

EL EFECTO DEL CLIMA EN LA BIOGEOGRAFÍA MICROBIANA DEL SUELO ASOCIADO A PLANTAS EN SIERRA NEVADA

FRANCISCO JAVIER PASCUAL MARTÍNEZ¹, SILVIA MARINA BLANCO MOYA²,
JUAN LUIS RAMOS MARTÍN³, PIETER VAN DILLEWIJN⁴,

RESUMEN

Teniendo en cuenta que los microorganismos presentes en el suelo y especialmente en el suelo rizosférico ejercen un papel clave en la dinámica y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres, es necesario conocer como las comunidades microbianas se ven influenciadas por los cambios climáticos que se producen en el medio ambiente. Por consiguiente, el objetivo principal del presente estudio ha sido evaluar el efecto del clima en las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de la planta cosmopolita tomillo salsero (*Thymus zygis* L) y en suelo suelto. Para ello se han estudiado tanto a nivel taxonómico como funcional las comunidades microbianas presentes en ambos tipos de suelo siguiendo un transecto altitudinal en dos regiones del Parque Nacional Sierra Nevada, Capileira y Puerto de la Ragua, durante dos años consecutivos. Los resultados obtenidos con la secuenciación masiva de amplicones de marcadores taxonómicos de bacterias y hongos en combinación con microchips funcionales (GeoChip) ha demostrado que las diferencias más significativas de comunidades microbianas se observan entre los distintos tipos de suelos (suelo suelto vs. suelo rizosférico) y en las distintas altitudes. También, el estudio ha permitido la identificación de los taxones bacterianos y fúngicos que componen los microbiomas centrales característicos de cada altitud. Este trabajo es el primer estudio sistemático de la diversidad taxonomía y funcional microbiana presente en diferentes regiones, tipos de suelos y altitudes en el Parque Nacional Sierra Nevada.

Palabras clave: Rizosfera, transecto altitudinal; diversidad microbiana, ADN metagenómico; *Thymus zygis*, cambio climático, suelo

¹ Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Dirección actual: Department of Microbial Ecology and Diversity Research, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania. Tel. +49 531-2616-36, Fax +49 531-2616-418; Correo electrónico: javier.pascual@dsMZ.de

² I Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Correo electrónico: silvia.blanco@eez.csic.es

³ I Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Correo electrónico: juanluis.ramos@eez.csic.es

⁴ I Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600, Fax +34 958 181609. Autor para correspondencia. Grupo Microbiología Ambiental y Biodegradación, Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda 1, 18008 Granada; Tel. +34 181600 ext 115, Fax +34 958 181609, Correo electrónico: pieter.vandillewijn@eez.csic.es

THE EFFECT OF CLIMATE ON THE MICROBIAL BIOGEOGRAPHY IN SOIL ASSOCIATED WITH PLANTS IN SIERRA NEVADA

ABSTRACT

Due to the importance of microorganisms in the biosphere as participants in all known biogeochemical processes and their fundamental role in plant and animal health, it is of major importance to gain a better understanding of how the climate may affect soil microbial communities. Therefore, the main objective has been to study the effect of climate on the taxonomic and functional diversity of microbial communities in the rhizosphere soil associated with the cosmopolitan wild thyme species *Thymus zygis* L and in bulk soil. To achieve this goal, the taxonomic and functional diversity of microbial soil and rhizosphere communities was studied along an altitudinal gradient in two regions (Capileira and Puerto de la Ragua) in the Sierra Nevada National Park during two years. The results obtained using massive sequencing of amplicons of bacterial and fungal taxonomic markers together with the use of functional microchips (GeoChips) has revealed the differences in the microbial communities formed in the different soil types (bulk vs. rhizosphere) and at different altitudes. Furthermore, the results have permitted the definition of both the bacterial and fungal core microbiomes at each altitude. The study provides the first systematic survey of the microbial taxonomy and functional diversity present in different regions, soil types and altitudes in the Sierra Nevada National Park.

Keywords: Rhizosphere, altitudinal gradient, microbial diversity, metagenomic DNA, *Thymus zygis*, climate change, soil.

INTRODUCCIÓN

Existe una gran preocupación por el cada vez más evidente cambio climático que está teniendo lugar a escala global, y cómo este cambio está alterando a su vez la estructura y dinámica de los ecosistemas. La mayoría de los estudios sobre el cambio climático y su efecto en los ecosistemas terrestres, se centran fundamentalmente en la fauna y flora macroscópica. No obstante, los efectos del cambio climático sobre los microorganismos del suelo se desconocen en gran medida, a pesar de que éstos juegan un papel clave en los ecosistemas.

Los microorganismos, incluyendo las bacterias, arqueas y hongos filamentosos, habitan el suelo en comunidades complejas y dinámicas, presentando una distribución heterogénea según las condiciones

bióticas y abióticas circundantes. Por ejemplo, en la rizosfera, que es la parte del suelo que se encuentra bajo la influencia de las raíces de las plantas (HARTMANN *et al.*, 2007; DE BRUIJN 2013), las comunidades microbianas se ven influenciadas principalmente por la especie de planta y las características del suelo (PHILIPPOT *et al.*, 2013; BULGARELLI *et al.*, 2013). En este biotopo, el flujo de nutrientes que provienen de los exudados radiculares liberados por las plantas (BAIS *et al.*, 2006) da lugar a una mayor actividad y riqueza microbiana que en la porción de suelo más alejada de la raíz (suelo suelto).

En general, los microorganismos presentes en el suelo, y más específicamente en la rizosfera, juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos así como en las redes tróficas. Un ejemplo es el papel que éstos presentan en la descomposición

de la materia orgánica gracias al arsenal de enzimas hidrolíticas que poseen, y por consiguiente en la formación del propio suelo (SÉGUIN *et al.*, 2005; DRIGO *et al.*, 2008). Esto hace que los microorganismos tengan una relación directa con el cambio climático tanto como productores y consumidores de gases con efecto invernadero tales como el dióxido de carbono, el metano y óxidos de nitrógeno (PHILIPPOT *et al.*, 2009) así como determinantes de la cantidad del carbono secuestrado en el suelo (POWLSON *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto del cambio climático sobre las comunidades microbianas no se ha estudiado en profundidad hasta la fecha, limitando la precisión de los modelos del cambio climático formulados para predecir y mitigar posibles efectos adversos (GÄRDENÄS *et al.*, 2011). Para determinar el efecto que ejerce el cambio climático sobre las comunidades bacterianas, los gradientes altitudinales en las cordilleras montañosas que abarcan varios pisos termoclimáticos en una distancia geográfica corta están recibiendo mucha atención en los últimos años. Hasta la fecha, son varios los estudios que se han centrados en los cambios taxonómicos y/o funcionales de las comunidades microbianas del suelo a lo largo de gradientes altitudinales (BRYANT *et al.*, 2008; FIERRER *et al.*, 2011; YASIR *et al.*, 2015; LIN *et al.* 2015; YANG *et al.* 2014; SILES & MARGESIN 2016; LANZEN *et al.*, 2016; entre otros). No obstante, las conclusiones obtenidas de dichos trabajos no siempre coincidieron y/o se limitaron a estudiar las comunidades microbianas de suelo suelto y no de suelo rizosférico. Debido a la marcada estratificación existente en el Parque Nacional de Sierra Nevada, éste resulta ser un lugar idóneo para llevar a término este tipo de estudios. Sierra Nevada es un macizo montañoso que alberga un clima de bosque mediterráneo caracterizado por elevadas temperaturas y bajas precipitaciones durante los meses estivales y por bajas temperaturas durante los invernales. En Sierra Nevada existen plantas cosmopolitas capaces de crecer en diferentes altitudes como el tomillo salsero (*Thymus zygis* L.), características que la convierte en una candidata idónea para ser utilizada como modelo de suelo rizosférico. Dicha planta posee una notable impor-

tancia ecológica en los bosques mediterráneos y a su vez, debido a los aceites esenciales que produce, es de gran interés en la industria farmacéutica, culinaria y cosmética (PASCUAL *et al.*, 2016). Por tanto, el objetivo del presente trabajo ha consistido en estudiar el efecto del clima en la biodiversidad taxonómica y funcional de los microorganismos (bacterias y hongos filamentosos) que habitan en suelo suelto y suelo rizosférico asociado a esta planta, a lo largo de un gradiente altitudinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio y toma de muestras

