gaona-Hernández et al., 2024; Sherman, 1991).

3.2 Métodos

3.2.1 Colecta de muestras

Las muestras se colectaron durante la campaña oceanográfica llamada Malla Fina-1 a finales de invierno (4 al 26 de marzo, 2016), en condición de luz (día, 12 pm) y oscuridad (madrugada, 3 am) en las regiones de Perdido y Coatzacoalcos (Figura 17). Las estaciones se dividieron en estaciones costeras (B5 y C10) y oceánicas (B9 y C14).

Las profundidades seleccionadas para el análisis fueron las profundidades ópticas de 100% de luz (superficie, SUR), 0.1% de luz (PAR 0.1), y la profundidad del máximo de fluorescencia (DCM, procedente del inglés *Deep Chlorophyll Maximum*) que comúnmente se encuentra en un rango del 10 al 1% de luz (Cullen, 2015).

Se colectaron 6 L de agua en la profundidad SUR mediante cubeta y 4 L de mediante botellas Niskin para las profundidades de DCM y PAR0.1. El agua se prefiltró con una malla de nylon NITEX® de luz de malla de 200 μm , para minimizar la presencia de eucariotas multicelulares. Una vez prefiltrada, la muestra se pasó por membranas de policarbonato *Nuclepore track-etched* (Whatman) de 47 mm de diámetro y de 0.8 μm de tamaño de poro para colectar la fracción entre 0.8 y 200 μm , que es la que contiene los eucariotas unicelulares. El tiempo máximo de filtración fue de 28 a 30 minutos, para minimizar al máximo los posibles cambios en la expresión los genes de la comunidad.

3.2.2 Extracción ADN y ARN y síntesis de ADNc

Para el análisis de la comunidad de protistas metabólicamente activa se realizó una co-extracción de ADN y ARN con el kit Allprep (Qiagen, Valencia, C.A. USA) siguiendo mayormente el protocolo recomendado por el fabricante, pero realizando modificaciones previas. Estas modificaciones son las descritas por Pearson et al (2015). Consisten en realizar una lisis mecánica usando glass beads (425 a 600 μm) para romper las células. El lisado obtenido se pasó por columnas QIAshredder (ID: 79656) para homogeneizarlo (Pearson et al. 2015). Después se siguió el protocolo normal.

Una vez obtenido el ARN total, se realizó la transcripción inversa para obtener el ADN complementario (ADNc), con el kit iScript (iScript, cDNA síntesis, BioRad ref. 1708890) siguiendo el protocolo del fabricante. El cDNA fue amplificado mediante PCR siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 2.9.

Para detectar el plancton microeucariota, se amplificó la región V9 de la subunidad 18S del gen del ARN ribosomal, utilizando los cebadores 1389f (5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG-3') y 1510r (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG 3') (Amaral-Zettler et al., 2009). Para las cianobacterias y bacterias la región amplificada fue la V4 de la subunidad 16S del gen del ARN ribosomal utilizando los cebadores 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA- 3') y 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3') (Caporaso et al., 2011). La normalización y purificación de los amplicones fueron realizadas con el kit SequalPrep (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La secuenciación se realizó con el kit MiSeq Reagent V2 de 300 ciclos paired-end en la plataforma MiSeq de Illumina de CICESE.

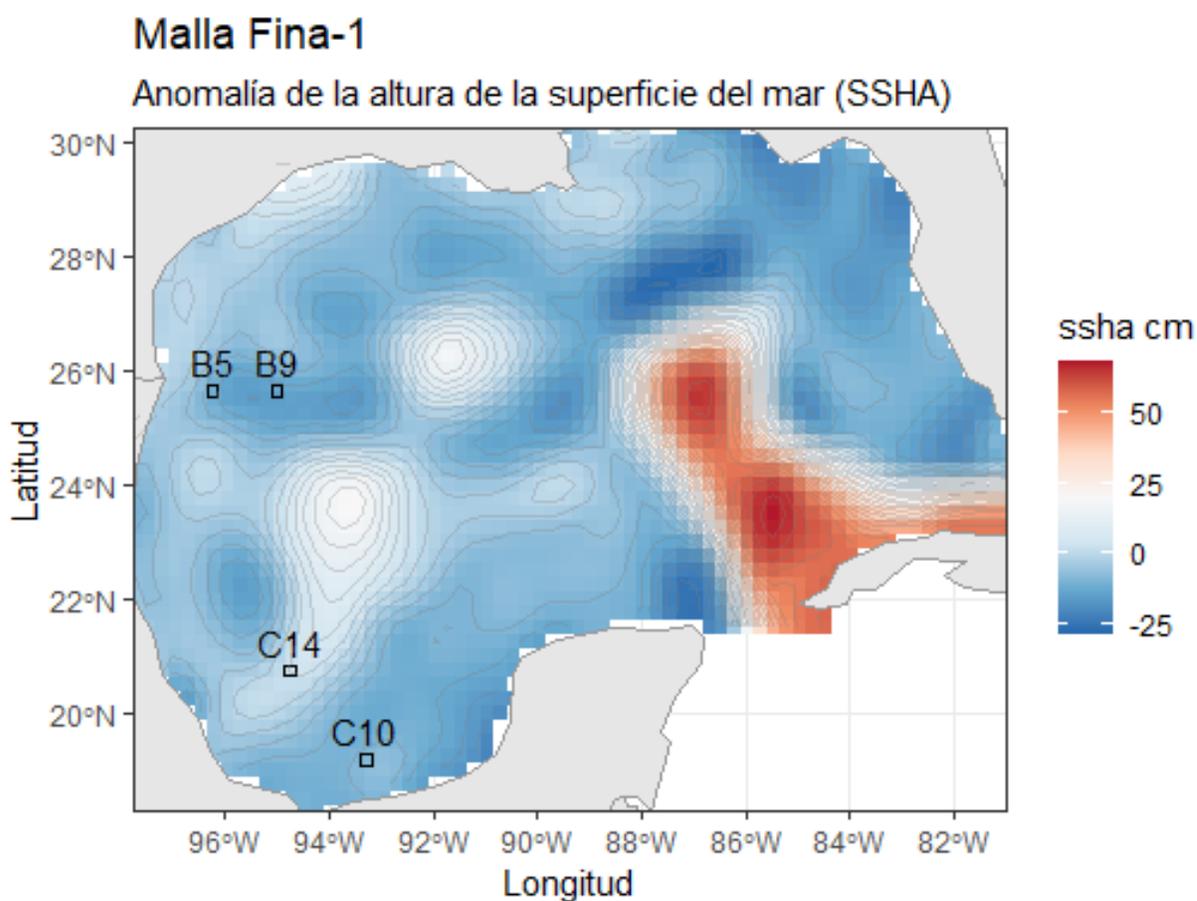


Figura 17. Mapa de las estaciones donde se colectaron muestras para el análisis ADN y ARN en la campaña oceanográfica Malla Fina-1. En el mapa se indica la altura superficial del mar (siglas en inglés de *sea surface height anomaly*, SSHA) en (cm) generado con datos de altimetría multisatélital de CCAR (*Colorado Center for Astrodynamic Research*) (Leben, 2005).

3.2.3 Procesamiento de las secuencias y asignación taxonómica

El procesamiento de las secuencias se realizó con el paquete *DADA2* (Callahan et al., 2016) en el ambiente de R v3.5.0 (R Core Team, 2018). Se eliminaron secuencias de baja calidad (< 10 QC), se corrigieron errores de secuenciación, se eliminaron las quimeras y las secuencias únicas (singletons) y se unieron las secuencias *forward* y *reverse* (merge, 150 PE) para formar los ASVs (*Amplicon Sequence Variants*, siglas en inglés). Los ASVs son las unidades taxonómicas definidas al 99% de identidad.

La asignación taxonómica de los ASVs para los protistas se realizó comparando los resultados con la base de datos *PR2* v.5.0.1 (Protist Ribosomal Reference database) (Guillou et al., 2012). Para las cianobacterias la asignación taxonómica se realizó con la base de datos *Cyanoseq* v.1.1.1 (Lefler et al., 2023) y *Silva* v.138.1 (The SILVA ribosomal RNA database project) (Quast et al., 2013). Los ASVs asociados al Supergrupo Opisthokonta y los ASVs no asignados (NA) en el rango taxonómico de División fueron eliminados del análisis.

3.2.4 Proxy de la actividad metabólica

Para calcular el proxy de la actividad metabólica se utilizaron sólo los ASVs anotados con ADN y ARN a nivel taxonómico de orden. Se descartaron los ASVs cuando estos se encontraban sólo en uno de los dos sets de datos. Una vez obtenida la relación rRNA:rDNA de los grupos taxonómicos, se normalizaron los datos a logaritmo (Log) para comparar la actividad, donde las tasas > 1 indican taxones metabólicamente hiperactivos, y < 1 taxones metabólicamente hipoactivos.

3.2.5 Análisis estadísticos

Los análisis de alfa diversidad se realizaron con los conteos de ASVs crudos usando la paquetería de *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013). Se estimó la diversidad de Shannon y el número de ASVs observados (riqueza), y se realizaron comparaciones de los índices de diversidad con respecto a la profundidad a partir de las moléculas ADN y ARN con el análisis no paramétrico *Krukall-wallis (test-H)*, el cual comprueba si todas las muestras pertenecen a una misma población.

Se analizó, a partir de gráficas upset con el paquete de R *UpSet* v.1.4.0 (Conway et al., 2017), cuantos ASVs se compartían entre las moléculas de ADN y ARN, y en la comunidad activa (RNA), se buscó cuantos ASVs se compartían con respecto a la profundidad (Conway et al., 2017). Se comparó la abundancia promedio por profundidad de los principales ASVs a partir de la comunidad obtenida por ADN y ARN con el paquete *microbiome* v.1.20.0 (Lahti & Shetty, 2019) .

Para obtener los análisis de beta diversidad, la abundancia fue normalizada a logaritmo centrado (CLR) con el paquete *microbiome* v.1.20.0 (Lahti & Shetty, 2019). Los datos ambientales de temperatura, salinidad, fluorescencia, nitrato, ácido silícico se normalizaron con z-score. Se utilizaron como estimadores de la beta diversidad las distancias de Aitchison, donde las matrices de distancia se calcularon a partir de la abundancia normalizada a clr y las distancias euclidianas con el paquete de R *vegan* v.2.6-4 (Oksanen et al., 2020).

Para evaluar cómo las variables ambientales influían sobre la comunidad activa de los protistas y las cianobacterias, se realizó un análisis de redundancia basado en distancias (*dbRDA*) a partir de distancias de Aitchison (999 permutaciones) y con las variables ambientales normalizadas por z-score. Por otro lado, para evaluar el porcentaje de variación explicado de las variables ambientales sobre la comunidad activa de protistas y las cianobacterias en la región de Perdido y Coatzacoalcos se realizó un análisis permutacional de la varianza (PERMANOVA, 999 permutaciones).

Finalmente, para conocer los patrones de co-ocurrencia (asociaciones negativas y positivas) entre la comunidad activa de protistas (ARN) y las cianobacterias, se realizó el modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (sPLS) del paquete de R *MixOmics* v.6.22.0 (Rohart et al., 2017). En este análisis solo se tomó en cuenta a la comunidad de las capas de SUR y DCM, debido a la baja o nula presencia de cianobacterias en la profundidad óptica del 0.1% de luz.

3.3 Resultados

3.3.1 Condiciones ambientales

A finales de invierno la temperatura superficial del agua (Figura 17A) fue más baja en la región de Perdido que en la región sur, en Coatzacoalcos, con temperaturas de 21-22 °C y de 24.5- 25 °C respectivamente.

La salinidad superficial se encontró en un rango de 36 a 36.5 en las estaciones B9, C10 y C14, mientras que la estación B5 presentó influencia de los ríos con una menor salinidad (34.5 a 35) (Figura 17B). El máximo de fluorescencia (Figura 17C) fue somero en la estación B5 con 25 m, comparado con el máximo de fluorescencia en la estación C14 el cual fue el más profundo (78 m).

También se observó un aumento de la fluorescencia en condición de oscuridad en todas las estaciones. Por otro lado, el oxígeno (Figura 17D) en la superficie y el DCM presentó una concentración de 200 a 225 $\mu\text{mol/l}$ y en el PAR0.1 de luz en las estaciones B5, B9 y C10 fue de 120 a 125 $\mu\text{mol/l}$, comparado con la estación C14 que fue de 178 $\mu\text{mol/l}$. En las estaciones B5, B9 y C10 el 0.1 % de luz coincidió con la oxiclina, mientras que en la estación C14 la oxiclina fue más profunda debido a que esta estación se encontraba dentro de un remolino anticiclónico cuando se colectó. En cambio, las estaciones B5, B9 y C10 se encontraron influenciadas por estructuras de mesoescala de tipo ciclónico (Figura 17).

El fosfato presentó concentraciones $< 0.05 \mu\text{mol kg}^{-1}$ en la superficie y el DCM, y en el 0.1% de luz la concentración aumentó en un rango de 0.1 a 0.6 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ en las estaciones B5, B9 y C10. El nitrato presentó el mismo patrón, bajas concentraciones en superficie y el DCM en las estaciones B5, B9 y C10 (de 0.97 a 0.05 $\mu\text{mol kg}^{-1}$) y un aumento considerable en la capa del 0.1% de luz con (de 3 a 11.9 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, (Tabla 7).

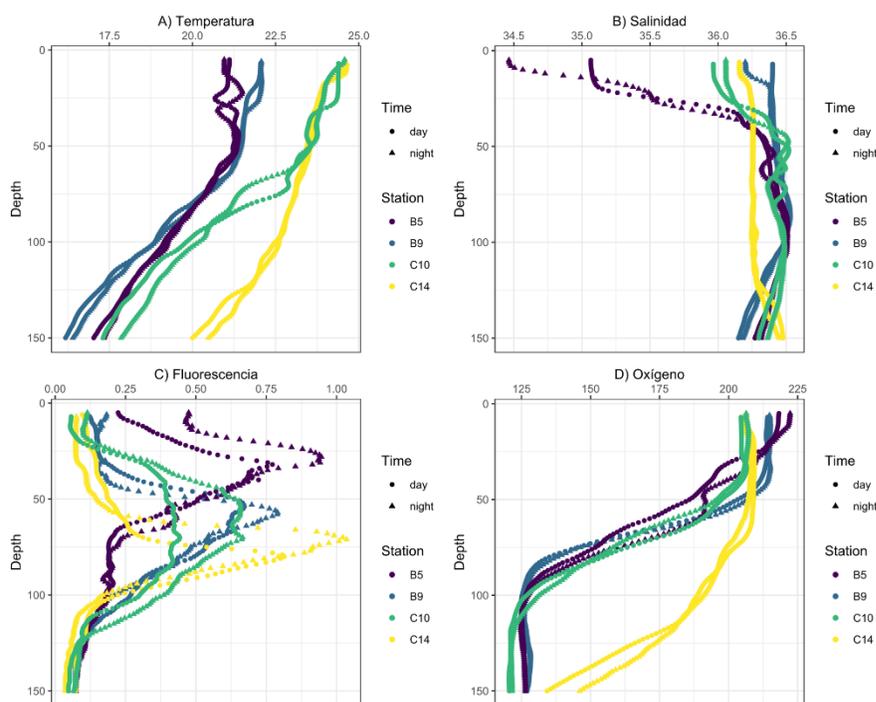


Figura 18. Perfil vertical de 0 a 150 m de la A) temperatura ($^{\circ}\text{C}$), B) salinidad, C) fluorescencia y D) oxígeno ($\mu\text{mol kg}^{-1}$).

Tabla 7. Valor discreto de la concentración de nutrientes de las estaciones y profundidades colectadas.

Estación	Profundidad				N:P
	(% de luz)	Fosfato ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	Nitrato ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	Acido silíceo ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	
B5	SUR	0.05	0.05	2.44	1
B5	DCM	0.04	0.37	1.57	9
B5	0.1%	0.60	10.61	4.58	18
B9	SUR	0.02	0.07	1.17	4
B9	DCM	0.05	0.76	1.35	15
B9	0.1%	0.56	10.71	3.78	19
C10	SUR	0.11	0.00	2.93	0
C10	DCM	-	0.98	1.70	-
C10	0.1%	0.64	11.92	4.65	19
C14	SUR	-	-	2.47	-
C14	DCM	0.04	0.43	1.57	11
C14	0.1%	0.17	3.04	2.83	18

3.3.2 Diversidad alfa y composición de especies

Se alcanzaron un total de 737 695 lecturas, con un promedio 15 369 lecturas por muestra. Con respecto a los ASVs se obtuvieron en total 3 249 ASVs con un promedio por muestra de 282 ASVs, y un máximo de 434 ASVs en la estación B9, en la profundidad de PAR0.1, en condición de oscuridad (noche) obtenida a partir de RNA. El mínimo fue de 193 en la estación B5 en la superficie, en condición de oscuridad (noche) a partir de RNA. La grafica de rarefacción (Figura 19) mostró que todas las muestras (24 muestras en total) alcanzaron la asíntota, por lo tanto, la profundidad de secuenciación fue suficiente para representar a la comunidad de protistas por profundidad y respecto al tipo de molécula (ADN y RNA, respectivamente).

Los análisis de la diversidad alfa no mostraron diferencias significativas con respecto a las especies observadas por profundidad, aunque sí se observó el aumento de la riqueza (ASVs observados) con respecto a la profundidad en ambas moléculas (ADN y ARN) (Figura 20A). Por otro lado, el índice de diversidad de Shannon, al igual que la riqueza, aumentó con respecto a la profundidad. Sin embargo, sólo se mostraron diferencias significativas entre las profundidades de DCM y el PAR0.1 ($p= 0.007$) en la comunidad metabólicamente activa (Figura 20B).

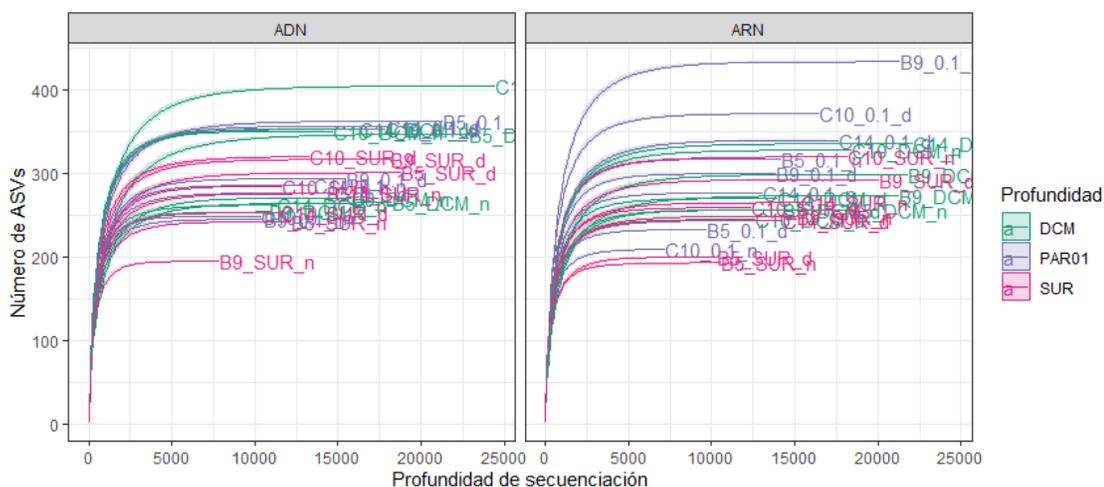


Figura 19. Gráfica de rarefacción agrupada por ADN y ARN. El color indica la profundidad donde se colectó (rosa= superficie, verde= máximo de fluorescencia y morado= 0.1% de luz (PAR0.1)). El eje y indica el número de ASVs observado y el eje x la profundidad de secuenciación.

