



UGR | Universidad
de Granada



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas.

TESIS DOCTORAL

**Análisis del metabolismo procariótico del
nitrógeno en la rizosfera de quercíneas del
Espacio Protegido de Sierra Nevada
mediante técnicas moleculares y
metagenómicas.**

D. José Francisco Cobo Díaz.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Francisco Cobo Díaz
D.L.: GR 911-2014
ISBN: 978-84-9028-946-4

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

TESIS DOCTORAL

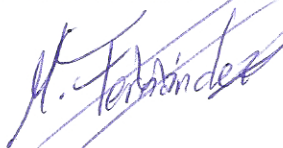
**Análisis del metabolismo procariótico del nitrógeno en la rizosfera de quercíneas del
Espacio Protegido de Sierra Nevada mediante técnicas moleculares y metagenómicas.**

Memoria presentada por D. José Francisco Cobo Díaz, Licenciado en Biología,
para optar al grado de Doctor



Fdo.: **José Francisco Cobo Díaz**

VºBº del director de la Tesis Doctoral



Fdo.: **Dº Manuel Fernández López**
Doctor en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

Universidad de Granada
Noviembre de 2013.



UGR | Universidad
de Granada



El doctorando José Francisco Cobo Díaz y el director de la tesis D. Manuel Fernández López garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la Tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores al ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 8 de Noviembre de 2013.

Director de la Tesis

Fdo.: Manuel Fernández López

Doctorando

Fdo.: José Francisco Cobo Díaz

Publicaciones:

Autores (p.o. de firma): Fernández-González, A.J., **J.F. Cobo-Díaz**, P.J. Villadas, A.B. Robles, N. Toro y M. Fernández-López.

Título: Análisis de la diversidad procariótica asociada a quercíneas (*Quercus ilex* sp. ballota y *Q. pyrenaica*) para la identificación de bioindicadores asociados a la evolución post-incendio y al cambio climático en Sierra Nevada.

Ref. 0 revista: X Libro:

Clave: CL Volumen: Proyectos de investigación en parques nacionales 2007-2010. L.Ramírez y B. Asensio (eds.) ISBN 978-84-8014-805-4 Páginas, inicial: 159 final: 174 Fecha: 2011

Editorial (si libro): Organismo Autónomo Parques Nacionales.

Lugar de publicación: Madrid.

Autores (p.o. de firma): **Cobo-Díaz, J.F.**, P. Martínez-Hidalgo, A.J. Fernández-González, E. Martínez-Molina, N. Toro, E Velázquez y M. Fernández-López.

Título: The endemism *Genista versicolor*, from Sierra Nevada National Park in Spain, is nodulated by new putative Bradyrhizobium species and a novel symbiovar (*sierranevadense*).

Ref. X revista: Systematic and Applied Microbiology 0 Libro

Clave: Volumen: Páginas, inicial: final:

Fecha: En prensa

Índice de impacto: 3,288, Q1 en Biotechnology and Applied Microbiology (40/160)

Autores (p.o. de firma): **Cobo-Díaz J.F.**, A.J. Fernández-González, P.J. Villadas, A.B. Robles, N.Toro y M. Fernández-López.

Título: Nitrogen metabolism in the rhizosphere of a Mediterranean forest after a wildfire assessed by metagenomics and diazotrophic diversity.

Ref. X revista: PLoS ONE 0 Libro

Clave: Volumen: Páginas, inicial: final:

Fecha: Sometido

Participación en congresos:

Autores: Fernández-López, M., A.J. Fernández-González, J.F. Cobo-Díaz, P.J. Villadas y N. Toro

Título: Forest rhizospheric ecosystems: prokaryotic diversity versus diazotrophy.

Tipo de participación: Conferencia invitada.

Congreso: XIII Reunión Nacional de la SEFIN y II Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno

Publicación: Biological Nitrogen Fixation and Plant-Associated Microorganisms

Lugar celebración: Zaragoza Fecha: 15-18 Junio 2010

Autores: Cobo-Díaz, J.F., P.J. Villadas, N. Toro y M. Fernández-López

Título: Diversity of nitrogen fixation in microbial communities from *Quercus* trees rhizosphere.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XIII Reunión Nacional de la SEFIN y II Congreso Luso-Español de Fijación de Nitrógeno

Publicación: Biological Nitrogen Fixation and Plant-Associated Microorganisms
Lugar celebración: Zaragoza Fecha: 15-18 Junio 2010

Autores: Fernández-González, A.J., J.F. Cobo-Díaz, P.J. Villadas, N. Toro y M. Fernández-López.
Título: Identificación de bioindicadores de procesos ambientales en la rizosfera de quercíneas mediante metagenómica.
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: III Congreso Nacional de Biodiversidad.
Publicación: Resúmenes del Congreso.
Lugar celebración: Granada Fecha: 08-10 de Junio de 2011

Autores: Fernández-López, M., Fernández-González, A.J., P.J. Villadas, J.F. Cobo-Díaz y N. Toro.
Título: Metagenomic approach to the prokaryotic Diversity of Quercus rhizosphere: biomarkers of forest evolution.
Tipo de participación: Póster
Congreso: FEMS 2011, 4th Congress of European Microbiologists.
Publicación: Resúmenes del Congreso.
Lugar celebración: Ginebra, Suiza Fecha: 26-30 de Junio de 2011

Autores: Fernández-González, A.J., P.J. Villadas, J.F. Cobo-Díaz, N. Toro, S.G. Tringe y M. Fernández-López.
Título: Diversity and evolution of the microbial communities at the rhizosphere of Quercus ilex subsp. ballota after a wildfire.
Tipo de participación: Póster
Congreso: BAGECO 12
Publicación: Resúmenes del Congreso.
Lugar celebración: Liubliana, Eslovenia Fecha: 9-13 de Junio de 2013

Autores: Fernández-López, M., A.J. Fernández-González, F.J. Cobo-Díaz, P.J. Villadas, S.G. Tringe y N. Toro.
Título: Diversidad y evolución de las comunidades microbianas en la rizosfera tras un incendio forestal.
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: II IBEMPA Conference; III Spanish-Portuguese Congress on Nitrogen Fixation; XIV Reunión de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno; XXVI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología.
Publicación: Resúmenes del Congreso.
Lugar celebración: Sevilla. Fecha: 2-6 de septiembre de 2013

Financiación obtenida:

Título del proyecto: Análisis de la diversidad procariótica asociada a quercíneas (*Quercus ilex* y *Q. pyrenaica*) para la identificación de biomarcadores asociados a la evolución post-incendio y al cambio climático en Sierra Nevada. OAPN 021/2007
Entidad financiadora: Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales.
Entidades participantes: EEZ-CSIC

Duración, desde: diciembre 2007 hasta: diciembre 2010 Cuantía de la subvención: 67.218 €

Investigador responsable: Dr. Manuel Fernández López

Número de investigadores participantes: 4

Título del proyecto: Identificación de bioindicadores microbianos en la rizosfera de quercíneas (*Quercus ilex* y *Q. pyrenaica*) asociados a cambio climático y evolución post-incendio. P08-CVI-03549.

Entidad financiadora: Junta de Andalucía.

Entidades participantes: EEZ-CSIC y Universidad Miguel Hernández.

Duración, desde: enero 2009 hasta: diciembre 2013 Cuantía de la subvención: 167.066 €

Investigador responsable: Dr. Manuel Fernández López.

Número de investigadores participantes: 5

Título del proyecto: Genómica comparada microbiana (Microgen).CSD2009-00006.

Entidad financiadora: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Programa Consolider-Ingenio.

Entidades participantes: CSISP, Univ. Miguel Hernández, EEZ-CSIC, IRNAS-CSIC, Univ. Illes Balears, Univ. Granada, Univ. Pol. Madrid, Univ. Valencia, IVIA, UPV.

Duración, desde: enero 2010 hasta: diciembre 2014 Cuantía de la subvención: 431.980 €

Investigador responsable: Dr. Nicolás Toro García

Número de investigadores participantes: 30

RESUMEN.

Las bacterias son indicadores tempranos de cambios en el ambiente debido a su papel en los distintos ciclos biogeoquímicos de los elementos y a su sensibilidad a las alteraciones del ambiente, teniendo un papel fundamental en el ciclo del N, ya que son los únicos seres vivos del planeta con capacidad para fijar el nitrógeno molecular atmosférico en forma de amonio, haciéndolo disponible para el resto de organismos. El objetivo principal del presente trabajo es analizar el papel de las bacterias como posibles bioindicadores de los cambios ambientales que sufren algunas de las formaciones boscosas del Parque Nacional de Sierra Nevada. Para ello se ha realizado un estudio de la diversidad de fijación de Nitrógeno y un análisis del potencial genético del ciclo del Nitrógeno en la rizosfera de un robledal en gradiente altitudinal, en la comparación robledal *versus* encinar, y en un encinar 3 y 6 años después de un incendio forestal. Además, también se ha realizado análisis de las bacterias formadoras de nódulos fijadores de Nitrógeno en las raíces de *Genista versicolor* Boiss., piornal amarillo, formación vegetal responsable de la formación de suelo en alta montaña.

Los resultados obtenidos muestran que *G. versicolor* es nodulada por bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, siendo predominante la presencia de *B. canariense* biovar *genistearum*. Además *G. versicolor* es una planta promiscua, ya que puede ser nodulada por otras 2 especies de *Bradyrhizobium*, perteneciendo una de ellas a un nuevo simbiovar que hemos denominado sierranevadense.

En cuanto a la diversidad de organismos diazotróficos, se ha observado que la muestra de encinas quemadas es la que menor riqueza y diversidad presenta, aunque ha aumentado entre los 3 y 6 años después del incendio, existiendo como género mayoritario *Azospirillum* y *Clostridium* respectivamente para cada año. En la rizosfera de robles se observa una correlación positiva entre la riqueza y diversidad de microorganismos diazotróficos y la relación C/N, la concentración de Mg_2^+ y Ca_2^+ , la salinidad y el pH del suelo. De acuerdo al análisis de diversidad del gen *nifH* el phylum Cyanobacteria es el más abundante. En la zona de expansión del robledal predomina *Sinorhizobium* y en las zonas menos alteradas abunda *Methylobacterium*. En la rizosfera de las formaciones boscosas de quercíneas mínimamente alteradas la abundancia relativa del género *Methylobacterium* podría ser un indicador de la calidad del suelo, ya que presenta una gran abundancia en estas muestras.

En la rizosfera de las formaciones boscosas de quercíneas mínimamente alteradas el potencial genético del ciclo del nitrógeno nos muestra un ecosistema desarrollado en el caso del roble, y en fase de alcanzarlo en el caso del encinar. El *phylum* Proteobacteria es diferencialmente predominante en el roble, y el de Acidobacteria en la rizosfera del encinar. Los microorganismos rizosféricos del roble en la zona de expansión presentan un ciclo del nitrógeno con bajas pérdidas y altas entradas de este elemento, lo cual es característico de un ecosistema en desarrollo. Además, el *phylum* Proteobacteria, con microorganismos típicamente heterótrofos, presenta una menor abundancia.

También se observa que cuando se produce un incendio forestal la microbiota asociada a la raíz potencia la obtención de nitrógeno desde fuentes inorgánicas, mientras que en el ecosistema no alterado lo obtiene de compuestos orgánicos. Los *phyla* bacterianos típicos del ecosistema no alterado, Proteobacteria y Acidobacteria, son reemplazados por el *phylum* Actinobacteria, destacando la presencia de los géneros *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Modestobacter* y *Blastococcus*.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Cambio Climático	3
1.1 Aspectos generales	3
1.2 Incendios forestales como consecuencia y causa del Cambio Climático	6
1.3 Cambio Climático en ecosistemas de montaña	8
2. Espacio Protegido de Sierra Nevada	9
2.1 Gradientes altitudinales en Sierra Nevada	11
3. Ciclo del nitrógeno	14
3.1 La enzima nitrogenasa	17
4. La comunidad microbiana del suelo y el Cambio Climático	18
4.1 Gradiente altitudinal	20
4.2 Incendios forestales	22
5, Metagenómica	24
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. Área de estudio	33
2. Toma de muestras y extracción de DNA	35
a. Toma de muestras.	35
b. Extracción de DNA de suelos.	36
c. Cuantificación de la concentración de DNA.	37
d. Preparación de DNA para secuenciación masiva de alta calidad.	37
3. Bacterias con capacidad de formar nódulos en <i>Genista versicolor</i> .	38
a. Recolección y almacenamiento de semillas y suelos.	38
b. Medios y soluciones.	39
c. Macetas con planta-trampa.	40
d. Aislamiento de cepas bacterianas de los nódulos obtenidos.	40
e. Extracción de DNA genómico.	41
f. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA.	42

g.	Conservación a largo plazo de cepas bacterianas.	44
h.	Comprobación de la capacidad de nodulación de los aislados de <i>Bradyrhizobium</i> .	45
i.	Amplificación y secuenciación de los genes <i>nifH</i> y <i>nodC</i> .	45
j.	RAPD fingerprinting	47
k.	Análisis de los genes <i>atpD</i> y de la región intergénica 16S-23S (ITS).	48
l.	Procesamiento informático y análisis de datos.	51
m.	Experimentos de rango de planta hospedadora.	51
4.	Estudio de las comunidades diazotróficas.	53
a.	Construcción de librerías del gen <i>nifH</i> .	53
b.	Análisis de las secuencias del gen <i>nifH</i> .	57
i.	Scripts empleados en el análisis de las secuencias de <i>nifH</i> .	57
ii.	Limpieza de las secuencias de <i>nifH</i> .	58
iii.	Composición de las comunidades diazotróficas.	59
iv.	Estructura de las comunidades diazotróficas.	59
v.	Comparación entre comunidades diazotróficas.	62
5.	Análisis de las secuencias metagenómicas.	63
a.	Scripts empleados en el análisis de las secuencias metagenómicas.	63
b.	Limpieza de lecturas metagenómicas y ensamblaje de las secuencias de Illumina.	64
c.	Procesamiento de las secuencias metagenómicas.	65

RESULTADOS **69**

Capítulo 1:	Bacterias de suelos de Sierra Nevada capaces de nodular <i>Genista versicolor</i> .	71
1.	Aislamiento de bacterias y experimentos de nodulación	72
2.	Análisis de RAPD fingerprinting	74
3.	Análisis del gen <i>rrs</i>	76
4.	Análisis de las secuencias ITS	84
5.	Análisis del gen <i>atpD</i>	86
6.	Análisis de genes simbióticos	88
7.	Experimentos de rango de plantas hospedadoras	91
Capítulo 2.1:	Influencia de la especie arbórea en la estructura y composición de las comunidades diazotróficas.	97
1.	Propiedades físico-químicas de los suelos de las zonas de estudio	98
2.	Análisis de las comunidades diazotróficas	99
Capítulo 2.2:	Efecto de un gradiente altitudinal en la estructura y composición de las comunidades diazotróficas asociadas a la rizosfera de roble melojo (<i>Q. pyrenaica</i> willd.).	105

1. Propiedades físico-químicas de los suelos de las zonas de estudio	106
2. Análisis de las comunidades diazotróficas	107
Capítulo 2.3: Efecto de un incendio forestal en la estructura y composición de las comunidades diazotróficas asociadas a la rizosfera de <i>Q. ilex</i> subsp. <i>ballota</i> .	115
1. Propiedades físico-químicas de los suelos de las zonas de estudio	116
2. Análisis de las comunidades diazotróficas	117
Capítulo 3.1: Análisis global de los metagenomas rizosféricos.	129
1. Efecto de un incendio forestal	133
2. Influencia del desarrollo de la cubierta general	135
3. Influencia del gradiente altitudinal	138
Capítulo 3.2: Efecto de un incendio forestal en las rutas metabólicas del nitrógeno de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i> .	141
1. Base de datos de subsistemas de SEED	143
2. Base de datos de KEGG Orthology (KO) de "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG).	150
Capítulo 3.3: Influencia del desarrollo de la cubierta vegetal en las rutas metabólicas del ciclo del nitrógeno de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de quercíneas.	155
1. Base de datos de subsistemas de SEED	157
2. Base de datos de KEGG Orthology (KO) de "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG).	163
Capítulo 3.4: Influencia del gradiente altitudinal en las rutas metabólicas del nitrógeno de las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de quercíneas.	171
1. Base de datos de subsistemas de SEED	173
2. Base de datos de KEGG Orthology (KO) de "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG).	178

DISCUSIÓN	185
1. Aspectos generales a tener en cuenta	187
2. Característica físico-químicas del suelo	188
3. Comunidades diazotróficas	191
4. Consideraciones a tener en cuenta debido a la metodología metagenómica empleada	198
5. Rutas metabólicas del ciclo del nitrógeno	201
CONCLUSIONES	207
BIBLIOGRAFÍA	211

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CAMBIO CLIMÁTICO.

1.1 ASPECTO GENERALES.

Por "cambio climático" se entiende un cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos comparables.

CONVENCION MARCO DE LAS NACIONES UNIDAS SOBRE EL CAMBIO CLIMATICO, 1992.

Artículo 1, párrafo 2.

Se denomina cambio climático a la modificación del clima con respecto al historial climático a una escala global o regional. Aunque la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático usa el término «cambio climático» solo para referirse al cambio por causas humanas (ver cita "Artículo1, párrafo 2") realmente un cambio climático se da debido a la influencia de una serie de factores, tanto externos al propio planeta (variaciones solares, variaciones orbitales e impacto de meteoritos) como internos (deriva continental, composición atmosférica, corrientes oceánicas, campo magnético terrestre y efectos antropogénicos). Dentro del factor de la composición atmosférica, es conveniente recordar la importancia, para el desarrollo de la vida, del efecto invernadero, que es el fenómeno por el cual parte de la radiación solar que llega a la superficie del planeta es de nuevo reflejada a la atmósfera en forma de radiación infrarroja y retenida por los gases de efecto invernadero (vapor de agua (H₂O), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), ozono (O₃), dióxido de carbono (CO₂) y derivados clorofluorocarbonados (CFC)). Debido a esto, la temperatura media del planeta está en torno a 15 °C, posibilitando la vida en la Tierra, ya que de no existir los gases de efecto invernadero la temperatura media global sería de -18 °C.

La concentración atmosférica de CO₂ se ha incrementado desde los 280 μmol·mol⁻¹ de la época preindustrial a niveles actuales de 400 μmol·mol⁻¹ (<http://www.co2now.org>), con previsiones de exceder los 700 μmol·mol⁻¹ al final de este siglo (Houghton y Ding, 2001). Este aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera, debido principalmente al efecto de la actividad humana, está provocando que el actual cambio climático dé lugar a un calentamiento global, entendiendo como calentamiento global un

INTRODUCCIÓN

aumento de la temperatura media anual de la superficie terrestre, existiendo predicciones de un aumento de entre 1,1 y 6,4 °C de la temperatura media de la superficie para finales del siglo XXI (IPCC, 2007). Aun así, el presente calentamiento global no es el único que ha sufrido nuestro planeta, habiendo sido el más reciente el periodo cálido medieval (que se dio entre los siglos X y XIV, siendo la región europea donde mejor se ha documentado este evento), aunque el calentamiento global actual es el más brusco, ya que la tasa de calentamiento actual no se ha dado con anterioridad, ni siquiera en la época de las glaciaciones, donde un cambio de entre 4 y 7 °C de la temperatura media anual se dio en un periodo de tiempo de unos 5.000 años (IPCC, 2007). El cambio climático actual es de gran interés para el ser humano por dos razones principales, la primera es que está afectando a la vida humana, tanto a nivel de salud como en aspectos socio-económicos, y la segunda razón es que al provocar la tasa de calentamiento global más rápida registrada en los últimos miles de años se plantea el problema de si los organismos vivos tienen la capacidad de adaptarse a estos cambios. Actualmente es evidente el devastador efecto que está teniendo el Cambio Climático sobre los ecosistemas, existiendo numerosas evidencias de especies en peligro crítico de extinción, de pérdida de riqueza y diversidad y de fragmentación y disminución de los hábitats. Así parece irremediable cambiar el rumbo, ya que existen estudios, como el presentado por Warren *et al.* (2013), en los que se llega a la conclusión de que una mitigación de los efectos del cambio climático reduciría la pérdida de biodiversidad que está sufriendo el planeta actualmente.

El cambio climático está provocando una serie de cambios en la biosfera, repercutiendo notablemente y de diferentes formas en la mayoría de los ecosistemas tanto terrestres como marinos. Además, está influyendo en los diferentes organismos del planeta tanto macroscópicos como microscópicos, afectando a éstos en muchas ocasiones a nivel de procesos metabólicos relativamente sencillos. Como ejemplo, el aumento de la concentración de CO₂ atmosférico está provocando una disminución del pH de los océanos, de la concentración de iones carbonatos y del estado de saturación del carbonato cálcico, provocando un aumento de la disolución de carbonatos en los océanos del todo el planeta (Feely *et al.* 2004; Orr *et al.* 2005). Esta alteración de las concentraciones iónicas y del pH de las aguas oceánicas provoca un debilitamiento de las estructuras calcáreas de los organismos marinos, ya que se disminuye la tasa de calcificación, y esto conlleva grandes alteraciones sobre todo en ecosistemas de corales. Por otro lado, diferentes estudios de campo han puesto de manifiesto que el aumento de CO₂ atmosférico hace que las plantas asimilen mayor cantidad de carbono (Drake *et al.* 1997; Ainsworth y Long, 2005), mientras que otros autores han sugerido que también se produciría una mayor acumulación de carbono (C) en el suelo, el cual es el mayor y más estable reservorio de carbono del planeta (Jastrow *et al.* 2005). De Graff *et al.* (2006) realizó un meta-análisis a partir de 117 estudios sobre el efecto del aumento de la concentración de CO₂ atmosférico en la producción de biomasa vegetal, en la dinámica de la materia orgánica del suelo y en la fijación de nitrógeno (N). En dicho

trabajo se concluye que un aumento de los niveles de CO₂ atmosférico provoca una mayor inmovilización de N, un incremento en la proporción C/N del suelo, el contenido de N y C microbiano, la respiración del suelo y también un aumento de la cantidad de biomasa vegetal, tanto aérea como subterránea, con su consecuente aumento en la respiración de CO₂ por parte de las plantas. Otra de las conclusiones a las que llega este trabajo es que el aumento de la biomasa vegetal en altas concentraciones de CO₂ sólo se puede mantener, a largo plazo, si existe un aporte extra de nutrientes. Esto significa que tanto las plantas como los microorganismos del suelo tienen la capacidad de regular los niveles de concentración de CO₂ atmosférico, acumulando ese exceso de CO₂ que se está dando actualmente en reservorios de carbono, como los bosques o la materia orgánica del suelo.

Por lo tanto, aunque el mayor efecto del cambio climático actual es un incremento de la temperatura media de la superficie terrestre, existen otros factores también asociados a la actividad humana (mayor deposición de N en ecosistemas cercanos a núcleos urbanos, alteración de cursos o caudales de ríos, deforestación...) que están alterando en mayor o menor medida los ecosistemas del planeta e incluso pueden afectar a la dinámica atmosférica y oceánica. Es importante remarcar que tanto la dinámica atmosférica como la oceánica regulan y mantienen el clima terrestre, ya que de no existir ambos las temperaturas en el planeta serían más extremas, con mayores temperaturas en latitudes cercanas al ecuador y temperaturas más bajas en las actuales latitudes de clima templado y frío. Por ello, existen diferentes enfoques a la hora de estudiar el cambio climático actual, algunos basados en la modelización de la dinámica física global (tanto la atmosférica como la oceánica) para conocer el funcionamiento de éstas y poder realizar previsiones a medio y largo plazo de las condiciones climáticas futuras, o incluso cómo afectara a la disponibilidad de recursos marinos y, por ende, a la economía de las regiones costeras. Otros estudios se centran en el análisis económico y social del cambio climático para estudiar las causas y sus efectos y para diseñar una estrategia eficiente que permita transitar a un desarrollo sostenible (<http://www.euroclima.org/es/euroclima/socios-euroclima/item/442-metodologías-para-el-análisis-del-cambio-climático>). También existen muchos trabajos sobre la influencia del cambio global en la biosfera a nivel macroscópico, donde se estudia diferentes aspectos de la fauna y la flora, como pueden ser la fragmentación de los hábitats, cambios en la distribución espacial o en la estructura de los bosques, cambios a nivel fisiológico o reproductivo tanto de especies vegetales como animales... Otra serie de investigaciones se centra en la alteración de los niveles de diferentes gases atmosféricos (sobre todo los gases de efecto invernadero) y su influencia tanto en el clima terrestre como en la biosfera, principalmente en la estructura, composición y funcionamiento de las comunidades vegetales y microbianas. En los últimos años, y gracias al avance de las tecnologías de secuenciación de DNA (Next Generation Sequencing), se están realizando numerosos estudios centrados en los cambios en las comunidades de organismos microscópicos del suelo, tanto hongos como bacterias, debidos al aumento de la temperatura, al aumento de la concentración de CO₂

INTRODUCCIÓN

atmosférico, al cambio de uso o manejo del suelo, donde se incluye el empleo de fertilizantes nitrogenados, al efecto de las comunidades vegetales presentes, al cambio de vegetación debido a alteraciones de la serie ecológica...

Hay que tener en cuenta que aunque existen diferentes enfoques en el estudio de las causas y efectos del cambio climático (dinámica global, efectos en la biosfera, efectos sociales y económicos....) todos estos aspectos están interrelacionados. Como ejemplo de esta interrelación de enfoques, en el trabajo de Hanewinkel *et al.* (2013) se indica que los cambios en la distribución de especies que están sufriendo actualmente los bosques europeos dará lugar a un escenario futuro dominado por bosques mediterráneos de robles y encinas, los cuales son de escaso valor económico dentro de la industria de la madera, por lo que afectará a la economía de la región. Y cabe destacar que es tal la importancia del estudio de las causas y efectos del cambio climático que existen numerosas revistas científicas con elevado índice de impacto especializadas en este tema o en algunos de los aspectos asociados, como, por poner algunos ejemplos, *Global Environmental Change*, *Global and Planetary Change*, *Environmental Pollution*...