En la primavera de 2013 y 2014 se llevó a cabo la recolección de muestras de suelo y suelo rizosférico asociadas a las raíces de tomillo salsero (*Thymus zygis*) en el Parque Nacional de Sierra Nevada, Granada, España. En concreto, se recogieron tres muestras de suelo suelto y tres muestras de suelo rizosférico a cinco altitudes diferentes: 1100m, 1400m, 1700m, 2000m y 2300m, y en dos regiones del Parque Nacional Sierra Nevada: una zona cercana al municipio de Capileira y otra al de Puerto de la Ragua (Figura 1). Para la obtención del suelo rizosférico del tomillo salsero, en cada punto de muestreo se recogieron tres plantas adultas (11-15 cm de tamaño de tallo) y aparentemente sanas antes de la época de floración y a una distancia entre ellas de 1 a 13 m. Tanto las plantas con sus raíces como el suelo rizosférico adherido a ellas fueron introducidas en bolsas de plástico polietileno estériles y transportados al laboratorio para su procesamiento. Las muestras de suelo suelto se obtuvieron excavando a una profundidad de 10-15 cm en un área adyacente (máximo 0,5 metros de distancia) al lugar en el que se recogieron cada planta. Las muestras de suelo suelto (~5 cm³) se guardaron a -20 °C en tubos Falcon de 50 ml (Sterilin) hasta su procesamiento. Una vez en el laboratorio, las raíces de las plantas fueron cortadas del tallo, descartando a su vez el suelo no adherido a las raíces. Posteriormente se lavaron las raíces con 100 ml de PBS

estéril agitando vigorosamente la solución durante 5-10 min para que el suelo adherido a las raíces se dispersara. Este proceso se repitió dos veces. Tras eliminar las raíces, el barro resultante de ambos lavados fue mezclado en un tubo de 50 ml y centrifugados a 8.000 g durante 15 min. El sobrenadante resultante fue descartado, conservando el suelo rizosférico a -20 °C hasta su análisis.



Fig. 1. Área de estudio y puntos de muestreo en el Parque Nacional de Sierra Nevada.

Secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rARN y de la región intergénica (ITS) de los genes ARNr 5S-28S

El ADN metagenómico de cada muestra de suelo suelto y rizosférico fue extraído con el kit comercial Fast DNA Spin para suelos (MP Biomedicals, LLC., Solon, OH, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para estudiar la estructura de las comunidades bacterianas se utilizó el gen ribosomal 16S ARN. Para ello la región hipervariable V123 de dicho gen fue amplificada por PCR utilizando los cebadores universales del dominio Bacteria 5'-TCAGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-CACCGCGC-

KGCTGGCAC-3' (BROSIOUS *et al.*, 1978). Dichos cebadores fueron suplementados con la secuencia fusión A o B de la tecnología 454, junto con 4 nucleótidos «key tag» y 10 nucleótidos específicos de cada muestra utilizados para la identificación. Para llevar a cabo la amplificación por PCR se utilizaron 0,3 ng de ADN metagenómico, 250 μM de cada uno de los cuatro dNTPs, 200 nM de cada cebador, 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Roche), y el apropiado tampón proporcionado por el fabricante. El programa de amplificación de PCR fue el siguiente: 1 ciclo de 5 min a 95 °C; 30-35 ciclos de 45 s a 95 °C, 45 s a 43-55 °C, y 2 min a 72 °C; y un ciclo final de 10 min a 72 °C. Los amplicones fueron posteriormente purificados corriendo un gel de agarosa al 1% (p/v) y extrayendo la banda cortada que contenía el ADN con el kit QIAQUICK Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany). Los productos de amplificación fueron cuantificados utilizando QUBIT (Invitrogen) y posteriormente enviados como mezcla equimolar a la compañía MacroGen (Seúl, Corea del Sur) para ser pirosecuenciados. Para ellos una EmPCR fue realizada antes de la pirosecuenciación bidireccional con la tecnología Roche GS FLX Titanium.

Para estudiar la estructura de las comunidades fúngicas se utilizó la región intergénica (ITS) de los genes ARNr 5S-28S. Para ello se utilizaron los cebadores 5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3' (ITS86F) y 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (ITSR2) que delimita la región ITS2 (OP DE BEECK *et al.*, 2014). Dichos cebadores fueron suplementados con una secuencia para facilitar la unión del adaptador identificador y la secuencia necesaria para utilizar la tecnología Illumina. Para llevar a cabo la amplificación por PCR se utilizaron 0,3 ng de ADN metagenómico, 200 μM de cada uno de los cuatro dNTPs, 500 nM de cada cebador, 0,6 U de Q5 High-Fidelity ADN polimerasa (New England Biolabs), y el apropiado tampón proporcionado por el fabricante. El programa de amplificación de PCR fue el siguiente: 1 ciclo de 30 s a 98 °C; 30-35 ciclos de 10 s a 98 °C, 15 s a 56 °C, y 30 s a 72 °C; y un ciclo final de 2 min a 72 °C. Cada

reacción de PCR se mandó a la Unidad de Genómica (Fundación Parque Científico de Madrid) donde se llevó a cabo el marcaje con secuencias identificativas de cada muestra y la secuenciación con Illumina MiSeq de 2 x 250 ciclos.

Análisis por microchips funcionales GeoChip

Para llevar a cabo el análisis funcional de las comunidades se seleccionó cinco muestras de suelo suelto y suelo rizosférico representativas de cada altitud tanto de la zona de Capileira tanto de Puerto de la Ragua. Para ello se mandaron las muestras de suelo a Glomics Inc. (USA), donde efectuaron la extracción de ADN metagenómico con el kit FastDNA spin para suelo (GAO *et al.*, 2014). El marcaje del ADN metagenómico, hibridación ADN-ADN con las sondas del GeoChip 5.0 con 180,000 sondas de ADN, la detección y posterior normalización de los resultados fueron efectuados por Glomics Inc siguiendo el protocolo descrito por VAN NOSTRAND *et al.* (2016).

Análisis bioinformático y estadístico de los datos

Las secuencias parciales del gen ARNr 16S fueron recortadas, filtradas y las potenciales secuencias químéricas eliminadas siguiendo el procedimiento sugerido por Qiime para datos de secuencias 454, utilizando la versión del paquete informático 1.9.1 (CAPORASO *et al.*, 2010). Para llevar a cabo el agrupamiento de las secuencias en unidades taxonómicas operativas (en inglés, OTUs) se utilizó el flujo de trabajo «open» desarrollado en Qiime. Los OTUs se definieron al 97% de similitud de secuencia utilizando la herramienta uclust y la base de datos SILVA versión 119 (QUAST *et al.*, 2013).

Para el análisis de las secuencias de ITS2 también se utilizaron las herramientas y el procedimiento sugerido por Qiime, siguiendo el flujo de trabajo «open» y la base de datos UNITE versión 7 (01-08-2015) (KÖLJALG *et al.*, 2013).

Los análisis de alfa y beta diversidad basados en análisis multivariantes fueron realizados mediante las herramientas disponibles en Qiime v1.9.1 (CAPORASO *et al.*, 2010) y en el caso de los datos de GeoChip con las herramientas estadísticas disponibles en la Universidad de Minnesota (<http://ieg.ou.edu/microarray>). La comparación entre las medianas de grupos univariantes se realizó utilizando el test no paramétrico ANOVA denominado Kruskal-Wallis. Para análisis post hoc por parejas de grupos, se utilizó el test Mann-Whitney. Para llevar a cabo la comparación estadística entre grupos basados en datos multivariantes, se aplicó el test no-paramétrico ANOSIM utilizando las distancias UniFrac en el caso de bacterias y Bray-Curtis en el caso de hongos y para GeoChips. Además, para evaluar el posible efecto de la altitud en el cambio de las agrupaciones funcionales de los GeoChips se realizó el test de Mantel. En todos los test estadísticos, se rechazó la hipótesis nula cuando el p-valor fue inferior a 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad bacteriana en suelos del Parque Nacional Sierra Nevada a lo largo un gradiente altitudinal

Las comunidades bacterianas presentes en muestras de suelo suelto y rizosférico se analizaron a lo largo de un gradiente altitudinal, en dos zonas del parque nacional de Sierra Nevada y durante dos años consecutivos. El gradiente altitudinal comprendió las altitudes de 1100m, 1400m, 1700m, 2000m y 2300m. Mediante la pirosecuenciación de los amplicones de 16S ARNr con la tecnología 454 GS FLX de Roche se obtuvieron 3.066.594 secuencias. Tras su posterior filtrado por calidad, longitud y posible presencia de quimeras, resultó un total de 1.365.077 secuencias de alta calidad y con una longitud media de 441 nt.