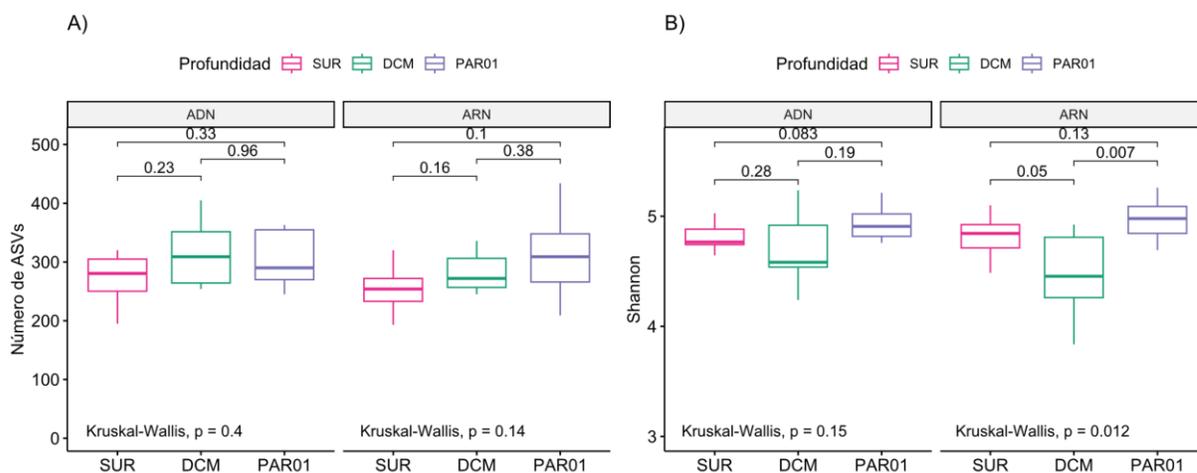


Figura 20. Comparación de la diversidad alfa en relación con la profundidad y agrupado por ADN y RNA. A) Comparación de la riqueza (número de ASVs) entre profundidades, agrupado por ADN y ARN. B) Comparación de la diversidad de Shannon por profundidad y por moléculas de ADN y ARN.

3.3.3 Comparación de la composición de la comunidad obtenida a partir de ADN y ARN

Los datos obtenidos a partir del ADN presentaron una mayor riqueza de ASVs únicos (1 114 ASVs), que los de ARN (1 067 ASVs). Sólo compartieron 1 068 ASVs (Figura 21). De forma particular, Dinoflagellata y Rhizaria presentaron un patrón de disminución de las lecturas y del porcentaje en la comunidad activa

(ARN) comparado con lo obtenido a partir de ADN. El caso opuesto se observó con Haptophytas y las picoeucariotas de la división Bygira, Gyrista y ciliados que aumentaron la proporción y lecturas en la comunidad activa (ARN) (Tabla 7).

Al comparar la comunidad activa por profundidad se detectó un mayor número de ASVs únicos y totales en la profundidad del PAR0.1 (1 127 ASVs únicos), además, SUR y PAR0.1 fueron las profundidades que menos ASVs compartieron, indicando que son comunidades muy distintas entre sí (Figura 22).

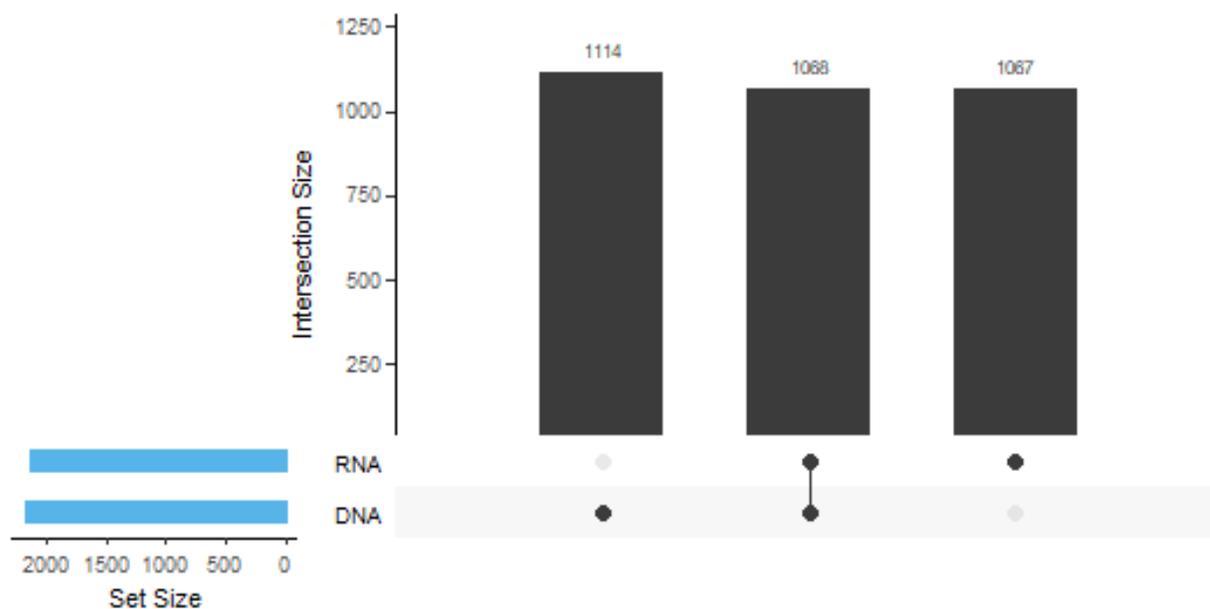


Figura 21. Gráfica *upset* que representa el número de ASVs únicos (puntos), compartidos (puntos conectados) y total de ASVs obtenidos a partir de ADN y ARN (barras horizontales).

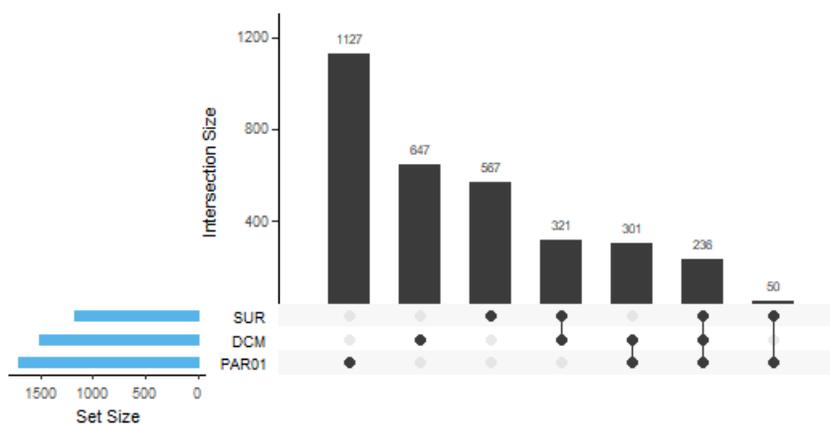


Figura 22. Gráfica *Upset* que representa el número de ASVs únicos (puntos), compartidos (puntos conectados) y total de ASVs obtenidos por profundidad (barras horizontales).

Tabla 8. Número total de secuencias de los principales grupos taxonómicos a nivel de División y su porcentaje obtenido a partir de las moléculas de ADN y RNA

	ADN		ARN	
	Secuencias	Porcentaje	Secuencias	Porcentaje
Alveolata				
Apicomplexa	106	0.73	6	0.04
Dinoflagellata	8714	60.43	3825	25.81
Ciliophora	355	2.46	1988	13.42
Rhizaria				
Radiolaria	2239	15.53	891	6.01
Euglenozoa	281	1.95	198	1.34
Cercozoa	35	0.24	70	0.47
Stramenopiles				
Bigyra	331	2.29	1663	11.22
Gyrista	1301	9.03	3823	25.79
Cryptophyta_X	78	0.54	125	0.84
Chlorophyta_X	289	2.01	313	2.12
Telonemia_X	133	0.92	207	1.40
Haptophyta_X	496	3.44	1538	10.38
Picozoa_X	61	0.42	172	1.16

A nivel de género, y por profundidad, el perfil de abundancia relativa promedio fue distinto usando ADN o ARN (Figura 23). En superficie la comunidad activa estuvo representada por los ASVs Dinophyceae (Clase), Pelagomonadales (Orden), Prymnesiophyceae (Clase), Oligotrichida (Orden) y los picoeucariotas MAST-1C, MAST-3E, y MAST-3I. En el DCM, los ASVs con mayor abundancia de la comunidad activa fueron las Pelagomonadales (Orden) seguidas de Dynophyceae (Clase).

En la profundidad del 0.1% (PAR0.1) de luz fue opuesto al DCM, los ASVs con mayor abundancia promedio fueron Dynophyceae (Clase) seguido de Pelagomonadales (Orden). Con respecto al ADN, en superficie y DCM se obtuvo la mayor proporción promedio de Dinophyceae (Clase). En el DCM y en el 0.1% de luz (PAR0.1) se observaron abundancias promedio representadas principalmente por ASVs de Dino-Group-II-Clade-22 (Syndiniales), *Liosphaeroidea* (Rhizaria), RAD-B-Group-II_X y RAD-A_Xb-X.

3.3.4 Composición de la comunidad y respuesta a las condiciones ambientales de la comunidad de protistas activa

La comunidad de protistas metabólicamente activa presentó una distribución vertical bien marcada (Figura 24), con una composición muy distinta entre SUR y PAR0, mientras que DCM fue una mezcla entre SUR y PAR0.1 por efecto de la mezcla profunda. En SUR y DCM el orden Pelagomonadales fue el más abundante (29%) en la región de Perdido y presentó un aumento de abundancia relativa en el PAR 0.1 en la estación C14 y B9. Mientras que en SUR los órdenes Gyrista, Prymnesiales, Phaeocystales y los ciliados Tintinnina y Oligotrichida presentaron una mayor abundancia relativa en SUR y DCM. En contraste con PAR01 que los órdenes de mayor abundancia fueron Diplonemida, Lambyrinthulomycetes, RAD-B y RAD-C.

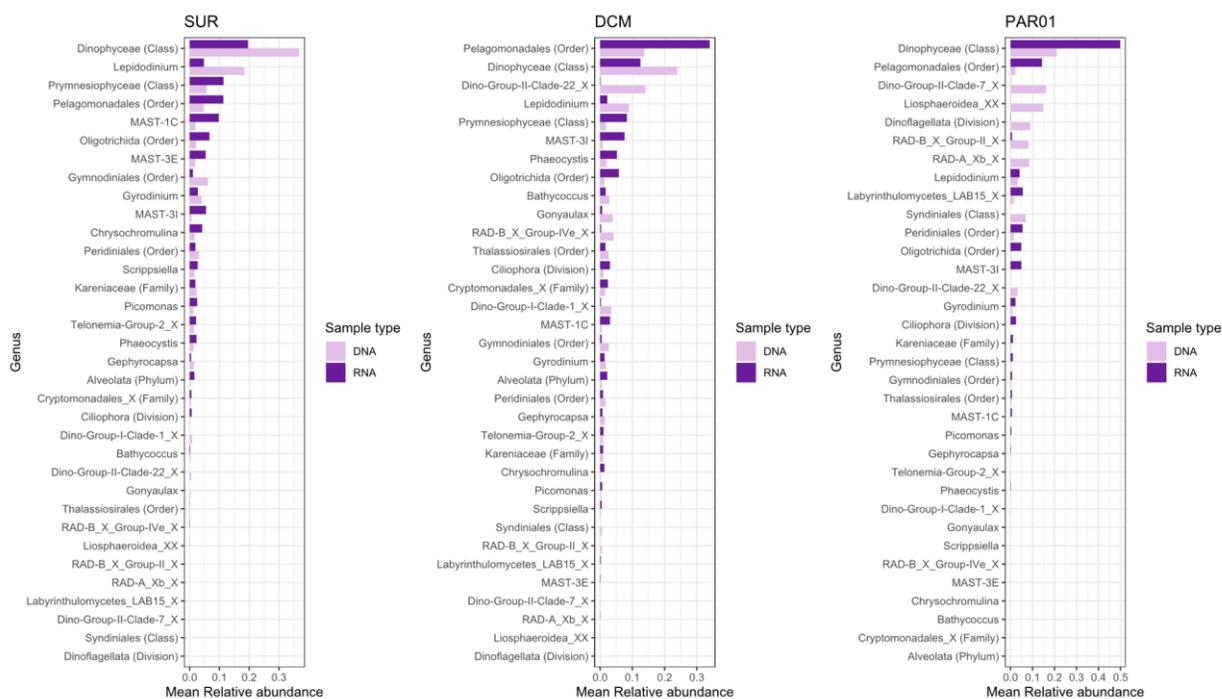


Figura 23. Abundancia relativa promedio de los principales ASVs (procedentes del ADN y ARN) en las profundidades de superficie (SUR), máximo de fluorescencia (DCM) y el 0.1% de luz (PAR0.1)

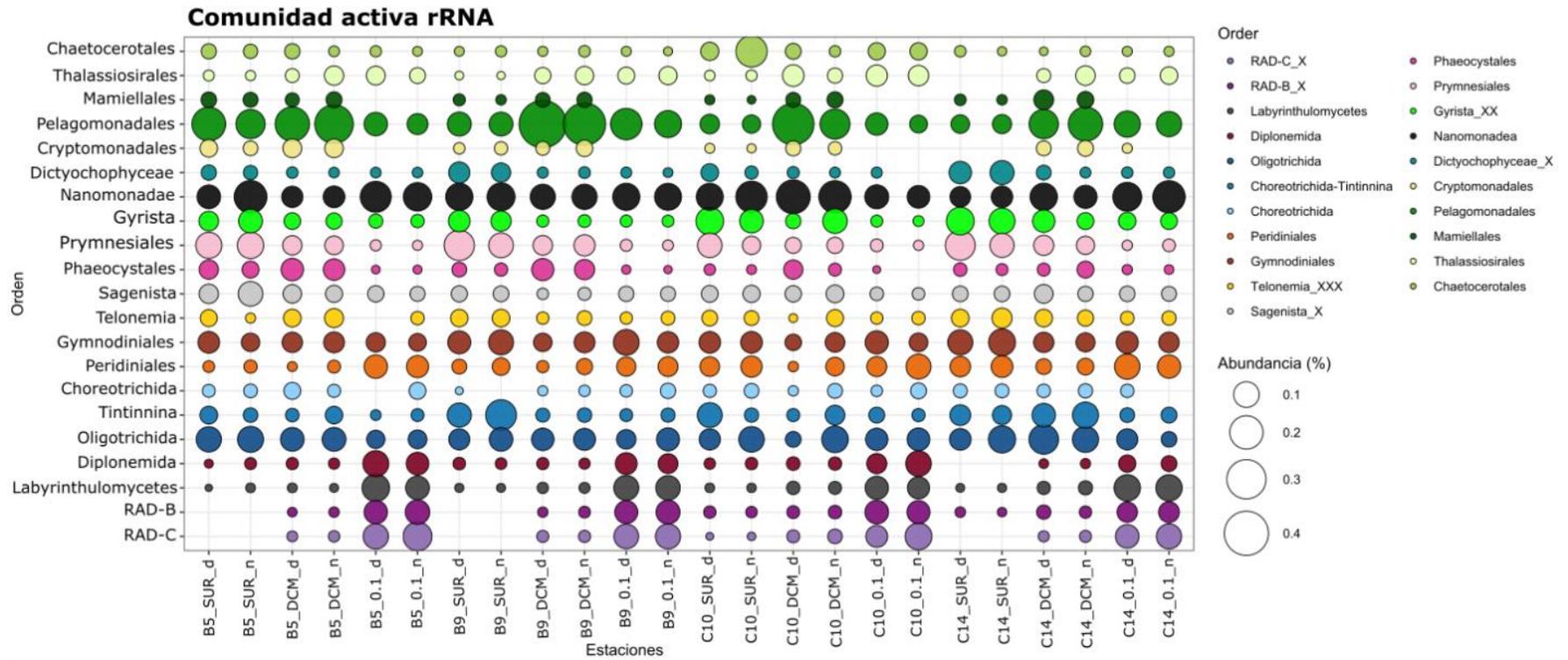


Figura 24. Gráfica de burbujas representando la abundancia de los principales ASVs metabólicamente activos a nivel de orden.

La comunidad de protistas activa estuvo significativamente influenciada por las condiciones ambientales y las muestras se agruparon por profundidad, debido a la disimilitud entre profundidades (Figura 25A). El modelo de dRDA fue significativo ($F= 2.8$, $p= 0.001$) y la comunidad constreñida a las condiciones ambientales explica un alto porcentaje de la variabilidad con un 32.4%. Además, las variables ambientales de temperatura ($p= 0.020$), salinidad ($p= 0.001$), fluorescencia ($p= 0.001$), nitrato ($p= 0.002$) y oxígeno ($p= 0.001$), se correlacionaron significativamente con esta comunidad (Figura 25A).

Para obtener cómo las variables ambientales tienen un efecto significativo a nivel región sobre la comunidad activa de los protistas, se utilizó la prueba de *adonis2* (PERMANOVA). En este caso no se separó por profundidad debido al bajo número de muestras. Del conjunto de muestras obtenidas en la región de Perdido, la fluorescencia, y principalmente, la temperatura ($R^2=35\%$) tuvieron una influencia significativa ($p= 0.001^{**}$). En la región de Coatzacoalcos fueron la fluorescencia, el nitrato, el ácido silícico y la temperatura, además en esta región la variable con mayor R^2 fue la salinidad (18.7 %, Figura 25B).

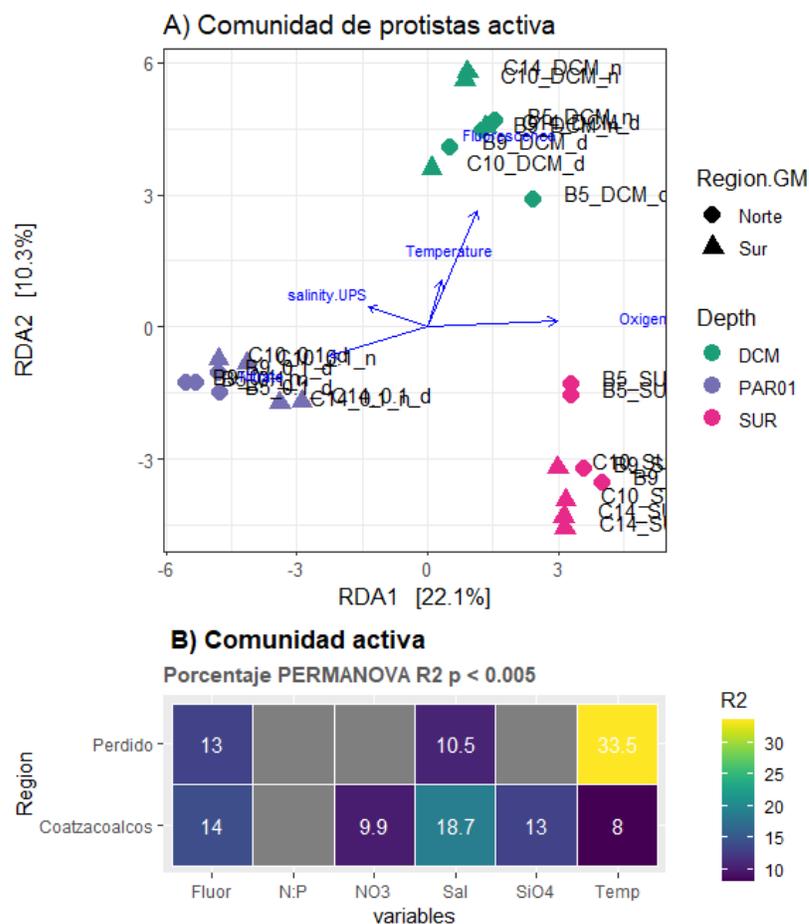


Figura 25. A) Análisis de redundancia basado en distancias (dbRDA), el color indica la profundidad y la forma representa la región. B) Porcentaje de variación (Adonis R^2) de la composición de la comunidad activa de protistas explicada por las variables ambientales de fluorescencia, razón N:P, nitrato, salinidad, ácido silicio y temperatura.

3.3.5 Cambios diarios (luz/oscuridad) y verticales de la actividad metabólica

Para determinar los cambios noche y día y verticales de la actividad relativa de la comunidad, se calculó como *proxy* de la actividad metabólica relativa la razón ARNr:ADNr (Figura 26). En SUR la actividad fue baja con un rango ARNr:ADNr de 0 a 2.

Los grupos que presentaron actividad en todas las estaciones fueron los protistas heterótrofos de la clase Sagenista (grupo Labyrinthulea) y la clase Spirotrichae (ciliados), mientras que las demás clases analizadas sólo presentaron actividad en la estación costera C10 en condición de luz y oscuridad.