1.2 INCENDIOS FORESTALES COMO CONSECUENCIA Y CAUSA DEL CAMBIO CLIMÁTICO.

Los incendios, como eventos ocasionales de origen natural, han influido en la vegetación de la cuenca mediterránea desde antes de la aparición del hombre en este área (Clark, 1996). Además, con el asentamiento del hombre en el área mediterránea, se introdujo otro factor importante, como es el pastoreo, que junto a otros factores (como son las sequías regulares, las elevadas temperaturas o los propios eventos de incendios ocasionales) ha permitido el desarrollo de una vegetación específica y adaptada a estas condiciones (Pausas, 2006) y muy característica de la región mediterránea: la dehesa, donde la acción ganadera juega un papel fundamental en el mantenimiento del ecosistema. El problema es que durante el desarrollo industrial, desde comienzos del siglo XIX, y hasta la actualidad, la estructura socio-económica de gran parte del planeta ha sufrido grandes cambios, siendo el más evidente el éxodo rural en busca de una mejor calidad de vida en núcleos urbanos e industriales. Este éxodo rural, con el consecuente abandono de las prácticas agrícolas, y la industrialización ha provocado cambios en los regímenes históricos de incendios y en la frecuencia e intensidad de los estreses climáticos (Pausas y Fernández-Muñoz, 2011). Además, los modelos de calentamiento global predicen cambios en los patrones espaciales y temporales de precipitaciones para las próximas décadas, con veranos secos en latitudes medias (Solomon *et al.* 2007) e incluyendo cambios en la frecuencias e intensidad de eventos

de sequía y olas de calor (IPCC, 2007; Good *et al.* 2008), como ya se ha demostrado en algunos estudios recientes, en los cuales se observa incrementos en la frecuencia de estos eventos (Della-Marta *et al.* 2007; Alexandrian *et al.* 1999), que también provocará una mayor frecuencia de incendios forestales (Dale *et al.* 2001). Por lo tanto, se puede decir que el abandono rural, el cual implica el uso de las dehesas como zonas de pastoreo, y el cambio climático global son las 2 principales causas del aumento de eventos de incendios forestales.

Los incendios forestales constituyen un feed-back positivo para el cambio climático, ya que contribuyen al calentamiento global de dos formas: por un lado la alta emisión de CO₂ (gas de efecto invernadero) que se produce en un incendio, y por otro lado la eliminación del efecto sumidero de CO₂ que supone la existencia de los bosques y de las comunidades microbianas asociadas a éstos. Los efectos de los incendios de bosques incluyen la aceleración de los ciclos de nutrientes, la mortalidad de árboles, cambios en la dirección de la sucesión ecológica del ecosistema, inducción de la germinación de semillas, pérdida del banco de semillas del suelo, incremento de la heterogeneidad del paisaje, cambios en las capas superficie-suelo y raíz de la planta y tejidos reproductivos, y volatilización de los nutrientes del suelo (Whelan, 1995). Además, los incendios forestales no sólo afectan a la estructura y composición vegetal de los ecosistemas, sino que también alteran las características físico-químicas y biológicas del suelo. Algunas de estas alteraciones son cambios en la temperatura y textura del suelo y en la calidad de la materia orgánica, los cuales tienen una gran influencia en algunos procesos importantes del ecosistema, como son la tasa de descomposición y mineralización de nutrientes (Swift y Heal, 1979; Schmidt *et al.* 2004).

En el caso de nuestro país, la superficie afectada por incendios en España alcanza una media anual de 127.209 hectáreas en el periodo del 2000 al 2009, incluyendo en éstas las formaciones herbáceas, arbustivas y boscosas (<http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/defensa-contra-incendios-forestales/estadisticas-de-incendios-forestales/>). Dentro de estos incendios está el que ocurrió en el Espacio Protegido de Sierra Nevada en septiembre de 2005. Este incendio afectó a una extensión de 3.416,74 ha (Gomez-Zotano *et al.* 2005), con la presencia de encinas en 412 ha del total de la superficie quemada, claro ejemplo de todo el expuesto anteriormente. Para facilitar la recuperación de estas formaciones vegetales es importante entender los procesos que afectan a la recuperación del suelo y las comunidades microbianas asociadas a éste.

1.3 CAMBIO CLIMÁTICO EN ECOSISTEMAS DE MONTAÑA.

Hace casi 250 años que Linneo documentó la existencia de distintas comunidades de plantas y animales caracterizando la sucesión de zonas climáticas a lo largo de las laderas de las montañas. Estudios realizados sobre cómo algunos taxones y la composición de la comunidad responde a gradientes altitudinales han llevado a la búsqueda de patrones altitudinales generales de la diversidad (Brown, 2001; Lomolino, 2001; McCain, 2005). Estos patrones señalan que en las zonas montañosas existe una clara tendencia a una disminución de la diversidad al aumentar la altitud, siendo los puntos con mayor diversidad los ubicados en zonas medias o bajas. Esto ha sido demostrado para una gran variedad grupos taxonómicos, incluyendo árboles, mamíferos, aves, reptiles, insectos y anfibios. Esto se debe a que en las zonas bajas las condiciones microclimáticas son más variables, dando lugar a una mayor diversidad de nichos ecológicos. Por otro lado, la homogeneidad de las condiciones ambientales en zonas altas, junto a unas condiciones más extremas y la escasez de algunos nutrientes provocan una mayor competencia y una menor diversidad de especies vegetales.

Los ecosistemas de las zonas de montaña son muy sensibles y vulnerables al cambio climático (Schröter *et al.* 2005), y la existencia de marcados gradientes climáticos en estas zonas permite que sean sitios idóneos para el estudio de dichos gradientes en una escala espacial relativamente pequeña (Díaz *et al.* 2003), incluyendo el estudio de los impactos del clima sobre los ecosistemas. Uno de los efectos esperables del cambio climático es una migración ascendente de las zonas de vegetación (e.g. Dullinger *et al.* 2003), lo cual conllevará a una alteración significativa de las comunidades de plantas y la cantidad y calidad de los residuos vegetales, que a su vez puede afectar la estructura, composición y funcionamiento de las comunidades microbianas (Myers *et al.* 2001; Dullinger *et al.* 2003). Sin embargo, estos cambios hacia mayores altitudes no siempre resultan en una mayor riqueza de especies vegetales en la parte alta de la montaña (Pauli *et al.* 2012). Si el aumento de la aridez es el principal causante de la pérdida de especies observada en muchas cumbres de la región mediterránea, esta tendencia continuará durante décadas, porque los modelos de cambio climático predicen un aumento de las temperaturas, una disminución de la precipitación anual, y veranos más secos y largos en el sur de Europa (Christensen *et al.* 2007; Benito *et al.* 2008), como es el caso de Sierra Nevada, que constituye el sistema de alta montaña más meridional de Europa.

2. ESPACIO PROTEGIDO DE SIERRA NEVADA

La región mediterránea constituye una zona de transición entre el árido clima del Norte de África y el templado y lluvioso clima de Europa Central. En este ecotono, cada pequeña modificación puede conllevar cambios sustanciales en el clima, haciendo de las montañas mediterráneas una región potencialmente muy vulnerable al cambio climático (Lionello *et al.* 2006). Las predicciones climáticas para estas regiones son de mayores temperaturas, menos precipitación y mayor variabilidad interanual que en montañas europeas no mediterráneas (Giorgi y Lionello, 2008), lo cual conllevará grandes cambios en la vegetación de estas zonas. Estos cambios de vegetación ya se han observado en algunos trabajos, como por ejemplo el de Ruiz-Labourdette *et al.* (2013), donde concluyen que los cambios en las especies arbóreas de las zonas bajas de las montañas mediterráneas se deben principalmente a las limitaciones hídricas que se están dando en estos sitios.

Por lo tanto, de todas las regiones de Europa, la región mediterránea parece la más vulnerable a los cambios climáticos (Schröter *et al.* 2005), siendo las principales amenazas debidas al cambio climático global, como son la disminución de las precipitaciones, el incremento de las temperaturas y el aumento de la frecuencia de los incendios forestales. Estos factores influyen negativamente en los ecosistemas alterando tanto la composición como la riqueza de la comunidad de plantas (Schröter *et al.* 2005), disminuyendo la cantidad y calidad de los recursos del suelo (nutrientes y materia orgánica), afectando a la biomasa y la diversidad microbiana (Guénon *et al.* 2011), y disminuyendo la actividad de mineralización de las comunidades microbianas del suelo (Acea y Carballas, 1996; Sardans y Peñuelas, 2005; Sardans *et al.* 2008). Teniendo en cuenta esto y, como se ha indicado anteriormente, que los ecosistemas de las zonas de montaña son muy sensibles y vulnerables al cambio climático, resulta interesante centrar el estudio de los efectos del cambio climático en un ecosistema mediterráneo de alta montaña, siendo el Parque Nacional de Sierra Nevada el ejemplo más representativo de este tipo de ecosistemas, según el Catálogo de Parques Nacionales del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://reddeparquesnacionales.mma.es>). Además, hay que destacar que como Reserva de la Biosfera, Sierra Nevada ha sido incluida a nivel mundial entre las 28 reservas de la Biosfera de Montaña que participan en la Red Internacional de Investigación y Seguimiento del Cambio Climático, el proyecto Global Change in Mountain Regions (GLOCHAMORE). Además, en la segunda fase de este proyecto, Sierra Nevada sigue siendo una de las 10 reservas de la biosfera seleccionadas a nivel mundial como Observatorio de Cambio Global.

El Espacio Protegido de Sierra Nevada se localiza en el Sureste de la Península Ibérica, entre las provincias de Granada y Almería, ubicándose entre las coordenadas geográficas de 36° 55' a 37° 15' de

INTRODUCCIÓN

latitud norte, y de 2° 56' a 3° 38' de longitud oeste, aproximadamente. Está delimitado por el valle del río Lecrín al oeste, el valle del río Guadalfeo al sur, por la depresión Bética al norte, por el corredor del río Górgal al este y por el valle del río Andarax al sureste. En sentido Este-Oeste, tiene una longitud de casi 80 Km y anchura que oscila entre los 15 y 30 Km, con una superficie de 172.238 ha, de las cuales 85.883 constituyen el Parque Nacional de Sierra Nevada (<http://www.juntadeandalucia.es>). En el ámbito internacional, desde 1986 pertenece a la Red Mundial de Reservas de la Biosfera de la UNESCO, zonas ecológicas representativas que constituyen espacios de gran diversidad biológica, con características naturales de gran interés científico (<http://reddeparquesnacionales.mma.es>). Posteriormente fue declarado Parque Natural en 1989 debido a las singularidades de su flora, fauna, geomorfología y paisaje.

Sierra Nevada es un refugio excepcional para la biodiversidad debido a su estratégica localización biogeográfica, a su aislamiento, su rango altitudinal y la diversidad de nichos ecológicos que presenta, lo cual hace que se hayan catalogado 2.100 especies vegetales, de las que 66 son endémicas de la región. Dentro de este ecosistema particular, hay que hacer notar que la vertiente Norte de la montaña presenta laderas agrestes y cortadas debido a la mayor erosión, mientras que en la cara Sur son lomas más suaves, aunque igualmente de gran pendiente. Las condiciones que determinan la enorme diversidad climática en Sierra Nevada son su amplitud altitudinal, su latitud y la compleja topografía del terreno. La amplitud altitudinal determina el aumento de la insolación conforme se asciende y provoca oscilaciones térmicas de gran importancia que difieren a lo largo del gradiente altitudinal : por debajo de los 1.500 m de altitud la temperatura media anual oscila entre los 12 y 16 °C; desde los 1.500 m hasta los 2.000 m entre 8 y 12 °C; entre los 2.000 y 2.500 m oscila entre 4 y 8 °C; y a partir de los 3.000 m la temperatura media anual es menor de 0 °C. Su posición meridional y en la zona de influencia mediterránea provoca una relativa sequedad; en verano (de mayo a octubre) la pluviosidad es mínima, mientras que en invierno las precipitaciones son casi exclusivamente en forma de nieve a partir de los 2.000 m.

En los ecosistemas de tipo mediterráneo las comunidades vegetales están expuestas a unas condiciones climáticas que pueden considerarse como extremas ya que alternan periodos de heladas invernales y periodos de sequía y alta temperatura estival con lluvias torrenciales ocasionales. Además, las previsiones respecto al clima, por efecto del cambio climático, señalan subidas de temperaturas generales que afectarán especialmente a las máximas de los meses de verano, mientras que la evolución de las precipitaciones es más irregular aunque se prevé un descenso general (Felicísimo *et al.* 2011), lo cual acentúa aún más los estreses propios de los ecosistemas mediterráneos, dando lugar a una posible migración de bosques hacia zonas más elevadas y también un aumento de la frecuencia de incendios forestales.

2.1. GRADIENTES ALTITUDINALES EN SIERRA NEVADA.

En Sierra Nevada pueden observarse todos los pisos bioclimáticos definidos para la región mediterránea, y este trabajo se centra principalmente en las series climatófilas (Valle, 2003) que se detallan a continuación.

SERIE SUPRA-MESOMEDITERRÁNEA FILÁBRICA Y NEVADENSE MALACITANO-ALMIJARENSE Y ALPUJARREÑO-GADORENSE SILICÍCOLA DE LA ENCINA (*QUERCUS ILEX* SUBSP. *BALLOTA*):

Ocupa una franja altitudinal situada entre 1.400 y 2.000 m. En su estado maduro estaría constituida por un encinar (*Adenocarpus decorticans-Quercetum rotundifoliae* S.), más pobre en especies que el desarrollado sobre sustrato calizo, aunque dada la estructura abierta que presentan la práctica totalidad de los encinares silicícolas, conviven con formaciones de espinales (facies húmedas) y escobonales (*Cytisus scoparii-Adenocarpum decorticans*) (facies secas), así como con jarales (*Thymo gadorensis- Cistetum laurifolii*), lastonares (*Dactylis hispanicae-Festucetum scariosae*) y tomillares subnitrófilos (*Artemisia-Santolinetum rosmarinifoliae helichrysetosum serotini*). La faciación típica de esta serie aparece en el termotipo supramediterráneo con ombrotipo subhúmedo, pero con una fuerte xericidad estival que limita bastante la aparición de caducifolios. La serie en general se halla bastante alterada, aparecen solamente algunos encinares que normalmente están abiertos y poco estratificados. Los factores que han contribuido a estos son el sobrepastoreo, los incendios, la deforestación o prácticas forestales inapropiadas y la agricultura de montaña.

SERIE MESOMEDITERRÁNEA NEVADENSE Y MALACITANO-ALMIJARENSE SILICÍCOLA DEL ROBLE MELOJO (*QUERCUS PYRENAICA*):

Su mayor extensión se presenta en barrancos umbríos de Sierra Nevada (Dehesa del Camarate, Maitena, Genil, Monachil, Dílar y Dúrcal) y en distintas zonas de la Alpujarra granadina ocupando las lomas de menor insolación (Cáñar-Soportújar, Barranco del Poqueira, Pitres, Busquístar y Trévez). El rango altitudinal en el que aparecen va desde los 1.100 - 1.200 m hasta 1.800 – 1.900 m, constituyendo el límite altitudinal del bosque. La vegetación potencial es un bosque (*Adenocarpus decorticans – Quercetum pyrenaicae*) donde domina el roble melojo (*Q. pyrenaica*). En los claros de este bosque aparecen numerosos elementos caducifolios en las facies más húmedas, mientras que en las facies más secas aparecería un escobonal (*Cytisus scoparii-Adenocarpum decorticans*). Además de estas comunidades es posible encontrar jarales (*Thymo gadorensis- Cistetum laurifolii*) en lugares más

INTRODUCCIÓN

alterados (a veces conviviendo con bosque abierto); lastonares (*Dactylido hispanicae-Festucetum scariosae*) y tomillares nitrófilos (*Artemisio-Santolinetum rosmarinifoliae helichrysetosum serotinii*) en zonas de cultivos abandonados o sometidas a sobrepastoreo. Dentro de los factores que determinan la presencia de esta serie, el más importante es la reducción de la xericidad estival, por lo que se presenta en laderas con poca insolación, en fondos de barrancos con compensación edáfica. Este tipo de formaciones no están bien adaptadas a las tendencias macroclimáticas actuales, estando su supervivencia en peligro debido a diferentes factores, entre los cuales se encuentra el sobrepastoreo (son zonas que ofrecen pastos a principios de la época seca), la deforestación y los incendios.

Los bosques autóctonos del Espacio Natural de Sierra Nevada ocupan una superficie aproximada de 15.000 ha. Aunque esta superficie es menor que la que le correspondería de forma natural, debido a que de forma tradicional han sido talados para obtener madera o pastos. El cambio de uso de los suelos durante las últimas décadas ha favorecido la expansión de las áreas forestales y las áreas de matorrales, aunque la tendencia esperada para formaciones claves, como el robledal, es negativa debido a los efectos del cambio climático (Olivares *et al.* 2011). Los robledales de Sierra Nevada o melojares (*Q. pyrenaica* Willd.) se localizan en los pisos supra y mesomediterráneos asociados con *Adenocarpus decorticans* (rascaviejas), constituyendo la serie silícicola del roble melojo, pudiéndose dar también mezclada únicamente con encina (*Q. ilex* sp. ballota) o con retama (*Retama sphaerocarpa*) (Valle, 2003). Su ámbito altitudinal va desde los 1.100 hasta los 1.900 m. desarrollándose en suelos silíceos y condiciones climáticas particularmente favorables con un extra de humedad. En la vertiente Sur de Sierra Nevada, el robledal se extiende por las colinas y no siguiendo el curso de los ríos, gracias a la influencia del aire húmedo mediterráneo (Martínez-Parras y Molero-Mesa, 1982). El robledal se encuentra limitado en su parte superior por el piornal amarillo (*Genista versicolor*), formación vegetal típica a esta altitud.

El roble melojo está considerado como Especie de Interés Especial según la Ley 8/2003 de flora y fauna andaluza, por lo que es merecedor de una atención especial para su conservación. Sin embargo desde principios del siglo XX se ha documentado un declive de los robledales, que en la década de 1.980 se ha convertido en un problema global afectando a Europa, Asia y América (Mosca *et al.* 2007). Los factores responsables de este declive se pueden agrupar en 3 categorías: a) De predisposición, que actúan a largo plazo y debilitan al árbol (caracteres genéticos, cambios ambientales,...); b) Iniciadores, con acción intensa y que favorecen la aparición de síntomas (heladas, sequías,...); y c) Coadyuvantes, que actúan al final acentuando el proceso (parásitos como hongos e insectos).

SERIE OROMEDITERRÁNEA FILÁBRICO-NEVADENSE SILICÍCOLA DEL ENEBRO
RASTRERO (*JUNIPERUS COMMUNIS* SUBSP. *NANA*):

Aparece a partir de los 1.800-1.900 m de altitud, llegando hasta los 2.800 m. La comunidad climática es una formación enebral-piornal (*Genista baeticae* – *Juniperetum nanae* S.), con especies como: *Juniperus communis* subsp. *nana*, *J. communis* subsp. *hemisphaerica* y *J. sabina* var. *humilis* (este último elemento domina en los afloramientos de rocas ultrabásicas). Como representantes del piornal (formaciones de caméfitos almohadillados) destacamos *Genista versicolor* y *Cytisus galianoi*; esta comunidad ocupa los lugares con suelos más evolucionados (regosoles y cambisoles dísticos). Es posible observar como la proporción de especies cambia en las distintas facies del piornal: mientras que *C. galianoi* domina en zonas más húmedas y con suelos más evolucionados, *G. versicolor* lo hace en condiciones más xéricas y con suelos menos evolucionados.

Es importante destacar que, de las 66 plantas endémicas que existen en el Parque Natural de Sierra Nevada, el arbusto *Genista versicolor* Boiss. (anteriormente *G. baetica* Spach) destaca por su importancia en la formación de matorrales de alta montaña en sitios con condiciones de estrés hídrico y suelos poco evolucionados. Se trata de una leguminosa de la tribu Genisteeae que es capaz de crecer en suelos silíceos de entre 1.600 y 2.700 metros sobre el nivel del mar (López-González, 2006), por lo que esta leguminosa de alta montaña siempre aparece por encima de las formaciones forestales. *G. versicolor* es una planta espinosa muy ramificada y puede alcanzar 100 cm de altura, dando cobertura y protección a las semillas de árboles y plantas, por lo que facilita la aparición de formaciones arbóreas en altura. Esta leguminosa contribuye a la formación de suelo a altas altitudes enriqueciendo el suelo en nitrógeno, como ocurre con otras leguminosas, debido a su capacidad para formar simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno.

Para la plantación y desarrollo de robledales a mayores altitudes sería ventajoso el empleo de arbustos nodriza, que aumentan la supervivencia en condiciones limitantes (Castro *et al.* 2006), como ocurre en este caso. Siendo el piornal el ecosistema que limita con los robledales en la parte alta, resulta importante profundizar en el estudio de *G. versicolor*, la principal especie formadora de estos piornales. Los organismos que son capaces de formar nódulos en su raíz juegan un papel importante tanto en el desarrollo de la planta como en el enriquecimiento de estos suelos pobres en nutrientes característicos de las zonas altas. Se ha descrito que algunas especies del género *Genista* establecen simbiosis con el género *Bradyrhizobium* (Rodríguez-Echeverría *et al.* 2003; Zakhia *et al.* 2004; Kalita *et al.* 2010) y dentro de este género, las especies que actualmente se conocen como endosimbiontes de alguna especie de *Genista* pertenecen al grupo I del género *Bradyrhizobium* según la nomenclatura de Menna *et al.* (2009) y al simbiovar *genistearum* (Kalita *et al.* 2010). Sin embargo, actualmente existen pocos estudios acerca

INTRODUCCIÓN

de los endosimbiontes de *Genista* y algunas especies de este género nunca han sido estudiadas, como ocurre con el endemismo ibérico *G. versicolor*.

3. CICLO DEL NITRÓGENO.

El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para todos los organismos (Labauer y Treseder, 2008), siendo el mayor reservorio mundial de nitrógeno la atmósfera terrestre, donde se encuentra principalmente en forma de gas (N_2), seguido de los compuestos orgánicos, donde forman moléculas más complejas como son las proteínas y los lípidos. La deposición atmosférica de nitrógeno biológicamente disponible se ha incrementado en más de 10 veces en gran parte del hemisferio Norte en los últimos 150 años (de 0,5-1 a 15-20 kg N por hectárea y año) y se prevé un aumento de más del doble en el próximo siglo (Galloway *et al.* 2004). Esta enorme alteración del ciclo biogeoquímico del Nitrógeno se debe a la actividad humana, y más concretamente por la utilización del proceso de Haber-Bosch para la fabricación de amoníaco, fertilizantes y otros compuestos nitrogenados a partir del nitrógeno atmosférico, lo que hace que la alteración del ciclo del nitrógeno de los suelos alcance niveles hasta ahora desconocidos. Esta perturbación de origen antropogénico del ciclo global del nitrógeno (N) también es responsable de un cambio generalizado en la diversidad y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Galloway *et al.* 2008; Gruber y Galloway, 2008; Bobbink *et al.* 2010). Las respuestas a la elevada deposición de N incluyen la aceleración de procesos de los ciclos de nutrientes, cambios específicos de especie en la productividad de plantas y la pérdida asociada de la diversidad y acumulación de N (Vitousek, 1997; Carroll *et al.* 2003; Galloway *et al.* 2008; Skogen *et al.* 2011).

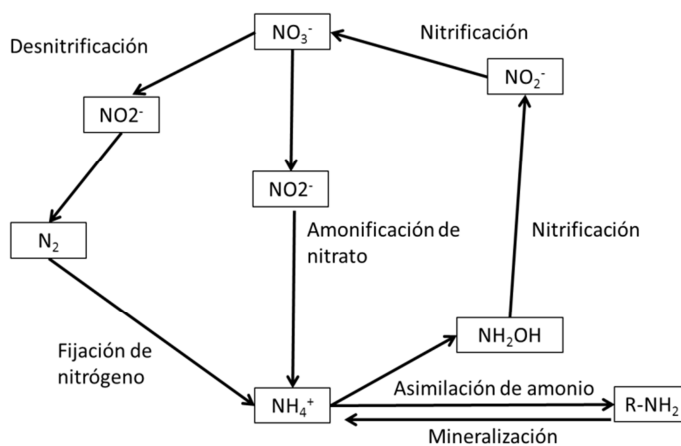


Figura I.1. Esquema general del ciclo del nitrógeno.

En el suelo el ciclo del N es impulsado por la materia orgánica que contiene aproximadamente un 50 % de carbono (C) y 5 % de N, del cual sólo el 5 % está en forma lábil (Jackson *et al.* 2008). Las plantas y los microorganismos compiten por el amonio (NH_4^+) y por los nitratos (NO_3^-) (Vitousek y Howarth, 1991), aunque se ha puesto de manifiesto, mediante la utilización de isótopos estables, que estos compuestos son utilizados por los microorganismos en los primeros días, para después de 1 mes o más pasar a las plantas (Harrison *et al.* 2007). Los principales procesos del ciclo del N que ocurren en el suelo son: fijación biológica, amonificación-nitrificación y desnitrificación, todos ellos llevados a cabo por diferentes y diversos grupos de microorganismos. La última etapa del proceso de desnitrificación está mediada por la enzima óxido nitroso reductasa, codificada por el gen *nosZ*, que transforma el N_2O en N_2 . Estos 2 gases vuelven a la atmósfera, pero mientras que el N molecular no tiene efectos negativos, el óxido nitroso (N_2O) tiene una capacidad de efecto invernadero 310 veces superior a la del CO_2 , contribuyendo a la destrucción del ozono. El gen *nosZ* es clave para conocer si el proceso ocurre de forma completa o si se producen interrupciones liberando óxido nítrico (NO) o nitrito (NO_2^-), por lo que no es práctico seguir la evolución de los genes *nar* (nitrato reductasa) o *nir* (nitrito reductasa) (Jackson *et al.* 2008). La amonificación consiste en obtener amonio (NH_4^+) a partir de la materia orgánica, y a partir de este compuesto obtener en última instancia nitrato (NO_3^-) mediante el proceso de nitrificación, siendo la etapa limitante en este proceso la oxidación del amonio (Kowalchuk y Stephen, 2001). Habitualmente este proceso se sigue mediante la monitorizando del gen *amoA*, presente tanto en bacterias (*ammonia-oxidizing bacteria*, AOB) como en arqueas (AOA), habiéndose descrito que las AOA son 3.000 veces más abundantes en los suelos que las AOB (Wessen *et al.* 2011). Además la abundancia y composición de las comunidades de AOB se ve alterada por la fertilización a largo plazo, que afecta raramente a las AOA (Shen *et al.* 2008). Por otra parte, la fijación biológica de Nitrógeno convierte el N_2 atmosférico en amonio en un proceso que sólo llevan a cabo algunos organismos procariotas, denominados diazotrofos. Este proceso, en el año 2000, supuso el 16 % de las 150 Tg de N incorporadas a los distintos ecosistemas (Schlesinger, 2009); aunque es mayoritario el aporte de N a través de la simbiosis con plantas leguminosas, no podemos olvidar que los microorganismos fijadores en vida libre pueden aportar de media 2-3 Kg de N por ha y año (Son, 2001). En todos los casos, la fijación del N_2 se realiza por la enzima nitrogenasa que está compuesta por 4 subunidades y tiene distintos cofactores (de Mo, V o Fe); el gen clave para la monitorización de esta enzima, y de este proceso, es *nifH* que codifica para una de sus subunidades.