Independientemente del lugar, año, tipo de suelo o altitud, a nivel taxonómico los taxones bacte-

rianos dominantes fueron *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria*, y en menor abundancia *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Figura 2). En el caso del *Alphaproteobacteria*, las familias dominantes fueron *Bradyrhizobiaceae* (0,9-9,4% del total de la comunidad) y *Hyphomicrobiaceae* (1,3-5,5%). Ambos taxones están íntimamente relacionados con plantas y en general a suelo. Especies de ambas familias tienen la capacidad de poder establecer relaciones simbióticas con algunas leguminosas formando nódulos en las raíces donde llevan a cabo la fijación del nitrógeno (KUYKENDALL 2015). Además, la familia *Hyphomicrobiaceae* también incluye bacterias fotosintéticas púrpura

que pueden contribuir a la producción primaria del ecosistema y unos pocos representantes capaces de crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación (OREN & XU, 2014). En el caso del filo *Actinobacteria*, las familias *Solirubrobacteraceae* (0,1-2,4%) y *Streptomycetaceae* (0,8-8,2%) fueron las mayoritarias. Estos taxones son habituales de las comunidades microbianas del suelo y se caracterizan por su resistencia a condiciones adversas como desecación y radiación solar entre otras (WHITMAN 2015). En el caso del filo *Acidobacteria*, la subdivisión 6 fue la mayoritaria (1,0-5,2%). Esta subdivisión, a pesar de ser normalmente uno de los taxones dominantes del suelo se caracteriza por ser extremadamente oligotrófico y de lento crecimiento (PASCUAL et al., 2015).

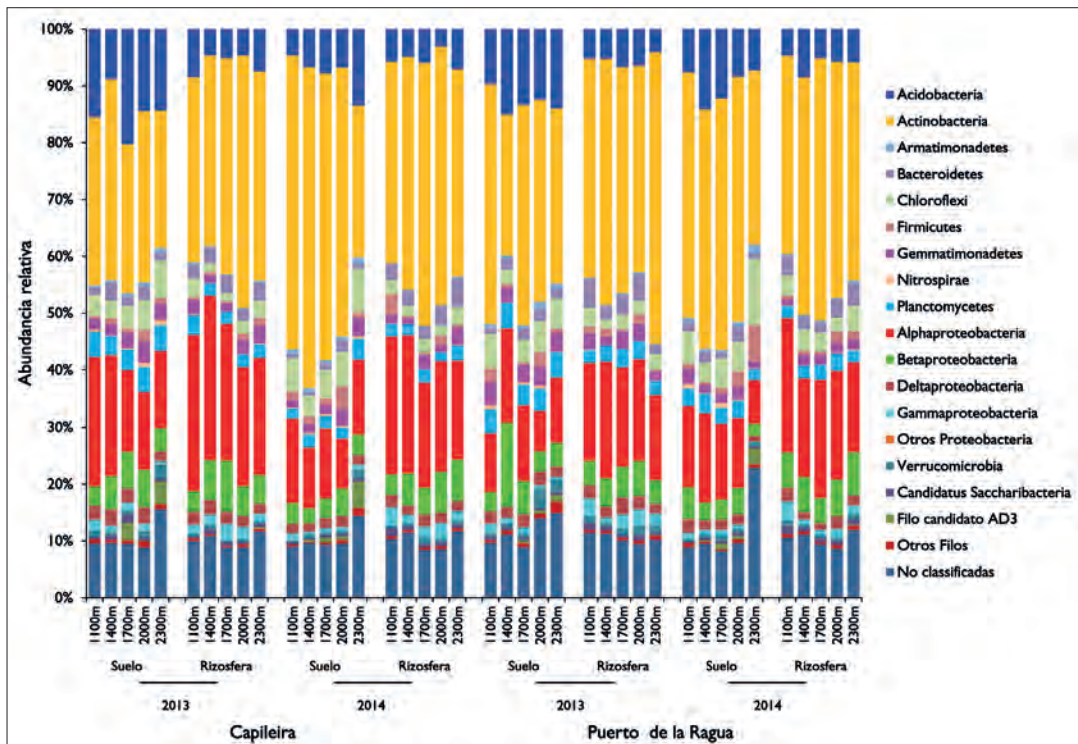


Fig. 2. Valor medio de las abundancias relativas de los filos bacterianos y clases de proteobacterias mayoritarios (> 1%) identificados en las muestras de suelo suelto y suelo rizosférico en los diferentes puntos de muestreo.

Cuando la estructura taxonómica de las comunidades bacterianas fue analizada en base al tipo

del suelo, suelo suelto vs. rizosfera, las abundancias relativas de un gran número de filos re-

sultaron ser estadísticamente diferentes (Kruskal-Wallis, p -valor $< 0,05$): *Alphaproteobacteria*, *Armatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Acidobacteria*, AD3, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, WS3, *Planctomycetes*, TM7, GN02, *Elusimicrobia*, ODI, FBP, *Firmicutes*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, GAL15, *Tenericutes*, TM6 y WPS-2. En el suelo rizosférico, los filos *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Bacteroidetes* fueron más numerosos, mientras que los filos *Acidobacteria*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes* lo fueron en suelo suelto. Las diferencias entre las comunidades bacterianas presentes en cada tipo de suelo podrían deberse a la diferente concentración de nutrientes en los suelos rizosféricos debido a los exudados radiculares excretados por las plantas (PASCUAL *et al.*, 2016).

En el caso del gradiente altitudinal, las abundancias relativas de *Alphaproteobacteria*, AD3, WPS-2, *Cyanobacteria*, FBP, *Thermi*, *Nitrospirae*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, AT18, GAL15, ODI y GN02 fueron diferentes entre altitudes distintas (Kruskal-Wallis, p -valor $< 0,05$). Algunos taxones como *Alphaproteobacteria* y *Verrucomicrobia* redujeron sus abundancias conforme se incrementó la altitud mientras que los filos *Gemmatimonadetes* y AD3 incrementaron su abundancia progresivamente con la altitud. Otros taxones como *Chloroflexi* y *Deltaproteobacteria* presentaron abundancias relativas mayores a baja y altas altitudes, reduciendo sus valores a altitudes intermedias, mientras que contrariamente *Betaproteobacteria* incremento su abundancia a altitudes intermedias (Figura 3).

Las comunidades bacterianas presentes en lo largo del transecto altitudinal presentaron valores de riqueza de OTUs (97% similitud) similares (Kruskal-Wallis, p -valor $< 0,05$). Los valores de riqueza oscilaron entre $3582,0 \pm 268,0$ OTUs a 1400 m y $4726,0 \pm 500,6$ OTUs a 2000 m. Estos valores de riqueza son comparables a los obtenidos en previos estudios centrados en

el mismo tipo de ecosistema (PASCUAL *et al.*, 2016). Respecto a los índices de diversidad de Shannon-Wiener y de dominancia de Simpson (1-D), en ambos casos se observaron diferencias significativas entre las cinco altitudes (Kruskal-Wallis, p -valores 0,009 y 0,0002, respectivamente). La tendencia de ambos índices fue a decrecer a los 1400 m de altitud, volviendo a crecer a mayores altitudes. Los valores mayores de diversidad y dominancia se alcanzaron a los 2000 m. Los valores de diversidad oscilaron entre 8,8 y 12,0. Estos valores sugirieron que en el suelo de Sierra Nevada existe una gran diversidad de taxones, al menos durante la época de muestreo que coincidió con la floración del tomillo. Dicha época se caracterizó por mayores precipitaciones y por unas temperaturas moderadas, clima típico de primavera del bosque mediterráneo. En el caso del índice de dominancia, los valores oscilaron entre 0,988 y 0,999. Estos valores próximo a 1 indica que la abundancia de todos los OTUs es homogénea entre ellos. En general, conforme se incrementa en altitud en un sistema montañoso las condiciones ambientales son más extremas (MARGESIN *et al.*, 2009) por lo que en principio se esperaría una reducción de la riqueza y diversidad bacteriana. No obstante, en el presente estudio se ha observado un incremento en dichos parámetros con la altitud, recuperándose los valores mínimos de riqueza, diversidad y dominancia a 1400m. Previos estudios han demostrado que los patrones ecológicos no se rigen de igual manera que la macro-flora y fauna. De hecho existen estudios de ecología microbiana de suelos donde se observó un incremento en los índices de diversidad con la altitud (FIERER *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2013), un descenso (BRYANT *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2014) u otras tendencias fluctuantes (SINGH *et al.*, 2012). Por ejemplo, SILES & MARGESIN (2016) observaron que los valores de riqueza, diversidad y equitatividad fueron diferentes al comparar las comunidades presentes en el punto de muestreo de menor altitud con respecto a los mayor altitud. No obstante

al comparar los puntos de muestreo de mayor altitud entre sí, no observaron diferencias significativas respecto a la alfa-diversidad. En nuestro caso, el incremento en los valores de alfa-diver-

sidad pudo estar relacionado con el incremento en la concentración de nutrientes observado a mayores altitudes (datos no demostrados) u otros factores abióticos.