En el DCM, la actividad relativa promedio del ARNr:ADNr fue de 1.6 a 3.3 y los grupos que tendieron a presentar una mayor actividad a nivel clase fueron los parásitos de diatomeas Opalozoa (MAST-3) y las clases fotosintéticas Pelagophyceae y Prymnesiophyceae. Por otro lado, en la profundidad del PAR01 el patrón de la actividad relativa ARNr:ADNr fue muy particular.

Los grupos heterótrofos RAD-C (picoeucariota Rhizaria), Sagenista (MAST-3) y Spirotrichea (ciliados) fueron los que presentaron una mayor actividad metabólica con respecto a SUR y DCM. Además, los grupos fotosintéticos a nivel clase, como Gyrista, Bacillariophyceae (diatomeas pennadas), Mediophyceae (diatomeas centrales), Pelagophyceae, Prymnesiophyceae, los mixotróficos Dinophyceae y los parásitos Sagenista (MAST-3) presentaron un patrón muy claro de un aumento en la actividad metabólica solo en condición de luz, en aquellas estaciones influenciadas por estructuras de mesoescala ciclónica. Mientras que la estación C14, influenciada por estructura de mesoescala anticiclónica, se presentó actividad tanto en condiciones de luz y como de oscuridad.

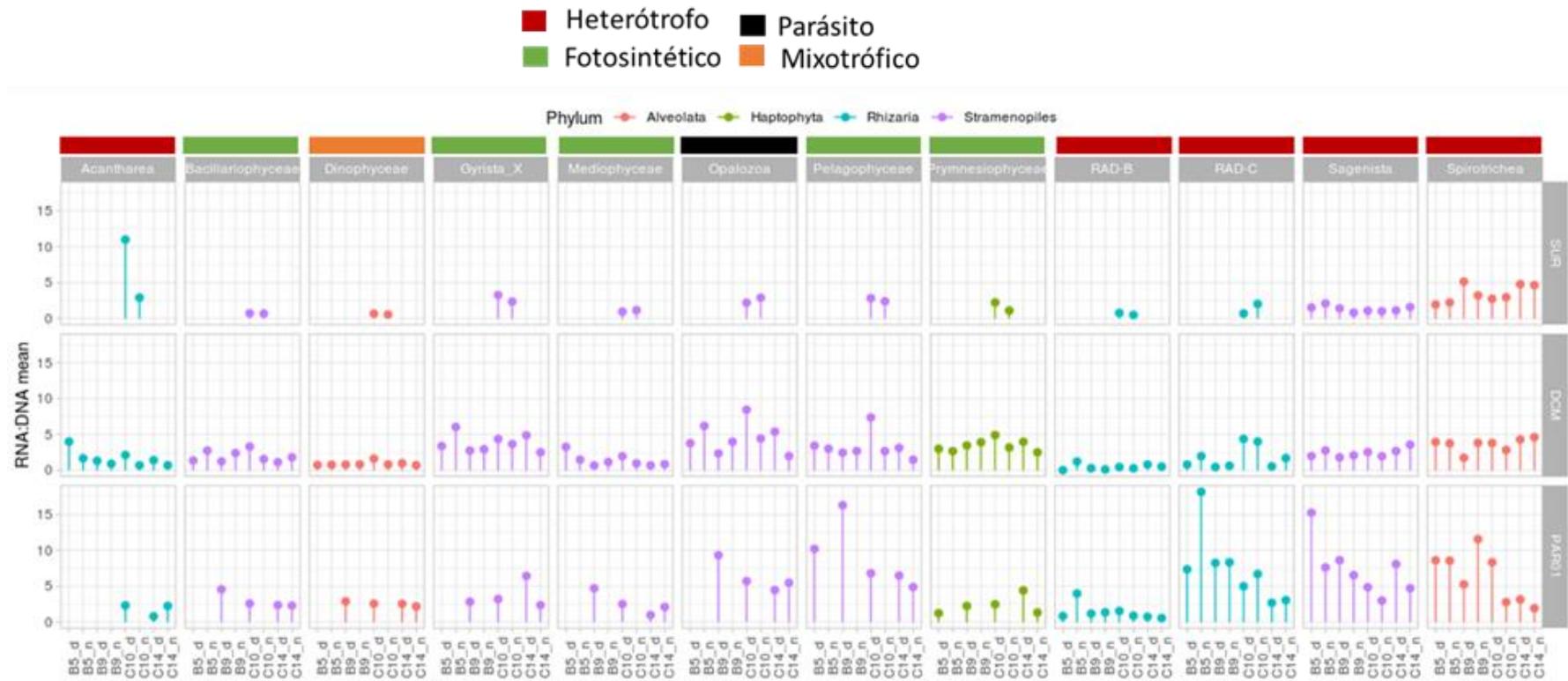


Figura 26. Comparación de la actividad metabólica relativa (ARNr:ADNr) a nivel taxonómico de clase. En eje x se muestran las estaciones que se colectaron durante el día (d) y durante la noche (n). En el eje y, se indica la actividad metabólica relativa.

3.3.6 Presas potenciales de los protistas: patrones de abundancia de las cianobacterias en condición de luz y oscuridad y patrones de co-ocurrencia con los protistas metabólicamente activos

Debido a que el número de copias del gen 16S de las cianobacterias caracterizadas se encuentra en un rango de 1 a 2 copias (*Ribosomal RNA Database rrnDB*, Stoddard et al., 2015), los datos se muestran en lecturas crudas como *proxy* de la abundancia absoluta.

En SUR se observó un mayor número de lecturas durante el día comparado con las estaciones que se colectaron durante la noche. En algunos casos, el número de lecturas disminuyó hasta la mitad (25 000 lecturas) con respecto a lo obtenido en el día (Figura 27).

En el DCM las estaciones con mayor cercanía a la costa (C10 y B5) no mostraron un patrón claro de disminución de su abundancia durante la oscuridad, comparado con las estaciones oceánicas (C14 y B9) que conservaron el mismo patrón que en superficie. Por otro lado, en el PAR0.1 el número de lecturas obtenidas fue en promedio menor a 10.

Al analizar de forma particular qué ASVs presentaron este patrón de disminución de lecturas en condiciones nocturnas se observó que fueron *Synechococcus* CC9902 y *Cyanobium* PCC6307, aunque no se identificaron diferencias significativas entre la condición de luz y oscuridad (Figura 28).

La fracción (0.8 a 200µm) se lograron detectar cianobacterias fijadoras de N₂ simbioses típicos de protistas como las UCYN-A y *Richelia*. Además, también se detectó el ecotipo de baja luz *Prochlorococcus* MIT9313 en SUR y DCM.

El análisis de la comunidad de bacterias y arqueas (Figura 29), mostró que en SUR y DCM dominaron las cianobacterias. En el PAR01 la composición de la comunidad cambió y se observó una mayor diversidad. En esta profundidad, en la región de Perdido disminuyó la proporción de cianobacterias y dominó el filo Proteobacteria, con un patrón de aumento de las Deltaproteobacteria SAR324 (Marine group B) y las arqueas Thermoplasmata. En Coatzacoalcos también dominaron las proteobacterias y aumentó el filo Planctomycetota.

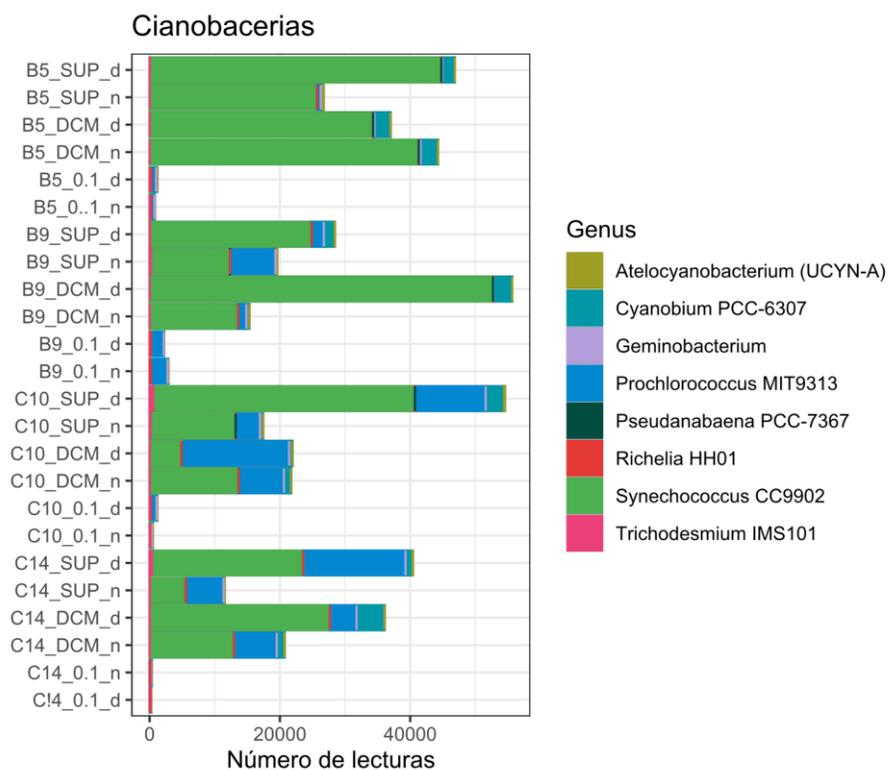


Figura 27. Número de lecturas por muestra de la comunidad de cianobacterias a nivel de género colectadas durante la campaña oceanográfica Malla Fina-1.

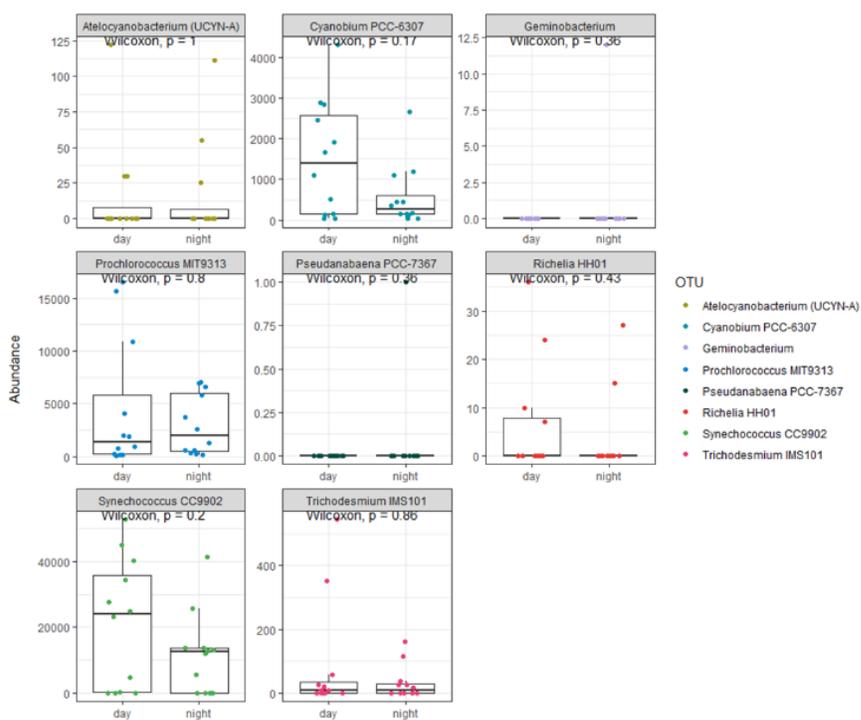


Figura 28. Número de lecturas de las cianobacterias a nivel género en condición de luz (día) comparado con la condición de oscuridad (noche).

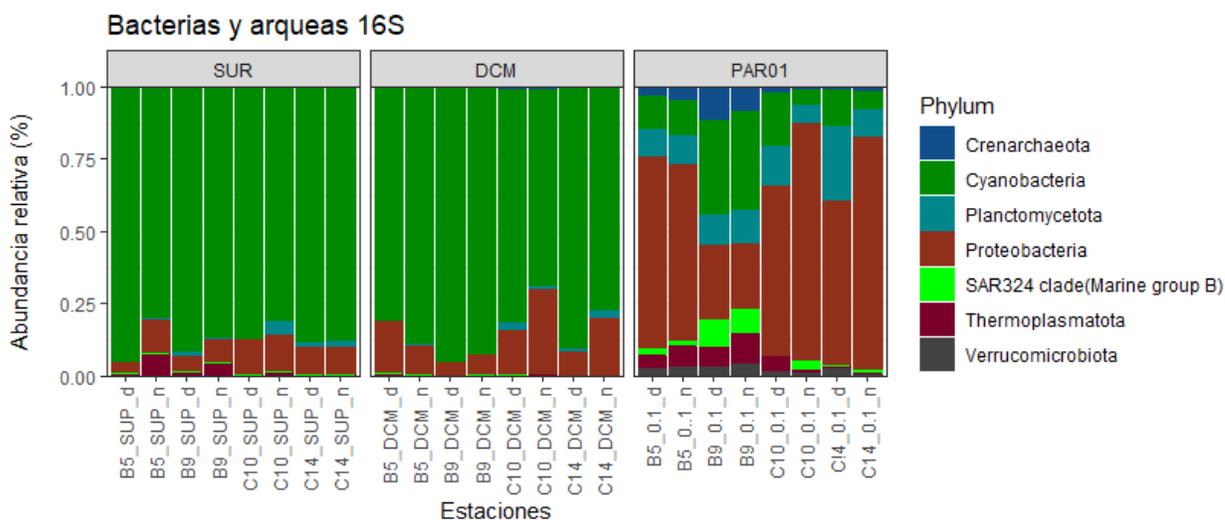


Figura 29. Abundancia relativa de la comunidad de bacterias y arqueas a nivel de filo de las muestras colectadas durante la campaña oceanográfica Malla Fina-1.

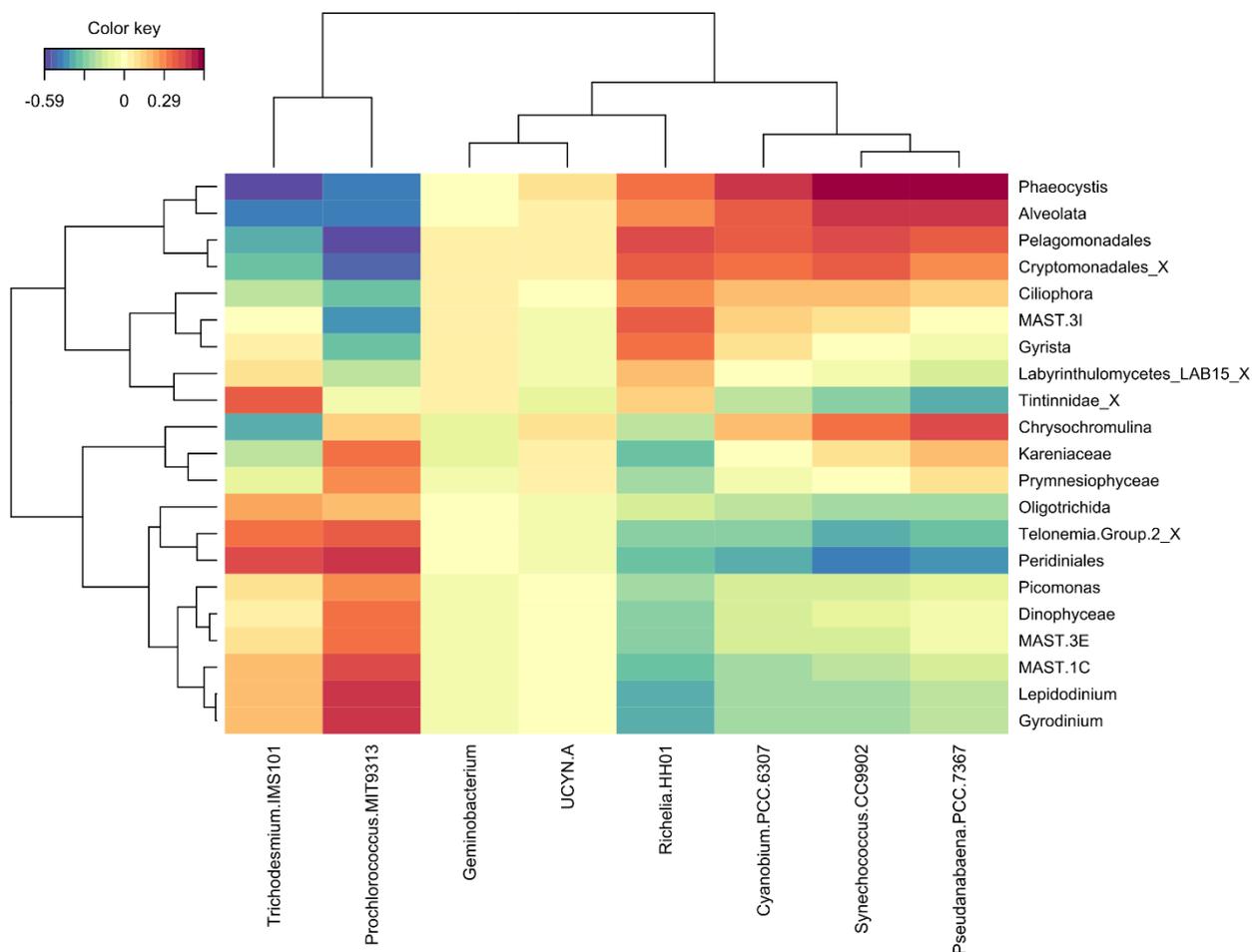


Figura 30. Mapa de calor que muestra el patrón de co-ocurrencia entre los ASVs de protistas metabólicamente activos y las cianobacterias.

Los patrones de co-ocurrencia entre los principales ASVs de protistas activos y los ASVs de cianobacterias a nivel taxonómico de género (Figura 30) podrían reflejar que comparten preferencias ambientales, así como interacciones biológicas.

De las cianobacterias más abundantes encontramos una alta correlación (> 0.30) de *Synechococcus* CC9902 con *Phaeocystis*, *Pelagomonadales* y *Crysochromullina*, seguido de *Prochlorococcus* MIT9313 con *Gyrodinium*, *Lepidodinium*, Peridiniales MAST-1C, MAST-3E, *Cyanobium* PCC 6307 presentó un patrón similar al de *Synechococcus* CC99 y presentó una alta correlación con *Phaeocystis*, Alveolata y *Pelagomonadale*.

En el caso de cianobacterias fijadoras de N_2 *Trichodesmium* presentó una alta correlación (> 0.30) con el ASV Tintinnidae y Peridiniales. *Richelia* HH01 con Pelagomonadales, Cryptomonadales y MAST.

3.4 Discusión

En este capítulo se evaluó la composición de la comunidad de los protistas metabólicamente activos con base en el análisis de los transcritos de ARN en las regiones de Perdido al norte y Coatzacoalcos al sur del GdM. Los análisis se realizaron en 3 profundidades (SUR, DCM y PAR0.1) y en condiciones de luz y oscuridad. Además, se evaluaron los patrones de co-ocurrencia entre las cianobacterias como presas potenciales de los protistas en esa comunidad activa.

3.4.1 Diferencias entre la comunidad obtenida a partir de ADN y ARN

Se encontraron diferencias entre la comunidad obtenida a partir de las moléculas de ADN y ARN. En ambas moléculas se observó una mayor riqueza (en términos de ASVs observados) y diversidad de Shannon en la profundidad del PAR0.1. Estos resultados nos indican que en la profundidad del PAR0.1 encontramos un mayor número de ASVs activos metabólicamente. Esto coincide con otras regiones, como la estación ALOHA, que se caracteriza por ser una región cálida, limitada en nutrientes y muy estratificada, donde han reportado una mayor riqueza de la comunidad activa metabólicamente en la zona afótica, asociada a una comunidad principalmente heterotrófica (Giner et al., 2020; Ollison et al., 2021).

Al analizar, a nivel de grandes grupos, el número de lecturas y la proporción obtenida procedentes de cada comunidad a partir de cada set de datos de ADN y ARN, se observó que las lecturas procedentes del ARN y asignadas a Dinoflagellata y Rhizaria disminuyen tanto en número como en proporción. Ambos grupos aportan una alta proporción de biomasa, biovolumen por célula, con un alto número de copias del gen ribosomal 18S (Biard et al., 2016; W. Gong & Marchetti, 2019).