La incorporación de N a los suelos no ocurre sólo por fijación biológica, la causa más importante es la fertilización de los sistemas agrícolas y recientemente la deposición del N presente en la atmósfera como consecuencia de las actividades industriales y urbanas (Jackson *et al.* 2008). Algunos autores consideran que la producción de cultivos y su fertilización es la principal causa, de origen humano, que contribuye a la alteración del ciclo de N (Ollivier *et al.* 2011). Por el contrario otros consideran que dada

INTRODUCCIÓN

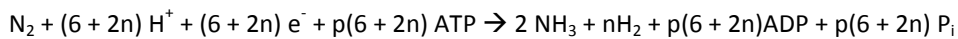
la tendencia de crecimiento de la población humana y el incremento del gasto energético, es muy probable que la entrada de N por deposición en los suelos y aguas duplique la tasa de recambio del ciclo de N tanto a nivel de ecosistemas terrestres como a nivel planetario (Gruber y Galloway, 2008). Según el Millenium Ecosystem Assessment de la ONU (<http://www.maweb.org>) el cambio global afectará profundamente al ciclo del N con una intensidad desconocida, por ejemplo un incremento de 3 °C en la temperatura del aire induce cambios en la comunidad de las AOB incrementando la nitrificación potencial (Ollivier *et al.* 2011), o que la mayor emisión de N₂O ocurre cuando se re-humedecen suelos secos, emisión que incrementa más cuanto más se humedecen (Ruser *et al.* 2006). Es claro que un mayor aporte de N a los ecosistemas permitirá que una gran parte se inmovilice en la biomasa microbiana y que otra parte sea tomada por las plantas permitiendo un mayor desarrollo de las formaciones vegetales, pero otra gran parte será perdida por lixiviación contaminando las aguas subterráneas o en forma gaseosa potenciando el cambio climático (Jackson *et al.* 2008; Ollivier *et al.* 2011).

Las interacciones entre la deposición de N y el aumento de la frecuencia de sequías estivales e incendios asociados son probables por varias razones. Los brezales secos de tierras bajas están dominados normalmente por pequeños arbustos de ericáceas y, debido a la gran cantidad de combustible presente, tienden a quemarse con facilidad y producir incendios con relativamente altas temperaturas (Tucker, 2003). La deposición de N ha sido asociada frecuentemente con el incremento de biomasa (Green, 2005; Carroll *et al.* 1999; Gordon *et al.* 1999) y la probabilidad, severidad, temperatura y duración de un incendio se puede incrementar bajo elevadas deposiciones de N como resultado de una mayor carga de combustible. Por lo tanto, los incendios forestales tienen la capacidad de eliminar una gran proporción del N acumulado en reservorios, retardando o incluso revertiendo el proceso de acumulación de nutrientes asociado a la carga de N (Green *et al.* 2013).

Además, el ciclo del C está ligado inevitablemente al del N, tanto en sus respectivas formas abióticas como en la biosfera, pudiéndose limitar cualquiera de los flujos de un ciclo a causa del otro. A largo plazo, el aumento de la actividad fotosintética debido a las altas concentraciones de CO₂ atmosférico sólo se podrá mantener si la fijación biológica de N₂ se incrementase.

3.1. LA ENZIMA NITROGENASA.

Como se ha indicado antes, la enzima nitrogenasa juega un papel clave en el ciclo del nitrógeno, ya que es la encargada de realizar la fijación del nitrógeno atmosférico. La enzima nitrogenasa consta típicamente de una ferroproteína (Fe-proteína) o nitrogenasa reductasa y de una molibdo-ferroproteína (MoFe-proteína) o nitrogenasa. Así está compuesta la llamada nitrogenasa convencional, pues existen algunas bacterias, como *Azotobacter vinelandii* y *Rhodobacter capsulatus* entre otras, con nitrogenasas alternativas en las que el molibdeno, si no existe en el medio, se sustituye por vanadio o hierro. La reacción estequiométrica general de la reacción que regula esta enzima es la siguiente:



En el modelo normalizado, la liberación de una molécula de dihidrógeno está acoplada a la reducción de una molécula de dinitrógeno con el consumo de dos moléculas de ATP por electrón transferido, esto es, $n = 1$ y $p = 2$. Pero esto no ocurre siempre así, y a altas concentraciones de N_2 se producen dos moléculas de amonio y una de H_2 . Con respecto al consumo de ATP, el proceso es menos eficiente, y en muchas condiciones p puede ser mayor de 2, aunque ocasionalmente puede ser igual a 1 si todo el hierro de la Fe-proteína está reducido.

El mecanismo básico de funcionamiento de la nitrogenasa implica 4 pasos:

1. La formación de un complejo entre la Fe-proteína reducida unida a dos moléculas de ATP y la MoFe-proteína
2. La transferencia de electrones entre las dos proteínas acoplada a la hidrólisis de ATP
3. La disociación de la Fe-proteína acompañada por reducción e intercambio de ATP por ADP
4. La repetición de este ciclo hasta que se haya acumulado suficiente número de electrones y protones para que los sustratos puedan ser reducidos

La Fe-proteína, codificada por el gen *nifH*, es un homodímero y la única que puede reducir la MoFe-proteína, que es la que actuará directamente sobre el sustrato. La reducción de la MoFe-proteína ocurre durante el acoplamiento transitorio de la Fe-proteína con MgATP. En estas condiciones se une a la MoFe-proteína, transfiere los electrones y una vez oxidada con el MgADP acoplado se disocia el complejo para de nuevo ser intercambiado el MgADP por MgATP y comenzar el proceso otra vez. El núcleo activo de la Fe-proteína es el grupo (4Fe-4S), que se une a la proteína por algunos de sus aminoácidos, como son las cisteínas 97 y 132 en el caso concreto de *A. vinelandii*.

INTRODUCCIÓN

La MoFe-proteína, codificada por los genes *nifDK*, es un tetradímero $\alpha_2 \beta_2$ ($\alpha_2 \beta_2 \delta_2$ en la alternativa). Contiene dos grupos activos, el cofactor homocitrato-hierro-molibdeno (FeMoco) (7Fe-9S-Mo-X-homocitrato) y el grupo (8Fe-7S) o grupo P. El FeMoco está unido a la proteína a través de una cisteína por el hierro y una histidina por el molibdeno que también se une al homocitrato a través de su grupo hidroxilo y un carboxilo. X parece ser N, C u O, según estudios recientes.

Además, el gen que codifica la enzima nitrogenasa (*nifH*) es un gen muy conservado filogenéticamente, por lo que se puede emplear para determinar grupos filogenéticos a partir de su secuencia, como se muestra en el trabajo realizado por Zehr *et al.* (2003). En dicho trabajo al comparar la filogenia de *nifH* y la filogenia del gen 16S *rRNA* se observaron muy pocas evidencias de transferencia horizontal del gen *nifH*, por lo que se confirma que su uso para realizar clasificaciones taxonómicas es apropiado.

4. LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO Y EL CAMBIO CLIMÁTICO.

Como se ha indicado antes, la elevada tasa de calentamiento global, debida principalmente a la concentración de gases de efecto invernadero, conlleva un gran problema o dilema a nivel biológico: ¿serán los organismos vivos capaces de adaptarse a tales cambios en un corto periodo de tiempo? Dentro de este aspecto, se sabe que los procesos microbiológicos han tenido y tienen una gran influencia en la regulación del clima del planeta, ya que, por ejemplo, las primeras moléculas de oxígeno fueron producidas por cianobacterias marinas hace unos 3,5 billones de años (Schopf y Parker, 1987) y dieron lugar a una atmósfera rica en oxígeno que permitió la evolución de la vida que actualmente existe en el planeta Tierra. El principal efecto de los microorganismos en la regulación del clima planetario se debe a que juegan un papel importante en la determinación de la concentración atmosférica de los gases de efecto invernadero, como el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O). Las respuestas de retroalimentación de los microorganismos al cambio climático en términos de flujo de gases de efecto invernadero pueden ser de amplificación (retroalimentación positiva) o reducción (retroalimentación negativa) de la velocidad del cambio climático, y teniendo en cuenta la situación actual de calentamiento global, debido fundamentalmente a la emisión de gases de efecto invernadero por efecto directo o indirecto de la actividad humana, es importante mejorar y ampliar nuestro conocimiento acerca de los procesos microbiológicos (Schimel y Gullledge, 1998; Allison *et al.* 2010).

Por ejemplo, trabajos realizados en suelo de quercíneas arbustivas (*Quercus myrtifolia* Willd. *Q. chapmanii* Sargent, y *Q. geminata* Small) concluyen que una mayor cantidad de CO₂ produce una alteración en las comunidades microbianas que se traduce en un incremento en la utilización de la materia orgánica del suelo y la pérdida de una cantidad de carbono de un 52 % aproximadamente del extra asimilado por las plantas (Carney *et al.* 2007), por lo que un teórico sumidero de carbono se convierte en una fuente. En esta misma comunidad vegetal de quercíneas, se ha observado que niveles elevados de CO₂ hacen que las plantas leguminosas asociadas tengan un mayor número de nódulos, un mayor crecimiento de la parte aérea y un mayor contenido en nitrógeno, pero sin afectar al contenido en nitrógeno de la biomasa microbiana del suelo (Hungate *et al.* 1999).

La biodiversidad juega un papel esencial en el mantenimiento de la resiliencia de los ecosistemas ante el cambio climático, siendo de vital importancia la diversidad funcional (diversidad y número de individuos de los distintos grupos funcionales), constituyendo los microorganismos una parte esencial de esta resiliencia, debido principalmente a que conforman la mayor biodiversidad del planeta (Gans *et al.* 2005; Rusch *et al.* 2007). Las bacterias forman el grupo de microorganismos más abundante de la biosfera, y tienen un papel fundamental en el ciclo de nutrientes y en el funcionamiento del ecosistema (Van der Heijden *et al.* 2008; Strickland *et al.* 2009), posiblemente por ser capaces de crecer rápidamente y porque pueden utilizar como fuentes de carbono y de nitrógeno una gran variedad de compuestos. Además, el suelo es considerado el hábitat microbiano más diverso de la Tierra y el que mayor abundancia de bacterias posee, siendo uno de los ecosistemas terrestres que presenta mayor biodiversidad (Anderson, 1975; Giller, 1996). Se ha calculado que el número de genomas de bacterias va de 2.000 a 18.000 por gramo de suelo (Daniel, 2005), con una estimación de entre 10³ y 10⁶ especies diferentes presentes por gramo de suelo y con un total de hasta 10⁹ individuos (Gans *et al.* 2005).

Como se ha indicado antes, los microorganismos del suelo juegan un papel clave en los ciclos biogeoquímicos, como los del carbono y del nitrógeno (Lucas *et al.* 2007; Liang *et al.* 2011), en el funcionamiento de los ecosistemas naturales (Stroud *et al.* 2007) e incluso en el cambio climático global (Singh *et al.* 2010). Existen numerosos estudios que demuestran que las comunidades microbianas están influidas por algunos factores bióticos y abióticos, como el tipo de vegetación (Bach *et al.* 2010; Hackl *et al.* 2005; Weand *et al.* 2010; Liang *et al.* 2012), la temperatura (Pettersson y Bååth, 2003), el contenido hídrico (Brockett *et al.* 2012), el pH (Bååth y Anderson, 2003; Rousk *et al.* 2010), el tipo de suelo (Bossio *et al.* 1998) y la profundidad del suelo (Fierer *et al.* 2003). Además, los microorganismos juegan un papel crucial en la defensa de enfermedades y en la promoción del crecimiento de las plantas, así como en los cambios en la vegetación (Doran *et al.* 1996; Garbeva *et al.* 2004). Las características microbianas del suelo pueden indicar cambios en la disponibilidad de recursos, la estructura del suelo o la contaminación y pueden representar una clave importante para entender el impacto de factores

INTRODUCCIÓN

ambientales y antropogénicos (DeLong y Pace, 2001; Tiedje *et al.* 1999; Pankhurst *et al.* 1996). La diversidad de los microorganismos del suelo puede representar la capacidad de un suelo para afrontar las perturbaciones (Bardgett, 2002; Johnsen *et al.* 2001). La alta densidad y diversidad que caracterizan a la microbiota del suelo, hacen que se adapte rápidamente a cambios en las condiciones ambientales por medio de ajustes en i) las tasas de actividad, ii) biomasa y iii) estructura de la comunidad, tres parámetros a tener en consideración para evaluar la calidad de un suelo (Schloter *et al.* 2003).

Actualmente hay controversia sobre cómo utilizar los microorganismos en la mitigación de los efectos del cambio climático, como influir en la emisión o absorción de gases con efecto invernadero (Singh *et al.* 2010). Aunque diferentes autores han puesto de manifiesto que los suelos dominados por microorganismos oligotrofos tienen un recambio (“turn-over”) de carbono bajo, por lo que emiten menos CO₂ aumentando el secuestro de C (Cleveland *et al.* 2007, Fierer *et al.* 2007a). Además el manejo de los suelos favoreciendo el desarrollo de bosques, o la práctica de una agricultura con bajos aportes de fertilizantes favorece el desarrollo de comunidades de microorganismos oligotrofos (Singh *et al.* 2010) siendo esta una vía para favorecer la mitigación. Por otra parte, en ciertos casos se ha descrito que un cierto aporte de N puede incrementar el almacenamiento de C en el suelo (Craine *et al.* 2007), y este aporte puede ser vía fijación biológica mediante la utilización de plantas leguminosas. Por tanto intentar favorecer el aumento de los microorganismos oligotrofos de los suelos, que a la vez tenga actividades PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), puede ser una estrategia válida para favorecer la gestión adaptativa de los bosques y la lucha contra el cambio climático.

4.1. GRADIENTE ALTITUDINAL.

Sin embargo, las variaciones de la composición de las comunidades microbianas del suelo y su actividad a lo largo de gradientes altitudinales/climáticos y gradientes de vegetación asociada todavía no han sido suficientemente documentadas. La biota del suelo es un importante factor regulador de la composición y dinámica de las comunidades de plantas (Klironomos, 2002); ya que pueden afectar a la sucesión ecológica de plantas (Van der Putten *et al.* 1993), a la distribución de especies y a los procesos de invasión (Mitchell y Power, 2003).

Existen factores abióticos, como la disponibilidad de nutrientes y el pH del suelo, que han sido identificados como determinantes en la riqueza y la composición de las comunidades microbianas (Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.* 2008). Por ejemplo, según los trabajos de Fierer y Jackson 2006 y Fierer *et al.* 2011, las acidobacterias están inversamente correlacionadas con el pH del suelo mientras que las proteobacterias tienen una correlación positiva con el pH del suelo. El problema es que ambos grupos taxonómicos engloban a un conjunto de bacterias muy numeroso y con gran diversidad

funcional. Es por lo tanto importante abordar este tipos de estudios desde un punto de vista funcional, pudiéndose abordar este planteamiento de una forma indirecta, mediante el empleo de amplicones del gen 16S *rRNA* y conociendo las características funcionales de los diferentes grupos taxonómicos que se obtengan, o de forma directa, mediante el empleo de amplicones de genes clave para determinados procesos fundamentales del ciclo biogeoquímico de los nutrientes. El cambio de los factores abióticos a lo largo del gradiente altitudinal conlleva cambios en la composición de las comunidades microbianas, como ha sido demostrado con anterioridad (Bryant *et al.* 2008; Fierer *et al.* 2011; Singh *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012a) y la composición de plantas afecta también a la composición de las comunidades microbianas (Kowalchuck *et al.* 2002), siendo la cobertura de plantas un factor importante en la distribución espacial de los microorganismos del suelo (Eskelinen *et al.* 2009; Zinger *et al.* 2011).

La aparición de nuevas tecnologías moleculares, y sobre todo el desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento han permitido ampliar los escasos conocimientos que se tenían sobre las diferencias en las comunidades microbianas a lo largo de un gradiente altitudinal, así como esclarecer qué factores son los que determinan la estructura y composición de estas comunidades. Antes de la aparición de estas tecnologías, los estudios centrados en los gradientes altitudinales de las comunidades microbianas son escasos, y en muchos casos se centran en determinados taxones, como las acidobacterias en el caso de Bryant *et al.* 2008, o incluso géneros, como ocurre en el trabajo de Risal *et al.* 2010, que se centra en la obtención de cepas de *Bradyrhizobium* empleando soja (*Glycine max*) como planta trampa e inoculando semillas con suelos obtenidos en diferentes alturas. También ocurre que en algunos de estos trabajos se tienen en cuenta diversos factores o variables que hacen más complejo el estudio y más complicado aislar los efectos debidos al gradiente altitudinal.

La importancia del estudio del gradiente altitudinal del roble melojo (*Quercus pyrenaica*) se debe a que éste no se encuentra en un ambiente óptimo para su desarrollo en las zonas bajas de las laderas dentro del Parque Natural de Sierra Nevada. En el trabajo realizado por Leal-García 2013 se determina que viabilidad de la zona baja del robledal de Cáñar se ve muy comprometida debido a los efectos del cambio climático, y las previsiones del IPCC (Panel Intergubernamental para el Cambio Climático de las Naciones Unidas) de menor precipitación y mayor temperatura para la zona mediterránea implicaría que los robledales podrían tener, en un futuro próximo, unas condiciones climáticas óptimas a una mayor altitud. Por tanto la gestión adaptativa de estos árboles, además de incluir la recuperación de las zonas que le son propias, puede extenderse a zonas de mayor altitud que la de su ámbito típico (1.900 m). Es por ello que en el presente trabajo se ha optado por estudiar las comunidades diazotróficas y los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno a lo largo de un gradiente altitudinal que va desde un robledal que está siendo invadido por encinas en la parte baja de éste a un piornal en el cual han aparecido pies aislados o pequeños grupos de robles.

INTRODUCCIÓN

Además, el inconveniente que puede generarse al ascender a mayores cotas se puede deber al escaso desarrollo de los suelos de dichas zonas, por lo que también resulta conveniente profundizar en el conocimiento de la biología de aquellas plantas que son capaces de mejorar la calidad del suelo de las cotas donde todavía no hay establecido un robledal. Es por ello que también se ha realizado un estudio de las bacterias noduladoras de *Genista versicolor*, que es la especie que forma los piornales por encima de los robledales de Sierra Nevada.

4.2. INCENDIOS FORESTALES.

Las altas temperaturas alcanzadas en un incendio cambian inmediatamente las propiedades físico-químicas del suelo, y la intensidad de estos cambios va a depender de la severidad del incendio y del tipo de suelo (Choromanska y DeLuca, 2002; Certini, 2005). Estos cambios junto a las condiciones ambientales tras el incendio van a determinar los cambios en las características biológicas del suelo (Certini, 2005; Mataix-Solera *et al.* 2009). La alteración biológica más obvia es la disminución de la biomasa microbiana (Hernández *et al.* 1997; Choromanska y DeLuca, 2002; De Marco *et al.* 2005) y de la actividad microbiana (Bååth *et al.* 1995; Prieto-Fernandez *et al.* 1998; Certini, 2005; Wang *et al.* 2012b), lo cual conduce a una alteración de la estructura fisiológica (Acea y Carballas, 1999; Campbell *et al.* 2008) y taxonómica (Yeager *et al.* 2005; Hamman *et al.* 2007; Jiménez-Esquillín *et al.* 2008; Smith *et al.* 2008; Bárcenas-Moreno *et al.* 2011) de los microorganismos del suelo. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que el *phylum* Acidobacteria y las bacterias formadoras de esporas son favorecidas por el proceso de esterilización y las condiciones del suelo después de un incendio (Yeager *et al.* 2005; Bárcenas-Moreno *et al.* 2011).

El nitrógeno disponible, junto al agua, es el nutriente limitante más común en ecosistemas naturales y agrícolas (Allen *et al.* 2002; Yeager *et al.* 2005). Después de un incendio hay una ganancia neta de nitrógeno disuelto, pero también se incrementa la posibilidad de perder este nitrógeno del ecosistema debido a lixiviados y a la disminución de la actividad microbiana (Certini, 2005; Wang *et al.* 2012). Siguiendo esta idea, Wang *et al.* (2012) concluyeron que en las zonas mediterráneas hay una respuesta positiva a los incendios por parte de los niveles de carbono orgánico y de nitrógeno total, pero negativa en los niveles de mineralización del nitrógeno. Las bacterias del suelo son componentes esenciales para el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, pero han sido muy poco estudiadas en ambientes post-incendio (Goodale y Aber, 2001). El incendio influye en los reservorios de nitrógeno en el suelo (Neary *et al.* 1999; Grogan *et al.* 2000; Wan *et al.* 2001) y en la composición de las comunidades bacterianas asociadas al ciclo del nitrógeno (Walley *et al.* 1996; Shaffer *et al.* 2000; Reich *et al.* 2001). Por otra parte, la incorporación neta de nitrógeno en el ecosistema es posible sólo a través de la fijación

del nitrógeno molecular realizada por organismos diazotróficos. Esta reacción es realizada por la enzima nitrogenasa que está compuesta, como hemos expuesto anteriormente, por dos subunidades multiprotéicas, la proteína MoFe y la proteína Fe. Esta última subunidad, la nitrogenasa reductasa, está codificada por el gen *nifH*, y tanto el alto nivel de conservación de este gen como su presencia en todas las bacterias diazotróficas hace de este gen un marcador molecular ideal (Zehr *et al.* 2003). El análisis molecular de este gen fue usado por Yeager y colaboradores (2005) para estudiar las bacterias fijadoras de nitrógeno después de un incendio forestal. Ellos demostraron que aunque hay un descenso en la biomasa microbiana total, incluyendo las bacterias asociadas al ciclo de nitrógeno, la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno se vuelve más diversa en un mes después del incendio. Por otro lado, otros autores han concluido que la riqueza relativa y la diversidad de estas comunidades decrecen 16 meses después de diferentes tipos de incendios (Kennedy y Egger, 2010). Otros genes con un papel clave en el ciclo del nitrógeno han sido usados como marcadores para diferentes etapas, como el gen *nosZ* para el estudio de la desnitrificación o el gen *amoA* para la oxidación del amonio. En este último caso la proporción de especies de bacterias oxidadoras del amonio fue menor en suelos quemados de un bosque mixto de coníferas 14 meses después del incendio ((Yeager *et al.* 2005) y estas diferencias son encontradas también una década después de un incendio forestal en una selva tropical (Isobe *et al.* 2009). No obstante, la riqueza relativa y la equidad de microorganismos desnitrificadores aumentó en un bosque de coníferas 16 meses después de un incendio (Kennedy y Egger, 2010).

En el caso del incendio ocurrido en Sierra Nevada en septiembre de 2005, objeto de estudio del presente trabajo, se estudiaron las comunidades diazotróficas de los suelos muestreados mediante el estudio de la diversidad del gen *nifH*, comprobada mediante librerías de clones, para conocer qué géneros son los responsables de la fijación de N a lo largo de la recuperación del ecosistema, en un periodo de tiempo de 6 años. También se realizó un análisis metagenómico de las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, a partir de sendas secuenciaciones masivas directas del DNA total del suelo tanto por tecnología de pirosecuenciación 454 como por tecnología Illumina, utilizando muestras extraídas 3 años después del incendio.

5. METAGENOMICA.

Los métodos tradicionales de estudio de microorganismos nos limitan a los que pueden ser cultivados en el laboratorio, pero la obtención de ADN del suelo ha permitido el análisis de comunidades microbianas mediante la determinación de las secuencias ribosomales 16S y 23S *rRNA* (Kirk *et al.* 2004). Por técnicas de biología molecular se ha demostrado que el número de microorganismos no cultivables presentes en distintos ambientes naturales, puede llegar a ser hasta el 99% del total (Gans *et al.* 2005). Por lo tanto, el que un microorganismo pueda ser cultivado es más una excepción que la regla. Por otra parte, Handelsman y colaboradores (1998) crearon el término “metagenoma” para definir el conjunto de los genomas de todos los organismos presentes en un determinado hábitat. El desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva (NGS) están permitiendo secuenciar directamente el ADN ambiental extraído del suelo, es decir sin necesidad de clonarlo en ningún tipo de vector. Al realizar la secuenciación de forma directa se evitan los sesgos motivados por el propio proceso de clonación y obtenemos una visión más realista de los procesos que ocurren en el suelo.

El análisis metagenómico proporciona un método para evaluar las bases para posibles rutas metabólicas de estos ambientes, representando una única instantánea, donde el DNA presente en el ambiente puede ser secuenciado para proporcionar una visión más amplia de la comunidad microbiana en cuanto a taxonomía y funcionamiento potencial (Steele y Streit, 2005; Hugenholtz y Tyson, 2008). Desde la aparición de estas nuevas tecnologías de secuenciación masiva se han realizado numerosos análisis metagenómicos a partir de DNA ambiental para detectar propiedades ecológicas microbianas (Edwards *et al.* 2006; Biddle *et al.* 2008) y para revelar comunidades microbianas en diversos ambientes, como aguas marinas (Gilbert *et al.* 2008), suelo (Urich *et al.* 2008), intestino humano (Qin *et al.* 2010) y cavidades orales (Lazarevic *et al.* 2009), entre otros muchos. Por ejemplo, en el trabajo de Penton *et al.* (2013) en muestras de rizosfera y de suelos de praderas, se secuencian amplicones de los genes *nirS* y *nirK* implicados en el proceso de desnitrificación, y del gen *nifH*, que actúa en el proceso de la fijación de nitrógeno. Estos 3 genes pueden ser empleados para realizar análisis de riqueza y diversidad, así como para realizar una adscripción taxonómica de las secuencias obtenidas, siendo muy útiles para hacer comparaciones entre muestras. El problema que plantea este acercamiento es que los resultados obtenidos vienen condicionados por la base de datos empleada, pudiéndose originar sesgos a favor de los grupos taxonómicos más ampliamente estudiados y en contra de los menos estudiados o abundantes en los ecosistemas, pero este problema es inherente a cualquier estudio de tipo en el que se haga uso de bases de datos.