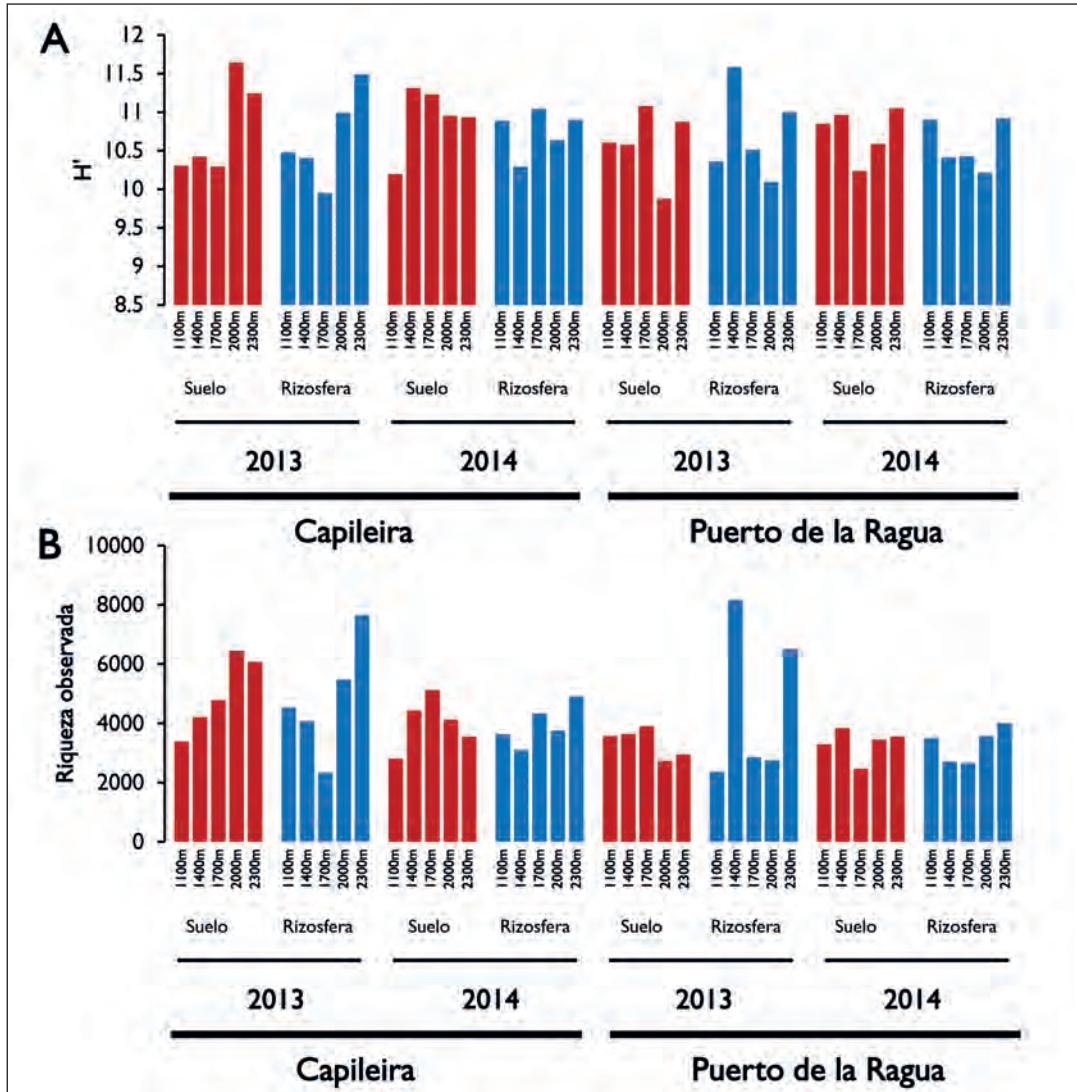


Fig. 3. Medias de los indicadores de diversidad de las comunidades bacterianas en las distintas altitudes: A) índice de diversidad de Shannon-Wiener (H'); y B) riqueza observada (OTUs 97%).

Cuando se compararon las comunidades del suelo suelto y el suelo rizosférico, no se observaron diferencias significativas respecto a la ri-

queza de OTUs ni del índice de diversidad. No obstante, si se observaron diferencias significativas con respecto al índice de Simpson (Krus-

kal-Wallis, p -valor = 0,009), obteniéndose mayores valores en el suelo suelto. Este resultado indica que en las raíces existe un mayor número de OTUs dominantes que con respecto al suelo suelto. El hecho de que la riqueza y la diversidad de ambos tipos de suelo no fueran estadísticamente diferentes fue sorprendente por la influencia de los exudados radicales de las raíces, sin embargo otros autores han observado este hecho en otras plantas como por ejemplo en la rizosfera de arroz EDWARDS *et al.* (2014).

Las curvas de rarefacción y la comparación entre la riqueza observada con respecto al estimador no paramétrico de riqueza Chao1 (datos no mostrados) confirmaron que se llevó a cabo un gran esfuerzo de muestreo de las comunidades bacterianas, teniendo acceso a la mayor parte de los OTUs (KEMP & ALLER 2004).

Para comparar las estructuras de las comunidades en base del tipo de suelo y la altitud, las muestras fueron analizadas con el estadístico multivariable ANOSIM. Este estadístico corroboró que la estructura de las comunidades bacterianas del suelo suelto con respecto a la rizosfera eran diferentes (p -valor < 0,01; permutaciones 9999). Similar resultado se obtuvo al comparar las cinco altitudes entre sí (p -valor < 0,01; permutaciones 9999).

Con el fin de identificar especies bacterianas representativas de cada altitud analizada, se definió el microbioma central bacteriano correspondiente a cada altitud teniendo en cuenta los datos de dos años consecutivos, dos regiones del macizo montañoso de Sierra Nevada, y los dos tipos de suelo. Esta combinación de tipos de muestra hizo que los resultados obtenidos fueran robustos, pues se tuvo en cuenta el posible cambio anual en la estructura de las comunidades así como el posible cambio longitudinal del muestreo. Los microbiomas centrales encontrados albergaron un total de 16, 23, 18, 30 y 11 OTUs para las altitudes 1100m, 1400m, 1700m, 2000m o 2300m, respectivamente. La gran mayoría de estos OTUs

fueron identificados como representantes de varias familias de los filos Proteobacteria y Actinobacteria. El microbioma central definido en el presente estudio resultó ser similar al microbioma central de la rizosfera de tomillo salsero determinado en un estudio anterior (PASCUAL *et al.*, 2016). Del conjunto de OTUs perteneciente a los microbiomas centrales, tres OTUs fueron compartidos por las cinco altitudes. Dichos OTUs pertenecen a las familias *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Geodermatophilaceae*, taxones que se caracterizan por estar bien adaptadas a las condiciones ambientales existentes en Sierra Nevada y por presentar una gran versatilidad metabólica, hecho que le permiten habitar tanto en suelo suelto como suelo rizosférico. Destaca la gran abundancia de representantes de la familia *Bradyrhizobiaceae* en los microbiomas centrales. Representantes de esta familia también han sido identificadas en otras regiones del Parque Nacional en estudios de suelo rizosférico (COBO-DÍAZ *et al.*, 2014; PASCUAL *et al.*, 2016) y dado su directa implicación en el ciclo de nitrógeno (COBO-DÍAZ *et al.*, 2015), se sugiere que este ciclo biogeoquímico es particularmente importante en el subsuelo de Sierra Nevada.