Otros estudios han asociado estas diferencias de lecturas obtenidas entre ambos tipos de moléculas, a que la fracción obtenida por DNA probablemente contiene material particulado en hundimiento o material genético disuelto en proceso de degradación (Hu et al., 2016; Xu et al., 2017). Por lo tanto, Dinoflagellata y Rhizaria podrían ser importantes contribuyentes de la materia orgánica en partícula y en hundimiento, como ya se ha registrado para Rhizaria en trampas de sedimentos al norte del océano Pacífico subtropical y en la corriente de California (Boeuf et al., 2019; Gutierrez-Rodriguez et al., 2019). Por otro lado, los grupos Bigyra (MAST), Gyrista (principalmente Pelagomonas) y Haptophytas aumentaron en número de lecturas y en proporción en el conjunto de datos a partir de ARN, lo que indica una mayor actividad por parte de estos grupos fotosintéticos.

3.4.2 La comunidad metabólicamente activa tiene una distribución vertical asociada a la mezcla

La comunidad metabólicamente activa fue muy distinta entre SUR y PAR0.1, compartiendo solo 50 ASVs, mientras que el DCM mostró una composición como resultado de la mezcla entre SUR y PAR0.1, compartiendo el DCM 321 ASVs con SUR y 301 con PAR0.1. Esto se puede asociar probablemente a la mezcla de invierno provocada por los vientos fríos llamados “nortes”. La interacción de los “nortes” con la superficie profundiza la capa de mezcla (Pasqueron de Fommervault et al., 2017; Martínez-López & Zavala-Hidalgo, 2009; Muller-Karger et al., 2015), que, a diferencia del verano, donde debido a la fuerte estratificación, cada capa contiene una comunidad muy distinta entre SUR y DCM (Capítulo 2, Figura 9) (Sidón-Ceseña, et al., 2023). La mezcla de invierno se reflejó principalmente en la composición de especies en SUR y DCM, el orden Pelagomonadales se observó en las 3 profundidades, no obstante, presentó una mayor abundancia en el DCM, comparado con las estaciones del año más cálidas donde se encontraron sólo en el DCM (Sidón-Ceseña, et al., 2023, Capítulo 2). Por otro lado, Mamelliales y Cryptomonadales sólo se presentaron en SUR y DCM. Caso opuesto, Diplonemida, Labyrinthulomycetes, RAD-B y RAD-C sólo se presentaron en DCM y PAR 0.1, aunque con mayor proporción en el PAR0.1. Esto indica que la comunidad fotosintética activa de protistas se encuentra principalmente en DCM. En PAR0.1, profundidad donde inicia

la zona mesopelágica dominaron principalmente heterótrofos, lo que coincide con lo previamente descrito en otros estudios (Giner et al., 2020; Kong et al., 2023; Sun et al., 2024). Además, los ciliados de los órdenes Choreotrichida, Tintitinida y Oligotrichida se encontraron en la comunidad metabólicamente activa con abundancias mayores a 10% y tendieron a aumentar su actividad relativa con la profundidad. Estos grupos se han reportado en la región norte del GdM con una alta riqueza y se ha detectado variabilidad temporal de ciliados usando datos procedentes del análisis del 18S-ARNr (Snyder et al., 2021). También se han encontrado diferencias significativas a nivel filogenético entre la comunidad de ciliados asociada a la costa con respecto a la oceánica (Santoferrara et al., 2018). Otros estudios observaron diferencias en relación con la profundidad analizando datos ADNc procedentes del oeste del océano Pacífico (Zhao et al., 2017).

Para la mayoría de las estaciones, no se observó un cambio en la composición de especies asociadas, por ejemplo, a la influencia de ríos, como ocurrió en la estación B5, que presentó una baja salinidad en superficie. La salinidad junto con la temperatura fueron las variables que explicaron el alto porcentaje de la variabilidad explicada de la comunidad en la región de Perdido, mientras que en Coatzacoalcos la salinidad y el ácido silícico fueron las principales variables. Estas diferencias pueden deberse a que las estaciones de Perdido (B5 y B9) estuvieron influenciadas por un remolino ciclónico, este hecho, incluso, se refleja en la temperatura superficial que es menor en esa región. La región de Coatzacoalcos en la que se analizó una estación muy cercana a la costa (estación C10) y una estación influenciada por un remolino anticiclónico (estación C14), se observó una mayor abundancia de diatomeas del orden Chaetocerotales en la estación C10 en superficie. En este estudio, debido al bajo número de muestras la comparación con respecto a la variable categórica de estructuras de mesoescala es poco robusta, sin embargo, las comparaciones con variables continuas (temperatura, salinidad, oxígeno) nos muestran claramente el efecto de estas estructuras sobre la comunidad.

3.4.3 La profundidad tiene un efecto claro sobre la actividad metabólica relativa y la función de los protistas

En el análisis de la actividad metabólica indicó que la profundidad tiene un efecto directo sobre la función de los protistas. En superficie, a nivel taxonómico de orden, se observó que los protistas fotosintéticos presentaron baja actividad en la estación C10 y cero actividades metabólicas relativas en las estaciones B5, B9 y C14. La baja actividad en superficie por parte de los fotosintéticos podría esperarse en respuesta a las condiciones opuestas de luz y nutrientes. El agua de superficie es más cálida y con mayor flotabilidad lo que produce un fuerte gradiente vertical, y los nutrientes se distribuyen del fondo hacia la superficie,

donde son escasos. En condición de mezcla los nutrientes se distribuyen con la profundidad y la mezcla alejaría a las algas de la luz y, por tanto, de su fuente de energía durante la mayor parte del tiempo. (Sigman et al., 2012). El exceso de irradiancia produce fotoinhibición del fotosistema II, con lo que disminuye la fotosíntesis y aunque el daño por fotoinhibición puede repararse por fotoaclimatación y disponibilidad de nutrientes, esto tiene efecto directo en la composición de pigmentos y en las tasas de renovación de proteínas (Alderkamp et al., 2010; Coesel et al., 2021).

Las condiciones ambientales en 0.1% de luz cambian drásticamente con respecto al DCM, que se localiza entre el 10 y 1% de luz en la región oceánica, y todos los taxones observados en esta profundidad presentaron actividad metabólica relativa (1-5). El 0.1% de luz coincidió con la oxiclina y con un aumento considerable del nitrato en las estaciones asociado también a las estructuras ciclónicas (B5, B9 y C10), comparado con la estación C14 que se encontró en un remolino anticiclónico donde la oxiclina, la termoclina y la nutriclina se profundizaron. En la estación C14 en particular, se presentó actividad de los protistas fotosintéticos independientemente de que fuese día o noche. Comparado con las estaciones B5, B9 y C10 en el 0.1 % de luz, donde las *Pelagomonas* aumentaron su actividad relativa y, junto con los grupos de los órdenes Bacillariophyceae (diatomeas pennadas), Mediophyceae (diatomeas centrales), Gyrista, Primnesiophyceae y los Dinophyceae presentaron actividad relativa sólo en condiciones luz. Estudios previos donde se analizaron ciclos diurnos de los protistas en la estación ALOHA y en la corriente de California, han reportado el aumento de actividad metabólica (trascritos) de diatomeas y haptophytas durante el anochecer, seguidos de bajadas de actividad metabólica durante la madrugada (Groussman et al., 2021; Kolody et al., 2019). Esto lo asocian a la reorganización de la célula en periodos de día/noche, que se atribuyen a procesos de fotoprotección, lo que minimiza la transcripción en periodos de ausencia de luz. En este crucero (MF-1), las muestras en condición de oscuridad se colectaron a las 3:00 a.m, lo que coincidió probablemente con esa disminución de actividad previamente reportada.

Los cambios biogeoquímicos en la profundidad del 0.1% de luz también se reflejaron en la comunidad de bacterias y arqueas que cambió de ser dominada en SUP y DCM por cianobacterias, que realizan fotosíntesis oxigénica, a ser dominada por proteobacterias, bacterias que juegan un papel importante de remineralización en la región mesopelágica (Mende et al., 2019). Además, en las estaciones de la región de Perdido (B5 y B9) aumentó la proporción de las Deltaproteobacterias SAR324 (Marine group B). Estas bacterias tienen la habilidad de obtener nitrógeno a partir de compuestos orgánicos y los ecotipos que se encuentran al inicio de la zona mesopelágica en condiciones de poca luz y con tolerancia al oxígeno presentan una alta abundancia de genes asociados al ciclo de Calvin-Benson en el que fijan carbono a partir de CO₂, y de genes responsables de incorporar formas simples y complejas de sacáridos (Boeuf et

al., 2021; Sheik et al., 2014). Sin embargo, los ecotipos de la zona totalmente oscura como SAR324 realizan principalmente quimiosíntesis (Boeuf et al., 2021, y referencias incluidas).

Pocos son los estudios en los que han asociado los protistas y su impacto en los ciclos biogeoquímicos en la zona del 0.1% de luz. Esta zona coincide con la oxiclina, muy poca luz y una comunidad microbiana eucariota que indica que dominan los procesos de remineralización (Boeuf et al., 2019; Giner et al., 2019; Ollison et al., 2021; Sun et al., 2024). Los protistas heterótrofos del orden Sagenista que corresponde al género *Labyrinthulomycetes*, RAD-C y *Spirotrichea* (ciliados), estuvieron activos en todas las estaciones en condiciones de luz y oscuridad, además, aumentaron su actividad relativa con la profundidad. Por ejemplo, los *Labyrinthulomycetes* son protistas que metabolizan la materia orgánica restante después de la degradación por las bacterias (Xie et al., 2021), lo que los convierte en un componente importante para la biogeoquímica en esta profundidad y que tan poco se sabe de su distribución y abundancia en la región tanto oceánica como costera del Golfo de México.

3.4.4 Los patrones de co-ocurrencia con los procariotas muestran nichos compartidos con la comunidad activa de los protistas

Las cianobacterias presentan patrones de sincronización de crecimiento, división y mortalidad con los cambios diurnos en océanos oligotróficos. Por ejemplo, la variación de abundancia de *Prochlorococcus* es muy poca de un día para otro, debido a que sus tasas de crecimiento y tasas de pérdida son muy similares (Ribalet et al., 2015; Vaulot & Marie, 1999). En este trabajo el análisis de las lecturas no mostró un patrón de cambio de abundancia de las cianobacterias significativo entre día y noche, además con el análisis de redundancia y la pregunta que se planteó fue si los protistas activos presentaban algún patrón de co-ocurrencia que indicaran asociaciones de endosimbiosis, predación o parasitismo. Es importante mencionar que los análisis de co-ocurrencia sólo permiten establecer hipótesis de las asociaciones y es necesario confirmar las asociaciones con técnicas de microscopía y moleculares como FISH (hibridación fluorescente *in situ*) (Johnson & Martiny, 2015).

Se sabe por experimentos *in situ* y etiquetado con isótopos (RNA-SIP) que los radiolarios, chrysophytas y los linajes de MAST son activos depredadores de *Prochlorococcus* (Wilken et al., 2023). Nuestros resultados mostraron que MAST-1C y MAST-3E se correlacionaron positivamente con el ecotipo de baja luz *Prochlorococcus* MIT9313 (Johnson et al., 2006), lo que nos podría indicar que MAST es más selectivo con

sus presas, comparado con el orden *Cryptomonadales_X*, el cual se correlacionó positivamente con *Synechococcus* CC9902, *Cyanobium* PCC6307 y con *Pseudobanabaena* PCC-7367. Por otro lado, la alta correlación entre especies estrictamente fotosintéticas como las del orden Pelagomonadales y *Phaeocystis* con las cianobacterias nos estaría indicando que comparten nicho ecológico, al igual que la correlación observada entre *Richellia* y MAST-3, ya que *Richellia* se asocia por simbiosis con diatomeas (Gómez et al., 2005) y el linaje ambiental sin cultivar coincide con *Solenicola* género endófito parásito de diatomeas (Gómez et al., 2010).

3.5 Conclusiones

En este capítulo se analizó a la comunidad activa metabólicamente, utilizando la fracción que se expresa del genoma (transcritos de ARN) y que representa a la comunidad con potencial para la sintetizar proteínas. Encontramos que en la profundidad de PAR0.1 presentó un mayor número de ASVs activos metabólicamente. La composición de la comunidad con respecto a ADN y ARN fue distinta y la disminución de lecturas y abundancia relativa de la comunidad activa de Dinoflagellata y Rhizaria nos indicó que son grupos con alto potencial de conformar parte de la materia orgánica particulada y disuelta.

La comunidad activa fue más sensible a los cambios ambientales y la composición respondió a las condiciones de mezcla de finales de invierno. La comunidad fue muy distinta entre SUR y PAR0.1 mientras que el DCM fue una mezcla de la comunidad superior e inferior.

Desde el punto de vista regional, la comunidad de Perdido respondió significativamente a la temperatura y la salinidad, mientras que la de Coatzacoalcos respondió significativamente a la temperatura, salinidad y ácido silicio, esto asociado a la estructura ciclónica y la bala salinidad que se presentó en la región de Perdido y el efecto de la costa en la regio de Coatzacoalcos.

La actividad metabólica relativa presentó un patrón claro donde la profundidad tuvo un efecto directo sobre la función de los protistas.

Los protistas fotosintéticos presentaron muy baja actividad en superficie, pero aumentó en el DCM. Mientras en el PAR0.1 en las estaciones influenciadas por estructuras de mesoescala de tipo ciclónico los protistas fotosintéticos solo presentaron actividad en condición de luz.

La profundidad PAR0.1 estuvo dominada por deltaproteobacterias, bacterias que juegan un rol muy importante en los procesos de remineralización de la materia orgánica en la región mesopelágica. Además, en esta profundidad aumentó la actividad metabólica relativa de los protistas heterótrofos.

Los patrones de co-ocurrencia entre la comunidad de protistas activos y cianobacterias mostraron asociaciones potenciales de predación y probablemente nicho ecológico compartido.

Sin embargo, se requieren modelos de co-ocurrencia más robustos para proponer hipótesis con un mejor sustento y poder obtener más información, más allá de patrones de correlación.

Literatura citada

- Agusti, S., Lubián, L. M., Moreno-Ostos, E., Estrada, M., & Duarte, C. M. (2019). Projected changes in photosynthetic picoplankton in a warmer subtropical ocean. *Frontiers in Marine Science*, 5(1), 506. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2018.00506/BIBTEX>
- Alderkamp, A. C., De Baar, H. J. W., Visser, R. J. W., & Arrigo, K. R. (2010). Can photoinhibition control phytoplankton abundance in deeply mixed water columns of the Southern Ocean? *Limnology and Oceanography*, 55(3), 1248–1264. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.3.1248>
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., & Huse, S. M. (2009). A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA Genes. *PLoS ONE*, 4(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006372>
- Andersen, R. A., Saunders, G. W., Paskind, M. P., & Sexton, J. P. (1993). Ultrastructure and 18s rRNA gene sequence for *Pelagomonas Calceolata* gen. et sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae classis nov.1. *Journal of Phycology*, 29(5), 701–715. <https://doi.org/10.1111/J.0022-3646.1993.00701.X>
- Anderson, S. R., Blanco-Bercial, L., Carlson, C. A., & Harvey, E. L. (2024). Role of Syndiniales parasites in depth-specific networks and carbon flux in the oligotrophic ocean. *ISME Communications*, 4(1), 14. <https://doi.org/10.1093/ISMECO/YCAE014>
- Anderson, S. R., & Harvey, E. L. (2020). Temporal Variability and Ecological Interactions of Parasitic Marine Syndiniales in Coastal Protist Communities. *MSphere*, 5(3). https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00209-20/SUPPL_FILE/MSPHERE.00209-20-SF005.TIF
- Armstrong, F. A. J., Stearns, C. R., & Strickland, J. D. H. (1967). The measurement of upwelling and subsequent biological process by means of the Technicon Autoanalyzer® and associated equipment. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 14(3), 381–389. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(67\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0011-7471(67)90082-4)
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., & Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Balch, W. M. (2018). The Ecology, Biogeochemistry, and Optical Properties of Coccolithophores. *Annual Review of Marine Science*, 10(1), 71–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121916-063319>
- Baumann, K.-H., & Boeckel, B. (2013). Spatial distribution of living coccolithophores in the southwestern Gulf of Mexico. *Journal of Micropalaeontology*, 32(2), 123–133. <https://doi.org/10.1144/jmpaleo2011-007>
- Beckett, S. J., Demory, D., Coenen, A. R., Casey, J. R., Dugenne, M., Follett, C. L., Connell, P., Carlson, M. C. G., Hu, S. K., Wilson, S. T., Muratore, D., Rodriguez-Gonzalez, R. A., Peng, S., Becker, K. W., Mende, D. R., Armbrust, E. V., Caron, D. A., Lindell, D., White, A. E., . . . Weitz, J. S. (2024). Disentangling top-down drivers of mortality underlying diel population dynamics of *Prochlorococcus* in the North Pacific Subtropical Gyre. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46165-3>

- Benoiston, A.-S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., & Bowler, C. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728), 20160397. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>
- Biard, T. (2022). Diversity and ecology of Radiolaria in modern oceans. *Environmental Microbiology*, 24, 2179–2200. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16004>
- Biard, T., Bigeard, E., Audic, S., Poulain, J., Gutierrez-Rodriguez, A., Pesant, S., Stemmann, L., & Not, F. (2017). Biogeography and diversity of Collodaria (Radiolaria) in the global ocean. *The ISME Journal*, 11(6), 1331–1344. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.12>
- Biard, T., Stemmann, L., Picheral, M., Mayot, N., Vandromme, P., Hauss, H., Gorsky, G., Guidi, L., Kiko, R., & Not, F. (2016). In situ imaging reveals the biomass of giant protists in the global ocean. *Nature*, 532(7600), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature17652>
- Bibby, T. S., & Moore, C. M. (2011). Silicate:nitrate ratios of upwelled waters control the phytoplankton community sustained by mesoscale eddies in sub-tropical North Atlantic and Pacific. *Biogeosciences*, 8(3), 657–666. <https://doi.org/10.5194/bg-8-657-2011>
- Biggs, D. C., Fargion, G. S., Hamilton, P., & Leben, R. R. (1996). Cleavage of a Gulf of Mexico Loop Current eddy by a deep water cyclone. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, 101(C9), 20629–20641. <https://doi.org/10.1029/96JC01078>
- Biggs, D. C., & Ressler, P. H. (2001). Distribution and abundance of phytoplankton, zooplankton, ichthyoplankton, and micronekton in deepwater Gulf of Mexico. *Gulf of Mexico Science*, 19(1), 7–29. <https://doi.org/10.18785/goms.1901.02>
- Blanco-Bercial, L., Parsons, R., Bolaños, L. M., Johnson, R., Giovannoni, S. J., & Curry, R. (2022). The protist community traces seasonality and mesoscale hydrographic features in the oligotrophic Sargasso Sea. *Frontiers in Marine Science*, 0, 1446. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.897140>
- Blazewicz, S. J., Barnard, R. L., Daly, R. A., & Firestone, M. K. (2013). Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *The ISME Journal*, 7(11), 2061–2068. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.102>
- Boeuf, D., Edwards, B. R., Eppley, J. M., Hu, S. K., Poff, K. E., Romano, A. E., Caron, D. A., Karl, D. M., & DeLong, E. F. (2019). Biological composition and microbial dynamics of sinking particulate organic matter at abyssal depths in the oligotrophic open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(24), 11824–11832. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903080116>
- Boeuf, D., Eppley, J. M., Mende, D. R., Malmstrom, R. R., Woyke, T., & DeLong, E. F. (2021). Metapangenomics reveals depth-dependent shifts in metabolic potential for the ubiquitous marine bacterial SAR324 lineage. *Microbiome*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01119-5>
- Bolaños, L. M., Karp-Boss, L., Choi, C. J., Worden, A. Z., Graff, J. R., Haëntjens, N., Chase, A. P., Della Penna, A., Gaube, P., Morison, F., Menden-Deuer, S., Westberry, T. K., O'Malley, R. T., Boss, E., Behrenfeld, M. J., & Giovannoni, S. J. (2020). Small phytoplankton dominate western North Atlantic biomass. *The ISME Journal*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0636-0>