Otro tipo de acercamiento metagenómico es la secuenciación directa del DNA ambiental, sin paso previo de PCR ni selección de un determinado gen. La ventaja principal de esta metodología es que se evitan los sesgos debidos a la PCR, aunque tiene el inconveniente de generar gran cantidad de secuencias de escaso valor informativo. Un ejemplo del empleo de esta metodología lo encontramos en Andreote *et al.* (2012), donde se estudian los sedimentos de manglares, encontrando dentro del metabolismo del nitrógeno, secuencias relacionadas con la reducción disimilatoria del nitrato, con la inmovilización del nitrógeno y con la desnitrificación. En este trabajo también se pudo determinar que *Burkholderiaceae*, *Planctomycetaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Desulfobacteraceae* son los organismos más importantes en el metabolismo del nitrógeno, el metano y el azufre en estos ecosistemas lacustres.

En el ámbito de suelos forestales cabe destacar el trabajo de Uroz *et al.* (2010), que se centra en la valoración de las comunidades microbianas de bosques de robles (*Quercus sessiliflora* Smith) mediante el empleo de amplicones del gen 16S *rRNA*, y encuentran que la diversidad de bacterias es menor en la rizosfera que en el suelo del bosque no asociado a la rizosfera, esto significa que los árboles seleccionan de alguna manera qué microorganismos proliferan bajo su influencia. En este trabajo también se observa un gran aumento en la cantidad de β -Proteobacteria y γ -Proteobacteria en la rizosfera de roble, con los *phyla* Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria como los más abundantes en ambas muestras.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

Las bacterias son indicadores tempranos de cambios en el ambiente debido a su papel en los distintos ciclos biogeoquímicos de los elementos y a su sensibilidad a las alteraciones del ambiente. Así son esenciales para el cierre de los ciclos del Carbono y del Nitrógeno en el suelo, al tiempo que también resultan fundamentales para favorecer la incorporación de estos elementos a las plantas. Su papel es todavía más importante en el ciclo del N ya que los microorganismos son los únicos seres vivos del planeta con capacidad para fijar el nitrógeno molecular atmosférico en forma de amonio. Esto hace, que junto con el agua, el nitrógeno sea el nutriente limitante más común para el desarrollo de las plantas. Por otra parte, en los próximos años las formaciones vegetales de la región mediterránea se verán sometidas a unas variaciones climáticas que incluyen aumento de temperatura y disminución de la precipitación, según el IPCC. Estos cambios además favorecerán siniestros, como son los incendios forestales, que dificultarán todavía más su supervivencia. Por tanto el objetivo principal del presente trabajo es **analizar el papel de las bacterias como posibles bioindicadores de los cambios ambientales que sufren las formaciones boscosas autóctonas del Parque Nacional de Sierra Nevada**. La elección de esta zona se debe a que representa el ecosistema de alta montaña mediterránea más meridional de Europa, estando en un equilibrio muy frágil lo que lo hace especialmente sensible a los cambios ambientales. Como elemento vegetal se han elegido el roble melojo (*Quercus pyrenaica* Willd.) ya que está en su límite meridional y casi es un relictos, y la encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*) ya que podría ocupar los espacios perdidos por el robledal. Con este bagaje, los objetivos parciales que nos propusimos son:

1. Estudio de la diversidad de fijación de Nitrógeno en la rizosfera de un robledal en gradiente altitudinal, en la comparación robledal *versus* encinar, y en un encinar 3 y 6 años después de un incendio forestal.
2. Análisis del potencial genético del ciclo del Nitrógeno en la rizosfera de un robledal en gradiente altitudinal, en la comparación robledal *versus* encinar y en un encinar tras un incendio forestal.
3. Análisis de las bacterias formadoras de nódulos fijadores de Nitrógeno en las raíces de *Genista versicolor* Boiss., piornal amarillo, formación vegetal responsable de la formación de suelo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1. ÁREA DE ESTUDIO.

El área de estudio se localiza en el Parque Nacional de Sierra Nevada, al sureste de España, en la provincia de Granada, en el cual se han seleccionado 3 zonas de estudio. La primera de estas zonas se ubica en el valle del río Lanjarón, en la cara sur de Sierra Nevada. Esta zona se eligió porque sufrió un incendio en septiembre de 2005 que afectó a 3.416,74 hectáreas (Gómez-Zotano *et al.*, 2005), de las cuales 411,91 ha contenían encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) en su composición. Dentro de esta zona tenemos 3 sitios de muestreo, dos de ellas en la extensión afectada por el incendio, una con pies de encinas que rebrotaron después del incendio (LJQ) y otro sitio en un terreno sin encinas donde después del incendio crecieron gran cantidad de leguminosas y germinaron algunas encinas a partir de bellotas (LJR para suelo sin encinas y LJRE para suelos rizosféricos de encinas); y el tercer sitio está en un encinar que no fue afectado por el incendio (LJN), situado ligeramente al norte de la extensión que sí fue afectada.

La segunda zona de estudio se ubica en la ladera del término municipal de Cáñar, también en la cara sur de la sierra, donde existe diferentes estadíos de un bosque de roble melojo o rebollo (*Quercus pyrenaica* Willd.). Dentro de esta zona tenemos 4 sitios de muestreo, siguiendo un gradiente de altitud. En el sitio más bajo (CNB) el robledal está siendo invadido por encinas, por lo que se considera un ecotono del bosque de robles que a la larga pasará a ser reemplazando por un encinar. El siguiente sitio, ascendiendo por el gradiente altitudinal, se ubica en la parte del bosque de robles que está bien desarrollado y que no presenta invasión de encinas (CNA). Después de este sitio aparece una franja donde existen robles aislados o formando pequeños grupos, pero sin formar un bosque (CNX). Por último, a igual altitud está el sitio donde no aparecen robles, un piornal dominado por *Genista versicolor* en el cual se pretende repoblar con diferentes especies arbóreas, entre ellas el roble (CNR).

La tercera y última zona de estudio se encuentra en la Dehesa del Camarate, ubicada en la cara norte de Sierra Nevada, donde se tomaron muestras de dos sitios diferentes, una formada por un encinar (CTE) y otra por pies sueltos de robles (CTR).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla MM-1. Características y georreferencias de los puntos de muestreo. La altitud se mide en metros sobre el nivel del mar (msnm).

Zona	Sitio	Localización	Altitud	Descripción del sitio	Orientación de la ladera
Valle del río Lanjarón	LJN	N 36°58'11", W 3°27'37"	1790 msnm	Encinar no quemado	Sur
	LJQ	N 36°57'26", W 3°27'48"	1566 msnm	Encinar quemado, rebrote de encinas.	
	LJR	N 36°57'40", W 3°27'42"	1610 msnm	Matorral y herbáceas quemadas	
	LJRE			Matorral y herbáceas quemadas, germinación de nuevas encinas	
Ladera de Cáñar	CNB	N 36°56'58", W 3°25'03"	1482 msnm	Robledal invadido por encinas	Sur
	CNA	N 36°57'44", W 3°25'09"	1823 msnm	Robledal sin invasión de encinas	
	CNX	N 36°57'56", W 3°25'45"	1945 msnm	Robles aislados, no forman bosque	
	CNR	N 36°57'38", W 3°26'15"	1938 msnm	Suelo no asociado a quercíneas, ubicado en un piornal	
Dehesa del Camarate	CTE	N 37°11'32", W 3°15'11"	1520 msnm	Encinar no quemado	Norte
	CTR	N 37°10'53", W 3°15'39"	1717 msnm	Robledal	

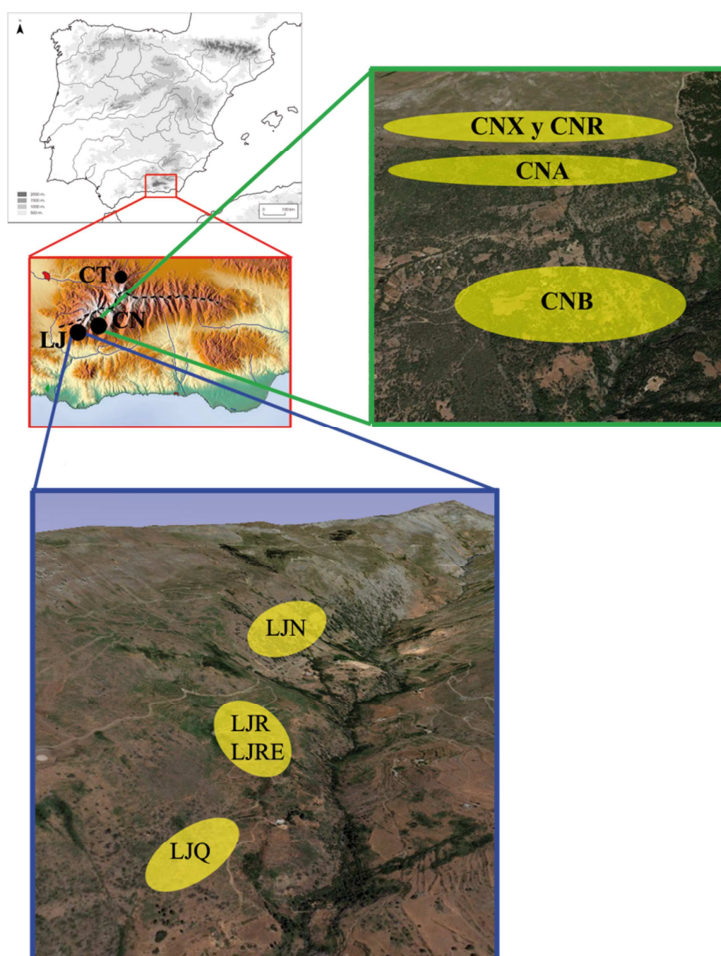


Figura MM-1. Detalle de la localización de las zonas de muestreo.

Las características físico-químicas de los suelos muestreados se determinaron, a partir de 2 kg de suelo de cada sitio de muestreo, en el Laboratorio Agroalimentario de Atarfe, Granada, perteneciente a la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, donde se analizaron diferentes características del suelo siguiendo métodos usuales.

2. TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE DNA.

A. TOMA DE MUESTRAS.

Para el muestreo se seleccionaron 3 parcelas para cada uno de los sitios de estudio. Estas parcelas fueron escogidas al azar, respetando la línea altitudinal y tomando como referencia el primer transecto realizado, el cual tiene una longitud de 1,5 km aproximadamente. De cada parcela fueron muestreados 3 árboles, con tamaño y estructura de árbol maduro y con al menos 5 metros de separación entre ellos, excepto en LJR y CNR, donde las muestras fueron tomadas en suelo no asociado a la rizosfera de quercíneas. La toma de muestras fue realizada en cada parcela de Lanjarón y Cáñar el 26 de abril de 2008 y el 29 de abril de 2011, mientras que en la Dehesa del Camarate (Lugros), en la cara Norte de Sierra Nevada, las muestras se tomaron una semana después.

Los puntos de muestreo fueron marcados con estacas de madera o marcando el árbol muestreado, además todas las localizaciones fueron registradas con GPS (Global Positioning System). Un área de suelo a no más de 50 cm del tronco del árbol (excepto en LJR y CNR, donde no hay árboles) fue seleccionada para cada punto de muestreo. De aquí se cogieron 500 g de suelo a una profundidad de entre 5 y 25 cm, después de retirar los primeros 5 cm de suelo y hojarasca siguiendo una raíz principal del árbol hasta donde se apreciaron raíces laterales jóvenes no suberificadas. El suelo recogido fue almacenado inmediatamente a 4° C, para su posterior procesamiento (Fig. MM-2),

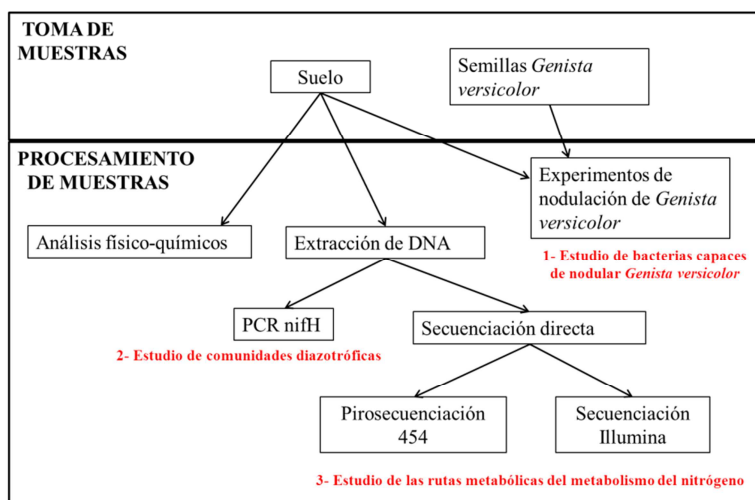


Figura MM-2. Esquema general del procesamiento de muestras.

B. EXTRACCIÓN DE DNA DE SUELOS.

La extracción de DNA total de cada suelo se realizó, tras pasarlo por un tamiz de 2 mm, mediante un método directo, usando el “PowerSoil DNA Isolation Kit” de la casa comercial MO BIO, antes de 24 horas desde la toma de muestras, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Adicionar 0,25 g de muestra de suelo a un “Power Bead Tube” y agitar suavemente la mezcla en un vórtex. El tampón que contiene ayuda a dispersar las partículas del suelo, disuelve los ácidos húmicos y protege los ácidos nucleicos de su degradación.
- Añadir 60 µl de solución C1, la cual contiene SDS (*Sodium dodecil sulphate*) y otros agentes químicos que facilitan la lisis celular, y se agita brevemente en un vórtex.
- Cerrar bien los Power Bead Tubes y agitar durante 10 minutos (min) a la máxima velocidad. En este paso se completa la homogenización y lisis celular por la acción combinada de los agentes químicos y la agitación mecánica con las bolitas de cristal que contiene el tubo.
- Centrifugar a 10.000 xg durante 30 segundos (s) a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante (400-500 µl) a un tubo eppendorf limpio. El sobrenadante sigue siendo de tono oscuro y puede contener algunas partículas de suelo.
- Adicionar 250 µl de solución C2 y, tras agitarlo durante 5 s en el vórtex, se incubó a 4 °C durante 5 min. La solución C2 contiene un agente que precipita las sustancias inorgánicas y las orgánicas que no sean DNA, como los ácidos húmicos, restos celulares y proteínas, que reducirían la pureza del DNA extraído y lo inhabilitarían para su uso posterior.
- Centrifugar los tubos a 10.000 xg durante 1 min a temperatura ambiente.
- Transferir unos 600 µl del sobrenadante a un tubo limpio, evitando arrastrar parte del pellet.
- Adicionar 200 µl de solución C3, agitar en vórtex suavemente e incubó a 4° C durante 5 minutos. La solución C3 contiene un agente precipitante adicional que contribuirá a la pureza del DNA extraído.
- Centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Transferir unos 750 µl de sobrenadante a un tubo eppendorf limpio.
- Adicionar 1,2 ml de solución C4 y agitar en vórtex durante 5 segundos. C4 es una solución salina de alta concentración que permitirá la unión cuasiespecífica del DNA a las columnas de sílica que se utilizan en pasos posteriores, eliminando así aquellos contaminantes que no se unan a la columna a altas concentraciones de sal.
- Cargar aproximadamente 675 µl dentro de un Spin Filter (columnas de sílica).
- Centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Tirar el eluido que ha pasado a través de la columna y repetir el proceso 3 veces en la misma columna, hasta agotar el sobrenadante al que añadimos la solución C4. En este momento el DNA se encuentra unido a la columna de sílica.

- Adicionar 500 μl de solución C5 a la columna de sílica y centrifugar a 10.000 xg durante 30 segundos a temperatura ambiente. La solución C5 contiene etanol y se utiliza para limpiar y lavar la columna y el DNA unido a ella, eliminando las sales, ácidos húmicos y otros contaminantes residuales, dejando el DNA unido a la columna.
- Tirar el eluido que pasa a través del tubo.
- Centrifugar a 10.000 xg durante 1 min a temperatura ambiente para eliminar el etanol residual que pueda interferir en las aplicaciones posteriores del DNA.
- Colocar el Spin Filter en un tubo eppendorf limpio. Añadir 100 μl de solución C6 (tampón de elución Tris 10 mM) en el centro de la membrana.
- Centrifugar a 10.000 xg durante 30 s a temperatura ambiente para recuperar en el tubo el DNA que estaba unido al sílica.
- Tirar el Spin Filter.
- Guardar el DNA extraído a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

C. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA.

El cálculo de la concentración de ácidos nucleicos se estimó siguiendo el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se midió la densidad óptica de las muestras en solución acuosa a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración se determinó en función de los valores estándar: 1 U a D.O. 260 nm se corresponde con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de cadena doble, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de cadena sencilla y RNA, y 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligonucleótidos. La relación D.O. 260 nm / D.O. 280 nm se usó como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Se ha usado un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer) que permite trabajar con volúmenes de muestra 1-2 μl ; facilitando el proceso de análisis.

D. PREPARACIÓN DE DNA PARA SECUENCIACIÓN MASIVA DE ALTA CALIDAD.

Para las muestras LJN, LJQ, CNA y CNB se emplearon 5 μg de DNA, a una concentración aproximada de 300 $\text{ng}/\mu\text{l}$, de cada uno de los sitios para realizar una secuenciación masiva de alta calidad mediante pirosecuenciación con el equipo 454 GS FLX Titanium de Roche, realizado por la empresa LifeSequencing SL (Valencia, España). También se utilizaron otros 5 μg de DNA, a una concentración aproximada de 300 $\text{ng}/\mu\text{l}$, de cada una de las cuatro muestras anteriores y de la muestra CNX para realizar una secuenciación masiva de alta calidad mediante la tecnología HiSeq2000 PE 101 de Illumina®, realizado en el Beijing Genomics Institute (Tai Po, Hong Kong, China).

MATERIAL Y MÉTODOS

3. BACTERIAS CON CAPACIDAD DE FORMAR NÓDULOS EN *GENISTA VERSICOLOR*.

En este apartado se va a realizar un estudio para obtener aquellas bacterias que son capaces de formar nódulos en raíces de individuos de la especie *Genista versicolor*. Para ello se siguió el esquema general que aparece en la figura MM-3 y que se detalla a continuación.

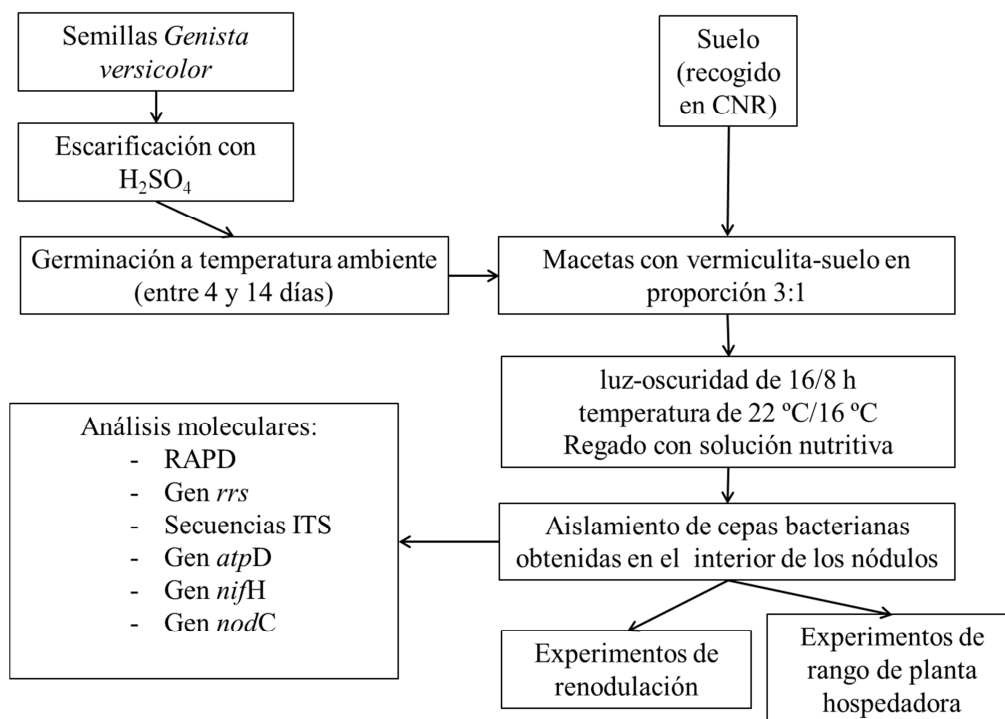


Figura MM-3. Esquema general del estudio de las bacterias capaces de formar nódulos en *Genista versicolor*.

A. RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS Y SUELOS.

Las semillas de *Genista versicolor*, antes llamada *G. baetica*, se recogieron durante el verano, a finales del mes de julio y principios de agosto, que es la época en la que estas plantas producen su cosecha. Para ello se recolectaron las vainas convenientemente desarrolladas de varios pies de planta, para evitar posibles problemas asociados al individuo. Después se dejaron secar a temperatura ambiente para provocar la apertura de las vainas y se recogieron todas las semillas para almacenarlas a 4 °C durante al menos un mes.

B. MEDIOS Y SOLUCIONES.

Para la realización de los experimentos con *G. versicolor* se utilizaron los siguientes medios y soluciones después de esterilizarlos en autoclave a 120 °C durante 20 min:

- Medio YEM, para el cultivo de bacterias del orden Rhizobiales.
 - K_2HPO_4 0,5 g
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g
 - NaCl 0,1 g
 - Extracto de levadura 1 g
 - Manitol 10 g
 - Agua 1 l
 - pH 6.8 (ajustado con HCl 1 M)
 - Agar al 1,5 %

- Medio TSB, generalista para el cultivo de bacterias del suelo.
 - Digerido pancreático de caseína 17 g
 - Digerido enzimático de soja 3 g
 - Dextrosa 2,5 g
 - NaCl 5 g
 - K_2HPO_4 2,5 g
 - Agua 1 l
 - pH 7,3 (ajustado con KOH 1 M)
 - Agar al 1,5 %

- Medio TY, para el cultivo de bacterias de la familia Rhizobiaceae.
 - Triptona 5 g
 - Extracto de levadura 3 g
 - $CaCl \cdot 2H_2O$ 0,5 g
 - Agua 1 l
 - pH 6,8
 - Agar al 1,5 %

- Solución nutritiva de plantas (Rigaud y Puppo, 1975)
 - Solución de micronutrientes 100 μ l
 - H_3BO_3 18,6 g/l
 - $MnSO_4$ 22,3 g/l
 - $ZnSO_4$ 29 g/l
 - $CuSO_4$ 24 g/l
 - Molibdato sódico (4 g/l) 1 ml
 - KH_2PO_4 0,2 g
 - $MgSO_4$ 0,2 g
 - ClK 0,2 g
 - $CaSO_4$ 0,12 g
 - EDTA-Fe 0,05g
 - Agua 1 l
 - pH 7 (ajustado con KOH 1 M)
 - $NO_3NH_4^{***}$ 0,16 g/l

*** Cuando fue necesario adicionar una fuente de nitrógeno se añadió nitrato amónico a una concentración de 2 mM.

MATERIAL Y MÉTODOS

C. MACETAS CON PLANTA-TRAMPA.

Los suelos empleados en este experimento fueron tomados en la zona de CNR y tras tamizarlos con una luz de malla de 2 mm se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Para la esterilización de la superficie de las semillas de *G. versicolor*, su escarificación y germinación se realizó el siguiente procedimiento:

- Sumergir las semillas en H₂SO₄ puro durante 30 min.
- Hacer 5 lavados con agua destilada estéril.
- Dejar embebiendo en agua destilada estéril durante 2 - 3 h.
- Repartir las semillas en placas de Petri con base de papel de filtro estéril.
- Añadir 2 ml de agua destilada estéril por placa.
- Dejar las placas debidamente cerradas a temperatura ambiente hasta que hayan germinado la mayoría de las semillas (entre 4 y 14 días).

Una vez que tuvimos suficientes semillas germinadas se fueron colocando 5 semillas por maceta. Éstas se prepararon con una proporción de vermiculita-suelo de 3:1, siendo este suelo el que se recogió en el sitio de muestreo CNR. Tanto el contenedor de las macetas como la vermiculita fueron previamente esterilizadas poniéndolas a 121 °C durante 20 min en autoclave. Se añadió a la superficie de la maceta una capa de perlita esterilizada para evitar la pérdida de humedad de la maceta y también la contaminación por hongos. Estas macetas se dejaron en una cámara con un ciclo de luz-oscuridad de 16/8 h y de temperatura de 22 °C/16 °C, y se regaron periódicamente con solución nutritiva de plantas Rigaud y Puppo.

D. AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS DE LOS NÓDULOS OBTENIDOS.

A partir de la octava semana de crecimiento de las plantas se empezaron a sacar éstas de las macetas de forma escalonada, hasta la onceava semana, en la cual se sacaron las últimas plantas. A partir de estas plantas se procedió a cultivar, en placa, las bacterias del interior de cada uno de los nódulos según el siguiente procedimiento:

- Seleccionar los nódulos de las plantas y lavar con agua destilada.
- Separar los nódulos (y un poco de raíz) del resto de la planta y sumergir en agua destilada.
- Sumergir los nódulos en HgCl₂ al 0,25 % durante 4 min.
- Dar 5 lavados con agua destilada estéril.

- Colocar los nódulos separados en una placa de Petri embebidos en una gota de agua destilada estéril.
- Triturar cada nódulo de forma individual con una varilla de cristal previamente flameada y sembrar con la propia varilla en:
 - Medio TY
 - Medio TSA
 - Medio YEM
- Incubar las placas a 28 °C hasta la aparición de colonias.

También se sembraron en placa un par de “nódulos control” para cada tipo de medio empleado, y para ello se frotó el nódulo sin triturar sobre la superficie del medio. De esta forma se puede comprobar que la esterilización superficial del nódulo es correcta y que las cepas que crezcan a partir de nódulos proceden realmente del interior de los mismos.

E. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Para la extracción de DNA genómico (para su posterior uso en reacciones de PCR) de cada cepa obtenida se empleó el kit “Realpure Genomic DNA Extraction” de la casa comercial REAL, siguiendo las instrucciones del fabricante que se detallan a continuación:

- Lisis celular.
 - Añadir 1 ml de un cultivo con D.O. de 0,6 a un tubo de 1,5 ml.
 - Centrifugar a 14.000 xg durante 30 s y eliminar el sobrenadante.
 - Añadir 600 µl de Solución de Lisis al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células e incubar las muestras a 80 °C durante 5 min.
- Tratamiento con RNasa.
 - Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
 - Añadir 3 µl de RNasa al lisado.
 - Mezclar la muestra por inversión del tubo e incubar a 37 °C durante 15-60 min.
- Precipitación de proteínas.
 - Añadir 300 µl de Solución de precipitación de proteínas.
 - Agitar mediante vórtex vigorosamente durante 20-30 s.
 - Centrifugar a 14.000 xg durante 5 min. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Precipitación de DNA.
 - Pasar el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo de 1,5 ml que contenga 600 µl de isopropanol. Mezclar por inversión varias veces.
 - Centrifugar a 14.000 xg durante 3 min.
 - Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 µl de etanol al 70 % e invertir varias veces para lavar el pellet de DNA.
 - Centrifugar a 14.000 xg durante 2 min. Eliminar todo el etanol cuidadosamente pues el pellet de DNA puede desplazarse.
 - Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 min.
- Hidratación de DNA.
 - Añadir 200 µl de Solución de Hidratación de DNA.
 - Incubar durante una noche (*over night*) a temperatura ambiente para que se rehidrate.
 - Conservar a -20 °C.

Para comprobar la cantidad y calidad de DNA extraído se realizó la cuantificación de DNA con un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer).

F. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S *RRNA*.

Las reacciones de amplificación del gen 16S *rRNA* por PCR se realizaron con la enzima polimerasa MasterTaq de 5PRIME con las siguientes cantidades de cada uno de los reactivos necesarios:

- | | | |
|---|-------------|--------------------------------|
| • 10x Tampón MasterTaq con 15 mM Mg ²⁺ | 2,5 µl | 1x (1.5 mM Mg ²⁺) |
| • 25 mM de Solución de Magnesio | 1 µl | 2,5mM Mg ²⁺ (final) |
| • 10 mM dNTP Mix (2,5mM cada uno) | 2 µl | 0,2 mM de cada uno |
| • Forward primer (12,5µM) | 0,5 µl | 0,25 µM |
| • Reverse primer (12,5µM) | 0,5 µl | 0,25 µM |
| • DNA molde | ~15 ng | |
| • Taq DNA Polymerase (5 U/µl) | 0,15 µl | 0,75 U |
| • Agua MilliQ | hasta 25 µl | |

Esta amplificación se realizó usando como forward primer el 9bfm (5 'GAGTTTGATYHTGGCTCAG 3') (Mühling *et al.* 2008), específico del dominio Bacteria, y como reverse primer el 1512UR (5 'ACGGHTACCTTGTTACGACTT 3'), primer Universal, empleando el siguiente programa de PCR:

- Desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C

- 25 ciclos de:
 - Desnaturalización de 1 min a 94 °C
 - Anillamiento de 1 min a 52 °C
 - Extensión de 1,5 min a 72 °C
- Extensión final de 10 min a 72 °C

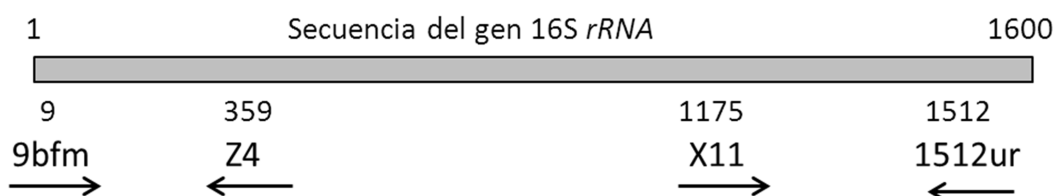
Se comprobó la correcta amplificación del gen 16S *rRNA* cargando 5 µl del producto de PCR con 1 µl de tampón de carga (glicerol al 50 %; EDTA pH 8 0,5M; orange g al 0,5%) en un gel de agarosa al 0,8 % en tampón TAE (Tris/HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 2 mM, ácido acético glacial 0,1142 % (v/v)) y se llevó a cabo una electroforesis durante 60 min a 110V. Se utilizó el marcador Φ29, que es DNA del fago Φ29 digerido con *HindIII*, cuyo patrón de digestión se compone de 14 fragmentos: 72, 156, 273, 453, 579, 611, 759, 1.150, 1.331, 1.933, 2.201, 2.498, 2.899 y 4.370 bp. El gel se tiñó en una solución con 100 µl de GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain) por litro de agua destilada y se fotografió bajo luz ultravioleta.

El producto de la PCR se limpió con las columnas Illustra MicroSpin™ S-300 HR de GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Resuspender la resina de la columna mediante vórtex.
- Girar la tapa un cuarto de vuelta y quitar el cierre inferior de la columna.
- Poner la columna en un tubo colector y centrifugar a 735 xg durante 1 min.
- Poner la columna en un tubo eppendorf libre de DNasa de 1,5 ml.
- Añadir de 25 a 100 µl de la muestra en el centro de la parte superior de la resina con cuidado.
- Centrifugar a 735 xg durante 2 min.
- Almacenar el eluido (la muestra purificada) a -20 °C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para obtener la secuencia completa del gen 16S *rRNA* (unas 1.400 bp) se realizaron 4 secuenciaciones diferentes del producto de la PCR. Para ello, en cuatro tubos diferentes se pusieron aproximadamente 40 ng de DNA en un volumen final de 12 μ l con agua MilliQ y con una concentración 0,4 μ M de los siguientes primers (un primer para cada tubo): 9bfm (5' 'GAGTTTGATYHTGGCTCAG 3'), 1512UR (5' 'ACGGHTACCTTGTTACGACTT 3'), Z4 (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), X11 (5'-GAGGAAGGTGGGGATGACGTC-3'). Los primers Z4 y X11 sirven para obtener la secuencia de región adyacente a la cual se ligan los primers 9bfm y 1512 UR y también la secuencia de esta región en la que se ligan.



G. CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO DE CEPAS BACTERIANAS.

Las cepas que se consideraron adecuadas (tras realizar la correspondiente secuenciación del gen 16S *rRNA*, ver detalle en el apartado 3.f.) fueron crecidas en 3 ml de su correspondiente medio líquido (YEM para *Bradyrhizobium* y TSB para *Bacillus* y otros géneros de crecimiento rápido) hasta alcanzar una densidad óptica de 0,7 a una absorbancia de 600 nm de longitud de onda (medida realizada en el espectrofotómetro Novaspec II de Pharmacia Biotech). Una vez obtenida la densidad óptica requerida, se añadió 750 μ l de este cultivo a un criotubo con 250 μ l de glicerol esterilizado previamente en autoclave a 120 °C durante 20 min. De esta forma la concentración final de glicerol es del 20 % v/v. Esta operación se realizó por duplicado para tener un tubo “de reserva”. Todo esto se realizó en una campana de flujo laminar y con todos los materiales empleados convenientemente esterilizados para evitar contaminaciones. Los dos criotubos fueron debidamente etiquetados, tanto en el tubo como en la tapa, y almacenados a -80 °C.

H. COMPROBACIÓN DE LA CAPACIDAD DE NODULACIÓN DE LOS AISLADOS DE *BRADYRHIZOBIUM*.

Para confirmar que las cepas de *Bradyrhizobium* obtenidas a partir de los nódulos de *G. versicolor* son capaces de nodular esta planta se procedió a inocular un representante de cada OTU obtenido (teniendo en cuenta un 100 % de identidad para el gen 16S *rRNA*). Para ello se repitió el proceso de esterilización y escarificación de las semillas de *G. versicolor* y esta vez se sembraron en macetas con una proporción 1:1 de arena y vermiculita. La arena se autoclavó dos veces a 120 °C durante 20 min para evitar la proliferación de cepas con formas de resistencia (esporas) y tras mezclarla con la vermiculita y verterla en la maceta se autoclavó de nuevo para mantener estéril todo el conjunto. Para cada cepa se pusieron 3 macetas con 5 semillas en cada maceta, las cuales se inocularon con 100 µl de cultivo celular con un valor de absorbancia de 0,5 medido a 600 nm de longitud de onda (tras centrifugar y resuspender en agua destilada estéril), lo que se estima que son del orden de 10⁷ células de *Bradyrhizobium* por planta. Posteriormente, se adicionó una capa superficial de perlita esterilizada para evitar la pérdida de humedad y la contaminación por hongos. Las macetas se dejaron en una cámara con un ciclo de luz-oscuridad de 16/8 h y de temperatura de 22/16 °C, y se regaron periódicamente con solución nutritiva de plantas Rigaud y Puppo.

A los dos meses de crecimiento de las plantas, se procedió al aislamiento de células bacterianas a partir de los nódulos en medio YEM (ver apartado 3.d.). Para confirmar la identidad de la cepa se realizó una amplificación por PCR del gen 16S *rRNA* tomando como DNA molde 1 µl de la lisis celular por calor (un picado de colonia en 20 µl de agua MilliQ a 94 °C durante 10 min) y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.f. Con el producto de la PCR se procedió a secuenciar el gen 16S *rRNA* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.f. y una vez obtenida la secuencia se alineó con la secuencia de la cepa obtenida en el experimento de plantas trampa y se comprobó que eran idénticas.

I. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS GENES *NIFH* Y *NODC*.

La amplificación de los genes *nifH* y *nodC* se realizó empleando los primers *nifHF* (5'-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3') y *nifHI* (5'-AGCATGTCTYCSAGYTCNTCCA-3') para el gen *nifH* y los primers *nodCF* (5'-AGGTGGTYGAYGACGGTTC-3') y *nodCI* (5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3') para el gen *nodC* (Laguerre *et al.* 2001). Se obtuvieron unos tamaños de amplicón de 784 bp para el gen *nifH* y de 930 bp para el gen *nodC*. Las reacciones de PCR se realizaron con la Taq polimerasa 5PRIME con la mezcla de reacción antes detallada (apartado 3.f.) y siguiendo los siguientes programas de PCR:

MATERIAL Y MÉTODOS

Programa de PCR para el gen *nifH*:

- Desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C
- 35 ciclos de:
 - Desnaturalización de 1 min a 94 °C
 - Anillamiento de 1 min a 57 °C
 - Extensión de 2 min a 72 °C
- Extensión final de 10 min a 72 °C

Programa de PCR para el gen *nodC*:

- Desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C
- 35 ciclos de:
 - Desnaturalización de 1 min a 94 °C
 - Anillamiento de 1 min a 55 °C
 - Extensión de 2 min a 72 °C
- Extensión final de 7 min a 72 °C

Se comprobó la correcta amplificación parcial de los genes *nifH* y *nodC* cargando 5µl de producto de PCR (con 1 µl de tampón de carga) en gel de agarosa al 2 % en tampón TAE (Tris/HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 2 mM, ácido acético glacial 0,1142 % (v/v)) y realizando una electroforesis durante 60 min a 110V utilizando como marcador de peso molecular el marcador Φ29. El gel se tiñó en una solución con 100 µl de GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain) por litro de agua destilada y se fotografió bajo luz ultravioleta.

Para la secuenciación de estas regiones de los genes *nifH* (784 bp) y *nodC* (930 bp) se envió el producto de cada una de las PCRs en dos tubos diferentes, los cuales contenían unos 25 ng de DNA en un tubo de PCR con un volumen final de 12 µl con agua MilliQ y con una concentración 0,4 µM de los primers empleados en las respectivas PCRs (un primer para cada tubo).

J. RAPD FINGERPRINTING.

Los patrones RAPD se obtuvieron según Rivas *et al.* (2006), usando el primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT -3'), que se utiliza para diferenciar entre cepas de la misma subespecie. El DNA extraído de cada cepa (2 μ l) se usó como DNA molde para las amplificaciones por PCR. La PCR se realizó usando el kit DreamTaq DNA polymerase de Thermo, siguiendo las instrucciones del fabricante:

Componente	Volumen final	Concentración final
2X DreamTaq	12,5 μ l	1X
Oligonucleótido M13 (20 μ M)	2,5 μ l	0.1–1.0 μ M
DNA molde	Z μ l	< 0.5 μ g/50 μ l
Agua libre de nucleasas	hasta 25 μ l	

Las condiciones de PCR fueron:

- Desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C
- 35 ciclos de:
 - Desnaturalización de 1 min a 95 °C
 - Anillamiento de 1 min a 40 °C
 - Extensión de 2 min a 75 °C
- Extensión final de 7 min a 72 °C

De cada producto de PCR se tomaron 10 μ l y fueron cargados en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TBE (Tris 100 mM, ácido bórico 83 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5) y se realizó una electroforesis durante 2 h a 6 Vcm⁻¹. Este gel se tiñó en una solución con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio y se fotografió bajo luz ultravioleta. Standard VI (Roche, USA) se utilizó como marcador de tamaño.

MATERIAL Y MÉTODOS

K. ANÁLISIS DE LOS GENES *ATPD* Y DE LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S (ITS).

El estudio de las ITS se realizó según lo descrito en Peix *et al.* (2005). 7µl del ADN extraído a partir de células fue usado para las amplificaciones por PCR de las ITS rDNA. Las PCRs se realizaron usando un AmpliTaq Gold reagent kit (Perkin-Elmer Biosystems, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante:

GeneAmp 10X buffer	5 µl
BSA 0,1%	1 µl
MgCl ₂	12 µl
dNTP	0,5µl
AmpliTaq Gold DNA polymerase	2 U
Primer 1 (2µM)	4 µl
Primer 2 (2µM)	4 µl
Agua MilliQ	hasta 50 µl

Los primers empleados en la amplificación fueron el primer ITS1F (5'-TGCGGCTGGATCACCTCC-3', posiciones 1552–1569 del gen 16S *rRNA* de *Escherichia coli*, número de referencia U00096) y el primer ITSPN1R (5'-CMCGTCCTTCATCGSCTC-3', posiciones 2078–2061 del gen 16S *rRNA* de *E. coli*, número de referencia U00096) con 0,2 mM de concentración final. El DNA contaminante de los reactivos de la PCR (excepto los primers) fueron eliminados usando el protocolo descrito por Rothman *et al.* (2002), que consiste en tratar todos los reactivos de PCR con la endonucleasa de restricción *AluI* (New England Biolabs) antes de la reacción de amplificación, a una concentración de 2,5 U/reacción de PCR y durante 1,5 h. La secuencia específica contiene 3 sitios para *AluI*, la cual es extremadamente específica para la secuencia nucleotídica AG→CT. No hay sitios para *AluI* en los propios primers de la PCR, por lo que la predigestión destruirá todos los DNA diana de los contaminantes pero dejará los primers intactos.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial de 9 min a 95 °C
- 35 ciclos de:
 - Desnaturalización de 1 min a 95 °C
 - Anillamiento de 1'10'' min a 54 °C
 - Extensión de 2 min a 72 °C
- Extensión final de 7 min a 72 °C

Los productos de la PCR fueron almacenados a 4 °C. Se realizó una electroforesis con el producto de la PCR en geles de agarosa al 1 % durante 1 h a 6 Vcm^{-1} en tampón TAE 1X (Tris/HCl 40 mM, EDTA- Na_2 2 mM, ácido acético glacial 0,1142 % (v/v)). Después se tiñó en una solución con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, y se fotografió bajo luz ultravioleta. Standard VI (Roche, USA) se utilizó como marcador de tamaño. A cada muestra se añadió una alícuota de 5 μl de solución de carga (sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25 %).

Los genes *atpD* fueron amplificados y secuenciados según Vinuesa *et al.* (2005), utilizando el kit REExtract-N-Amp PCR de Sigma o con el kit GoTaq Flexi DNA polymerase de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Un fragmento del gen *atpD* de 550 bp se amplificó con los primers *atpD* 273f y *atpD* 771r (Gaunt *et al.*, 2001) o *atpD* 255F (GCTSGGCCGCATCMTSAACGTC) y *atpD* 782R (GCCGACACTTCMGAACCNGCCTG) usando la misma mezcla de reacción y parámetros de PCR usada para amplificaciones de ITS en Vinuesa *et al.*, 1998:

GeneAmp 10X buffer	5 μl
BSA 0,1%	1 μl
MgCl_2	12 μl
dNTP	0,5 μl
AmpliTaq Gold DNA polymerase	2 U
Primer 1 (2 μM)	4 μl
Primer 2 (2 μM)	4 μl
Agua MilliQ	hasta 50 μl

Las condiciones de PCR para el gen *atpD* fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial de 3 min 30 s a 95 °C
- 30 ciclos de:
 - Desnaturalización de 1 min a 95 °C
 - Anillamiento de 1'10" s a 54 °C
 - Extensión de 1 min a 72 °C
- Extensión final de 5 min a 72 °C

Se amplificaron fragmentos parciales del gen *recA* con los primers *recA* 41F (TTCGGCAAGGG MTCGRSATSATG) y *recA* 640R (ACATSACRCCGA TCTTCATGC), usando la misma mezcla de reacción y protocolo de PCR descrito para *atpD* (pero con anillamiento a 58 °C).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cada una de las bandas correspondientes a los diferentes genes fueron purificadas de gel mediante centrifugación a temperatura ambiente usando el “DNA gel extraction device” de Millipore a 5.000 xg durante 10 min o eluyendo la banda extraída y filtrándola a través de columnas de sílicagel usando el “Qiaquick DNA Gel Extraction Kit” de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Cortar el fragmento de DNA de un gel de agarosa con un escalpelo limpio.
- Pesar el fragmento de gel en un tubo incoloro. Añadir 3 volúmenes de tampón QG por 1 volumen de gel (100 mg ~ 100 µl).
- Incubar a 50° C durante 10 minutos o hasta que el fragmento de gel se haya disuelto completamente. Durante la incubación, mezclar mediante vórtex cada 2 o 3 minutos para ayudar a que se disuelva el gel.
- Después de que se haya disuelto completamente el gel, comprobar que el color de la mezcla es amarillo (similar al tampón QG sin agarosa disuelta).
- Colocar una columna QIAquick en un tubo colector de 2 ml proporcionado por el kit.
- Para unir el DNA, añadir la muestra en una columna de QIAquick y centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto.
- Desechar el eluido y colocar la columna QIAquick en el mismo tubo colector.
- Añadir 500µl de tampón QG en la columna y centrifugar 1 minuto a 10.000 xg.
- Desechar el eluido y colocar la columna QIAquick sobre el mismo tubo colector.
- Para lavar, añadir 750 µl de tampón PE a la columna QIAquick, esperar 5 min y centrifugar a 10.000 xg durante 1 min.
- Desechar el eluido y centrifugar de nuevo a 10.000 xg durante 1 min.
- Colocar la columna QIAquick en un tubo eppendorf de 1,5 ml limpio.
- Para eluir el DNA, añadir 50 µl de tampón EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8,5) o agua en el centro de la membrana de la columna QIAquick y centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Alternativamente, para incrementar la concentración de DNA, añadir 30 µl de tampón de elución en el centro de la membrana de la columna de QIAquick, dejar reposar la columna durante 1 min y después centrifugar a 10.000 xg durante 1 min.

La reacción de secuenciación se realizó en un secuenciador ABI PRISM 3100 usando el BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., USA) tal como se suministra por el fabricante.

L. PROCESAMIENTO INFORMÁTICO Y ANÁLISIS DE DATOS.

Para el análisis de los patrones de bandas de los RAPDs se construyó un dendrograma basado en la matriz generada usando el método UPGMA y el coeficiente Pearson con el software Bionumerics version 4.0 (Applied Maths, Austin, TX).

Para el resto de estudios moleculares (las regiones intergénicas ITS y los genes 16S *rRNA*, *atpD*, *nifH* y *nodC*) las secuencias obtenidas se compararon con las de GenBank usando el software BLASTN (Altschul *et al.* 1990). Estas fueron alineadas usando el software Clustal W (Thompson *et al.* 1997). Las distancias calculadas según el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura 1980) se usaron para inferir árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud (Felsenstein 1981) utilizando el software MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). Los valores de confianza para los nodos de los árboles se generaron por el análisis de bootstrap utilizando 1.000 permutaciones de los conjuntos de datos.

M. EXPERIMENTOS DE RANGO DE PLANTA HOSPEDADORA.

Para comprobar el rango de hospedador de las cepas de *Bradyrhizobium* GV101, GV135 y GV137 se inocularon dichas cepas en semillas previamente esterilizadas, escarificadas y germinadas de las siguientes especies: soja (*Glycine max*), cowpea (*Vigna unguiculata*), retama (*Retama sphaerocarpa*) y rascavieja (*Adenocarpus decorticans*).

Para esterilizar y escarificar las semillas de rascavieja y retama se procedió de la siguiente forma:

- Cortar la cubierta de la semilla con un bisturí.
- Sumergir las semillas en hipoclorito sódico al 28,5 % durante 10 min.
- Lavar 4 o 5 veces con agua destilada estéril.
- Dejar embebiendo en agua destilada estéril durante 2-3 h.
- Repartir las semillas en placas de Petri con base de papel de filtro estéril.
- Añadir 2 ml de agua destilada estéril por placa.
- Dejar las placas debidamente cerradas a 28 °C y oscuridad hasta que hayan germinado la mayoría de las semillas (entre 4 y 14 días).

En el caso de las semillas de soja y cowpea se procedió de la misma forma pero en vez de cortar la cubierta de la semilla y sumergir en hipoclorito sódico se sumergieron directamente las semillas en etanol al 96 % durante 3 minutos, necesitando sólo 2 días para germinar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez germinadas, las semillas de soja se sembraron en jarras Leonard y el resto de semillas en macetas con vermiculita. Para cada una de las 3 cepas de *Bradyrhizobium* seleccionadas se pusieron:

- 3 macetas con 4 semillas de retama en cada maceta.
- 3 macetas con 4 semillas de rascavieja en cada maceta.
- 6 macetas con 2 semillas de cowpea en cada maceta.
- 4 jarras Leonard con 2 semillas de soja en cada jarra.

Cada semilla se inoculó con 100 μ l de cultivo celular con un valor de absorbancia de 0,5 medido a 600 nm de longitud de onda, lo que se estima que son del orden de 10^7 células de *Bradyrhizobium* por planta. La inoculación se realizó tras centrifugar y resuspender en agua destilada estéril el cultivo bacteriano. También se dejaron semillas sin inocular (3 macetas de soja, 3 de cowpea, 2 de rascavieja y 2 de retama) para comprobar que no ha habido contaminación por parte de alguna bacteria noduladora. Posteriormente, se adicionó una capa superficial de perlita esterilizada para evitar la pérdida de humedad y la contaminación por hongos. Las macetas se dejaron en una cámara con un ciclo de luz-oscuridad de 16/8 h y de temperatura de 22/16 °C, y se regaron periódicamente con solución nutritiva de plantas Rigaud y Puppo. Tanto las macetas y jarras Leonard como la perlita vertida en éstas fueron previamente esterilizadas 120 °C durante 20 min.

Cuando las plantas estuvieron suficientemente desarrolladas se procedió a sacarlas de las macetas para comprobar si se había producido infección y/o nodulación.

4. ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS.

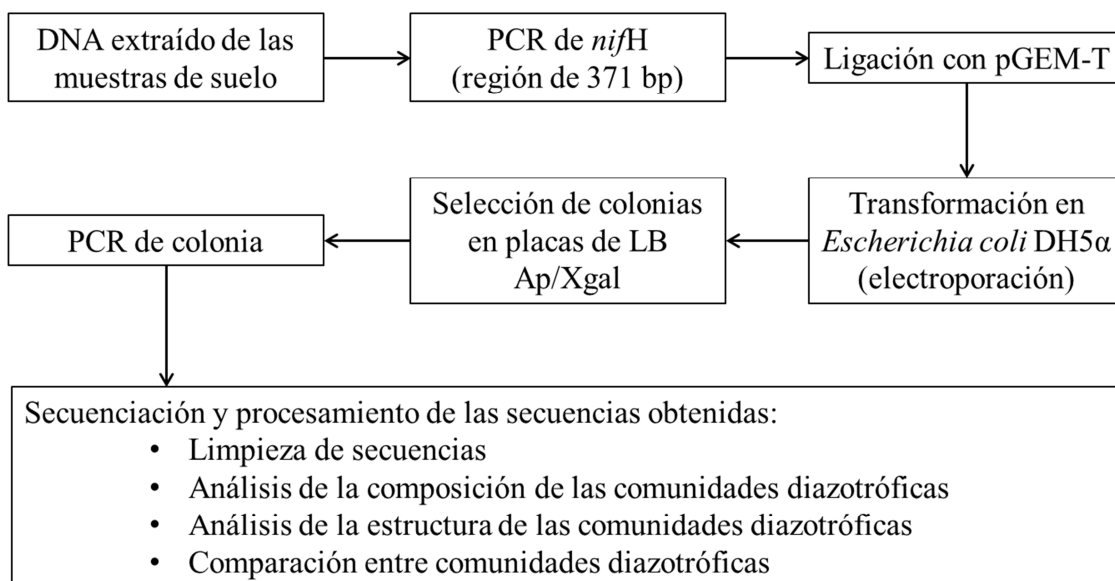


Figura MM-4. Esquema general del procesamiento de muestras para el estudio de las comunidades diazotróficas.

A. CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS DEL GEN *NIFH* .

La amplificación del gen *nifH* fue realizada mediante PCR usando los primers *nifH* (forA) (5'-GCIWTITAYGGNAARGGNGG-3'), *nifH* (forB) (5'-GGITGTGAYCCNAAVGCNGA-3') y *nifH* (rev) (5'-GCRTAIABNGCCATCATYTC-3'), descritos por Widmer *et al.* (1999), en una PCR anidada usando la enzima Taq polimerasa (5PRIME) según Villadas *et al.* (2007), obteniendo unos amplicones de 371 bp de tamaño. En este caso, la cantidad de cada uno de los reactivos de la PCR es la indicada en el apartado 3.f., pero añadiendo 5 µl de 5x TaqMaster PCR Enhancer en la primera de las reacciones de PCR. Esta TaqMaster PCR Enhancer sólo se emplea cuando el DNA molde se ha extraído de suelo, ya que en estas muestras suele haber gran cantidad de ácidos húmicos y otro tipo de sustancias que pueden interferir en el funcionamiento de la enzima polimerasa.

Programa de PCR con el primer *nifH*(forA):

- Desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C
- 29 ciclos de:
 - Desnaturalización de 45 s a 94 °C
 - Anillamiento de 45 s a 56 °C
 - Extensión de 45 s a 72 °C
- Extensión final de 10 min a 72 °C

MATERIAL Y MÉTODOS

Programa de PCR con el primer *nifH*(forB):

- Desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C
- 30 ciclos de:
 - Desnaturalización de 45 s a 94 °C
 - Anillamiento de 45 s a 53 °C
 - Extensión de 45 s a 72 °C
- Extensión final de 7 min a 72 °C

Se comprobó la correcta amplificación parcial del gen *nifH* cargando 5µl de producto de PCR (con 1 µl de tampón de carga) en gel de agarosa al 2 % en tampón TAE (Tris/HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 2 mM, ácido acético glacial 0,1142 % (v/v)) y corriendo una electroforesis durante 60 min a 110V utilizando como marcador de peso molecular el marcador Φ29. El gel se tiñó en una solución con 100 µl de GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain) por litro de agua destilada y se fotografió bajo luz ultravioleta.