La diversidad y biogeografía fúngica en suelos del Parque Nacional Sierra Nevada a lo largo de un gradiente altitudinal

En el caso de las comunidades fúngicas, el estudio de la diversidad taxonómica se basó en ampliaciones de la región ITS2 a partir del ADN metagenómico secuenciados mediante la tecnología MiSeq Illumina. Un total de 14.952.893 secuencias de alta calidad con una longitud media de 298 nt se obtuvieron tras filtrar las 21.257.149 secuencias obtenidas originalmente. Los resultados mostraron que las comunidades fúngicas presentes en las muestras analizadas estaban dominadas por representantes del filo *Ascomycota* cuya abundancia relativa osciló entre el 48,4% y el 88,5% del total (Figura 4). Las clases dominantes de dicho

filo resultaron ser *Dothideomycetes*, *Pezizomycetes*, *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes* y *Leotiomycetes*. El segundo filo mayoritario fue *Basidiomycota* (4,9% - el 50,2%), representado principalmente por las clases *Agaricomycetes* y *Tremellomycetes*. Aunque

en menor proporción, las comunidades también albergaron representantes de los filos *Glomeromycota* y *Zygomycota*, *Chytridiomycota* y *Rozellomycota* junto con un grupo de OTUs que no pudieron ser clasificados a nivel de filo (Figura 5).

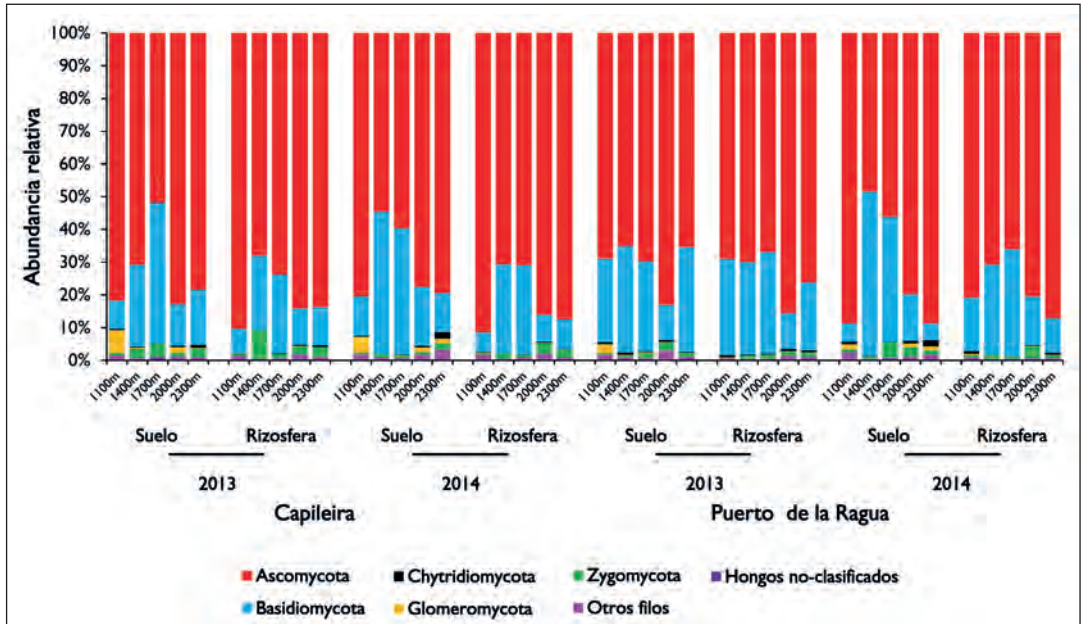
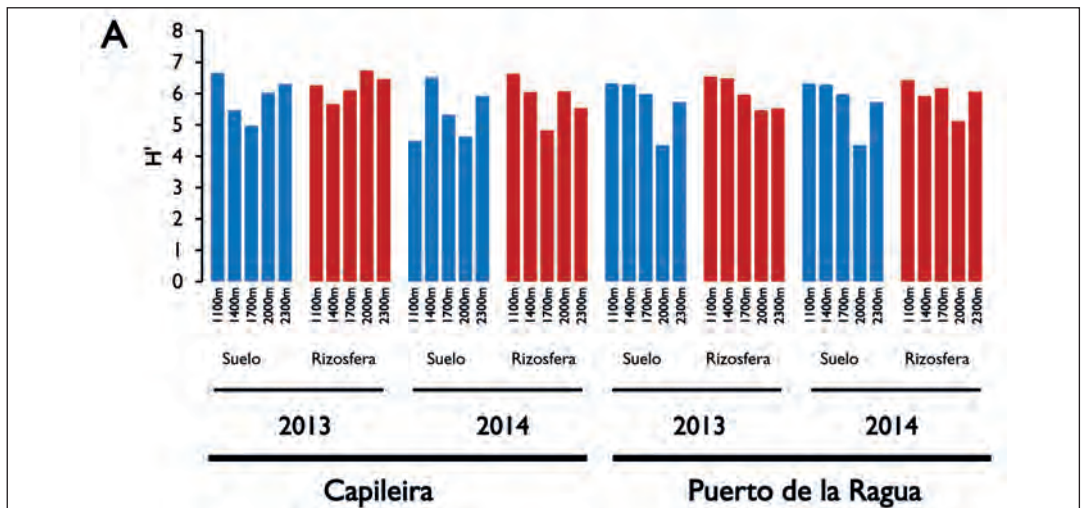


Fig. 4. Valor medio de las abundancias relativas de los filos fúngicos mayoritarios (> 1%) identificados en las muestras de suelo suelto y suelo rizosférico en ambos regiones de muestreo y en dos años consecutivos.