- Brannock, P. M., Ortmann, A. C., Moss, A. G., & Halanych, K. M. (2016). Metabarcoding reveals environmental factors influencing spatio-temporal variation in pelagic micro-eukaryotes. *Molecular Ecology*, 25(15), 3593–3604. <https://doi.org/10.1111/mec.13709>
- Brown, S. L., Landry, M. R., Selph, K. E., Jin Yang, E., Rii, Y. M., & Bidigare, R. R. (2008). Diatoms in the desert: Plankton community response to a mesoscale eddy in the subtropical North Pacific. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 55(10–13), 1321–1333. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.02.012>
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. B. (2020). The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*, 35(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Suppl. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Caron, D. A., Countway, P. D., Jones, A. C., Kim, D. Y., & Schnetzer, A. (2012). Marine Protistan Diversity. *Annual Review of Marine Science*, 4(1), 467–493. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142802>
- Carradec, Q., Pelletier, E., Da Silva, C., Alberti, A., Seeleuthner, Y., Blanc-Mathieu, R., Lima-Mendez, G., Rocha, F., Tirichine, L., Labadie, K., Kirilovsky, A., Bertrand, A., Engelen, S., Madoui, M. A., Méheust, R., Poulain, J., Romac, S., Richter, D. J., Yoshikawa, G., ... Wincker, P. (2018). A global ocean atlas of eukaryotic genes. *Nature Communications*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02342-1>
- Cervantes-Díaz, G. Y., Hernández-Ayón, J. M., Zirino, A., Herzka, S. Z., Camacho-Ibar, V., Norzagaray, O., Barbero, L., Montes, I., Sudre, J., & Delgado, J. A. (2022). Understanding upper water mass dynamics in the Gulf of Mexico by linking physical and biogeochemical features. *Journal of Marine Systems*, 225, 103647. <https://doi.org/10.1016/J.JMARSYS.2021.103647>
- Chambouvet, A., Morin, P., Marie, D., & Guillou, L. (2008). Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science*, 322(5905), 1254–1257. <https://doi.org/10.1126/science.1164387>
- Charvet, S., Vincent, W. F., & Lovejoy, C. (2014). Effects of light and prey availability on Arctic freshwater protist communities examined by high-throughput DNA and RNA sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(3), 550–564. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12324>
- Choi, C. J., Jimenez, V., Needham, D. M., Poirier, C., Bachy, C., Alexander, H., Wilken, S., Chavez, F. P., Sudek, S., Giovannoni, S. J., & Worden, A. Z. (2020). Seasonal and Geographical Transitions in Eukaryotic Phytoplankton Community Structure in the Atlantic and Pacific Oceans. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.542372>
- Choi, J., & Park, J. S. (2020). Comparative analyses of the V4 and V9 regions of 18S rDNA for the extant eukaryotic community using the Illumina platform. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-63561-Z>

- Clayton, S., Lin, Y. C., Follows, M. J., & Worden, A. Z. (2017). Co-existence of distinct *Ostreococcus* ecotypes at an oceanic front. *Limnology and Oceanography*, *62*(1), 75–88. <https://doi.org/10.1002/LNO.10373>
- Coesel, S. N., Durham, B. P., Groussman, R. D., Hu, S. K., Caron, D. A., Morales, R. L., Ribalet, F., & Armbrust, E. V. (2021). Diel transcriptional oscillations of light-sensitive regulatory elements in open-ocean eukaryotic plankton communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.2011038118>
- Conway, J. R., Lex, A., & Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics*, *33*(18), 2938–2940. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx364>
- Cortés, M. Y., Bollmann, J., & Thierstein, H. R. (2001). Coccolithophore ecology at the HOT station ALOHA, Hawaii. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *48*(8–9), 1957–1981. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(00\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(00)00165-X)
- Countway, P. D., Gast, R. J., Dennett, M. R., Savai, P., Rose, J. M., & Caron, D. A. (2007). Distinct protistan assemblages characterize the euphotic zone and deep sea (2500 m) of the western North Atlantic (Sargasso Sea and Gulf Stream). *Environmental Microbiology*, *9*(5), 1219–1232. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2007.01243.X>
- Cullen, J. J. (2015). Subsurface chlorophyll maximum layers: Enduring enigma or mystery solved? *Annual Review of Marine Science*, *7*(7), 207–239. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MARINE-010213-135111/CITE/REFWORKS>
- Cullen JJ, Franks PJS, Karl DM, Longhurst A (2002) Physical influences on marine ecosystem dynamics. In: Robinson AR, McCarthy JJ, Rothschild BJ (eds) *The sea*, Vol 12. John Wiley & Sons, New York, NY, p 297–336
- Cuvelier, M. L., Allen, A. E., Monier, A., McCrow, J. P., Messié, M., Tringe, S. G., Woyke, T., Welsh, R. M., Ishoey, T., Lee, J. H., Binder, B. J., DuPont, C. L., Latasa, M., Guigand, C., Buck, K. R., Hilton, J., Thiagarajan, M., Caler, E., Read, B., ... Worden, A. Z. (2010). Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(33), 14679–14684. https://doi.org/10.1073/PNAS.1001665107/SUPPL_FILE/PNAS.201001665SI.PDF
- Damien, P., Pasqueron de Fommervault, O., Sheinbaum, J., Jouanno, J., Camacho-Ibar, V. F., & Duteil, O. (2018). Partitioning of the Open Waters of the Gulf of Mexico Based on the Seasonal and Interannual Variability of Chlorophyll Concentration. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, *123*(4), 2592–2614. <https://doi.org/10.1002/2017JC013456>
- de Boyer Montégut, C., Madec, G., Fischer, A. S., Lazar, A., & Iudicone, D. (2004). Mixed layer depth over the global ocean: An examination of profile data and a profile-based climatology. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, *109*(12), 1–20. <https://doi.org/10.1029/2004JC002378>
- De La Rocha, C. L., & Passow, U. (2014). The Biological Pump. *Treatise on Geochemistry: (2a. ed.)*, 93–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00604-5>
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahe, F., Logares, R., Lara, E., Berney, C., Le Bescot, N., Probert, I., Carmichael, M., Poulain, J., Romac, S., Colin, S., Aury, J.-M., Bittner, L., Chaffron, S.,

- Dunthorn, M., Engelen, S., ... Velayoudon, D. (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348(6237), 1261605–1261605. <https://doi.org/10.1126/science.1261605>
- Delgado, J. A., Sudre, J., Tanahara, S., Montes, I., Hernández-Ayón, J. M., & Zirino, A. (2019). Effect of Caribbean Water incursion into the Gulf of Mexico derived from absolute dynamic topography, satellite data, and remotely sensed chlorophyll; *Ocean Science*, 15(6), 1561–1578. <https://doi.org/10.5194/os-15-1561-2019>
- Demir-Hilton, E., Sudek, S., Cuvelier, M. L., Gentemann, C. L., Zehr, J. P., & Worden, A. Z. (2011). Global distribution patterns of distinct clades of the photosynthetic picoeukaryote *Ostreococcus*. *ISME Journal*, 5(7), 1095–1107. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.209>
- Dimier, Cé., Brunet, C., Geider, R., & Raven, J. (2009). Growth and photoregulation dynamics of the picoeukaryote *Pelagomonas calceolata* in fluctuating light. *Limnology and Oceanography*, 54(3), 823–836. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.3.0823>
- Dupont, C. L., Mccrow, J. P., Valas, R., Moustafa, A., Walworth, N., Goodenough, U., Roth, R., Hogle, S. L., Bai, J., Johnson, Z. I., Mann, E., Palenik, B., Barbeau, K. A., Craig Venter, J., & Allen, A. E. (2015). Genomes and gene expression across light and productivity gradients in eastern subtropical Pacific microbial communities. *ISME Journal*, 9(5), 1076–1092. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.198>
- Durán-Campos, E., Salas-de-León, D. A., Monreal-Gómez, M. A., & Coria-Monter, E. (2017). Patterns of chlorophyll-a distribution linked to mesoscale structures in two contrasting areas Campeche Canyon and Bank, Southern Gulf of Mexico. *Journal of Sea Research*, 123, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.03.013>
- Duret, M. T., Lampitt, R. S., & Lam, P. (2020). Eukaryotic influence on the oceanic biological carbon pump in the Scotia Sea as revealed by 18S rRNA gene sequencing of suspended and sinking particles. *Limnology and Oceanography*, 65(S1), S49–S70. <https://doi.org/10.1002/LNO.11319>
- Endo, H., Ogata, H., & Suzuki, K. (2018). Contrasting biogeography and diversity patterns between diatoms and haptophytes in the central Pacific Ocean. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29039-9>
- Eppley, R. W., & Cullen, J. J. (1981). Chlorophyll Maximum Layers of the Southern California Bight and Possible Mechanisms of Their Formation and Maintenance. *Oceanologica Acta*, 4(1), 23–32.
- Eppley, R. W., & Peterson, B. J. (1979). Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature*, 282(5740), 677–680. <https://doi.org/10.1038/282677a0>
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682), 354–360. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1095964/SUPPL_FILE/FALKOWSKI.SOM.PDF
- Falkowski, P.G., Laws, E.A., Barber, R.T., Murray, J.W. (2003). Phytoplankton and Their Role in Primary, New, and Export Production. En: Fasham, M.J.R. (eds) Ocean Biogeochemistry. Global Change — The IGBP Series (closed). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55844-3_5
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 538–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>

- Sánchez-Soto Jiménez, M., Cerqueda-García, D., Montero-Muñoz, J. L., Leopoldina Aguirre-Macedo, M., & García-Maldonado, J. Q. (2018). Assessment of the bacterial community structure in shallow and deep sediments of the Perdido Fold Belt region in the Gulf of Mexico. *PeerJ*, 2018(9), e5583. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.5583/SUPP-15>
- Flynn, K. J., Mitra, A., Anestis, K., Anschütz, A. A., Calbet, A., Ferreira, G. D., Gypens, N., Hansen, P. J., John, U., Martin, J. L., Mansour, J. S., Maselli, M., Medić, N., Norlin, A., Not, F., Pitta, P., Romano, F., Saiz, E., Schneider, L. K., ... Traboni, C. (2019). Mixotrophic protists and a new paradigm for marine ecology: where does plankton research go now? *Journal of Plankton Research*, 41(4), 375–391. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBZ026>
- Frias-Lopez, J., Thompson, A., Waldbauer, J., & Chisholm, S. W. (2009). Use of stable isotope-labelled cells to identify active grazers of picocyanobacteria in ocean surface waters. *Environmental Microbiology*, 11(2), 512–525. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01793.x>
- Fuhrman, J. A., Cram, J. A., & Needham, D. M. (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology* 13(3), 133–146. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3417>
- Gaona-Hernández, A., Suárez-Morales, E., Linacre, L., Compaire, J. C., Lara-Lara, J. R., & Herzka, S. Z. (2024). Seasonal variability drives differences in the structure of the calanoid copepod community in two contrasting regions of the Gulf of Mexico. *Journal of Plankton Research*, 46(2), 158–173. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbad057>
- Geisen, S., Vaultot, D., Mahé, F., Lara, E., Vargas, C. de, & Bass, D. (2019). A user guide to environmental protistology: primers, metabarcoding, sequencing, and analyses. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/850610>
- Georges, C., Monchy, S., Genitsaris, S., & Christaki, U. (2014). Protist community composition during early phytoplankton blooms in the naturally iron-fertilized Kerguelen area (Southern Ocean). *Bioeosciences*, 11, 5847–5863. <https://doi.org/10.5194/bg-11-5847-2014>
- Gérikas Ribeiro, C., Lopes dos Santos, A., Marie, D., Pereira Brandini, F., & Vaultot, D. (2018). Small eukaryotic phytoplankton communities in tropical waters off Brazil are dominated by symbioses between Haptophyta and nitrogen-fixing cyanobacteria. *The ISME Journal*, 12(5), 1360–1374. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0050-z>
- Giner, C. R., Pernice, M. C., Balagué, V., Duarte, C. M., Gasol, J. M., Logares, R., & Massana, R. (2020). Marked changes in diversity and relative activity of picoeukaryotes with depth in the world ocean. *ISME Journal*, 14(2), 437–449. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0506-9>
- Glibert, P. M., & Mitra, A. (2022). From webs, loops, shunts, and pumps to microbial multitasking: Evolving concepts of marine microbial ecology, the mixoplankton paradigm, and implications for a future ocean. *Limnology and Oceanography*, 67(3), 585–597. <https://doi.org/10.1002/lno.12018>
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. In *Frontiers in Microbiology*. 8(11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>

- Gómez, F., Furuya, K., & Takeda, S. (2005). Distribution of the cyanobacterium *Richelia intracellularis* as an epiphyte of the diatom *Chaetoceros compressus* in the western Pacific Ocean. *Journal of Plankton Research*, 27(4), 323–330. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBI007>
- Gómez, F., Moreira, D., Benzerara, K., & López-García, P. (2011). *Solenicola setigera* is the first characterized member of the abundant and cosmopolitan uncultured marine stramenopile group MAST-3. *Environmental Microbiology*, 13(1), 193–202. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02320.x>
- Gong, J., Dong, J., Liu, X., & Massana, R. (2013). Extremely High Copy Numbers and Polymorphisms of the rDNA Operon Estimated from Single Cell Analysis of Oligotrich and Peritrich Ciliates. *Protist*, 164(3), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2012.11.006>
- Gong, W., & Marchetti, A. (2019). Estimation of 18S gene copy number in marine eukaryotic plankton using a next-generation sequencing approach. *Frontiers in Marine Science*, 6(4), 219. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2019.00219/BIBTEX>
- Gran-Stadniczeňko, S., Krabberød, A. K., Sandaa, R. A., Yau, S., Egge, E., & Edvardsen, B. (2019). Seasonal dynamics of algae-infecting viruses and their inferred interactions with protists. *Viruses*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/v11111043>
- Gran-Stadniczeňko, S., Šupraha, L., Egge, E. D., & Edvardsen, B. (2017). Haptophyte Diversity and Vertical Distribution Explored by 18S and 28S Ribosomal RNA Gene Metabarcoding and Scanning Electron Microscopy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(4), 514–532. <https://doi.org/10.1111/JEU.12388>
- Gray, N. D., & Head, I. M. (2008). Microbial Ecology. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, 2357–2368. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00519-X>
- Gregg, W. W., & Rousseaux, C. S. (2019). Global ocean primary production trends in the modern ocean color satellite record (1998-2015). *Environmental Research Letters*, 14(12). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab4667>
- Grippo, M. A., Fleeger, J. W., Rabalais, N. N., Condrey, R., & Carman, K. R. (2010). Contribution of phytoplankton and benthic microalgae to inner shelf sediments of the north-central Gulf of Mexico. *Continental Shelf Research*, 30(5), 456–466. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2009.12.015>
- Groussman, R. D., Coesel, S. N., Durham, B. P., & Armbrust, E. V. (2021). Diel-Regulated Transcriptional Cascades of Microbial Eukaryotes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682651>
- Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., & Brors, B. (2014). Circlize Implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(19), 2811–2812. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU393>
- Guérin, N., Ciccarella, M., Flamant, E., Frémont, P., Mangenot, S., Istace, B., Noel, B., Romac, S., Bachy, C., Gachenot, M., Pelletier, E., Alberti, A., Jaillon, O., Cruaud, C., Wincker, P., Aury, J.-M., & Carradec, Q. (2021). Genomic adaptation of the picoeukaryote *Pelagomonas calceolata* to iron-poor oceans revealed by a chromosome-scale genome sequence. *BioRxiv*, 2021.10.25. <https://doi.org/10.1101/2021.10.25.465678>

- Guerrero, A., Licea, A. F., & Lizárraga-Partida, M. L. (2022). Metagenomic analysis among water masses and sediments from the Southern Gulf of Mexico. *Frontiers in Marine Science*, *9*, 2146. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.1020136/BIBTEX>
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., del Campo, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W. H. C. F., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R., ... Christen, R. (2012). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D597–D604. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>
- Guillou, L., Viprey, M., Chambouvet, A., Welsh, R. M., Kirkham, A. R., Massana, R., Scanlan, D. J., & Worden, A. Z. (2008). Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). *Environmental Microbiology*, *10*(12), 3349–3365. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01731.x>
- Gutiérrez-Rodríguez, A., Lopes dos Santos, A., Safi, K., Probert, I., Not, F., Fernández, D., Gourvil, P., Bilewitch, J., Hulston, D., Pinkerton, M., & Nodder, S. D. (2022). Planktonic protist diversity across contrasting Subtropical and Subantarctic waters of the southwest Pacific. *Progress in Oceanography*, *206*, 102809. <https://doi.org/10.1016/J.POCEAN.2022.102809>
- Gutierrez-Rodriguez, A., Stukel, M. R., Lopes dos Santos, A., Biard, T., Scharek, R., Vaulot, D., Landry, M. R., & Not, F. (2019). High contribution of Rhizaria (Radiolaria) to vertical export in the California Current Ecosystem revealed by DNA metabarcoding. *ISME Journal*, *13*(4), 964–976. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0322-7>
- Hagino, K., Onuma, R., Kawachi, M., & Horiguchi, T. (2013). Discovery of an Endosymbiotic Nitrogen-Fixing Cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae). *PLoS ONE*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081749>
- Haidar, A. T., & Thierstein, H. R. (2001). Coccolithophore dynamics off Bermuda (N. Atlantic). *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *48*(8–9), 1925–1956. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(00\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(00)00169-7)
- Hamilton, P., Leben, R., Bower, A., Furey, H., & Pérez-Brunius, P. (2018). Hydrography of the Gulf of Mexico using autonomous floats. *Journal of Physical Oceanography*, *48*(4), 773–794. <https://doi.org/10.1175/JPO-D-17-0205.1>
- Hansen, P. J., & Hjorth, M. (2002). Growth and grazing responses of *Chrysochromulina ericina* (Prymnesiophyceae): The role of irradiance, prey concentration and pH. *Marine Biology*, *141*(5), 975–983. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0879-5>
- Hawco, N. J., Barone, B., Church, M. J., Babcock-Adams, L., Repeta, D. J., Wear, E. K., Foreman, R. K., Björkman, K. M., Bent, S., Van Mooy, B. a. S., Sheyn, U., DeLong, E. F., Acker, M., Kelly, R. L., Nelson, A., Ranieri, J., Clemente, T. M., Karl, D. M., & John, S. G. (2021). Iron depletion in the deep chlorophyll maximum: mesoscale eddies as natural iron fertilization experiments. *Global Biogeochemical Cycles*, *35*(12). <https://doi.org/10.1029/2021gb007112>
- Henson, S. A., Cael, B. B., Allen, S. R., & Dutkiewicz, S. (2021). Future phytoplankton diversity in a changing climate. *Nature Communications*, *12*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25699-w>