Para generar las librerías de genes se realizó un paso preliminar que consistió en mezclar los productos de PCR de las tres muestras de cada sitio, para tener una muestra representativa, minimizando el sesgo que pueda producir tomar una única muestra de un único árbol. Se limpiaron 60 µl del producto de PCR con las columnas Illustra MicroSpin™ S-300 HR de GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante (ver apartado 3.f.).

El DNA purificado se ligó en el vector pGEM-T Easy de Promega, para lo cual se dejó un tubo eppendorf de 1,5 ml a 12 °C durante una noche con 12 µl de DNA purificado, 4 µl de agua MilliQ, 2 µl de buffer, 1 µl de vector y 1 µl de ligasa. El producto de esta ligación fue usado para su transformación dentro de la cepa DH5α de *E. coli* siguiendo los siguientes pasos:

- Dializar la mezcla de ligación durante 15 min en una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 0,025 mm (filtro de nitrocelulosa VSWP de MILLIPORE) que se encuentra flotando en agua destilada estéril dentro de una placa Petri.
- Mientras se dializa la mezcla, sacar los tubos eppendorf con 50 µl de células electrocompetentes *E. coli* DH5α de -80 °C y ponerlos en hielo, junto a las cubetas de electroporación y los tubos eppendorf (estériles) que se van a utilizar.
- Poner 10 µl de plásmido dializado en el tubo eppendorf que contiene las células electrocompetentes (hacer este y los siguientes pasos en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones) y mezclar por pipeteo suave.
- Añadir los 60 µl de la mezcla de células y plásmidos a una cubeta de electroporación.
- Poner la cubeta en el electroporador (Electroporador Eppendorf 2510) y darle 2 pulsos a 1.800 V de 3 a 5 ms de duración.

- Añadir rápidamente 1.000 μl de medio de cultivo LB en la cubeta, resuspender suavemente por pipeteo y poner la resuspensión de células y plásmidos en un tubo eppendorf.
- Incubar a 37 °C durante 1 h.
- Sembrar en placas con medio sólido LB*, con ampicilina y X-Gal, diferentes cantidades de la cepa transformada e incubar a 37 °C durante 24 h.

*Medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.* 1989)

- Agua destilada
- NaCl 5 g/l
- Triptona 10 g/l
- Extracto de levadura 5 g/l
- Agarosa al 1,6 %.
- Esterilización en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Se seleccionaron al menos 50 colonias positivas por muestra crecidas en las placas de LB con ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y X-Gal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), siendo colonias positivas aquellas que al tener un inserto en el gen *lacZ* del plásmido pGEM-T no generan color azul al crecer en presencia de X-Gal. El tamaño de inserto de cada colonia fue comprobado mediante una PCR de colonia usando los primers T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGG-3') y SP6 (5'-AGCTATTTAGGTGACACTATA-3') tomando como DNA molde 1 μl de la lisis celular por calor (un picado de colonia en 20 μl de agua MilliQ a 94 °C durante 10 min) siguiendo las siguientes concentraciones de la mezcla de PCR:

- ADN molde 1 μl
- Tampón 2,5 μl
- Primer T7 1 μl
- Primer SP6 1 μl
- dNTPs 0,5 μl
- Taq polimerasa 0,2 μl
- Agua MilliQ hasta 25 μl

El programa de PCR que se empleó es el siguiente:

- Desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C
- 30 ciclos de:
 - Desnaturalización de 30 s a 94 °C
 - Anillamiento de 30 s a 57 °C
 - Extensión de 2 min a 72 °C
- Extensión final de 5 min a 72 °C

MATERIAL Y MÉTODOS

Se comprobó el tamaño de amplificado del inserto cargando 5µl de producto de PCR (con 1 µl de tampón de carga) en gel de agarosa al 2 % en tampón TAE (Tris/HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 2 mM, ácido acético glacial 0,1142 % (v/v)) y realizando un electroforesis durante 60 min a 110V utilizando como marcador de peso molecular el marcador Φ29. El gel se tiñó en una solución con 100 µl de GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain) por litro de agua destilada y se fotografió bajo luz ultravioleta.

El producto de esta PCR se envió a secuenciar después de limpiar en columnas MicroSpin Illustra™ S-300 HR de GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante (ver en el apartado 3.f.). Todas las comprobaciones de integridad, tamaño y cantidad de DNA se realizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % con tampón TAE (Tris-acetic-EDTA). La secuenciación de los clones se realizó mediante tecnología Sanger con el secuenciador ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer, siguiendo las instrucciones del fabricante.

B. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *nifH*.

i. Scripts empleados en el análisis de las secuencias de *nifH*.

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *nifH* se han tenido que desarrollar una serie de “scripts” escritos en el lenguaje de programación Ruby. Los scripts desarrollados y la función que realizan se listan a continuación:

- *limpiasecuencias.rb*: elimina de una o más secuencias, obtenidas a partir de una transformación con el plásmido pGEM-T easy, aquella o aquellas partes de la secuencia que pertenece al plásmido, dejando únicamente el inserto.
- *anotador_con_blastx.rb*: añade al archivo de salida de un blast una columna con la descripción de cada uno de los hits, siendo la descripción el gen o proteína y la clasificación taxonómica de la secuencia.
- *quita_uncultured.rb*: elimina del archivo de salida de un blast todos aquellos *hits* en los que no se obtiene homología con NifH y aquellos que sí dan homología con NifH pero esta homología es con una bacteria *uncultured* o *unidentified*.
- *fasta_extrac_buenas.rb*: extrae de un archivo fasta aquellas secuencias que aparecen en una lista dada, las cuales se consideran buenas (en este caso porque dan homología con NifH).
- *matriz_OTUs.rb*: a partir de un listado de agrupamiento de OTUs genera una matriz con la abundancia de cada OTU en cada muestra.
- *tableador.rb*: a partir del archivo de salida del script *anotador_con_blastx.rb* se obtienen dos archivos:
 - un listado con el nombre de la secuencia y el género con el que da mayor homología
 - un listado con el nombre de cada género encontrado y el número de secuencias en las cuales da homología
- *pipeline_librerias_nifH.rb*: a partir de un archivo fasta genera un flujo de trabajo por el cual aplica los siguientes procesos siguiendo el orden indicado y empleando como archivo “input” el archivo “output” del proceso anterior:
 - ejecuta el script *limpiasecuencias.rb* ***
 - realiza un blastx
 - ejecuta el script *anotador_con_blastx.rb*
 - ejecuta el script *quita_uncultured.rb*
 - ejecuta el script *tableador.rb*

*** este script en ocasiones no limpia de forma correcta la secuencia, debido principalmente a la existencia de algún cambio nucleotídico en la secuencia del vector que limita con la secuencia del inserto, por lo que normalmente se omite este paso dentro del script *pipeline_librerias_nifH.rb* y se realiza previamente junto a un chequeo manual de las secuencias.

MATERIAL Y MÉTODOS

- *automatizar.rb*: ejecuta determinado script (se le indica cuál) de forma individual para cada uno de los archivos aportados en un listado.

ii. Limpieza de las secuencias de nifH.

Las secuencias brutas, enviadas por el servicio de secuenciación en archivos con formato “.ab1” fueron procesadas con el programa Sequence Scanner version 1.0, para comprobar la calidad de la secuenciación y eliminar aquellas secuencias con una mala calidad o aquellos nucleótidos con mala calidad. Cada una de las secuencias se fue añadiendo a un archivo de texto con formato fasta, el cual consiste en poner en una línea el nombre o identificador de la secuencia precedido del símbolo “>” y en la siguiente línea la secuencia nucleotídica a la cual se refiere dicho nombre. Al final se obtuvo un archivo fasta con al menos 50 secuencias nucleotídicas para cada uno de los sitios y fechas de muestreo, teniendo un total de 14 fastas convenientemente nombrados (el nombre del archivo contiene el nombre del sitio y el año de muestreo). A partir de este archivo fasta se eliminó de cada secuencia aquellos fragmentos que pertenecen al vector pGEM-T empleando para ello un script de ruby llamado “limpiasecuencias.rb”, y se repasó y quitó de forma manual aquellos fragmentos de vector que dicho script fue incapaz de eliminar. Con esto se obtuvo un archivo fasta con las secuencias limpias, y con el cuál se realizaron diferentes análisis de datos.

iii. Composición de las comunidades diazotróficas.

A partir de los diferentes archivos fasta obtenidos anteriormente se procedió a realizar un análisis de la composición de las comunidades microbianas siguiendo los siguientes pasos:

- Se realiza un BlastX (búsqueda de homología de DNA frente a proteínas) para cada una de las secuencias nucleotídicas obtenidas. Para ello se emplea la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990) de forma local enfrentando las secuencias a la base de datos nr (non-redundant) descargada previamente del servidor NCBI. Se dejan los parámetros por defecto del programa excepto el *num_descriptions*, al cual se le da un valor de 100, que es el número de *hits* que va a devolver para cada secuencia. Se escoge el formato tabular (*outfmt* = 6) como formato de salida de los datos del blast y se le denomina como *blastx_XXX.txt*, siendo XXX el nombre de la muestra.
- Se ejecuta el script *anotador_con_blastx.rb* para añadir la descripción (información de la proteína y del organismo con el cual da homología) de cada *hit* al final de cada línea que se obtiene con el formato tabular del archivo de salida del blast. A este archivo de salida se le denomina *anotados_blastx_XXX.txt*.

- Se ejecuta el script *quita_uncultured.rb* para realizar las siguientes acciones partir del archivo *anotados_blastx_XXX.txt*:
 - Eliminar aquellas secuencias que no dan homología con NifH.
 - Eliminar aquellos *hits* que dan homología con NifH pero con bacterias *Uncultured* o *Unidentified*. De esta forma, aunque el primer *hit* con el que da una secuencia sea de una bacteria desconocida, se va bajando en la lista de *hits* hasta encontrar una bacteria conocida, siempre y cuando los valores de porcentaje de identidad superiores al 75 % y de *e* menores a 10^{-10} para considerar que se ha obtenido una buena homología.
- Se ejecuta el script *tableador.rb* para obtener la lista de géneros de cada sitio, así como la abundancia de cada género.
- Se ejecuta el script *fasta_extrac_buenas.rb* para eliminar del archivo fasta original aquellas secuencias que no dan homología con NifH.

Todo esto se puede hacer paso por paso o utilizando el script *pipeline_librerias_nifH.rb*, que automatiza todo este flujo de trabajo, con cada una de las muestras. También se puede emplear el script *automatizar.rb* para que se ejecute el script *pipeline_librerias_nifH.rb* para cada uno de los archivos (muestras) indicados en una lista de forma automatizada.

iv. Estructura de las comunidades diazotróficas.

Para obtener los diferentes parámetros que caracterizan la estructura de una comunidad se procedió a realizar las siguientes acciones a partir cada uno de los archivos fasta obtenidos tras utilizar el script *fasta_extrac_buenas.rb* para cada una de las muestras:

- Se alinean las secuencias usando el servidor web MAFFT 6 (Katoh y Standley, 2013) manteniendo los parámetros por defecto y se guarda con el prefijo “aln” en el nombre del archivo para saber que se trata de un archivo de alineamiento.
- Se obtiene la matriz de distancia a partir del alineamiento, utilizando el programa dnadist del paquete informático Phylip-3.68 (Felsenstein, 1989). Para ello se emplea el índice de distancia Kimura 2-parameter, se analizan 1.000 conjuntos de datos (*data sets*) y se mantiene el resto de parámetros del programa por defecto. Se guarda la matriz con el prefijo “dnadist” para indicar qué tipo de archivo es.
- Se ejecuta el programa informático DOTUR (Schloss y Handelsman, 2005) trabajando a un nivel de distancia nucleotídica del 0,07, como se indica para el gen *nifH* en publicaciones anteriores (Hsu y Buckley, 2009).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los índices y parámetros que se obtuvieron a partir de la matriz de distancia empleando el DOTUR son los siguientes:

- Número de OTUs (S , riqueza observada): grupos de secuencias que se parecen entre sí con un valor de distancia nucleotídica menor a 0,07 y que se diferencian del resto de secuencias con al menos un valor de 0,07 de distancia nucleotídica.
- Índice de Chao1 (riqueza estimada): Es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra (Chao, 1984). Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Chao } 1 = S + a^2/2b$$

Donde S es el número de especies en una muestra, a es el número de especies que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra (número de "singletons") y b es el número de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra.

- Índice de Shannon, también conocido como índice de Shannon-Wiener o de Shannon-Weaver (diversidad y riqueza): este índice de abundancia proporcional relaciona la cantidad de especies presentes con el número de individuos de cada una. Expresa, por tanto, el grado promedio de incertidumbre en la predicción de la especie de un individuo escogido al azar desde una comunidad. Su fórmula es:

$$H' = -\sum p_i \ln(p_i)$$

Donde p_i es la abundancia relativa del OTU i .

- Rarefacción (curva de esfuerzo): muestra el cambio en el valor esperado de riqueza de especies de acuerdo al tamaño de las muestras. Calcula el número esperado de especies de cada muestra si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar. Es decir, si la muestra fuera considerada de n individuos ($n < N$), ¿cuántas especies se habrían registrado? Se calcula con la fórmula:

$$E(S) = \sum 1 - \left[\frac{(N - N_i)}{n} \right] \frac{(N - n)}{N}$$

Donde $E(S)$ es número esperado de OTUs, N el número total de individuos en la muestra, N_i el número de individuos de la i -ésima especie y n el tamaño de la muestra estandarizado. Se representa con un gráfico, con el número de secuencias en el eje X y el número esperado de OTUs en el eje Y (Fernández *et al.* 2001). Te proporciona la información de si has podido acceder a la mayor parte de los OTUs presentes en tu muestra con las secuencias estudiadas o

si se debe tener mayor número de secuencias para abarcar un porcentaje mayor de los OTUs de la población. También informa de si un mayor esfuerzo de muestreo, aumentaría o no, significativamente el registro de especies anteriormente no registradas (Kenneth *et al.* 1975).

A partir de estos datos generados con el software DOTUR también se obtuvo:

- Índice de Pielou (diversidad o equidad): mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Su valor oscila entre 0 y 1, siendo 1 el valor correspondiente a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes (Magurran, 1988). Se calcula aplicando la fórmula:

$$J' = H'/\ln S$$

Donde H' es el índice de Shannon y S el número de OTUs. El logaritmo neperiano de S es la forma de calcular el máximo valor de H' ($H'max$) que se puede dar en una población de S número de OTUs. Este índice es muy práctico cuando se quiere comparar la diversidad entre dos muestras que no tienen el mismo número de OTUs, ya que el índice de Shannon aumenta con el aumento del número de OTUs. Por lo tanto, ayuda a relativizar la diversidad y que ésta no dependa del número de OTUs obtenidos.

- Cobertura de Good (Good's coverage): estima la proporción de OTUs observados respecto al total de OTUs esperados en la población. Se calcula aplicando la fórmula:

$$G = 1 - n/N$$

Donde n es el número de singltons (OTUs formados por una única secuencia) y N es el número de secuencias de la muestra (Good, 1953).

v. Comparación entre comunidades diazotróficas.

La comparación entre comunidades se realizó a partir de la matriz de abundancia relativa de OTUs. Para obtener esta matriz se partió de un archivo fasta que contiene las secuencias nucleotídicas del gen *nifH* de las diferentes muestras que queremos comparar y se procedió de la siguiente manera:

- Se realiza un alineamiento en MAFFT (Katoh y Standley, 2013), la matriz de distancia con el programa Dnadist de Phylip-3.68 y la obtención de índices de riqueza y diversidad con el software DOTUR como se indica en el apartado 5.c.iv.
- Se utiliza el programa informático J-LIBSHUFF (Schloss *et al.* 2004), a partir de la matriz de distancia (archivo "dnadist_" obtenido con Phylip-3.68) de las secuencias de las diferentes muestras que se quieren comparar, por lo que se puede realizar la comparación entre 2 o más librerías de forma simultánea analizando diferencias a nivel de secuencia. Con este programa se obtiene qué muestras difieren significativamente.
- De los múltiples archivos de salida que da el software DOTUR se selecciona el que termina en ".fn.list", y de éste sólo se selecciona la fila que corresponde al valor de distancia con el que queremos trabajar, siendo de 0,07 en este caso.
- Se traspone esta fila para obtener una única columna donde cada fila contiene el nombre de las secuencias que se agrupan en un OTU, y se guarda este archivo en formato ".txt".
- Se utiliza el script de Ruby *matriz_OTUs.rb* con el archivo obtenido en el paso anterior, y con esto se genera una matriz con la abundancia de cada OTU en cada muestra.
- Se genera la matriz de abundancia relativa de OTUs pasando los valores de abundancia de la matriz obtenida con el script *matriz_OTUs.rb* a porcentaje de abundancia (del total de secuencias de la muestra).
- Se utiliza la herramienta Metastats (White *et al.* 2009) para ver qué OTUs tienen una abundancia significativamente diferente entre sitios. Esta herramienta compara la abundancia de OTUs de dos poblaciones e indica cuáles difieren significativamente entre los dos sitios.
- Se realiza un Clústering Jerárquico Aglomerativo mediante el algoritmo UPGMA y usando para ello la matriz de distancia euclídea formada a partir de la matriz de abundancia relativa de cada OTU para cada muestra. Esto se realiza con la herramienta estadística GINKGO (De Cáceres *et al.* 2003).

5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS METAGENÓMICAS.

A. SCRIPTS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS METAGENÓMICAS.

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación masiva se han tenido que desarrollar una serie de “scripts” escritos en el lenguaje de programación Ruby. Los scripts desarrollados y la función que realizan se listan a continuación:

- *blastxeador_fmt6_annotador_eliminando_repetidas.rb*: a partir de un archivo fasta que puede contener secuencias repetidas se crea un nuevo archivo eliminando las secuencias repetidas, con este archivo se realiza un blastx (con el formato 6 de salida) y al archivo de salida de este blastx se le añade una columna con la descripción de cada uno de los hits, siendo la descripción el gen o proteína y la clasificación taxonómica de la secuencia (esto último es lo mismo que realiza el script *annotador_con_blastx.rb* descrito en el apartado 4.a.).
- *elimina_repetidas_blast.rb*: elimina del archivo de salida (con el formato 6) de un blast aquellos resultados redundantes, es decir, cuando para una secuencia el blast devuelve más de un resultado repetido (mismo *subject*) se eliminan todos menos uno. Esta repetición del mismo resultado se debe a un cambio en el marco de lectura (*frameshift*) de la secuencia nucleotídica al ser pasada a secuencia aminoacídica.
- *listador_MGRast_genero.rb*: a partir del resultado anotado de un blast (con anotado nos referimos a que se ha añadido la descripción del gen o proteína y la clasificación taxonómica de la secuencia) y del fasta obtenido en el MG-RAST (donde aparece a qué proteína de la base de datos KO es homóloga la secuencia) genera un listado con 3 columnas, en la primera se pone el nombre de la secuencia, en la segunda el género con el que ha dado mayor homología en el blastx, y en la tercera la proteína a la cual ha sido asignada en el MG-RAST .
- *matricea_desde_listado.rb*: a partir del listado generado con el script anterior (*listador_MGRast_genero.rb*) se genera una matriz con el número de secuencias que hay de cada proteína (o gen) y género (o especie) que aparece en el listado.
- *matricea_por_sitios.rb*: a partir de diferentes listados generados cada uno para una muestra con el script *listador_MGRast_genero.rb* se generan dos matrices, una con el número de secuencias de cada género (o especie) presentes en cada muestra, y otra con el número de secuencias de cada proteína (o gen) presentes en cada muestra.
- *automatizar.rb*: ejecuta determinado script (se le indica cuál) de forma individual para cada uno de los archivos aportados en un listado.

B. LIMPIEZA DE LECTURAS METAGENÓMICAS Y ENSAMBLAJE DE LAS SECUENCIAS DE ILLUMINA.

Con las secuencias brutas obtenidas de la secuenciación directa del DNA extraído de suelo se realizó el siguiente procesamiento:

Para las secuencias obtenidas mediante el sistema 454:

- Se eliminan las secuencias repetidas con la herramienta informática 454 Replicate Filter web tool (Gómez-Álvarez *et al.* 2009), con un corte al 90% de identidad de secuencia, un valor de 0 en la diferencia de longitud y de 10 en el número de bases del inicio a chequear.
- Se realiza un filtrado de las secuencias de baja complejidad y calidad con la herramienta informática "SeqTrim pipeline" (Falgueras *et al.* 2010), usando los parámetros por defecto.

Para las secuencias obtenidas mediante el sistema Illumina:

- Se fusionan los dos archivos FastQ, Read1 perteneciente a la región 5' de las lecturas y Read2 perteneciente a la región 3' de las mismas, utilizando la herramienta Combine separate Read1 and Read2 del servidor web GALAXY/JGI (<https://galaxy.jgi-psf.org/>), devolviendo un archivo FastQ con las lecturas pareadas ordenadas de forma contigua.
- Para los siguientes procesos se utiliza la herramienta Import Illumina Data del servidor web GALAXY/JGI. Con esta herramienta se descomprime el archivo FastQ, se eliminan todas aquellas secuencias con más de un nucleótido ambiguo "N", se eliminan las regiones 3' de las secuencias que tienen una calidad inferior a Q³, observando dicho valor de tres en tres nucleótidos en dirección 3' → 5' (este filtro es laxo, ya que el programa FLASH utiliza su propio filtro de calidad más estricto). También se eliminan aquellas secuencias que tras los pasos anteriores tienen un tamaño menor de 50 nucleótidos. Por último, se eliminan todas aquellas secuencias de baja complejidad, que son aquellas lecturas que tienen más del 90% de su secuencia constituida por repeticiones mono/dinucleotídicas.

En el caso de las secuencias obtenidas mediante el sistema de Illumina, se procedió a ensamblarlas siguiendo los siguientes pasos:

- Se unen las secuencias pareadas utilizando el programa FLASH v 1.0.3, albergado también en el servidor web GALAXY/JGI, utilizando los parámetros por defecto.
- Se realiza un ensamblaje, tanto las secuencias que se han unido en el paso anterior como las que no, utilizando el programa SOAPdenovo (Li *et al.* 2010), empleando para ello unos tamaños de k-mer de 71, 75, 79, 83, 87 y 91. Posteriormente se fusionaron los seis ensamblajes resultantes eliminando los contigs* redundantes, manteniendo siempre el de mayor tamaño. Para llevar a cabo este procedimiento y conocer qué tamaños de k-mer

eran los más apropiados se utilizó la herramienta mgaSOAPdenovo del servidor web GALAXY/JGI.

* Aunque un contig es el conjunto de secuencias contiguas no solapantes de un genoma (Edwards *et al.* 1990 y Zerbino *et al.* 2008), en un metagenoma desconocemos la contigüidad de estas secuencias al tratarse de fragmentos secuenciados al azar de decenas, cientos o miles de genomas de diferentes individuos. Así en metagenómica, se considera como contig a la secuencia de mayor tamaño que las *reads* obtenidas por secuenciación masiva y que es reconstruida tras la identificación de *reads* solapantes, su posterior alineamiento y la fusión de las mismas (Namiki *et al.* 2012).

C. PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS METAGENÓMICAS.

Para el procesamiento tanto de las secuencias obtenidas por secuenciación 454 como por las obtenidas en el ensamblaje de las secuencias de Illumina, se procedió de la misma forma siguiendo los siguientes pasos:

- Se enfrentan las secuencias, previamente filtradas, de los diferentes metagenomas a diferentes bases de datos (base de datos de subsistemas de “The SEED” y base de datos de Kegg Orthology del Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, también conocido como KEGG) usando el servidor web MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008), con un corte de máximo e-valor de 10^{-5} , un corte de identidad mínima del 60 % y una longitud mínima de alineamiento de 50 bp.
- El formato “table” del MG-RAST del archivo con las secuencias asociadas al metabolismo del nitrógeno se transformó al formato “STAMP” (en el caso de las secuencias enfrentadas a la base de datos KO se tuvo que eliminar la columna “id”) empleando para ello el propio programa informático STAMP (Parks y Beiko, 2010).
- Se compara la abundancia de secuencias para cada una de las funciones metabólicas y entre los diferentes sitios tomados dos a dos con el programa informático STAMP usando el test exacto de dos caras de Fisher con el intervalo de confianza de Newcombe-Wilson y la corrección de Storey FDR. En el caso de que los p-valores no se distribuyan uniformemente, se realiza de nuevo el análisis empleando la corrección de Benjamini-Hochberg FDR en lugar de la de Storey FDR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con todo este procesamiento se obtiene qué grupos funcionales y proteínas tienen diferencias significativas entre las distintas muestras en cuanto a su abundancia relativa. Para conocer algo más acerca de qué géneros tienen algún papel importante dentro del ciclo del nitrógeno se procedió de la siguiente forma:

- Se extraen a un archivo fasta y desde el servidor web MG-RAST todas las secuencias que dan homología con alguna función del metabolismo del nitrógeno de la base de datos KO.
- Utilizando el script de Ruby *blastxeador_fmt6_annotador_eliminando_repetidas.rb* se realiza un blastx frente a la base de datos nr, no teniendo en cuenta aquellas secuencias repetidas, y añadiendo la descripción del “subject”.
- Se ejecuta el script *elimina_repetidas_blast.rb* para eliminar los resultados redundantes del blastx debidos a cambios en el marco de lectura de la secuencia nucleotídica.
- Se ejecuta el script *listador_MGRast_genero.rb* para obtener una lista con el nombre de cada secuencia y la proteína y el género con el que dan mayor homología.
- Se ejecuta el script *matricea_desde_listado.rb* para obtener las matrices del número de secuencias de cada proteína y género para cada muestra.
- Se ejecuta el script *matricea_por_sitios.rb* para obtener la matriz del número de secuencias de cada género en cada muestra y la del número de secuencias de cada proteína en cada muestra.
- Se realiza un clústering jerárquico utilizando el “average linkage clustering” y la distancia euclídea de las matrices de abundancia de géneros y de abundancia de proteínas en cada muestra.
- De forma manual, se realizan las correspondientes matrices de abundancia de *phyla*.
- Se compara, dos a dos, la abundancia de géneros y de *phyla* entre muestras con el servidor web Metastats, dejando los valores por defecto, para ver qué géneros y *phyla* tienen abundancias significativamente distintas entre muestras.