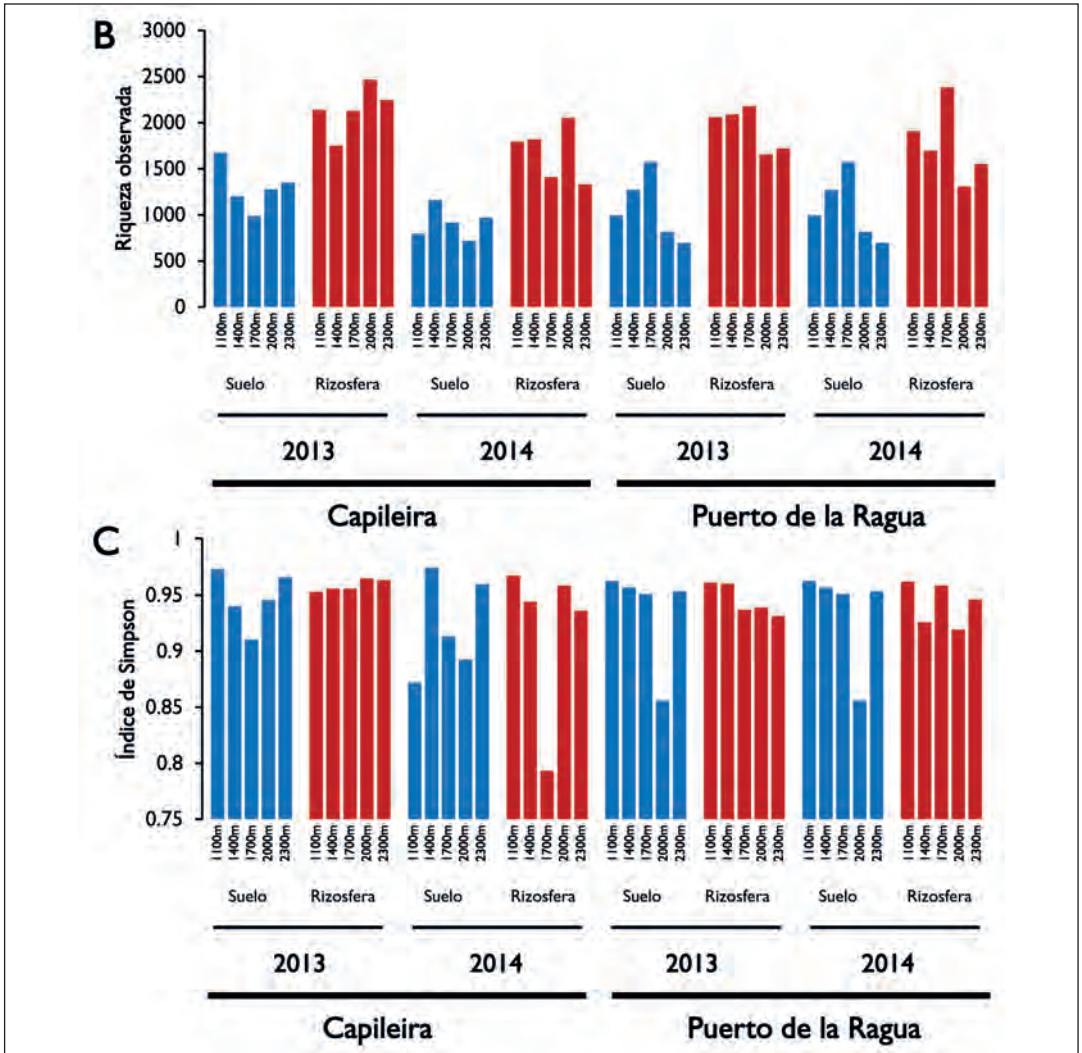


Fig. 5. Medias de los indicadores de diversidad de las comunidades fúngicas en las muestras del gradiente altitudinal: A) índice de Shannon-Wiener (H'); B) la riqueza observada (OTUs 97%); y C) índice de Dominancia de Simpson ($1-D$).

Las comunidades fúngicas presente en suelo suelto y en la rizosfera se diferenciaron principalmente respecto a la abundancia de representantes de los filos *Glomeromycota* y *Chytridiomycota* que fue mayor en el suelo suelto, mientras que el grupo de hongos no clasificados fue mayor en la rizosfera (Kruskal-Wallis, p -valor < 0,05). El hecho de que *Glomeromycota* apareciera en mayor abundancia en suelo suelto

no coincide con la biología de este microorganismo, pues en general este filo se asocia con micorrizas arbusculares (del Inglés, AMF). No obstante, tal y como han apuntado otros autores, no todos los AMF son simbiontes obligados de plantas (HEMPEL *et al.*, 2007). Al comparar las comunidades fúngicas en base al gradiente altitudinal, también se observaron diferencias significativas en las abundancias relativas de los

filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota*. En el caso de *Ascomycota*, su abundancia fue mayor a 1100m, 2000m y 2300m, mientras que la abundancia de *Basidiomycota* fue mayor a 1400m y 1700m. Las comunidad fúngica asociada al suelo rizosférico presentó una mayor riqueza de OTUs (97% similitud) y fue más diversas que la del suelo suelto (Kruskal-Wallis, p-valor < 0,05). El número de OTUs observados en el suelo rizosférico y suelto fueron $1883,5 \pm 63,8$ y $1056,25 \pm 53,7$, respectivamente, mientras que los valores de diversidad de Shannon-Wiener (H') oscilaron entre $6,0 \pm 0,1$ y $5,6 \pm 0,1$. Los valores de riqueza y diversidad fueron inferiores que los obtenidos para bacterias a pesar de definir los OTUs a un mismo nivel de similitud de secuencia y a que la tasa de evolución de la región ITS es mayor que la del gen rARN 16S. Esta discrepancia entre hongos y bacterias también ha sido observada por otros autores en suelos de bosque alpino en los Alpes italianos (SILES & MARGESIN, 2016). Respecto al valor de dominancia de Simpson, no se observaron diferencias significativas entre ambos tipo de suelo. Los valores de dominancia también fueron inferiores a los obtenidos para bacterias ($0,94 \pm 0,008$ en rizosfera y $0,93 \pm 0,006$ en suelo suelto), sugiriendo que en el caso de hongos unos pocos taxones fueron los mayoritarios, y por consiguiente la estructura de las comunidades fue más heterogénea que en el caso de las bacterias. Dicho fenómeno se puede ver en la distribución taxonómica de los fillos, donde el filo *Ascomycota* domina claramente las comunidades. Al comparar los índices de diversidad de hongos a lo largo del transecto altitudinal se observó la misma dinámica que la comunidad bacteria, produciéndose un descenso en los valores de alfa-diversidad desde 1100m a 1400m, e incrementándose los valores posteriormente con la altitud. Los valores de riqueza oscilaron en entre $1296,0 \pm 113,4$ OTUs a 1400m y a $1643,3 \pm 114,7$ OTUs a 2000m. No obstante, dichas diferencias no fueron signifi-

cativas (Kruskal-Wallis, p-valor > 0,05). Por otra parte, en el caso de los índices de diversidad (H') y dominancia (1-D) si se observaron diferencias significativas en las diferentes altitudes siendo mayores a 2000 m e inferiores a 1400m. La comparación de los valores de riqueza observada con la estimada mediante el estadístico Chao1 así como las curvas de rarefacción generadas confirmaron que el esfuerzo de muestreo realizado fue suficiente para acceder a la gran mayoría de taxones estimados (datos no mostrados).

Al igual que en las comunidades bacterianas, el análisis mediante ANOSIM mostró que las comunidades fúngicas del suelo suelto y de la rizosfera presentaron diferente composición (p-valor < 0,05; 9999 permutaciones). Las comunidades fúngicas presentes en cada altitud se pudieron diferenciar claramente entre ellas (ANOSIM, p-valor < 0,05, 9999 permutaciones), sugiriendo que la composición de hongos se ven fuertemente influenciados por las condiciones bióticas y abióticas asociadas a cada altitud.

El microbioma central fúngico de cada altitud comprendió un total de 23, 5, 10, 24 y 20 OTUs (97% similitud de secuencia) para las muestras de las altitudes 1100m, 1400m, 1700m, 2000m y 2300m, respectivamente. La gran mayoría de estos OTUs fueron identificados como representantes de los fillos *Ascomycota* y *Basidiomycota*. De estos OTUs, ninguno fue observado en todas las altitudes. No obstante, 5 OTUs identificados como *Agaricomycetes*, *Tremellomycetes*, *Dothideomycetes*, y dos no clasificados fueron compartidos por 4 altitudes. Además de los OTUs compartidos por varias altitudes, otros resultaron ser exclusivamente universales de cada altitud y por consiguiente podrían servir como potenciales bioindicadores. Hasta la fecha, esta es la primera vez que se estudia los microbiomas centrales fúngicos asociados a un gradiente altitudinal en una cordillera montañosa.

Análisis de la diversidad funcional en un gradiente altitudinal

La diversidad funcional microbiana asociada a cada altitud se analizó con la herramienta GeoChip (HE *et al.*, 2010), utilizando para ello el ADN metagenómico de las muestras de suelo suelto como rizosférico pertenecientes a cada una de las cinco altitudes analizadas de la zona de Capileira. El análisis con el Geochips consistió en la hibridación del ADN metagenómico frente a una extensa batería de sondas de ADN de genes involucrados en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre así como genes involucrados en el metabolismo de energía, resistencia a antibióticos o metales pesados y en la degradación de contaminantes orgánicos. La intensidad de fluorescencia normalizada de cada sonda es una medida directa del número de copias de un mismo gen presente en el ambiente y por consiguiente una medida indirecta de la abundancia de grupos funcionales microbianos VAN NOSTRAND *et al.* (2016). El perfil de las categorías funcionales analizadas en las muestras de suelo suelto fue más heterogéneo que en suelo rizosférico con un marcado aumento en las intensidades de señal en la muestra del suelo suelto a 1700m (Figura 6). Sin embargo, por lo general, se detectó una mayor abundancia de genes pertenecientes a todas las categorías funcionales analizadas en las muestras de suelo rizosférico. Además el análisis multivariable de la estructura de los grupos funcionales de las comunidades microbianas presente en suelo suelto y rizosférico resultaron ser estadísticamente diferentes (ANOSIM, p-valor < 0,05). Además, también se observó un incremento en la abundancia de genes conforme se incrementaba en altitud, siendo esta tendencia más evidente en la rizosfera. Mediante el test Mantel se observó que existe una correlación negativa ($r = -0,29$; p-valor < 0,05) entra la estructura funcional de las comunidades y la altitud.