- Hernández-Becerril, D. U., Aquino-Cruz, A., Salas-de-León, D. A., Signoret-Poillon, M., & Monreal-Gómez, M. A. (2012). Studies on picophytoplankton in the southern Gulf of Mexico: pigment analysis and potential importance of the picoeukaryote Prasinophyte *Micromonas pusilla*. *Marine Biology Research*, 8(4), 331–340. <https://doi.org/10.1080/17451000.2011.638639>
- Hernández-Becerril, D. U., & Flores Granados, C. (1998). Species of the diatom genus *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) in the plankton from the southern Gulf of Mexico. *Botanica Marina*, 41(5), 505–519. <https://doi.org/10.1515/BOTM.1998.41.1-6.505>
- Hernández-Becerril, D. U., García-Reséndiz, J. A., Salas-de León, D. A., Monreal-Gómez, M. A., Signoret-Poillon, M., & Aldeco-Ramírez, J. (2008). Nanoplankton fraction in the phytoplankton structure in the southern Gulf of Mexico (April 2000). *Ciencias Marinas*, 34(1), 77–90. <https://doi.org/10.7773/cm.v34i1.1263>
- Hu, S. K., Campbell, V., Connell, P., Gellene, A. G., Liu, Z., Terrado, R., & Caron, D. A. (2016). Protistan diversity and activity inferred from RNA and DNA at a coastal ocean site in the eastern North Pacific. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw050. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIW050>
- Hu, S. K., Connell, P. E., Mesrop, L. Y., & Caron, D. A. (2018). A Hard Day's Night: Diel Shifts in Microbial Eukaryotic Activity in the North Pacific Subtropical Gyre. *Frontiers in Marine Science*, 5(10), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00351>
- Hu, S. K., Liu, Z., Alexander, H., Campbell, V., Connell, P. E., Dyhrman, S. T., Heidelberg, K. B., & Caron, D. A. (2018a). Shifting metabolic priorities among key protistan taxa within and below the euphotic zone. *Environmental Microbiology*, 20(8), 2865–2879. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14259>
- Hu, S. K., Liu, Z., Alexander, H., Campbell, V., Connell, P. E., Dyhrman, S. T., Heidelberg, K. B., & Caron, D. A. (2018). Shifting metabolic priorities among key protistan taxa within and below the euphotic zone. *Environmental Microbiology*, 20(8), 2865–2879. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14259>
- Huang, P. Q., Lu, Y. Z., & Zhou, S. Q. (2018). An objective method for determining ocean mixed layer depth with applications to WOCE data. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, 35(3), 441–458. <https://doi.org/10.1175/JTECH-D-17-0104.1>
- Hydes, D., Aoyama, M., Aminot, A., Bakker, K., Becker, S., Coverly, S., Daniel, A., Dickson, A., Grosso, O., Kerouel, R., J. V. O., Sato, K., Tanhua, T., Woodward, M., & Zhang, J. (2010, June 1). Determination of dissolved nutrients (N, P, Si) in seawater with high precision and inter-comparability using gas-segmented continuous flow analysers. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00020/13141/>
- Ibarbalz, F. M., Henry, N., Brandão, M. C., Martini, S., Bussení, G., Byrne, H., Coelho, L. P., Endo, H., Gasol, J. M., Gregory, A. C., Mahé, F., Rigonato, J., Royo-Llonch, M., Salazar, G., Sanz-Sáez, I., Scalco, E., Siviadan, D., Zayed, A. A., Zingone, A., ... Zinger, L. (2019). *Global Trends in Marine Plankton Diversity across Kingdoms of Life*. *Cell*, 179(5), 1084–1097. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.10.008>
- Johnson, Z. I., & Martiny, A. C. (2015). Techniques for Quantifying Phytoplankton Biodiversity. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 299–324. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015902>
- Johnson, Z. I., Zinser, E. R., Coe, A., McNulty, N. P., Woodward, E. M. S., & Chisholm, S. W. (2006). Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science*, 311(5768), 1737–1740. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1118052>

- Junger, P. C., Sarmiento, H., Giner, C. R., Mestre, M., Sebastián, M., Morán, X. A. G., Aristegui, J., Agustí, S., Duarte, C. M., Acinas, S. G., Massana, R., Gasol, J. M., & Logares, R. (2023). Global biogeography of the smallest plankton across ocean depths. *Science Advances*, 9(45). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADG9763/SUPPL_FILE/SCIADV.ADG9763_SM.PDF
- Kang, Y., Harke, M. J., Berry, D. L., Collier, J. L., Wilhelm, S. W., Dyhrman, S. T., & Gobler, C. J. (2021). Transcriptomic Responses of Four Pelagophytes to Nutrient (N, P) and Light Stress. *Frontiers in Marine Science*, 8, 223. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.636699/BIBTEX>
- Kelly, T. B., Knapp, A. N., Landry, M. R., Selph, K. E., Shropshire, T. A., Thomas, R. K., & Stukel, M. R. (2021). Lateral advection supports nitrogen export in the oligotrophic open-ocean Gulf of Mexico. *Nature Communications*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23678-9>
- Kemp, A. E. S., & Villareal, T. A. (2013). High diatom production and export in stratified waters – A potential negative feedback to global warming. *Progress in Oceanography*, 119, 4–23. <https://doi.org/10.1016/J.POCEAN.2013.06.004>
- Kemp, A. E. S., & Villareal, T. A. (2018). The case of the diatoms and the muddled mandalas: Time to recognize diatom adaptations to stratified waters. *Progress in Oceanography*, 167, 138–149. <https://doi.org/10.1016/J.POCEAN.2018.08.002>
- Ki, J. S. (2012). Hypervariable regions (V1-V9) of the dinoflagellate 18S rRNA using a large dataset for marker considerations. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1035–1043. <https://doi.org/10.1007/S10811-011-9730-Z/TABLES/2>
- Kolody, B. C., McCrow, J. P., Allen, L. Z., Aylward, F. O., Fontanez, K. M., Moustafa, A., Moniruzzaman, M., Chavez, F. P., Scholin, C. A., Allen, E. E., Worden, A. Z., Delong, E. F., & Allen, A. E. (2019). Diel transcriptional response of a California Current plankton microbiome to light, low iron, and enduring viral infection. *The ISME Journal*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0472-2>
- Kong, H., Yang, E. J., Jiao, N., Lee, Y., Jung, J., Cho, K. H., Moon, J. K., Kim, J. H., & Xu, D. (2023). RNA outperforms DNA-based metabarcoding in assessing the diversity and response of microeukaryotes to environmental variables in the Arctic Ocean. *Science of the Total Environment*, 876. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162608>
- Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R., Medlin, L. K., & Mann, D. G. (2007). The Origin and Evolution of the Diatoms. Their Adaptation to a Planktonic Existence. En *Evolution of Primary Producers in the Sea* (Issue December). <https://doi.org/10.1016/B978-012370518-1/50012-6>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Krupke, A., Mohr, W., Laroche, J., Fuchs, B. M., Amann, R. I., & Kuypers, M. M. M. (2015). The effect of nutrients on carbon and nitrogen fixation by the UCYN-A-haptophyte symbiosis. *ISME Journal*, 9(7), 1635–1647. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.253>
- Kurczyn, J. A., Duran, R., Beier, E., & Souza, A. J. (2021). On the Advection of Upwelled Water on the Western Yucatan Shelf. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1450. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.723452/BIBTEX>

- Kurtz, Z. D., Müller, C. L., Miraldi, E. R., Littman, D. R., Blaser, M. J., & Bonneau, R. A. (2015). Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLOS Computational Biology*, 11(5), e1004226. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004226>
- Latasa, M., Cabello, A. M., Morán, X. A. G., Massana, R., & Scharek, R. (2017). Distribution of phytoplankton groups within the deep chlorophyll maximum. *Limnology and Oceanography*, 62(2), 665–685. <https://doi.org/10.1002/lno.10452>
- Latorre, F., Deutschmann, I. M., Labarre, A., Obiol, A., Krabberød, A. K., Pelletier, E., Sieracki, M. E., Cruaud, C., Jaillon, O., Massana, R., & Logares, R. (2021). Niche adaptation promoted the evolutionary diversification of tiny ocean predators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(25). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2020955118>
- Le Bescot, N., Mahé, F., Audic, S., Dimier, C., Garet, M. J., Poulain, J., Wincker, P., de Vargas, C., & Siano, R. (2016). Global patterns of pelagic dinoflagellate diversity across protist size classes unveiled by metabarcoding. *Environmental Microbiology*, 18(2), 609–626. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13039>
- Lê Cao, K. A., Rossouw, D., Robert-Granié, C., & Besse, P. (2008). A sparse PLS for variable selection when integrating omics data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1390>
- Leben, R. R. (2005). Altimeter-derived loop current metrics. In *Geophysical Monograph Series* (Vol. 161, pp. 181–201). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1029/161GM15>
- Lee-Sánchez, E., Camacho-Ibar, V. F., Velásquez-Aristizábal, J. A., Valencia-Gasti, J. A., & Samperio-Ramos, G. (2022a). Impacts of mesoscale eddies on the nitrate distribution in the deep-water region of the Gulf of Mexico. *Journal of Marine Systems*, 229(2), 103721. <https://doi.org/10.1016/j.imarsys.2022.103721>
- Lefler, F. W., Berthold, D. E., & Laughinghouse, H. D. (2023). Cyanoseq: A database of cyanobacterial 16S rRNA gene sequences with curated taxonomy. *Journal of Phycology*, 59(3), 470–480. <https://doi.org/10.1111/JPY.13335>
- Legendre, P., & Anderson, M. J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, 69(1), 1–24. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(1999\)069\[0001:DBRATM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(1999)069[0001:DBRATM]2.0.CO;2)
- Legendre, P., Oksanen, J., & ter Braak, C. J. F. (2011). Testing the significance of canonical axes in redundancy analysis. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(3), 269–277. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00078.x>
- Leles, S. G., Polimene, L., Bruggeman, J., Blackford, J., Ciavatta, S., Mitra, A., & Flynn, K. J. (2018). Modelling mixotrophic functional diversity and implications for ecosystem function. *Journal of Plankton Research*, 40(6), 627–642. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBY044>
- Li, C., Chiang, K. P., Laws, E. A., Liu, X., Chen, J., Huang, Y., Chen, B., Tsai, A. Y., & Huang, B. (2022). Quasi-Antiphase Diel Patterns of Abundance and Cell Size/Biomass of Picophytoplankton in the Oligotrophic Ocean. *Geophysical Research Letters*, 49(5). <https://doi.org/10.1029/2022GL097753>

- Licea, S., Ruiz-Moreno, J. L., & Luna, R. (2016). Checklist of Diatoms (Bacillariophyceae) from the Southern Gulf of Mexico: Data-Base (1979-2010) and New Records. *Journal of Biodiversity & Endangered Species*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2332-2543.1000174>
- Licea, S., Zamudio, M. E., Luna, R., & Soto, J. (2004). Free-living dinoflagellates in the southern Gulf of Mexico: Report of data (1979-2002). *Phycological Research*, 52(4), 419–428. <https://doi.org/10.1111/J.1440-183.2004.00364.X>
- Lin, Y. C., Campbell, T., Chung, C. C., Gong, G. C., Chiang, K. P., & Worden, A. Z. (2012). Distribution patterns and phylogeny of marine stramenopiles in the North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3387–3399. https://doi.org/10.1128/AEM.06952-11/SUPPL_FILE/AEM-AEM06952-11-S03.ZIP
- Lin, Y., Chin, C., Yang, J. W., Chiang, K., Hsieh, C., Gong, G., Shih, C., & Chen, S. (2021). How Communities of Marine Stramenopiles Varied with Environmental and Biological Variables in the Subtropical Northwestern Pacific Ocean. *Microbial Ecology*, 83(4), 916–928. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01788-7>
- Linacre, L., Durazo, R., Camacho-Ibar, V. F., Selph, K. E., Lara-Lara, J. R., Mirabal-Gómez, U., Bazán-Guzmán, C., Lago-Lestón, A., Fernández-Martín, E. M., & Sidón-Ceseña, K. (2019). Picoplankton Carbon Biomass Assessments and Distribution of Prochlorococcus Ecotypes Linked to Loop Current Eddies During Summer in the Southern Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 124(11), 8342–8359. <https://doi.org/10.1029/2019JC015103>
- Linacre, L., Durazo, R., Camacho-Ibar, V., Mirabal-Gómez, U., Velásquez-Aristizábal, J. A., Sánchez-Robles, C., Lara-Lara, J. R., & Bazán-Guzmán, C. (2024). Drivers of microbial carbon biomass variability in two oceanic regions of the Gulf of Mexico. *Progress in Oceanography*, 103348. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2024.103348>
- Linacre, L., Lara-Lara, R., Camacho-Ibar, V., Herguera, J. C., Bazán-Guzmán, C., & Ferreira-Bartrina, V. (2015). Distribution pattern of picoplankton carbon biomass linked to mesoscale dynamics in the southern gulf of Mexico during winter conditions. *Deep Sea Research Part I Oceanographic Research Papers*, 106, 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2015.09.009>
- Linacre, L., Sánchez-Robles, C., Mirabal-Gómez, U., Lara-Lara, J. R., & Bazán-Guzmán, C. (2021). Cell carbon content and biomass assessments of dinoflagellates and diatoms in the oceanic ecosystem of the Southern Gulf of Mexico. *PLoS ONE*, 16(2), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247071>
- Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., Not, F., & De Vargas, C. (2009). Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12803–12808. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0905841106>
- Liu, S., Cui, Z., Zhao, Y., & Chen, N. (2022). Composition and spatial-temporal dynamics of phytoplankton community shaped by environmental selection and interactions in the Jiaozhou Bay. *Water Research*, 218(0.), 118488. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2022.118488>
- Liu, Y., Hu, Z., Deng, Y., Shang, L., Gobler, C. J., & Tang, Y. Z. (2021). Dependence of genome size and copy number of rRNA gene on cell volume in dinoflagellates. *Harmful Algae*, 109, 102108. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2021.102108>

- Logares, R., Sunagawa, S., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F. M., Ferrera, I., Sarmiento, H., Hingamp, P., Ogata, H., de Vargas, C., Lima-Mendez, G., Raes, J., Poulain, J., Jaillon, O., Wincker, P., Kandels-Lewis, S., Karsenti, E., Bork, P., & Acinas, S. G. (2014). Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environmental Microbiology*, *16*(9), 2659–2671. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12250>
- Lopes dos Santos, A., Ong, D., Vault, D., Gérikas Ribeiro, C., Garczarek, L., Shi, X. L., Gutiérrez-Rodríguez, A. (2021). Phytoplankton diversity and ecology through the lens of high throughput sequencing technologies. En *Advances in Phytoplankton Ecology: Applications of Emerging Technologies* (pp. 353–413). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822861-6.00020-0>
- Lorbacher, K., Dommenges, D., Niiler, P. P., & Köhl, A. (2006). Ocean mixed layer depth: A subsurface proxy of ocean-atmosphere variability. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, *111*(C7), 7010. <https://doi.org/10.1029/2003JC002157>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker, P., Iudicone, D., De Vargas, C., Bittner, L., Zingone, A., & Bowler, C. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(11), E1516–E1525. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1509523113/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Marañón, E. (2015). Cell Size as a Key Determinant of Phytoplankton Metabolism and Community Structure. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Marine-010814-015955>, *7*, 241–264. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MARINE-010814-015955>
- Marañón, E., Holligan, P. M., Barciela, R., González, N., Mouriño, B., Pazó, M. J., & Varela, M. (2001). Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Marine Ecology Progress Series*, *216*, 43–56. <https://doi.org/10.3354/meps216043>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *17*(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martinez, M. A., Hereu, C. M., Arteaga, M. C., Jiménez-Rosenberg, S. P. A., Herzka, S. Z., Saavedra-Flores, A., Robles-Flores, J., Gomez-Reyes, R., Batta-Lona, P. G., Gasca-Pineda, J., & Galindo-Sánchez, C. E. (2021). Epipelagic zooplankton diversity in the deep water region of the Gulf of Mexico: a metabarcoding survey. *ICES Journal of Marine Science*, *78*(9), 3317–3332. <https://doi.org/10.1093/ICESJMS/FSAB090>
- Martínez-López, B., & Zavala-Hidalgo, J. (2009). Seasonal and interannual variability of cross-shelf transports of chlorophyll in the Gulf of Mexico. *Journal of Marine Systems*, *77*(1–2), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2008.10.002>
- Massana, R. (2011). Eukaryotic Picoplankton in Surface Oceans. *Annual Review of Microbiology*, *65*(1), 91–110. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102903>
- Massana, R., Del Campo, J., Sieracki, M. E., Audic, S., & Logares, R. (2014). Exploring the uncultured microeukaryote majority in the oceans: reevaluation of ribogroups within stramenopiles. *The ISME Journal*, *8*(4), 854. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2013.204>

- Massana, R., Gobet, A., Audic, S., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., Chambouvet, A., Christen, R., Claverie, J. M., Decelle, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Forn, I., Forster, D., Guillou, L., Jaillon, O., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., ... de Vargas, C. (2015). Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environmental Microbiology*, 17(10), 4035–4049. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12955>
- McGillicuddy, D. J., Anderson, L. A., Bates, N. R., Bibby, T., Buesseler, K. O., Carlson, C. A., Davis, C. S., Ewart, C., Falkowski, P. G., Goldthwait, S. A., Hansell, D. A., Jenkins, W. J., Johnson, R., Kosnyrev, V. K., Ledwell, J. R., Li, Q. P., Siegel, D. A., & Steinberg, D. K. (2007). Eddy/Wind interactions stimulate extraordinary mid-ocean plankton blooms. *Science*, 316(5827), 1021–1026. <https://doi.org/10.1126/science.1136256>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mende, D. R., Boeuf, D., & DeLong, E. F. (2019). Persistent Core Populations Shape the Microbiome Throughout the Water Column in the North Pacific Subtropical Gyre. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2273. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02273>
- Merino-Virgilio, F. del C., Okolodkov, Y. B., Aguilar-Trujillo, A. C., & Herrera-Silveira, J. A. (2013). Phytoplankton of the northern coastal and shelf waters of the Yucatan Peninsula, southeastern Gulf of Mexico, Mexico. *Check List*, 9(4), 771–779. <https://doi.org/10.15560/9.4.771>
- Millard, R. C., Owens, W. B., & Fofonoff, N. P. (1990). On the calculation of the Brunt-Väisälä frequency. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 37(1), 167–181. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(90\)90035-T](https://doi.org/10.1016/0198-0149(90)90035-T)
- Millette, N. C., Gast, R. J., Luo, J. Y., Moeller, H. V., Stamieszkin, K., Andersen, K. H., Brownlee, E. F., Cohen, N. R., Duhamel, S., Dutkiewicz, S., Glibert, P. M., Johnson, M. D., Leles, S. G., Maloney, A. E., Mcmanus, G. B., Poulton, N., Princiotta, S. D., Sanders, R. W., & Wilken, S. (2023). Mixoplankton and mixotrophy: future research priorities. *Journal of Plankton Research*, 45(4), 576–596. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBAD020>
- Mitra, A., Flynn, K. J., Burkholder, J. M., Berge, T., Calbet, A., Raven, J. A., Granéli, E., Glibert, P. M., Hansen, P. J., Stoecker, D. K., Thingstad, F., Tillmann, U., Våge, S., Wilken, S., & Zubkov, M. V. (2014). The role of mixotrophic protists in the biological carbon pump. *Biogeosciences*, 11(4), 995–1005. <https://doi.org/10.5194/BG-11-995-2014>
- Monier, A., Worden, A. Z., & Richards, T. A. (2016). Phylogenetic diversity and biogeography of the Mamiellophyceae lineage of eukaryotic phytoplankton across the oceans. *Environmental Microbiology Reports*, 8(4), 461–469. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12390>
- Moore, L. R., & Chisholm, S. W. (1999). Photophysiology of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*: Ecotypic differences among cultured isolates. *Limnology and Oceanography*, 44(3 1), 628–638. <https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.3.0628>
- Morey, S. L., Martin, P. J., O'Brien, J. J., Wallcraft, A. A., Zavala-Hidalgo, J., Morey, C. :, Martin, P. J., O'Brien, J. J., Wallcraft, A. A., & Zavala-Hidalgo, J. (2003). Export pathways for river discharged fresh water in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 108(C10), 3303. <https://doi.org/10.1029/2002JC001674>