RESULTADOS.

**CAPÍTULO 1: BACTERIAS DE SUELOS DE SIERRA NEVADA CAPACES DE
NODULAR *GENISTA VERSICOLOR*.**

El piornal, dominado por *Genista versicolor*, es una formación de porte arbustivo que se desarrolla a mayores altitudes que los robledales de Sierra Nevada, limitando con éstos en su límite superior. Además, se trata de una planta colonizadora capaz de favorecer la creación y el enriquecimiento del suelo, lo cual crea unas condiciones adecuadas para el establecimiento de otro tipo de formaciones vegetales, como pueden ser los robledales ubicados en el límite inferior del piornal. Es por ello que resulta interesante conocer qué bacterias son capaces de formar nódulos en *Genista versicolor* y, con ello, favorecer el crecimiento y desarrollo de la planta.

1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y EXPERIMENTOS DE NODULACIÓN.

A partir de suelos recogidos donde crece el piornal amarillo y utilizando individuos de la especie *Genista versicolor* como planta trampa, se obtuvieron un total de 212 nódulos a partir de 21 plantas crecidas durante de 2 meses. A partir de la siembra de las bacterias contenidas en el interior de estos nódulos se obtuvieron un total de 143 colonias. De estas colonias se tuvo que descartar algunas por diversas razones, siendo la mayoría de las cepas descartadas bacterias de rápido crecimiento sin capacidad de formar nódulos pero que se hallaron dentro de éstos, con un total de 55 cepas del género *Bacillus*, 1 del género *Micromonospora*, 1 del género *Micrococcus*, y 23 cepas de rápido crecimiento que no fueron estudiadas. Con algunas de las cepas de *Bacillus* se comprobó, mediante inoculación en plantas de *Genista*, que no son capaces de formar nódulos. Después de la secuenciación parcial del gen 16S *rRNA* se obtuvo un total de 63 cepas del género *Bradyrhizobium*, y de éstas se seleccionaron un total de 56, ya que el resto presentaban problemas a la hora de crecerlas en placa. La colección de aislados se caracterizó según diferentes técnicas moleculares (como se muestra en los siguientes apartados) y se establecieron 8 grupos según los análisis de RAPD fingerprinting. Una cepa representativa de cada uno de estos grupos se inoculó en 15 plantas de *G. versicolor* (cada cepa) con el objetivo de comprobar su capacidad de formar nódulos en condiciones de esterilidad. Las cepas que se emplearon fueron la GV115 para el grupo I de los RAPD, la GV137 para el grupo II, la GV102 para el grupo III, la GV159 para el grupo IV, la GV101 para el grupo V, la GV135 para el grupo VI, la GV104 para el grupo VII y la GV144 para el grupo VIII. Después de dos meses se observó que todas las cepas eran capaces de formar nódulos. Cada bacteria se aisló de nuevo del interior de los nódulos y se secuenció parcialmente el gen 16S *rRNA*. Los resultados muestran que todas las cepas aisladas tienen un 100 % de homología con la cepa inoculada (datos no mostrados). Por lo tanto, se puede concluir que estas bacterias aisladas son las responsables de la formación de nódulos en las raíces de *G. versicolor* y que no se obtuvieron de la ocupación de los nódulos formados por otras bacterias.

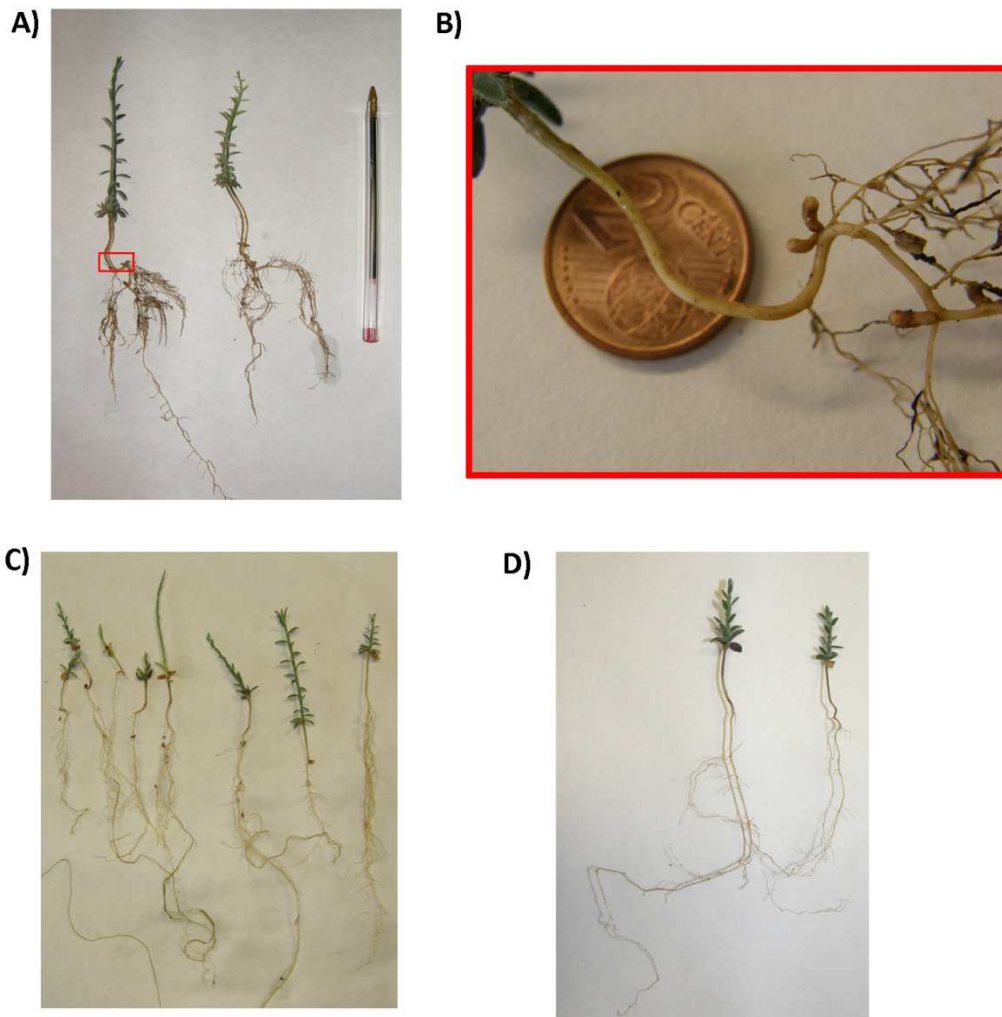


Figura 1-1. A) Plantas de *Genista versicolor* después de ser crecidas en macetas con suelo del piornal de Sierra Nevada. B) Detalle de algunos nódulos obtenidos. C) Plantas crecidas con inoculaciones de diferentes cepas de *Bradyrhizobium*, donde se observa la formación de nódulos. D) Plantas crecidas con inoculación de una cepa de *Bacillus*, donde no se observa la formación de nódulos.

2. ANÁLISIS DE RAPD FINGERPRINTING.

Las 57 cepas que fueron capaces de nodular plantas de *G. versicolor* se analizaron mediante la técnica de RAPD fingerprinting, lo cual permite la diferenciación de cepas dentro de una misma especie bacteriana proporcionando una estimación de la diversidad genética (Chahboune *et al.* 2012; Durán *et al.* 2013; Ramírez-Bahena *et al.* 2013). En un trabajo reciente (Ramírez-Bahena *et al.* 2013) se mostró que cepas del género *Bradyrhizobium* con más del 70 % de similitud en los análisis de patrones de RAPD muestran genes *atpD* y fragmentos ITS idénticos, por lo que en este trabajo se considera este valor de similitud como el valor de corte para seleccionar cepas para proceder con el resto de análisis de genes. Las cepas extraídas de *G. versicolor* se distribuyeron en 8 grupos con un porcentaje de similitud mayor al 70 % (Figura 1-2), de cada uno de los cuales se seleccionó una cepa representativa para emplearla en el análisis de marcadores filogenéticos. En el grupo I están las cepas GV110, GV111, GV115 y GV120, escogiéndose la GV115 como la representativa de este grupo. Los grupos II y III están formados por una única cepa cada uno, la GV137 en el grupo II y la GV102 en el III. El grupo IV está formado por dos cepas, la GV145 y la GV159, siendo ésta la que se ha elegido como representativa de este grupo para posteriores análisis. En el grupo V existen 10 cepas: GV101, GV112, GV113, GV114, GV118, GV119, GV120, GV129, GV130 y GV143; siendo la cepa GV101 la representativa de este grupo. El grupo VI está formado por las cepas GV135, GV142 y GV150, siendo la primera la representativa de este grupo. Dentro del grupo VII hay un total de 10 cepas: GV103, GV104, GV105, GV106, GV116, GV122, GV124, GV125, GV128 y GV134; siendo la cepa GV104 la representativa de este grupo. Por último está el grupo VIII, donde existen 9 cepas: GV140, GV141, GV144, GV147, GV148, GV149, GV151, GV152 y GV158; siendo la cepa GV144 la representativa de este grupo (Figura 1-2).

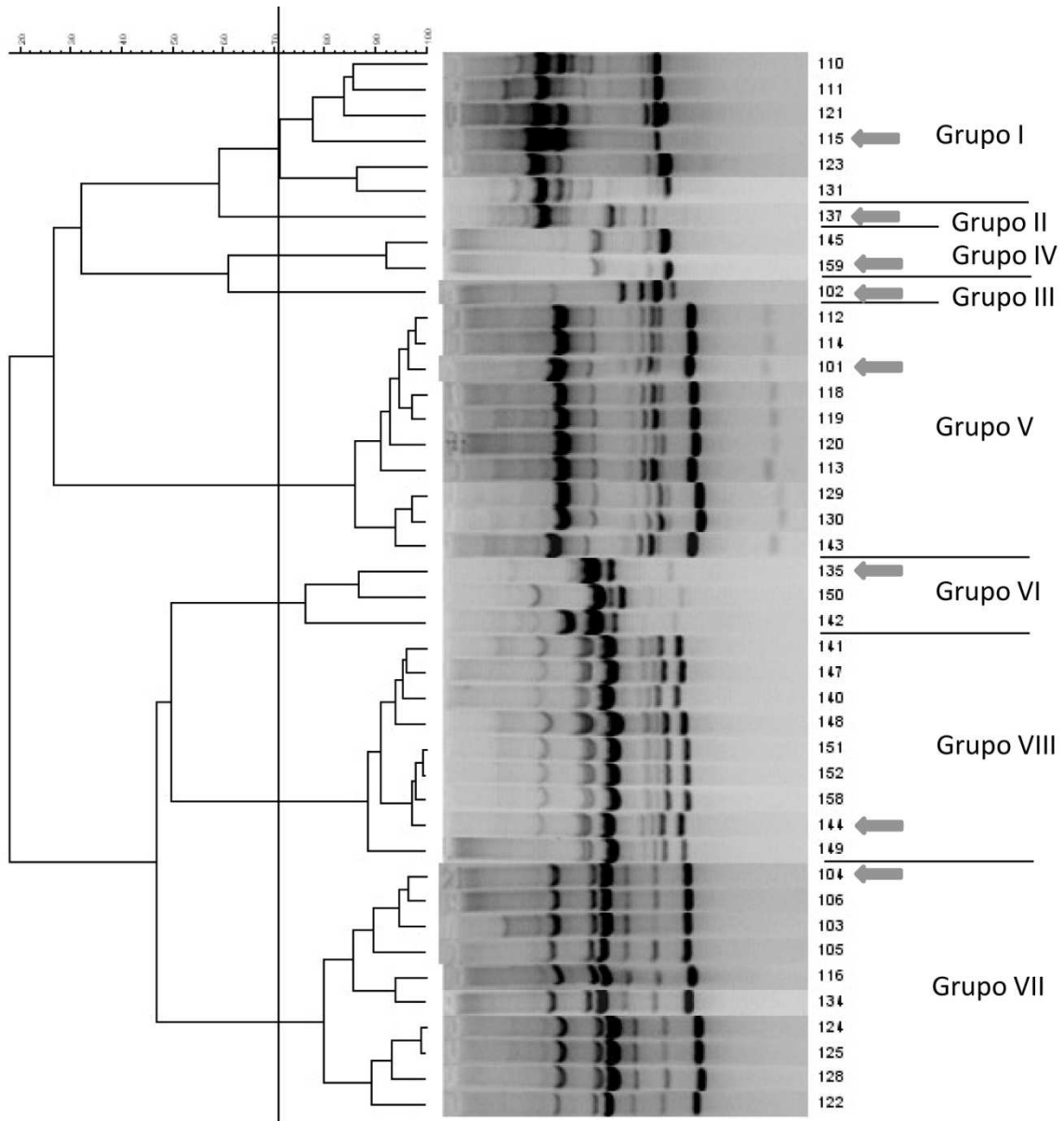


Figura 1-2. Dendrograma obtenido para las cepas aisladas de nódulos de *Genista versicolor* usando el coeficiente de Pearson y el análisis UPGMA de los perfiles de RAPD. Se indican los grupos obtenidos con el 70 % de similitud y con flecha gris se marca la cepa representante de cada grupo empleada en otros análisis moleculares.

3. ANÁLISIS DEL GEN RRS.

La actual clasificación de *Bradyrhizobium* está basada predominantemente en secuencias del gen *rrs*, por lo que la identificación de aislados de nódulos tiene que estar basada en este gen. Dentro del género *Bradyrhizobium* existen dos grupos bien diferenciados definidos según el gen *rrs* y el análisis de secuencias multi-locus, el grupo I y el grupo II (Menna *et al.*, 2009). El primero de ellos incluye a las especies *Bradyrhizobium japonicum*, *B. betae*, *B. liaoningense*, *B. canariense*, *B. yuanmingense* y *B. japonicum* USDA 110, mientras que en el segundo grupo tendríamos a las cepas relacionadas con *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76T, *B. pachyrhizi* PAC48T y *B. jicamae* PAC68T.

GV101	1	tttgat	tttggctcagagcgaacgctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgagcgggc
GV102	1
GV115	1
GV144	1
GV104	1
GV159	1	-----	.c.....ga.....gt.c.t.....
GV135	1ga.....gt.c.t.....
GV137	1
GV101	61	gtagcaatacgtcagcggcagacgggtgagtaacgcgtgggaacataccttttggttcgg	
GV102	61
GV115	61
GV144	61
GV104	61
GV159	55
GV135	61g.....
GV137	61	a.....t.....	g.....g.....
GV101	121	aacaacacagggaaacttgctgctaataaccggataagcccttacgggaaagatttatcgc	
GV102	121
GV115	121
GV144	121
GV104	121
GV159	115
GV135	121
GV137	121
GV101	181	cgaaagattggcccgcgtctgattagctagttggtgaggtaatggctcaccaaggcgacg	
GV102	181
GV115	181
GV144	181
GV104	181
GV159	175
GV135	181c.....ag.....ct.....
GV137	181c.....c.....
GV101	241	atcagtagctgggtctgagaggatgatcagccacattgggactgagacacggcccaaactc	
GV102	241
GV115	241
GV144	241
GV104	241
GV159	235
GV135	241
GV137	241

```

GV101 301 ctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgcaagcctgatccagccatgcc
GV102 301 .....
GV115 301 .....
GV144 301 .....g...c.....
GV104 301 .....
GV159 295 .....g...c.....
GV135 301 .....
GV137 301 .....

GV101 361 gcgtgagtgatgaaggccctagggttgtaaagctctttgtgcggaagataatgacggt
GV102 361 .....
GV115 361 .....
GV144 361 .....
GV104 361 .....
GV159 355 .....
GV135 361 .....
GV137 361 .....

GV101 421 accgcaagaataagccccggctaacttcgtgccagcagccggttaatacgaagggggct
GV102 421 .....
GV115 421 .....
GV144 421 .....
GV104 421 .....
GV159 415 .....
GV135 421 .....
GV137 421 .....

GV101 481 agcgttgctcgaatcactgggcgtaaagggtgcgtaggcgggtctttaagtcaaggggtg
GV102 481 .....
GV115 481 .....
GV144 481 .....
GV104 481 .....
GV159 475 .....
GV135 481 .....t.....
GV137 481 .....

GV101 541 aaatcctggagctcaactccagaactgccttgatactgaggatcttgagttcgggagag
GV102 541 .....
GV115 541 .....
GV144 541 .....a.....
GV104 541 .....
GV159 535 .....a.....
GV135 541 .....a.....c.....
GV137 541 .....a.....

GV101 601 gtgagtggaactgaggtgtagaggtaaattcgtagatattcgcaagaacaccagtggc
GV102 601 .....
GV115 601 .....
GV144 601 .....
GV104 601 .....
GV159 595 .....
GV135 601 .....
GV137 601 .....

GV101 661 gaaggcggctcactggccccgatactgacgctgaggcacgaaagcgtggggagcaaacagg
GV102 661 .....
GV115 661 .....
GV144 661 .....
GV104 661 .....
GV159 655 .....
GV135 661 .....g.....
GV137 661 .....

```

Resultados Capítulo 1

GV101	721	attagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgaatgccagccgttagtgggttact
GV102	721
GV115	721
GV144	721
GV104	721
GV159	715
GV135	721
GV137	721
GV101	781	cactagtggcgcagctaacgctttaagcattccgcctggggagtacggtcgcaagattaa
GV102	781
GV115	781
GV144	781
GV104	781
GV159	775
GV135	781
GV137	781
GV101	841	aactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggaggatgtggtttaattcgacgc
GV102	841
GV115	841
GV144	841
GV104	841
GV159	835
GV135	841
GV137	841
GV101	901	aacgcgcagaaccttaccagcccttgacatgtccaggaccggtcgc-----agagatg
GV102	901-----
GV115	901-----
GV144	901-----
GV104	901-----
GV159	895-----
GV135	901-----
GV137	901-c.....ggactcc.....c.
GV101	954	t-gaccttctcttcggagcctggaac---acaggtgctgcatggctgctcagctcgt
GV102	954	.-.....-----
GV115	954	.-.....-----
GV144	954	.-.....-----
GV104	954	.-.....-----
GV159	948	.-.....-----
GV135	954	.-.....-----
GV137	954	ga.tt...ag.....-c.ggag.....
GV101	1009	gtcgtgagatgttgggttaagtcccgcacagcgcgaacccccgtccttagttgctacca
GV102	1009
GV115	1009
GV144	1009
GV104	1009
GV159	1003
GV135	1009
GV137	1011
GV101	1069	tttagttgagcactctaaggagactgccggtgataagccgcgaggaaggtggggatgacg
GV102	1069
GV115	1069
GV144	1069
GV104	1069
GV159	1063
GV135	1069
GV137	1071

```

GV101 1129 tcaagtcctcatggcccttacgggctgggctacacacgtgctacaatggcggtgacaatg
GV102 1129 .....
GV115 1129 .....
GV144 1129 .....
GV104 1129 .....
GV159 1123 .....
GV135 1129 .....
GV137 1131 .....

GV101 1189 ggacgctaaggggcaacccttcgcaaactcaaaaagccgtctcagttcggattgggctc
GV102 1189 .....
GV115 1189 .....
GV144 1189 .....
GV104 1189 .....
GV159 1183 .....
GV135 1189 .....
GV137 1191 ...t.....g.....

GV101 1249 tgcaactcgagcccatgaagttggaatcgctagtaatcgtggatcagcacgccacgggta
GV102 1249 .....
GV115 1249 .....
GV144 1249 .....
GV104 1249 .....
GV159 1243 .....
GV135 1249 .....
GV137 1251 .....

GV101 1309 atacggtccccgggccttgtaacacaccgcccgtcacaccatgggagttgggtttacctgaa
GV102 1309 .....
GV115 1309 .....
GV144 1309 .....
GV104 1309 .....
GV159 1303 .....
GV135 1309 .....
GV137 1311 .....

GV101 1369 gacgggtgcgctaaccagcaatggaggcagccggccacggtagggtcagcgcactgggggta
GV102 1369 .....c...g.....
GV115 1369 .....c...g.....
GV144 1369 .....
GV104 1369 .....
GV159 1363 .....
GV135 1369 .....c...g.....
GV137 1371 .....c...g.....

GV101 1429 agtcgtaacaaggtaacc
GV102 1429 .....
GV115 1429 .....
GV144 1429 .....
GV104 1429 .....-
GV159 1423 .....
GV135 1423 -----
GV137 1431 .....

```

Figura 1-3. Alineamiento de las secuencias 16S rRNA de las cepas representativas de cada uno de los 8 grupos obtenidos según el análisis de perfiles RAPD.

Las cepas GV115, GV102, GV159, GV101, GV104 y GV144, que son las seleccionadas como representativas de los grupos I, III, IV, V, VII y VIII del análisis RAPD, respectivamente, pertenecen al grupo filogenético I del género *Bradyrhizobium*, según la clasificación realizada por Menna et al. 2009, y son muy cercanas (más del 99 % de identidad) a *B. canariense* (Figura 1-4), una especie capaz de formar nódulos en otras leguminosas de la tribu Genisteeae (Vinuesa et al. 2005a). La cepa GV135, representativa del grupo VI del RAPD, también pertenece al grupo I del género *Bradyrhizobium* y está filogenéticamente relacionada con las especies *B. cytisi* y *B. rifense* (Figura 1-4), aisladas de nódulos de *Cytisus villosus*, planta que también es de la tribu Genisteeae (Chahboune et al. 2011; Chahboune et al. 2012). Estos resultados contrastan con los que se obtuvieron en Kalita et al. (2010) con *Genista tinctoria* del Noreste de Europa, en la cual cepas relacionadas con *B. japonicum* sv *genistearum* BGA-1 (actualmente se ha propuesto el cambio de nomenclatura de *B. japonicum* por *B. diazoefficiens*, pero en el presente trabajo se va a mantener la primera de estas nomenclaturas por no generar posibles confusiones) son las que forman los nódulos de dicha planta.

La cepa GV137 pertenece al grupo II de *Bradyrhizobium* (Figura 1-4), en el cual también existe la especie *B. retamae*, descrita recientemente, que es capaz de formar nódulos en *Retama* spp., también perteneciente a la tribu Genisteeae (Guerrouj et al. 2013). Sin embargo, el gen *rrs* de esta cepa se relaciona fuertemente, con más del 99 % de identidad, con *B. jicamae*, una especie formadora de nódulos en *Pachyrhizus erosus*, una planta de la familia Fabaceae y de la tribu Phaseoleae que se encuentra en América (Ramírez-Bahena et al., 2009).

Por lo tanto, las secuencias del gen *rrs* de las cepas obtenidas en el presente trabajo tanto de los grupos I y II de la clasificación filogenética realizada con el gen *rss* (Menna et al. 2009) presentan unos valores de identidad superiores al 99% con respecto a las secuencias de especies de *Bradyrhizobium* descritas anteriormente (Tabla 1-1). Sin embargo, es habitual encontrar dentro del género *Bradyrhizobium* altas identidades en el gen *rrs* (hasta del 100 %) entre especies diferentes, por lo que resulta necesario emplear otros marcadores filogenéticos para clasificar taxonómicamente de forma adecuada los aislados a nivel de especie e incluso para detectar nuevas especies. Dentro de estos marcadores filogenéticos, los fragmentos ITS y el gen *atpD* han sido extensamente secuenciados en especies de *Bradyrhizobium*, permitiendo su diferenciación de especies capaces de formar nódulos en leguminosas de la tribu Genisteeae (Chahboune et al., 2011; 2012; Guerrouj et al., 2013; Kalita y Malek, 2010; Menna et al., 2009; Ramírez-Bahena et al., 2009; 2013; Rivas et al., 2004; Safronova et al., 2007; Velázquez et al., 2010; Vinuesa et al., 2005a; 2005b; Willems et al., 2003).

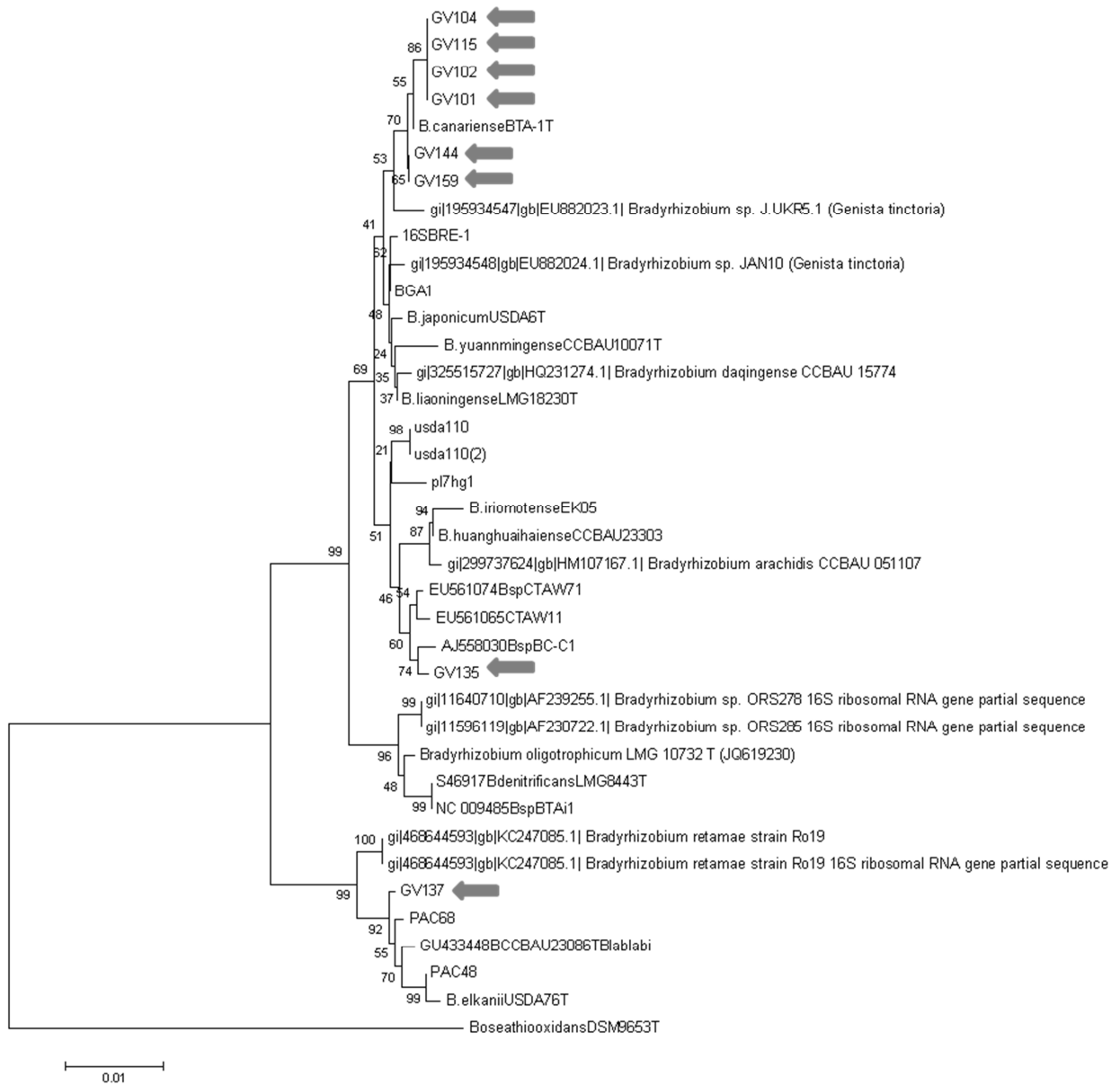


Figura 1-4. Árbol filogenético de Máxima Probabilidad basado en las secuencias del gen *rrs*, mostrando la afiliación taxonómica de las cepas representativas de cada uno de los grupos obtenidos en RAPD. Se ha utilizado *Bosea thiooxidans* como outgroup o raíz para realizar este árbol. Se indican los valores de bootstrap calculados para 1000 réplicas. La barra muestra la distancia de la sustitución 1 nucleótido de cada 100. Entre barras se dan los números de acceso para el Genbank.