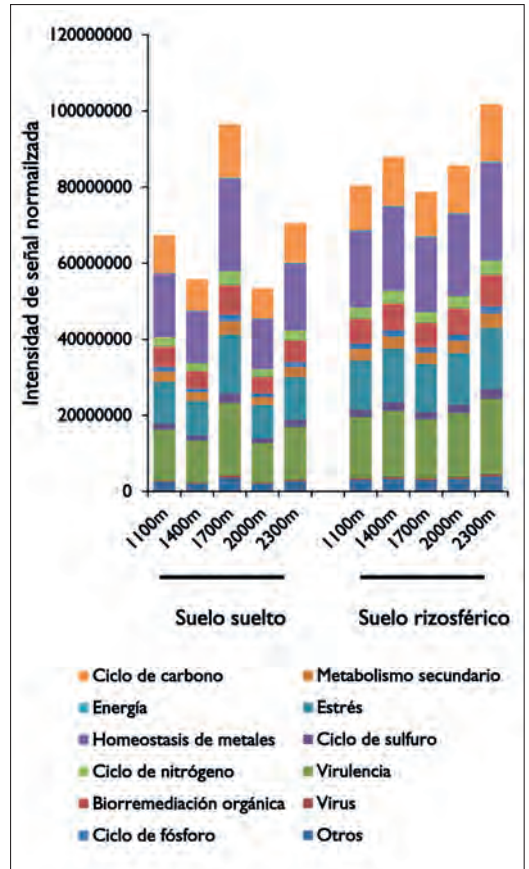


Fig. 6. Intensidad total de señal normalizada de genes funcionales presentes en cada muestra analizada con los GeoChips. Los genes aparecen agrupados en categorías funcionales.

Si en lugar de la intensidad de señal se cuentan el número de distintos genes que dieron señales, siempre el número total fue mayor en las muestras de suelo rizosférico que en suelo a igual altitud (datos no mostrados). Este mayor número de genes en suelo rizosférico se puede interpretar como un aumento en la diversidad funcional de las comunidades microbianas. El hecho que las comunidades microbianas de la rizosfera sean funcionalmente más diversas, puede deberse al mayor número de interacciones existentes, planta-microorganismo y mi-

croorganismo-microorganismo, así como por la existencia de una mayor cantidad y diversidad de nutrientes (BAIS *et al.*, 2006). Por otra parte la reducida homogeneidad entre las muestras del suelo suelto podría indicar que estas comunidades microbianas son más susceptibles a factores abióticos que aquellas asociadas a suelo rizosférico.

La predominancia de bacterias íntimamente relacionadas con el ciclo de nitrógeno en los microbiomas centrales bacterianos como es el orden *Rhizobiales* y particularmente la familia de *Bradyrhizobiaceae* apuntan a una gran relevancia del ciclo de nitrógeno en dicho entorno. Los resultados (Figura 7) con

los GeoChips confirmaron la abundancia de genes relacionados con el ciclo del nitrógeno especialmente aquellos asociados con los procesos de amonificación, desnitrificación y fijación de nitrógeno. Además, el número de genes asociados a estos procesos aumentan con la altitud siendo siempre mayor en la rizosfera que en suelo suelto. La amonificación, la desnitrificación y la fijación de nitrógeno son procesos cíclicos de liberación y captación de nitrógeno atmosférico, respectivamente (BARTON & NORTHUP, 2011). Por lo cual, los resultados del estudio funcional apuntan que a mayor altitud existe un mayor transformación de nitrógeno especialmente en suelo rizosférico.

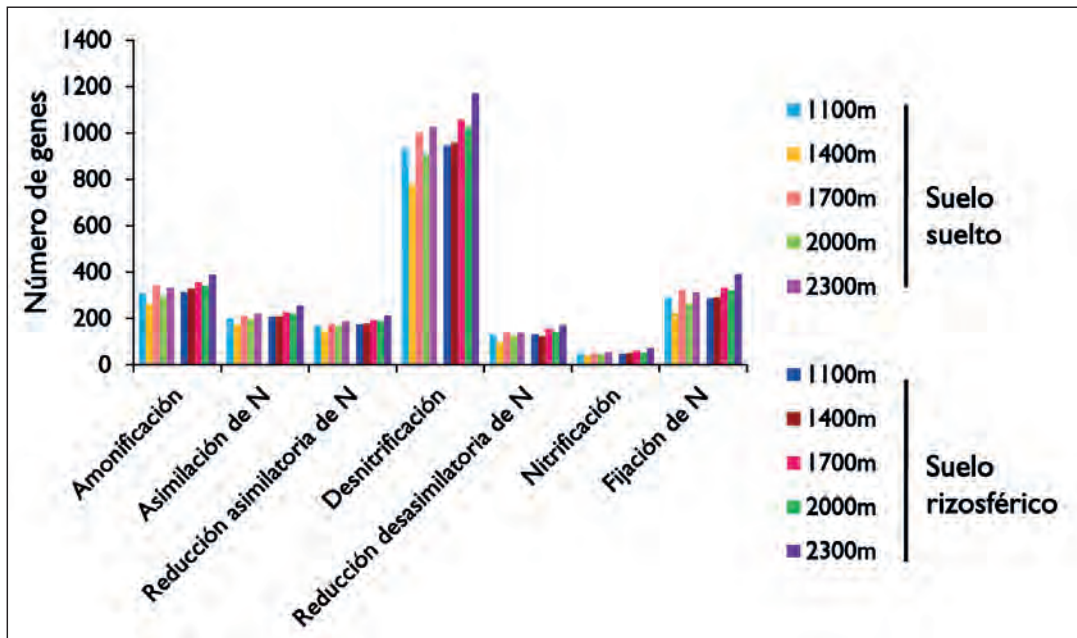


Fig. 7. Número total de diferentes genes funcionales relacionados con el ciclo de nitrógeno.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto que la estratificación altitudinal ejerce sobre la estructura taxonómica y funcional de las comunidades de bacterias y hongos presentes tanto

en suelo suelto como rizosférico. Los resultados obtenidos han confirmado que las comunidades bacterianas se ven claramente influenciadas por el tipo de suelo en el que habitan así como por la altitud en el que se encuentran. Con el fin de identificar especies microbianas

representativas de cada altitud analizada, se definió el microbioma central correspondiente a cada altitud. Hasta la fecha, este es el primer estudio que estudia en paralelo las comunidades microbianas asociadas al suelo suelto y suelo rizosférico a lo largo de transectos altitudinales. Además, este estudio ha permitido incrementar el conocimiento que se tenía de la diversidad taxonómica y funcional de microorganismos presentes en suelos del parque Nacional de Sierra Nevada y de la rizosfera del tomillo salsero.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto de referencia OAPN 590/2012 por parte del Organismo Autónomo Parques Nacionales, perteneciente al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. También se obtuvo parte de la financiación del proyecto BIO2010-17227 del Ministerio de Economía y Competitividad y fondos FEDER. Queremos expresar nuestro agradecimiento a las autoridades del Parque Nacional Sierra Nevada por su asistencia y concesión de los permisos pertinentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S. y VIVANCO, J. M. (2006): The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-66.
- BARTON, L. L. y NORTHUP, D. (2011): *Microbial Ecology: Beginnings and the Road Forward*. En: *Microbial Ecology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VER LOREN VAN THEMAAT, E. y SCHULZE-LEFERT, P. (2013): Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807-838.
- BROSIOUS, J.; PALMER, M. L.; KENNEDY, P. J. y NOLLER, H. F. (1978): Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75: 4801-4805.
- BRYANT, J. A.; LAMANNA, C.; MORLON, H.; KERKHOFF, A. J.; ENQUIST, B. J. y GREEN, J. L. (2008): Colloquium paper: microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105: Supplement 1 | 11505-11.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; GONZALEZ PEÑA, A.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; McDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J. y KNIGHT, R. (2010): QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335-336.
- COBO-DÍAZ, J. F.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. J.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; TORO, N.; VELÁZQUEZ, E. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. (2014): The endemic *Genista versicolor* from Sierra Nevada National Park in Spain is nodulated by putative new *Bradyrhizobium* species and a novel symbiovar *sierranevadense*. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 177-185.
- COBO-DÍAZ, J. F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. J.; VILLADAS, P. J.; ROBLES, A. B.; TORO, N. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. (2015): Metagenomic assessment of the potential microbial nitrogen pathways in the rhizosphere of a mediterranean forest after a wildfire. *Microbial Ecology* 69: 895-904.
- DE BRUIJN, F. J. (2013): *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- DRIGO, B.; KOWALCHUK, G. A. y VEEN, J. A. (2008): Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO₂ on microbial community structure and activities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* 44: 667-679.
- EDWARDS, J.; JOHNSON, C.; SANTOS-MEDELÍN, C.; LURIE, E.; PODISHETTY, N. K.; BHATNAGAR, S.; EISEN, J. A. y SUNDARESAN, V. (2015): Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 112: E911-920.