- Muller-Karger, F. E., Smith, J. P., Werner, S., Chen, R., Roffer, M., Liu, Y., Muhling, B., Lindo-Atichati, D., Lamkin, J., Cerdeira-Estrada, S., & Enfield, D. B. (2015a). Natural variability of surface oceanographic conditions in the offshore Gulf of Mexico. *Progress in Oceanography*, *134*, 54–76. <https://doi.org/10.1016/J.POCEAN.2014.12.007>
- Muller-Karger, F. E., Smith, J. P., Werner, S., Chen, R., Roffer, M., Liu, Y., Muhling, B., Lindo-Atichati, D., Lamkin, J., Cerdeira-Estrada, S., & Enfield, D. B. (2015b). Natural variability of surface oceanographic conditions in the offshore Gulf of Mexico. *Progress in Oceanography*, *134*, 54–76. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2014.12.007>
- Not, F., del Campo, J., Balagué, V., de Vargas, C., & Massana, R. (2009). New Insights into the Diversity of Marine Picoeukaryotes. *PLOS ONE*, *4*(9), e7143. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007143>
- Not, F., Probert, I., Ribeiro, C. G., Crenn, K., Guillou, L., Jeanthon, C., & Vaulot, D. (2016). Photosymbiosis in marine pelagic environments. *The Marine Microbiome: An Untapped Source of Biodiversity and Biotechnological Potential*, 305–332. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33000-6_11/FIGURES/1
- Obiol, A., Giner, C. R., Sánchez, P., Duarte, C. M., Acinas, S. G., & Massana, R. (2020). A metagenomic assessment of microbial eukaryotic diversity in the global ocean. *Molecular Ecology Resources*, *20*(3), 718–731. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13147>
- Okolodkov, Y. B. (2003). A review of Russian plankton research in the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea in the 1960-1980s. *Hidrobiológica*, *13*(3), 207–221. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/1126>
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. and Wagner, H. (2014) Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.2-0. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>
- Ollison, G. A., Hu, S. K., Mesrop, L. Y., DeLong, E. F., & Caron, D. A. (2021). Come rain or shine: Depth not season shapes the active protistan community at station ALOHA in the North Pacific Subtropical Gyre. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 103494. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2021.103494>
- Orsi, W. D., Wilken, S., del Campo, J., Heger, T., James, E., Richards, T. A., Keeling, P. J., Worden, A. Z., & Santoro, A. E. (2018). Identifying protist consumers of photosynthetic picoeukaryotes in the surface ocean using stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, *20*(2), 815–827. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14018>
- Osman, R. W. (2018). The intermediate disturbance hypothesis. In *Encyclopedia of Ecology* (pp. 441–450). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09480-X>
- Ottesen, E. A., Young, C. R., Gifford, S. M., Eppley, J. M., Marin, R., Schuster, S. C., Scholin, C. A., & DeLong, E. F. (2014). Multispecies diel transcriptional oscillations in open ocean heterotrophic bacterial assemblages. *Science*, *345*(6193), 207–212. <https://doi.org/10.1126/science.1252476>
- Pasqueron de Fommervault, O., Perez-Brunius, P., Damien, P., Camacho-Ibar, V. F., & Sheinbaum, J. (2017a). Temporal variability of chlorophyll distribution in the Gulf of Mexico: bio-optical data from profiling floats. *Biogeosciences*, *14*(24), 5647–5662. <https://doi.org/10.5194/bg-14-5647-2017>

- Pérez-Brunius, P., García-Carrillo, P., Dubranna, J., Sheinbaum, J., & Candela, J. (2013). Direct observations of the upper layer circulation in the southern Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *85*, 182–194. <https://doi.org/10.1016/J.DSR2.2012.07.020>
- Piredda, R., Claverie, J., Decelle, J., Vargas, C. De, Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eikrem, W., Forster, D., Wiebe, H., Kooistra, C. F., Logares, R., Massana, R., Montresor, M., Ogata, H., Pawlowski, J., Romac, S., Sarno, D., & Zingone, A. (2018). Diatom diversity through HTS-metabarcoding in coastal European seas. *Scientific Reports*, December, 37–49. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36345-9>
- Polimene, L., Sailley, S., Clark, D., Mitra, A., & Allen, J. I. (2017). Biological or microbial carbon pump? The role of phytoplankton stoichiometry in ocean carbon sequestration. *Journal of Plankton Research*, *39*(2), 180–186. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBW091>
- Portela, E., Tenreiro, M., Pallàs-Sanz, E., Meunier, T., Ruiz-Angulo, A., Sosa-Gutiérrez, R., & Cusí, S. (2018). Hydrography of the Central and Western Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, *123*(8), 5134–5149. <https://doi.org/10.1029/2018JC013813>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quevedo, M., & Anadón, R. (2001). Protist control of phytoplankton growth in the subtropical north-east Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, *221*, 29–38. <https://doi.org/10.3354/MEPS221029>
- Raes, E. J., Bodrossy, L., Van De Kamp, J., Bissett, A., Ostrowski, M., Brown, M. V., Sow, S. L. S., Sloyan, B., & Waite, A. M. (2018). Oceanographic boundaries constrain microbial diversity gradients in the south pacific ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(35), E8266–E8275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719335115>
- Raggi, L., García-Guevara, F., Godoy-Lozano, E. E., Martínez-Santana, A., Escobar-Zepeda, A., Gutierrez-Rios, R. M., Loza, A., Merino, E., Sanchez-Flores, A., Licea-Navarro, A., Pardo-Lopez, L., Segovia, L., & Juarez, K. (2020). Metagenomic Profiling and Microbial Metabolic Potential of Perdido Fold Belt (NW) and Campeche Knolls (SE) in the Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1825. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01825/BIBTEX>
- Ramond, P., Siano, R., Schmitt, S., de Vargas, C., Marié, L., Memery, L., & Sourisseau, M. (2021). Phytoplankton taxonomic and functional diversity patterns across a coastal tidal front. *Scientific Reports*, *11*(1), 2682. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82071-0>
- Ribalet, F., Swalwell, J., Clayton, S., Jiménez, V., Sudek, S., Lin, Y., Johnson, Z. I., Worden, A. Z., & Armbrust, E. V. (2015). Light-driven synchrony of *Prochlorococcus* growth and mortality in the subtropical Pacific gyre. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(26), 8008–8012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424279112>
- Rii, Y. M., Bidigare, R. R., & Church, M. J. (2018). Differential responses of eukaryotic phytoplankton to nitrogenous nutrients in the North Pacific Subtropical Gyre. *Frontiers in Marine Science*, *5*(3). <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00092>
- Rinta-Kanto, J. M., Sun, S., Sharma, S., Kiene, R. P., & Moran, M. A. (2012). Bacterial community transcription patterns during a marine phytoplankton bloom. *Environmental Microbiology*, *14*(1), 228–239. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02602.x>

- Rodríguez-Gómez, C. F., Vázquez, G., Papiol, V., Mariño-Tapia, I., & Enriquez, C. (2022). Phytoplankton distribution and its ecological and hydrographic controls in two contrasting areas of a stratified oligotrophic system. *Hydrobiologia*, 849(14), 3175–3195. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04924-7>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Lê Cao, K.-A. (2017). mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*, 13(11), e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Salmerón-García, O., Zavala-Hidalgo, J., Mateos-Jasso, A., & Romero-Centeno, R. (2011). Regionalization of the gulf of Mexico from space-time chlorophyll-a concentration variability. *Ocean Dynamics*, 61(4), 439–448. <https://doi.org/10.1007/S10236-010-0368-1/METRICS>
- Salomon, P. S., Granéli, E., Neves, M. H. C. B., & Rodriguez, E. G. (2009). Infection by Amoebophrya spp. parasitoids of dinoflagellates in a tropical marine coastal area. *Aquatic Microbial Ecology*, 55(2), 143–153. <https://doi.org/10.3354/ame01293>
- Santi, I., Kasapidis, P., Karakassis, I., & Pitta, P. (2021). A comparison of DNA metabarcoding and microscopy methodologies for the study of aquatic microbial eukaryotes. *Diversity*, 13(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/d13050180>
- Santoferrara, L., Burki, F., Filker, S., Logares, R., Dunthorn, M., & McManus, G. B. (2020). Perspectives from Ten Years of Protist Studies by High-Throughput Metabarcoding. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67(5), 612–622. <https://doi.org/10.1111/jeu.12813>
- Santoferrara, L. F. (2019). Current practice in plankton metabarcoding: optimization and error management. *Journal of Plankton Research*, 41(5), 571–582. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBZ041>
- Santoferrara, L. F., Rubin, E., & McManus, G. B. (2018). Global and local DNA (meta)barcoding reveal new biogeography patterns in tintinnid ciliates. *Journal of Plankton Research*, 40(3), 209–221. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBY011>
- Sheik, C. S., Jain, S., & Dick, G. J. (2014). Metabolic flexibility of enigmatic SAR324 revealed through metagenomics and metatranscriptomics. *Environmental Microbiology*, 16(1), 304–317. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12165>
- Sherman, K. (1991). The Large Marine Ecosystem Concept: Research and Management Strategy for living Marine Resources. *Ecological Applications*, 1(4), 349–360. <https://doi.org/10.2307/1941896>
- Sherr, E., & Sherr, B. (2007). Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 352, 187–197. <https://doi.org/10.3354/meps07161>
- Sherr, E., & Sherr, B. (1988). Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. *Limnology and Oceanography*, 33(5), 1225–1227. <https://doi.org/10.4319/LO.1988.33.5.1225>
- Shi, Y., Tyson, G. W., & DeLong, E. F. (2009). Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean’s water column. *Nature*, 459(7244), 266–269. <https://doi.org/10.1038/nature08055>

- Sidón-Ceseña, K., Martínez-Mercado, M. A., Chong-Robles, J., Ortega-Saad, Y., Camacho-Ibar, V. F., Linacre, L., & Lago-Lestón, A. (2023). Response of microbial eukaryote community to the oligotrophic waters of the Gulf of Mexico: a plausible scenario for warm and stratified oceans. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.07.26.548711>
- Sigman, D. M., Hain, M. P., & Education, N. (2012). *The Biological Productivity of the Ocean*. 3(6), 1–16. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-biological-productivity-of-the-ocean-section-71072666/>
- Simmons, M. P., Sudek, S., Monier, A., Limardo, A. J., Jimenez, V., Perle, C. R., Elrod, V. A., Pennington, J. T., & Worden, A. Z. (2016). Abundance and biogeography of picoprasinophyte ecotypes and other phytoplankton in the eastern North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1693–1705. <https://doi.org/10.1128/AEM.02730-15/FORMAT/EPUB>
- Snyder, R. A., Moss, J. A., Santoferrara, L., Head, M., & Jeffrey, W. H. (2021). Ciliate microzooplankton from the Northeastern Gulf of Mexico. *ICES Journal of Marine Science*, 78(9), 3356–3371. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsab002>
- Sow, S. L. S., Trull, T. W., & Bodrossy, L. (2020). Oceanographic Fronts Shape Phaeocystis Assemblages: A High-Resolution 18S rRNA Gene Survey From the Ice-Edge to the Equator of the South Pacific. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1847. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01847/BIBTEX>
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D593–D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D. M., Breiner, H. W., & Richards, T. A. (2010). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 19(SUPPL. 1), 21–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x>
- Strom, S. L., & Strom, M. W. (1996). Microplankton growth, grazing, and community structure in the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 130(1–3), 229–240. <https://doi.org/10.3354/MEPS130229>
- Stukel, M. R., Gerard, T., Kelly, T. B., Knapp, A. N., Laiz-Carrión, R., Lamkin, J. T., Landry, M. R., Malca, E., Selph, K. E., Shiroza, A., Shropshire, T. A., Swalethorp, R., & Irigoien, X. (2022). Plankton food webs in the oligotrophic Gulf of Mexico spawning grounds of Atlantic bluefin tuna. *Journal of Plankton Research*, 44(5), 763–781. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBAB023>
- Sun, P., Liao, Y., Wang, Y., Yang, E. J., Jiao, N., Lee, Y., Jung, J., Cho, K. H., Moon, J. K., & Xu, D. (2022). Contrasting Community Composition and Co-Occurrence Relationships of the Active Pico-Sized Haptophytes in the Surface and Subsurface Chlorophyll Maximum Layers of the Arctic Ocean in Summer. *Microorganisms*, 10(2), 248. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020248/S1>
- Sun, P., Wang, Y., Huang, X., Xu, S. S., Logares, R., Huang, Y., Xu, D., & Huang, B. (2024). Cracking the dynamic code of the deep: Unexpected seasonal patterns of active protistan-bacterial microbiomes in the mesopelagic zone of the South China Sea. *Progress in Oceanography*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2024.103280>

- Sun, P., Wang, Y., Zhang, Y., Logares, R., Cheng, P., Xu, D., & Huang, B. (2023). From the Sunlit to the Aphotic Zone: Assembly Mechanisms and Co-Occurrence Patterns of Protistan-Bacterial Microbiotas in the Western Pacific Ocean. *MSystems*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00013-23>
- Timmermans, K. R., Van Der Wagt, B., Veldhuis, M. J. W., Maatman, A., & De Baar, H. J. W. (2005). Physiological responses of three species of marine pico-phytoplankton to ammonium, phosphate, iron and light limitation. *Journal of Sea Research*, 53(1–2), 109–120. <https://doi.org/10.1016/J.SEARES.2004.05.003>
- Toner, M., Kirwan, J. D., Poje, A. C., Kantha, L. H., Müller-Karger, F. E., & Jones, C. K. R. T. (2003). Chlorophyll dispersal by eddy-eddy interactions in the Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 108(C4). <https://doi.org/10.1029/2002JC001499>
- Tragin, M., & Vaultot, D. (2018). Green microalgae in marine coastal waters: The Ocean Sampling Day (OSD) dataset. *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32338-w>
- Trefault, N., De la Iglesia, R., Moreno-Pino, M., Lopes dos Santos, A., Gérikas Ribeiro, C., Parada-Pozo, G., Cristi, A., Marie, D., & Vaultot, D. (2021). Annual phytoplankton dynamics in coastal waters from Fildes Bay, Western Antarctic Peninsula. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80568-8>
- Unrein, F., Gasol, J. M., Not, F., Forn, I., & Massana, R. (2013). Mixotrophic haptophytes are key bacterial grazers in oligotrophic coastal waters. *The ISME Journal 2014*, 8(1), 164–176. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.132>
- Vaultot, D., Eikrem, W., Viprey, M., & Moreau, H. (2008). The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 795–820. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00121.x>
- Vaultot, D., & Marie, D. (1999). Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 104(C2), 3297–3310. <https://doi.org/10.1029/98jc01333>
- Velásquez-Aristizábal, J. A., Camacho-Ibar, V. F., Durazo, R., Valencia-Gasti, J. A., Lee-Sánchez, E., & Trasviña-Castro, A. (2022). Nitracentric/Hydrographic Classification and Prediction of Nitrate Profiles for Oceanographic Stations Under the Influence of Mesoscale Eddies in the Gulf of Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.827574>
- Villamaña, M., Marañón, E., Cermeño, P., Estrada, M., Fernández-Castro, B., Figueiras, F. G., Latasa, M., Otero-Ferrer, J. L., Reguera, B., & Mouriño-Carballido, B. (2019). The role of mixing in controlling resource availability and phytoplankton community composition. *Progress in Oceanography*, 178(9). <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2019.102181>
- Villareal, T. A., Pilskaln, C. H., Montoya, J. P., & Dennett, M. (2014). Upward nitrate transport by phytoplankton in oceanic waters: Balancing nutrient budgets in oligotrophic seas. *PeerJ*, 2014(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.302>
- Villiot, N., Poulton, A. J., Butcher, E. T., Daniels, L. R., & Coggins, A. (2021). Allometry of carbon and nitrogen content and growth rate in a diverse range of coccolithophores. *Journal of Plankton Research*, 43(4), 511–526. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbab038>

- Wang, F., Xie, Y., Wu, W., Sun, P., Wang, L., & Huang, B. (2019). Picoeukaryotic diversity and activity in the northwestern pacific ocean based on rDNA and rRNA high-throughput sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 10(1), 3259. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.03259/BIBTEX>
- Ward, B. A., Dutkiewicz, S., Jahn, O., & Follows, M. J. (2012). A size-structured food-web model for the global ocean. *Limnology and Oceanography*, 57(6), 1877–1891. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.6.1877>
- Ward, C. H. (2017). Habitats and biota of the Gulf of Mexico: Before the deepwater horizon oil spill. Volume 2: Fish Resources, Fisheries, Sea Turtles, Avian Resources, Marine Mammals, Diseases and Mortalities. En *Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill* (Vol. 1). <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3447-8>
- Wawrik, B., & Paul, J. H. (2004). Phytoplankton community structure and productivity along the axis of the Mississippi River plume in oligotrophic Gulf of Mexico waters. *Aquatic Microbial Ecology*, 35(2), 185–196. <https://doi.org/10.3354/ame035185>
- Wilken, S., Yung, C. C. M., Poirier, C., Massana, R., Jimenez, V., & Worden, A. Z. (2023). Choanoflagellates alongside diverse uncultured predatory protists consume the abundant open-ocean cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.2302388120>
- Worden, A. Z. (2006). Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 43(2), 165–175. <https://doi.org/10.3354/ame043165>
- Worden, A. Z., Follows, M. J., Giovannoni, S. J., Wilken, S., Zimmerman, A. E., & Keeling, P. J. (2015). Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science*, 347(6223). <https://doi.org/10.1126/science.1257594>
- Worden, A. Z., Janouskovec, J., McRose, D., Engman, A., Welsh, R. M., Malfatti, S., Tringe, S. G., & Keeling, P. J. (2012). Global distribution of a wild alga revealed by targeted metagenomics. *Current Biology*, 22(17), R675–R677. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.07.054/ATTACHMENT/819AB93C-6018-4E1D-9936-6CC8778794D9/MMC1.PDF>
- Xie, N., Hunt, D. E., Johnson, Z. I., He, Y., & Wang, G. (2021). Annual partitioning patterns of Labyrinthulomycetes protists reveal their multifaceted role in marine microbial food webs. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.01652-20>
- Xu, D., Kong, H., Yang, E. J., Wang, Y., Li, X., Sun, P., Jiao, N., Lee, Y., Jung, J., & Cho, K. H. (2022). Spatial dynamics of active microeukaryotes along a latitudinal gradient: Diversity, assembly process, and co-occurrence relationships. *Environmental Research*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113234>
- Xu, D., Li, R., Hu, C., Sun, P., Jiao, N., & Warren, A. (2017). Microbial eukaryote diversity and activity in the water column of the South China sea based on DNA and RNA high throughput sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), 1121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01121>
- Zavala-Hidalgo, J. (2003). Seasonal circulation on the western shelf of the Gulf of Mexico using a high-resolution numerical model. *Journal of Geophysical Research*, 108(12), 3389. <https://doi.org/10.1029/2003JC001879>

- Zhao, F., Filker, S., Xu, K., Huang, P., & Zheng, S. (2017). Patterns and drivers of vertical distribution of the ciliate community from the surface to the abyssopelagic zone in the Western Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology*, 8(12), 2559. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02559/BIBTEX>
- Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D., & Vaulot, D. (2005). Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1), 79–92. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSEC.2004.10.00>

Anexos

Tabla 9. Abundancia promedio y desviación estándar de los ASVs con abundancia > 1% que se encontraron en la capa de mezcla (ML).

Profundidad	ASVs	Abundancia promedio (%)	sd_abundance
ML	Bacillariophyta_X (Order)	2.7	10.3
ML	Diplonemea (Order)	3.2	2.5
ML	Haptophyta (Division)	2.7	1.8
ML	Prymnesiaceae (Family)	12.8	4.8
ML	Prymnesiophyceae (Class)	2.6	0.9
ML	Raphid-pennate (Family)	4.4	6.8
ML	Spongodiscidae-Coccodiscidae (Family)	0.4	1.3
ML	Spumellarida-Group-I (Family)	0.6	2.5
ML	Telonemia-Group-2 (Family)	8.4	3.7
ML	Bathycoccus	0.0	0.2
ML	Braarudosphaera	3.6	2.3
ML	Chrysochromulina	4.6	3.0
ML	Gephyrocapsa	2.3	3.3
ML	Hemiselmis	3.3	5.0
ML	MAST-1C_XX	4.1	1.5
ML	MAST-1D_XX	13.2	6.0
ML	MAST-3E_XX	4.9	2.3
ML	MAST-4B_XX	4.9	2.4
ML	MOCH-5_XXX	6.1	5.6
ML	Ostreococcus	0.1	0.4
ML	Pelagomonas	0.4	1.2
ML	Phaeocystis	2.1	1.2
ML	Picomonas	6.1	3.2
ML	Prymnesiophyceae_Clade_D_XX	0.1	0.3
ML	Pseudo-nitzschia	0.9	3.9
ML	RAD-A_XXX	0.0	0.2
ML	RAD-B-Group-II_X	1.0	2.4
ML	RAD-B-Group-IV_X	4.3	7.0
ML	RAD-B-Group-I_X	0.0	0.1
ML	Spumellarida-Group-I_X	0.5	1.1

Tabla 10 Abundancia promedio y desviación estándar de los ASVs con abundancia > 1% que se encontraron en el máximo de fluorescencia (DCM)

Profundidad	ASVs	Abundancia promedio	
		(%)	sd_abundance
DCM	Bacillariophyta_X (Order)	0.8	5.2
DCM	Diplonemea (Order)	0.1	0.3
DCM	Haptophyta (Division)	0.6	1.0
DCM	Prymnesiaceae (Family)	2.1	2.2
DCM	Prymnesiophyceae (Class)	1.6	1.1
DCM	Raphid-pennate (Family)	0.2	0.9
DCM	Spongodiscidae-Coccodiscidae (Family)	2.2	4.8
DCM	Spumellarida-Group-I (Family)	11.6	14.0
DCM	Telonemia-Group-2 (Family)	3.1	1.8
DCM	Bathycoccus	3.0	3.0
DCM	Braarudosphaera	1.4	1.0
DCM	Chrysochromulina	2.1	2.1
DCM	Gephyrocapsa	1.9	2.1
DCM	Hemiselmis	0.4	0.6
DCM	MAST-1C_XX	1.2	1.3
DCM	MAST-1D_XX	1.7	2.6
DCM	MAST-3E_XX	0.2	0.6
DCM	MAST-4B_XX	0.3	0.9
DCM	MOCH-5_XXX	0.1	0.4
DCM	Ostreococcus	2.9	4.0
DCM	Pelagomonas	32.9	13.8
DCM	Phaeocystis	4.2	2.8
DCM	Picomonas	1.2	1.7
DCM	Prymnesiophyceae_Clade_D_XX	2.7	1.9
DCM	Pseudo-nitzschia	2.1	5.4
DCM	RAD-A_XXX	4.3	5.3
DCM	RAD-B-Group-II_X	2.2	3.6
DCM	RAD-B-Group-IV_X	0.2	1.1
DCM	RAD-B-Group-I_X	2.7	4.3
DCM	Spumellarida-Group-I_X	10.3	11.2

Tabla 11. Asociaciones positivas y negativas entre protista-protista de la capa de mezcla, obtenidas con el análisis de co-ocurrencia.