- FIERER, N.; MCCAIN, C. M.; MEIR, P.; ZIMMERMANN, M.; RAPP, J. M.; SILMAN, M. R. y KNIGHT, R. (2011): Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* 92: 797-804.
- GAO, Y.; WANG, S.; XU, D.; YU, H.; WU, Q.; LIN, Q.; HU, Y.; LI, X.; HE, Z.; DENG, Y.; ZHOU, J. y YANG, Y. (2014): GeoChip as a metagenomics tool to analyze the microbial gene diversity along an elevational gradient. *Genomics Data* 2: 132-134.
- GÄRDENÄS, A. I.; ÅGREN, G. I.; BIRD, J. A.; CLARHOLM, M.; HALLIN, S.; INESON, P.; KÄTTERER, T.; KNICKER, H.; NILSSON, S. I.; NÄSHOLM, T.; OGLE, S.; PAUSTIAN, K.; PERSSON, T. y STENDAHL, J. (2011): Knowledge gaps in soil carbon and nitrogen interactions - From molecular to global scale. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 702-717.
- HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M. y SCHMID, M. (2007): Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 312: 7-14.
- HE, Z.; DENG, Y.; VAN NOSTRAND, J. D.; TU, Q.; XU, M.; HEMME, C. L.; LI, X.; WU, L.; GENTRY, T. J.; YIN, Y.; LIEBICH, J.; HAZEN, T. C., y ZHOU, J. (2010): GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *The ISME Journal* 4: 1167-79.
- HEMPEL, S.; RENKER, C. y BUSCOT, F. (2007): Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930-1938.
- KEMP, P. F. y ALLER, J. Y. (2004): Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnology and Oceanographic Methods* 2: 114-125.
- KÖLJALG, U.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; TAYLOR, A. F. S.; BAHRAM, M.; BATES, S. T.; BRUNS, T. D.; BENGTSSON-PALME, J.; CALLAGHAN, T. M.; DOUGLAS, B.; DRENKHAN, I.; EBERHARDT, U.; DUEÑAS, M.; GREBENC, T.; GRIFFITH, G. W.; HARTMANN, M.; KIRK, P. M.; KOHOUT, P.; LARSSON, E.; LINDAHL, B. D.; LÜCKING, R.; MARTÍN, M. P.; MATHENY, P. B.; NGUYEN, N. H.; NISKANEN, T.; OJA, J.; PEAY, K. G.; PEINTNER, U.; PETERSON, M.; POLDMAA, K.; SAAG, L.; SAAR, I.; SCHÜSSLER, A.; SCOTT, J. A.; SENES, C.; SMITH, M. E.; SUJJA, A.; TAYLOR, L.; TELLERIA, M. T.; WEISS, M. y LARSSON, K.-H. (2013): Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22: 5271-5277.
- KUYKENDALL, L. D. (2015): *Bradyrhizobium*. En: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. pp 1-11. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK.
- LANZEN, A.; EPELDE, L.; BLANCO, F.; MARTÍN, I.; ARTETXE, U. y GARBISU, C. (2016): Multi-targeted metagenetic analysis of the influence of climate and environmental parameters on soil microbial communities along an elevational gradient. *Scientific Reports* 6: 28257.
- LIN, Y. T.; WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; SHI, S. Y.; TANG, S. L. y CHIU, C. Y. (2015): Changes of soil bacterial communities in bamboo plantations at different elevations. *FEMS Microbiology Ecology* 91: fiv033.
- MARGESIN, R.; JUD, M.; TSCHERKO, D. y SCHINNER, F. (2009): Microbial communities and activities in alpine and subalpine soils. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 208-218.
- MENG, H.; LI, K.; NIE, M.; WAN, J.-R.; QUAN, Z.-X.; FANG, C.-M.; CHEN, J.-K.; GU, J.-D. y LI, B. (2013): Responses of bacterial and fungal communities to an elevation gradient in a subtropical montane forest of China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 2219-30.
- OP DE BEECK, M.; LIEVENS, B.; BUSSCHAERT, P.; DECLERCK, S.; VANGRONVELD, J. y COLPAERT, J. V. (2014): Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE* 9: e97629.
- OREN, A.; XU, X.-W. (2014): The Family *Hyphomicrobiaceae*. En: *The Prokaryotes*. pp. 247-281. Springer. Berlin.
- PASCUAL, J.; BLANCO, S.; GARCÍA-LÓPEZ, M.; GARCÍA-SALAMANCA, A.; BURSAKOV, S. A.; GENILLOU, O.; BILLS, G. F.; RAMOS, J. L. y VAN DILLEWIJN, P. (2016): Assessing bacterial diversity in the rhizosphere of *Thymus zygis* growing in the Sierra Nevada National Park Spain through culture-dependent and independent approaches. *PLoS One* 11: e0146558.
- PASCUAL, J.; WÜST, P. K.; GEPPERT, A.; FOESEL, B. U.; HUBER, K. J. y OVERMANN, J. (2015): Novel isolates double the number of chemotrophic species and allow the first description of higher taxa in Acidobacteria subdivision 4. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 534-544.
- PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; BÖRJESSON, G. y BAGGS, E. M. (2009): Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant and Soil* 321: 61-81.
- PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P. y VAN DER PUTTEN, W. H. (2013): Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews in Microbiology* 11: 789-799.

- POWLSON, D. S.; WHITMORE, A. P. y GOULDING, K. W. T. (2011): Soil carbon sequestration to mitigate climate change: A critical re-examination to identify the true and the false. *European Journal of Soil Science* 62: 42-55.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J. y GLÖCKNER, F. O. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41: D590-596.
- SÉGUIN, V.; COURCHESNE, F.; GAGNON, C.; MARTIN, R. R.; NAFFEL, S. J. y SKINNER, W. (2005): Mineral weathering in the rhizosphere of forested soils. En: P.M. Huang & G.R. Gobran (eds.) *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. pp. 29–55. Elsevier B.V. Amsterdam.
- SHEN, C.; XIONG, J.; ZHANG, H.; FENG, Y.; LIN, X.; LI, X.; LIANG, W. y CHU, H. (2013): Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 204-211.
- SILES, J. A. y MARGESIN, R. (2016): Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: What are the driving factors? *Microbial Ecology* 72: 207-220.
- SINGH, D.; TAKAHASHI, K.; KIM, M.; CHUN, J. y ADAMS, J. M. (2012): A hump-backed trend in bacterial diversity with elevation on Mount Fuji, Japan. *Microbial Ecology* 63: 429-432.
- VAN NOSTRAND, J. D.; YIN, H.; WU, L.; YUAN, T. y ZHOU, J. (2016): Hybridization of environmental microbial community nucleic acids by GeoChip. En: Francis Martin and Stéphane Uroz (eds.) *Microbial Environmental Genomics (MEG), Methods in Molecular Biology*, vol. 1399, pp. 183-196. Springer Science Business Media, New York.
- WHITMAN, W. B. (2015): *Solirubrobacter*. En: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. pp. 1-5. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK.
- YANG, Y.; GAO, Y.; WANG, S.; XU, D.; YU, H.; WU, L.; LIN, Q.; HU, Y.; LI, X.; HE, Z.; DENG, Y. y ZHOU, J. (2014): The microbial gene diversity along an elevational gradient of the Tibetan grassland. *The ISME Journal* 8: 430-440.
- YASIR, M.; AZHAR, E. I.; KHAN, I.; BIBI, F.; BAABDULLAH, R.; AL-ZAHRANI, I. A. y AL-GHAMDI, A. K. (2015): Composition of soil microbiome along elevation gradients in southwestern highlands of Saudi Arabia. *BMC Microbiology* 15: 1-9.
- ZHANG, Y.; CONG, J.; LU, H.; LI, G.; XUE, Y.; DENG, Y.; LI, H.; ZHOU, J. y LI, D. (2014): Soil bacterial diversity patterns and drivers along an elevational gradient on Shennongjia Mountain, China. *Microbial Biotechnology* 8: 739-746.