Var1	Var2	Weight
ASV_00058:g__Telonemia-Group-2	ASV_00128:o__Prymnesiophyceae	0.30
ASV_00045:Karlodinium	ASV_00685:g__Arthracanthida-Symphycanthida_X	0.27
ASV_00058:g__Telonemia-Group-2	ASV_00077:Chrysochromulina	0.25
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00021:Gyrodinium	0.25
ASV_00005:Gymnodinium	ASV_00006:o__Dinophyceae	0.25
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00107:Phaeocystis	0.23
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	0.22
ASV_00232:f__Diplonemea	ASV_00641:DSPD-1_X	0.22
ASV_00101:Bathycoccus	ASV_00491:Dino-Group-II-Clade-26_X	0.21
ASV_00210:c__Ciliophora	ASV_00279:g__Dino-Group-I-Clade-4	0.21
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00804:Pseudocubus	0.20
ASV_00005:Gymnodinium	ASV_00054:f__Gymnodinales	0.19
ASV_00050:MAST-1D_XX	ASV_00078:Picomonas	0.17
ASV_00005:Gymnodinium	ASV_00161:Torodinium	0.16
ASV_00045:Karlodinium	ASV_01121:MAST-3E_XX	0.16
ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	ASV_00434:RAD-C_XXX	0.16
ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	ASV_00418:g__Picozoa_XXX	0.15
ASV_00092:Dino-Group-II-Clade-22_X	ASV_00123:Ostreococcus	0.14
ASV_00021:Gyrodinium	ASV_00086:Lepidodinium	0.14
ASV_00154:Pseudo-nitzschia	ASV_00377:Thalassiosira	0.14
ASV_00119:Blastodinium	ASV_00539:o__Spirotrichea	0.13
ASV_00058:g__Telonemia-Group-2	ASV_00349:MOCH-4_XXX	0.12
ASV_00065:Dino-Group-I-Clade-1_X	ASV_00184:c__Dinoflagellata	0.11
ASV_00120:g__Spongodiscidae-Coccodiscidae	ASV_00635:f__Spumellarida	0.11
ASV_00336:f__Dino-Group-II	ASV_00358:Dino-Group-II-Clade-6_X	0.11
ASV_00170:c__Haptophyta	ASV_00756:o__Acantharea	0.11
ASV_00210:c__Ciliophora	ASV_00337:MAST-3I_XX	0.10
ASV_00107:Phaeocystis	ASV_00132:Prymnesiophyceae_Clade_D_XX	0.09
ASV_00054:f__Gymnodinales	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	0.09
ASV_00158:g__RAD-B-Group-IV	ASV_00491:Dino-Group-II-Clade-26_X	0.08
ASV_00110:MAST-1C_XX	ASV_00210:c__Ciliophora	0.08
ASV_00065:Dino-Group-I-Clade-1_X	ASV_00250:g__Sphaerozoidae	0.07
ASV_00283:g__Cryptomonadales_X	ASV_00810:MAST-3D_XX	0.07
ASV_00150:RAD-B-Group-I_X	ASV_00345:Dino-Group-II-Clade-7_X	0.06
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00132:Prymnesiophyceae_Clade_D_XX	0.05
ASV_00409:Nassellaria_XX	ASV_00804:Pseudocubus	0.05
ASV_00336:f__Dino-Group-II	ASV_00448:Dino-Group-V_XX	0.05
ASV_00135:Azadinium	ASV_00483:f__Peridinales	0.04
ASV_00073:RAD-A_XXX	ASV_00128:o__Prymnesiophyceae	0.04

Var1	Var2	Weight
ASV_00218:c__Chlorophyta	ASV_00395:Chloropicon	0.04
ASV_00092:Dino-Group-II-Clade-22_X	ASV_00232:f__Diplonemea	0.04
ASV_00150:RAD-B-Group-I_X	ASV_00333:RAD-B_XXX	0.04
ASV_00150:RAD-B-Group-I_X	ASV_00474:Dino-Group-II-Clade-35_X	0.03
ASV_00127:f__Dinophysiales	ASV_00135:Azadinium	0.03
ASV_00045:Karlodinium	ASV_00078:Picomonas	0.03
ASV_00154:Pseudo-nitzschia	ASV_00777:Chaetoceros	0.02
ASV_00065:Dino-Group-I-Clade-1_X	ASV_00924:Dino-Group-I-Clade-2_X	0.02
ASV_00161:Torodinium	ASV_00184:c__Dinoflagellata	0.02
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00161:Torodinium	0.02
ASV_00248:MOCH-2_XXX	ASV_00337:MAST-3I_XX	0.02
ASV_00377:Thalassiosira	ASV_00590:g__Polar-centric-Mediophyceae	0.02
ASV_00123:Ostreococcus	ASV_00590:g__Polar-centric-Mediophyceae	0.02
ASV_00050:MAST-1D_XX	ASV_00107:Phaeocystis	-0.01
ASV_00073:RAD-A_XXX	ASV_00198:g__Raphid-pennate	-0.01
ASV_00073:RAD-A_XXX	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	-0.01
ASV_00135:Azadinium	ASV_00234:RAD-B-Group-IV_X	-0.01
ASV_00239:f__Dictyochophyceae_X	ASV_00539:o__Spirotrichea	-0.02
ASV_00092:Dino-Group-II-Clade-22_X	ASV_00138:Gephyrocapsa	-0.02
ASV_00234:RAD-B-Group-IV_X	ASV_00283:g__Cryptomonadales_X	-0.02
ASV_00170:c__Haptophyta	ASV_00924:Dino-Group-I-Clade-2_X	-0.02
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00685:g__Arthracanthida-Symphycanthida_X	-0.02
ASV_00086:Lepidodinium	ASV_00240:f__RAD-B_X	-0.02
ASV_00337:MAST-3I_XX	ASV_00480:MAST-4C_XX	-0.02
ASV_00078:Picomonas	ASV_00107:Phaeocystis	-0.03
ASV_00033:g__Spumellarida-Group-I	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	-0.05
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00078:Picomonas	-0.05
ASV_00101:Bathycoccus	ASV_00279:g__Dino-Group-I-Clade-4	-0.06
ASV_00198:g__Raphid-pennate	ASV_00337:MAST-3I_XX	-0.06
ASV_00158:g__RAD-B-Group-IV	ASV_00530:Syndiniales_XXX	-0.09
ASV_00021:Gyrodinium	ASV_00756:o__Acantharea	-0.09
ASV_00418:g__Picozoa_XXX	ASV_00985:Alexandrium	-0.09
ASV_00345:Dino-Group-II-Clade-7_X	ASV_00539:o__Spirotrichea	-0.09
ASV_00039:g__Gymnodiniaceae	ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	-0.12
ASV_00050:MAST-1D_XX	ASV_00161:Torodinium	-0.14
ASV_00099:Paragymnodinium	ASV_00924:Dino-Group-I-Clade-2_X	-0.16
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	-0.20

Tabla 12. Asociaciones positivas y negativas entre protista-protista de la capa de mezcla, obtenidas con el análisis de co-ocurrencia.

Var1	Var2	Weight
ASV_00058:g__Telonemia-Group-2	ASV_00128:o__Prymnesiophyceae	0.30
ASV_00045:Karlodinium	ASV_00685:g__Arthracanthida-Symphyacanthida_X	0.27
ASV_00058:g__Telonemia-Group-2	ASV_00077:Chrysochromulina	0.25
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00021:Gyrodinium	0.25
ASV_00005:Gymnodinium	ASV_00006:o__Dinophyceae	0.25
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00107:Phaeocystis	0.23
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	0.22
ASV_00232:f__Diplonemea	ASV_00641:DSPD-1_X	0.22
ASV_00101:Bathycoccus	ASV_00491:Dino-Group-II-Clade-26_X	0.21
ASV_00210:c__Ciliophora	ASV_00279:g__Dino-Group-I-Clade-4	0.21
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00804:Pseudocubus	0.20
ASV_00005:Gymnodinium	ASV_00054:f__Gymnodiniales	0.19
ASV_00050:MAST-1D_XX	ASV_00078:Picomonas	0.17
ASV_00005:Gymnodinium	ASV_00161:Torodinium	0.16
ASV_00045:Karlodinium	ASV_01121:MAST-3E_XX	0.16
ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	ASV_00434:RAD-C_XXX	0.16
ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	ASV_00418:g__Picozoa_XXX	0.15
ASV_00092:Dino-Group-II-Clade-22_X	ASV_00123:Ostreococcus	0.14
ASV_00021:Gyrodinium	ASV_00086:Lepidodinium	0.14
ASV_00154:Pseudo-nitzschia	ASV_00377:Thalassiosira	0.14
ASV_00119:Blastodinium	ASV_00539:o__Spirotrichea	0.13
ASV_00058:g__Telonemia-Group-2	ASV_00349:MOCH-4_XXX	0.12
ASV_00065:Dino-Group-I-Clade-1_X	ASV_00184:c__Dinoflagellata	0.11
ASV_00120:g__Spongodiscidae-Coccodiscidae	ASV_00635:f__Spumellarida	0.11
ASV_00336:f__Dino-Group-II	ASV_00358:Dino-Group-II-Clade-6_X	0.11
ASV_00170:c__Haptophyta	ASV_00756:o__Acantharea	0.11
ASV_00210:c__Ciliophora	ASV_00337:MAST-3I_XX	0.10
ASV_00107:Phaeocystis	ASV_00132:Prymnesiophyceae_Clade_D_XX	0.09
ASV_00054:f__Gymnodiniales	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	0.09
ASV_00158:g__RAD-B-Group-IV	ASV_00491:Dino-Group-II-Clade-26_X	0.08
ASV_00110:MAST-1C_XX	ASV_00210:c__Ciliophora	0.08
ASV_00065:Dino-Group-I-Clade-1_X	ASV_00250:g__Sphaerozoidae	0.07
ASV_00283:g__Cryptomonadales_X	ASV_00810:MAST-3D_XX	0.07
ASV_00150:RAD-B-Group-I_X	ASV_00345:Dino-Group-II-Clade-7_X	0.06
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00132:Prymnesiophyceae_Clade_D_XX	0.05
ASV_00409:Nassellaria_XX	ASV_00804:Pseudocubus	0.05
ASV_00336:f__Dino-Group-II	ASV_00448:Dino-Group-V_XX	0.05

Var1	Var2	
ASV_00135:Azadinium	ASV_00483:f__Peridiniales	0.04
ASV_00073:RAD-A_XXX	ASV_00128:o__Prymnesiophyceae	0.04
ASV_00218:c__Chlorophyta	ASV_00395:Chloropicon	0.04
ASV_00092:Dino-Group-II-Clade-22_X	ASV_00232:f__Diplonemea	0.04
ASV_00150:RAD-B-Group-I_X	ASV_00333:RAD-B_XXX	0.04
ASV_00150:RAD-B-Group-I_X	ASV_00474:Dino-Group-II-Clade-35_X	0.03
ASV_00127:f__Dinophysiales	ASV_00135:Azadinium	0.03
ASV_00045:Karlodinium	ASV_00078:Picomonas	0.03
ASV_00154:Pseudo-nitzschia	ASV_00777:Chaetoceros	0.02
ASV_00065:Dino-Group-I-Clade-1_X	ASV_00924:Dino-Group-I-Clade-2_X	0.02
ASV_00161:Torodinium	ASV_00184:c__Dinoflagellata	0.02
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00161:Torodinium	0.02
ASV_00248:MOCH-2_XXX	ASV_00337:MAST-3I_XX	0.02
ASV_00138:Gephyrocapsa	ASV_00434:RAD-C_XXX	0.00
ASV_00279:g__Dino-Group-I-Clade-4	ASV_00491:Dino-Group-II-Clade-26_X	0.00
ASV_00050:MAST-1D_XX	ASV_00107:Phaeocystis	-0.01
ASV_00073:RAD-A_XXX	ASV_00198:g__Raphid-pennate	-0.01
ASV_00073:RAD-A_XXX	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	-0.01
ASV_00135:Azadinium	ASV_00234:RAD-B-Group-IV_X	-0.01
ASV_00239:f__Dictyochophyceae_X	ASV_00539:o__Spirotrichea	-0.02
ASV_00092:Dino-Group-II-Clade-22_X	ASV_00138:Gephyrocapsa	-0.02
ASV_00234:RAD-B-Group-IV_X	ASV_00283:g__Cryptomonadales_X	-0.02
ASV_00170:c__Haptophyta	ASV_00924:Dino-Group-I-Clade-2_X	-0.02
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00685:g__Arthracanthida-Symphyacanthida_X	-0.02
ASV_00086:Lepidodinium	ASV_00240:f__RAD-B_X	-0.02
ASV_00337:MAST-3I_XX	ASV_00480:MAST-4C_XX	-0.02
ASV_00078:Picomonas	ASV_00107:Phaeocystis	-0.03
ASV_00033:g__Spumellarida-Group-I	ASV_00786:f__Bacillariophyta_X	-0.05
ASV_00008:Pelagomonas	ASV_00078:Picomonas	-0.05
ASV_00101:Bathycoccus	ASV_00279:g__Dino-Group-I-Clade-4	-0.06
ASV_00198:g__Raphid-pennate	ASV_00337:MAST-3I_XX	-0.06
ASV_00158:g__RAD-B-Group-IV	ASV_00530:Syndiniales_XXX	-0.09
ASV_00021:Gyrodinium	ASV_00756:o__Acantharea	-0.09
ASV_00418:g__Picozoa_XXX	ASV_00985:Alexandrium	-0.09
ASV_00345:Dino-Group-II-Clade-7_X	ASV_00539:o__Spirotrichea	-0.09
ASV_00039:g__Gymnodiniaceae	ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	-0.12
ASV_00050:MAST-1D_XX	ASV_00161:Torodinium	-0.14
ASV_00099:Paragymnodinium	ASV_00924:Dino-Group-I-Clade-2_X	-0.16
ASV_00006:o__Dinophyceae	ASV_00242:g__Chaunacanthida_X	-0.20

Tabla 13. Concentración en ng/ μ l y cantidad de DNA en ng extraídos de las estaciones del crucero Malla Fina-1

Muestra	Concentración DNA	Volumen	Cantidad DNA
	(ng/μl)	(μl)	(ng)
B5dSUR	40	88	3520
B5dDFM	22.5	176	3960
B5d0.1	50	264	13200
B5nSUR	20	88	1760
B5nDFM	28.3	264	7480
B5n0.1	36.7	264	9680
B9dSUR	15	88	1320
B9dDFM	10.7	264	2816
B9d0.1	26	264	6864
B9nSUR	14.7	88	1293.6
B9nDFM	13.7	264	3608
B9n0.1	25.7	264	6776
C10dSUR	35	88	3080
C10dDFM	31.7	264	8360
C10d0.1	27.3	264	7216
C10nSUR	25	88	2200
C10nDFM	19.5	264	3432
C10n0.1	55	264	14520
C14dSUR	15	88	1320
C14dDFM	15	264	3960
C14d0.1	15.6	264	4136
C14nSUR	70	88	6160
C14nDFM	22	264	5808
C14n0.1	41	264	10824

Tabla 14. Concentración en ng/ μ l y cantidad de RNA en ng extraídos de las estaciones del crucero Malla -Fina -1 con el fluorómetro *Qubit*[®] y valores de integridad del RNA (RIN) medidos con un chip en *Bioanalyzer*

Muestra	Concentración	Volumen	Columna	Cantidad
	RNA ng/μl)	(μl)	RIN	RNA (ng)
B5dSUR	12.9	35	6.6	451
B5dDFM	6.19	11	6.4	681
B5d0.1	<1	35	6.8	-
B5nSUR	8.33	35	3.8	292
B5nDFM	2.08	170	6.6	354
B5n0.1	<1	70	N/A	-
B9dSUR	6.67	35	N/A	234
B9dDFM	2.45	70	6.8	172
B9d0.1	<1	100	N/A	-
B9nSUR	7.4	29	3.5	215
B9nDFM	3.66	120	4.1	434
B9n0.1	<1	80	N/A	-
C10dSUR	8.73	35	3.2	306
C10dDFM	<1	67	5.6	-
C10d0.1	<1	42	4.9	-
C10nSUR	7.4	35	4.6	259
C10nDFM	1.84	70	N/A	129
C10n0.1	<1	70	2.6	-
C14dSUR	3.95	35	4.6	138
C14dDFM	1.74	120	4.4	209
C14d0.1	<1	35	2.5	-
C14nSUR	5.86	35	6.3	205
C14nDFM	1.4	35	7.1	49
C14n0.1	<1	70	N/A	-

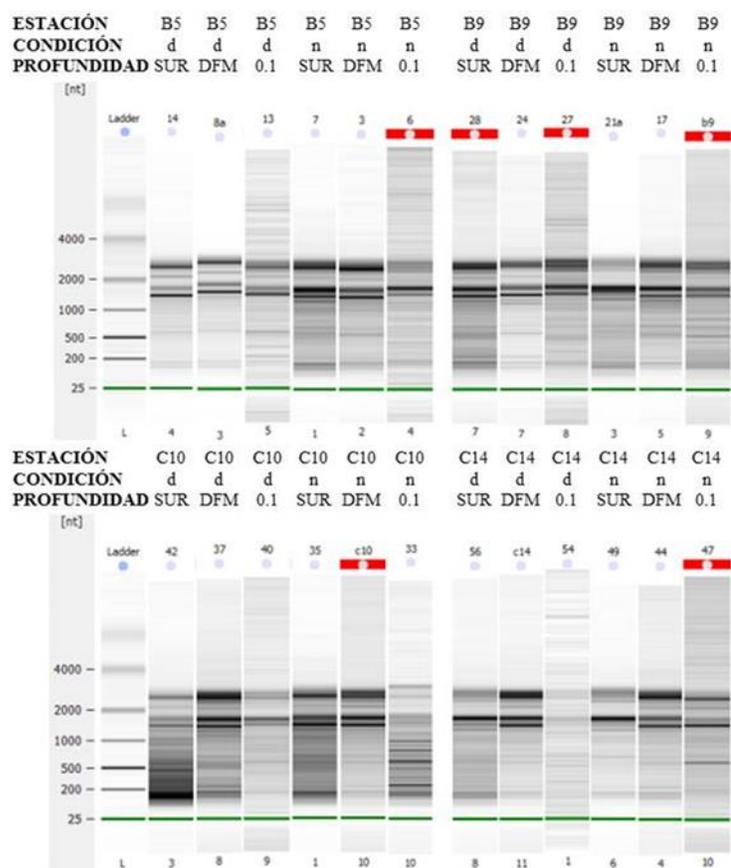


Figura 31. Gel de electroforesis obtenido por mediciones con chip de Bioanalyzer de las profundidades de superficie, máximo de fluorescencia y 0.1% de luz en las estaciones de serie de tiempo de la campaña Malla Fina-01.