Resultados Capítulo 1

Tabla 1-1. Resultado del blastn realizado con las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas representativas de cada uno de los grupos RAPD obtenidos.

Cepa	Grupo RAPD	Acc. Number	Subject	% de identidad	Longitud de alineamiento	mismatches/gaps	e-valor
GV115	I	KF483530	gi 309401317 gb GU306143.1	100,00	1359	0/0	0,0
GV137	II	KF483532	gi 260150830 gb GQ369129.1	100,00	1265	0/0	0,0
GV102	III	KF483528	gi 309401317 gb GU306143.1	100,00	1349	0/0	0,0
GV159	IV	KF483534	gi 164504778 gb EU333382.1	99,92	1290	1/0	0,0
GV101	V	KF483527	gi 186909137 gb EU420084.1	100,00	1349	0/0	0,0
GV135	VI	KF483531	gi 312285060 gb HQ233243.1	100,00	1342	0/0	0,0
GV104	VII	KF483529	gi 186909137 gb EU420084.1	100,00	1358	0/0	0,0
GV144	VIII	KF483533	gi 37693280 emb AJ558025.1	99,93	1359	1/0	0,0

Cepa	Grupo RAPD	Acc. Number	Descripción del Subject
GV115	I	KF483530	Bradyrhizobium canariense strain LL-6 16S ribosomal RNA and genes, partial sequence
GV137	II	KF483532	Bradyrhizobium sp. Z2-YC6861 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GV102	III	KF483528	Bradyrhizobium canariense strain LL-6 16S ribosomal RNA and genes, partial sequence
GV159	IV	KF483534	Bradyrhizobium japonicum isolate RLA12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GV101	V	KF483527	Bradyrhizobium canariense strain RS-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GV135	VI	KF483531	Bradyrhizobium sp. ISLU9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GV104	VII	KF483529	Bradyrhizobium canariense strain RS-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GV144	VIII	KF483533	Bradyrhizobium sp. BTA-1 partial 16S rRNA gene, strain BTA-1

4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS ITS.

Los análisis de las regiones ITS han sido empleados como una herramienta más potente para la demarcación de especies dentro del género *Bradyrhizobium* que el análisis del gen *rrs*, llegando a nivel de genespecies para secuencias ITS con más del 95,5 % de similitud (Willems *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2004). Menna *et al.* (2009) mostró que el análisis de ITS permite la diferenciación de dos grupos iguales a los obtenidos con el análisis del gen *rrs*, aunque cuando las especies *B. denitrificans* y *B. oligotrophicum* son considerados en este análisis se obtiene un tercer grupo, como fue señalado por Ramírez-Bahena *et al.* (2013). Este grupo no ha sido incluido en la figura 3 ya que su divergencia con los grupos I y II dificulta la visualización de diferencias internas dentro de estos dos grupos, aunque a este grupo pertenecen algunas cepas de *Bradyrhizobium* fotosintéticas, como la BTAi1, fuertemente relacionada con la especie *Bradyrhizobium denitrificans*.

Atendiendo a las secuencias ITS, las cepas GV115, GV102, GV101, GV104, representativas de los grupos de RAPD I, III, V y VII, respectivamente, se agrupan con *B. canariense* BTA-1^T (Fig. 1-5). Estas cepas están divididas en dos subgrupos muy cercanos, con identidades mayores al 98 % (gaps no considerados), que coinciden con los reportados por Safronova *et al.* (2007) dentro de *B. canariense*, los cuales se pueden diferenciar por la presencia de un inserto en las cepas del subgrupo ITS-I de *B. canariense*. Las cepas GV101 y GV104 pertenecen al subgrupo ITS-I y las cepas GV102 y GV115 al subgrupo ITS-II (Fig. 1-5). El subgrupo ITS-I está más extensamente representado en los nódulos de *G. versicolor* que el subgrupo ITS-II, como ocurre en otros hospedadores analizados previamente (Safronova *et al.* 2007, Velázquez *et al.* 2010).

Las cepas GV159 y GV144, representativas de los grupos de RAPD IV y VIII, respectivamente, están relacionadas con *B. canariense*, pero con identidades menores al 97% (Fig. 1-5), formando un segundo agrupamiento con el grupo I de *Bradyrhizobium*. A este grupo también pertenece la cepa GV135, la cual está relacionada con *B. iriomotense* EK05^T, aunque con menos del 95% de identidad en las secuencias de ITS (Fig. 1-5).

Finalmente, la cepa GV137 pertenece al grupo II dentro del género *Bradyrhizobium*, con menos del 92% de identidad con respecto a las cepas tipo del resto de especies de este grupo: *B. elkanii*, *B. pachyrhizi*, *B. jicamae*, *B. lablabi* y *B. retamae* (Fig. 1-5).

Por lo tanto, a pesar de la cercanía de los genes *rrs* de los aislados de *G. versicolor* con las especies de *Bradyrhizobium* actualmente descritas, el análisis de la región ITS sugiere que varios de estos aislados pueden representar algunas supuestas nuevas especies. Con el objetivo de confirmar estos resultados se analizó el gen *atpD*, cuya utilidad en la delimitación de especies de *Bradyrhizobium* ha sido bien establecida y analizada previamente en varias cepas aisladas de Genisteeae (Vinuesa *et al.*, 2005a; Vinuesa *et al.*, 2005b; Ramírez-Bahena *et al.*, 2009; Chahboune *et al.*, 2011; Chahboune *et al.*, 2012; Ramírez-Bahena *et al.*, 2013; Guerrouj *et al.*, 2013; Kalita y Malek, 2010; Menna *et al.*, 2009; Stepkowski *et al.*, 2007; Velázquez *et al.*, 2010).

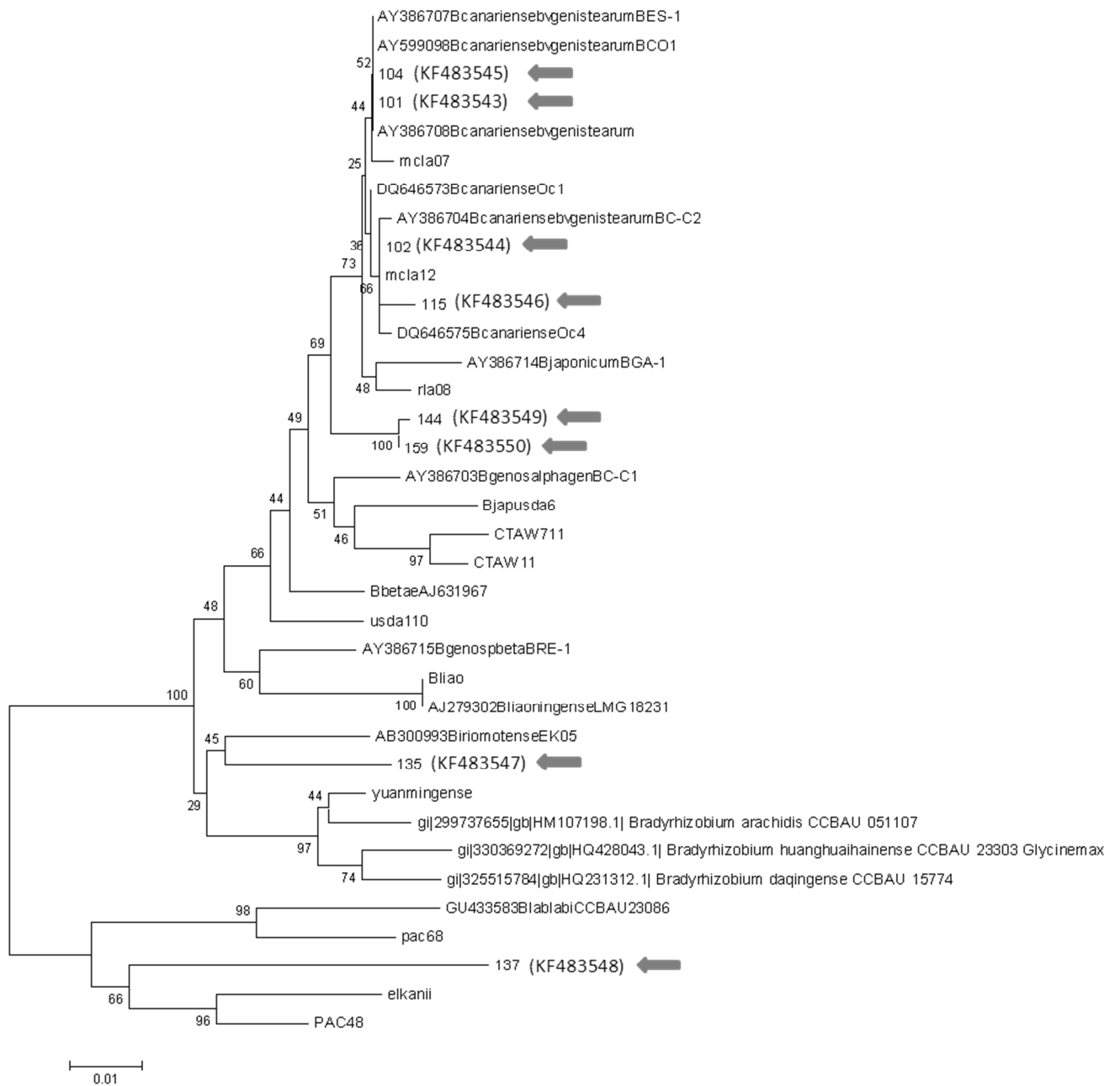


Figura 1-5. Árbol filogenético de Máxima Probabilidad basado en la secuencias del espacio intergénico de los genes 16S-23S *rRNA* (ITS) mostrando la afiliación taxonómica de las cepas representativas de cada uno de los grupos obtenidos en RAPD. Se indican los valores de bootstrap calculados para 1000 réplicas. La barra muestra la distancia de la sustitución 1 nucleótido de cada 100. Entre barras se dan los números de acceso para el Genbank.

5. ANÁLISIS DEL GEN *ATPD*.

El gen *atpD* es un gen “housekeeping” que ha sido secuenciado en todas las especies de *Bradyrhizobium* así como en dos cepas bacterianas aisladas de *Genista tinctoria* en Europa, JAN10 and JAN16 (Kalita y Malek, 2010). El análisis de este gen (Fig. 1-6) confirma que las cepas aisladas en este trabajo pertenecen a diferentes ramas divergentes de aquellas formadas por las cepas JAN10 y JAN16 que pertenecen a *B. japonicum* sv. *genistearum* y están estrechamente relacionadas con la cepa BGA-1, aislada de especies vegetales de la tribu Genisteeae en las Islas Canarias (Vinuesa *et al.* 2005).

Las cepas GV101, GV102 y GV104, las cuales tienen ligeras diferencias en las secuencias ITS, tienen genes *atpD* idénticos y se identifican con *B. canariense* con un 100 % de identidad (Fig. 1-6). Sin embargo, la cepa GV115, que también se agrupa con estas cepas aunque tiene una ITS ligeramente divergente, ocupa una posición intermedia entre *B. canariense* y *B. cytisi* con identidades menores al 98 y 97 %, respectivamente (Fig. 1-6).

Las cepas GV144 y GV159, las cuales muestran pequeñas diferencias en las secuencias de los fragmentos de ITS, tienen genes *atpD* idénticos que son filogenéticamente divergentes con respecto a las especies descritas del género *Bradyrhizobium* con identidades menores de 97 % (Fig. 1-6), aunque se agrupan con *B. japonicum* sv. *genistearum* BGA-1 aislado de las Islas Canarias (Vinuesa *et al.* 2005) y las cepas JAN10 y JAN16 aisladas de *Genista tinctoria* en Polonia (Kalita y Malek, 2010).

La cepa GV135 también es filogenéticamente divergente con identidades menores del 95 % con respecto al resto de especies de *Bradyrhizobium* (Fig. 1-6) y a otros aislados de *Genista* de España y Polonia, y se agrupa, como también se observó en el análisis de ITS, con *B. iriomotense* EK05^T, aislado en Japón de tumores de la planta fabácea *Entada koshunensis* (Islam *et al.*, 2008).

Finalmente, la cepa GV137, que pertenece al grupo II de *Bradyrhizobium*, es filogenéticamente divergente con respecto a las especies de este grupo con identidades menores del 93 % (Fig. 1-6), incluyendo *B. retamae*, un especie descrita recientemente que fue aislada también de una leguminosa de la tribu Genisteeae (Guerrouj *et al.*, 2013).

Estos resultados indican que algunas cepas con capacidad para formar nódulos en *G. versicolor* en el Parque Nacional de Sierra Nevada constituyen nuevos linajes dentro del género *Bradyrhizobium* y al menos GV135 y GV137 representan dos nuevas especies diferentes dentro de este género. Además, el análisis del gen *atpD* mostró que, en concordancia con el análisis del fragmento ITS, la cepa BTAi-1 pertenece a la especie *Bradyrhizobium denitificans* y, por lo tanto, el nombre de esta especie debería ser cambiado.

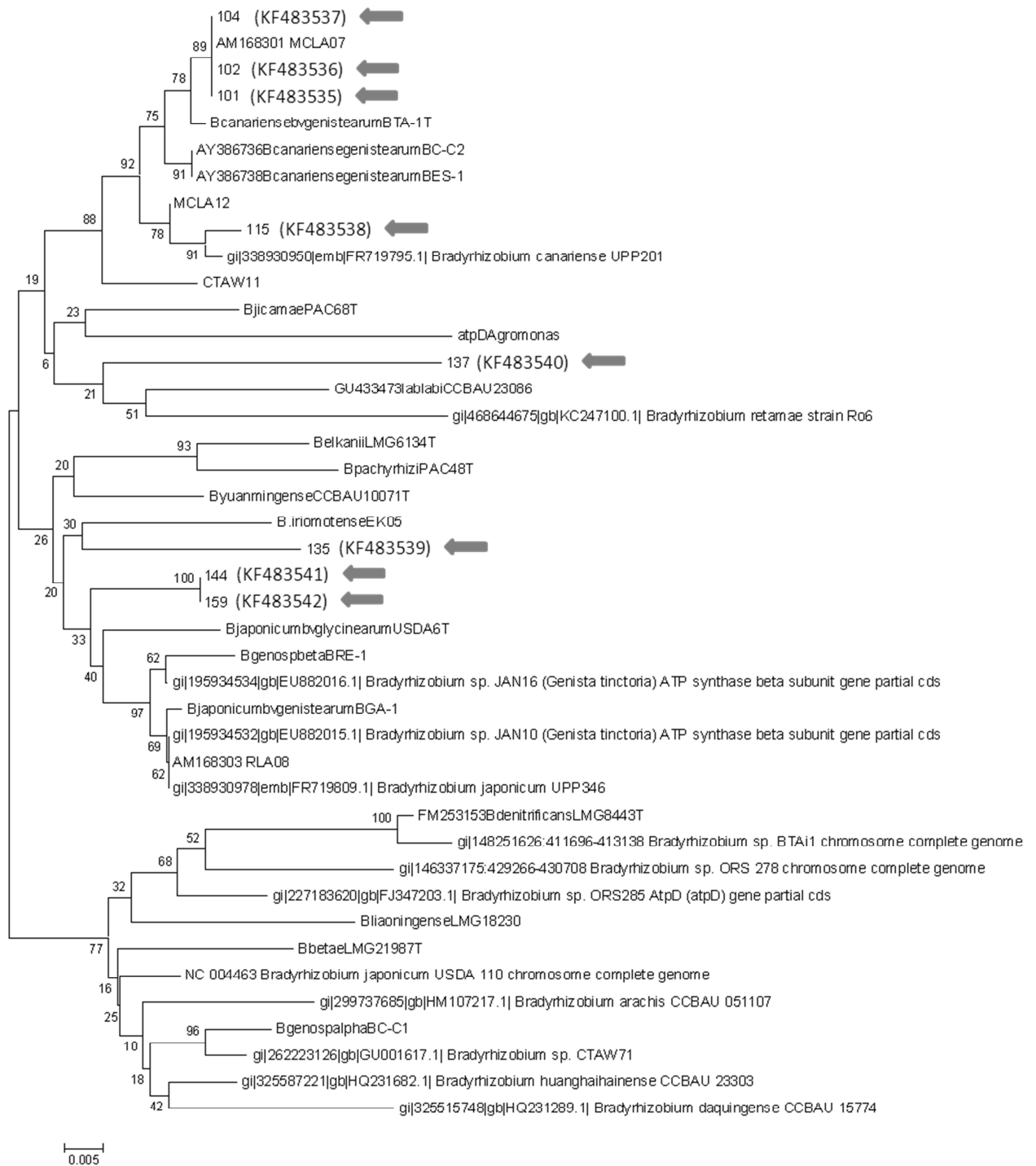


Figura 1-6. Árbol filogenético de Máxima Probabilidad basado en las secuencias del gen *atpD*, mostrando la afiliación taxonómica de las cepas representativas de cada uno de los grupos obtenidos en RAPD. Se indican los valores de bootstrap calculados para 1000 réplicas. La barra muestra la distancia de la sustitución de 5 nucleótidos de cada 1000. Entre barras se dan los números de acceso para el Genbank.

6. ANÁLISIS DE GENES SIMBIÓTICOS.

El gen *nodC* codifica una quitina sintasa implicada en la síntesis la N-acetil-glucosamina, que constituye el esqueleto básico de los factores de nodulación, por tanto este gen está relacionado con el rango de hospedador de rhizobia y con su grado de promiscuidad (Roche *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2000; Laguerre *et al.*, 2001), por lo que este gen se utiliza comúnmente para definir simbiovars (Vinuesa *et al.*, 2005; Rogel *et al.*, 2011; Guerrouj *et al.*, 2013). Los datos disponibles muestran que las cepas aisladas de *Genista* en el Noreste de Europa pertenecen al simbiovar *genistearum* (Kalita *et al.*, 2012), pero sus secuencias son muy pequeñas y por ello no han sido incluídas en nuestros análisis. El gen *nifH* codifica la dinitrogenasa reductasa del complejo nitrogenasa y, al igual que el gen *nodC*, normalmente existe como una copia única en las cepas de *Bradyrhizobium* cuyos genomas han sido secuenciados. El gen *nifH* ha sido encontrado en todas las cepas de *Bradyrhizobium* fotosintéticas, pero el gen *nodC* sólo ha sido localizado en la cepa ORS285 de los *bradyrhizobia* fotosintéticos.

Dentro de *Bradyrhizobium* actualmente hay descritos 3 simbiovars que sean capaces de formar nódulos en diferentes leguminosas y son claramente distinguibles en base a sus secuencias del gen *nodC* (Fig. 1-7). El simbiovar *glycinearum* fue definido por Vinuesa *et al.* (2005) a partir de cepas noduladoras de soja y en la actualidad este simbiovar está presente en varias especies formadoras de nódulos en esta leguminosa como *B. japonicum*, *B. huanghainense*, *B. daqingense* y la recientemente descrita *B. azotoefficiens*, cuya cepa tipo es USDA 110^T (Delamuta *et al.*, 2013). Los mismos autores definieron el simbiovar *genistearum* en cepas formadoras de nódulos en plantas de la tribu Genisteeae, en las cuales están presentes las especies *B. canariense*, *B. cytisi* y *B. rifense*. Recientemente el nuevo simbiovar *retamae* ha sido descrito para ubicar la cepa tipo de las especies *B. retamae* aisladas de *Retama monosperma* de la tribu Genisteeae (Guerrouj *et al.*, 2013).

El análisis del gen *nodC* muestra que todas las cepas del grupo I de *Bradyrhizobium* aisladas de *G. versicolor* pertenecen al mismo grupo filogenético, al que también pertenecen las cepas aisladas de otras especies vegetales de la tribu Genisteeae y corresponde al simbiovar *genistearum* (Fig. 1-7).

La cepa GV137, que pertenece al grupo II de *Bradyrhizobium*, pertenece a un nuevo linaje filogenético según la secuencia del gen *nodC*, con menos del 85 % de identidad en este gen con respecto al resto de simbiovars del género *Bradyrhizobium* (Fig. 1-7). Ya que los simbiovars actualmente descritos dentro de este género tienen identidades internas mayores al 92 % en el gen *nodC*, podemos concluir que la cepa GV137 representa un nuevo simbiovar en *Bradyrhizobium*. Sin embargo más cepas que pertenecen al mismo grupo filogenético son necesarias para definir un nuevo simbiovar.

El análisis del gen *nifH* muestra resultados congruentes con los del gen *nodC*, ya que las cepas obtenidas también se agrupan en dos grupos filogenéticamente divergentes, uno de ellos formado por las cepas del simbiovar *genistearum* y un segundo linaje formado por la cepa GV137 (Fig. 1-8). Las cepas del simbiovar *genistearum* (grupo I de *Bradyrhizobium*) forman una agrupamiento equivalente al que se forma en el análisis del gen *nodC*, aunque la cepa GV115 es la cepa más filogenéticamente divergente con un 94 % de identidad (Fig. 1-8). La cepa GV137, perteneciente al grupo II de *Bradyrhizobium*, es filogenéticamente divergente con el resto de especies del género *Bradyrhizobium*, con menos del 92 % de identidad (Fig. 1-8), lo cual está en consonancia con los resultados del gen *nodC*.

Por lo tanto, el análisis de dos genes simbióticos, *nodC* y *nifH*, muestra que las cepas aisladas de *G. versicolor* en este estudio pertenecen a dos simbiovares de *Bradyrhizobium*, uno de ellos corresponde, como es de esperar, al simbiovar *genistearum*, y el otro corresponde con un simbiovar no descrito anteriormente y que sólo se ha encontrado hasta la fecha en el Parque Nacional de Sierra Nevada. Considerando que *G. versicolor*, la planta hospedadora de la cual ha sido aislada este simbiovar por primera vez, es un endemismo de este Parque Nacional, se propone utilizar el nombre *sierranevadense* para este nuevo simbiovar, el cual es capaz de nodular especies de la tribu Genisteeae pero no *Gycine max* (ver más adelante), como ocurre con los simbiovares *genistearum* y *retamae* (Vinuesa *et al.* 2005; Guerrouj *et al.* 2013).

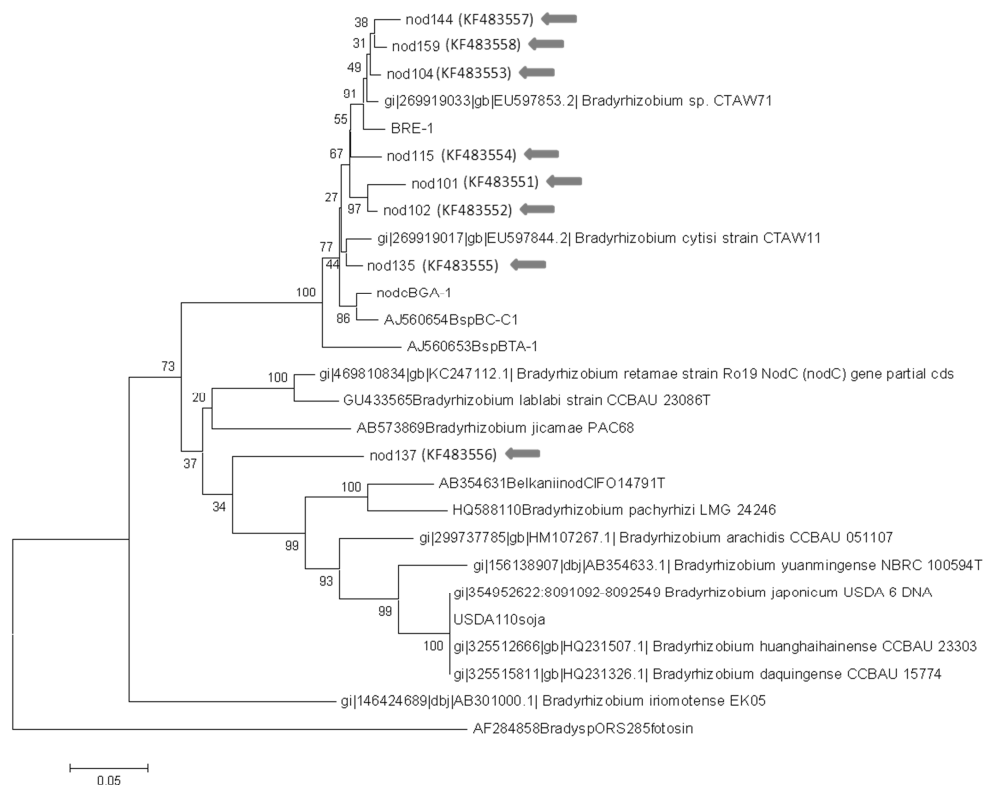


Figura 1-7. Árbol filogenético de Máxima Probabilidad basado en las secuencias del gen *nodC*, mostrando la posición de las cepas representativas de cada uno de los grupos obtenidos en RAPD. Se indican los valores de bootstrap calculados para 1000 réplicas. La barra muestra la distancia de la sustitución de 5 nucleótidos de cada 100. Entre barras se dan los números de acceso para el Genbank.

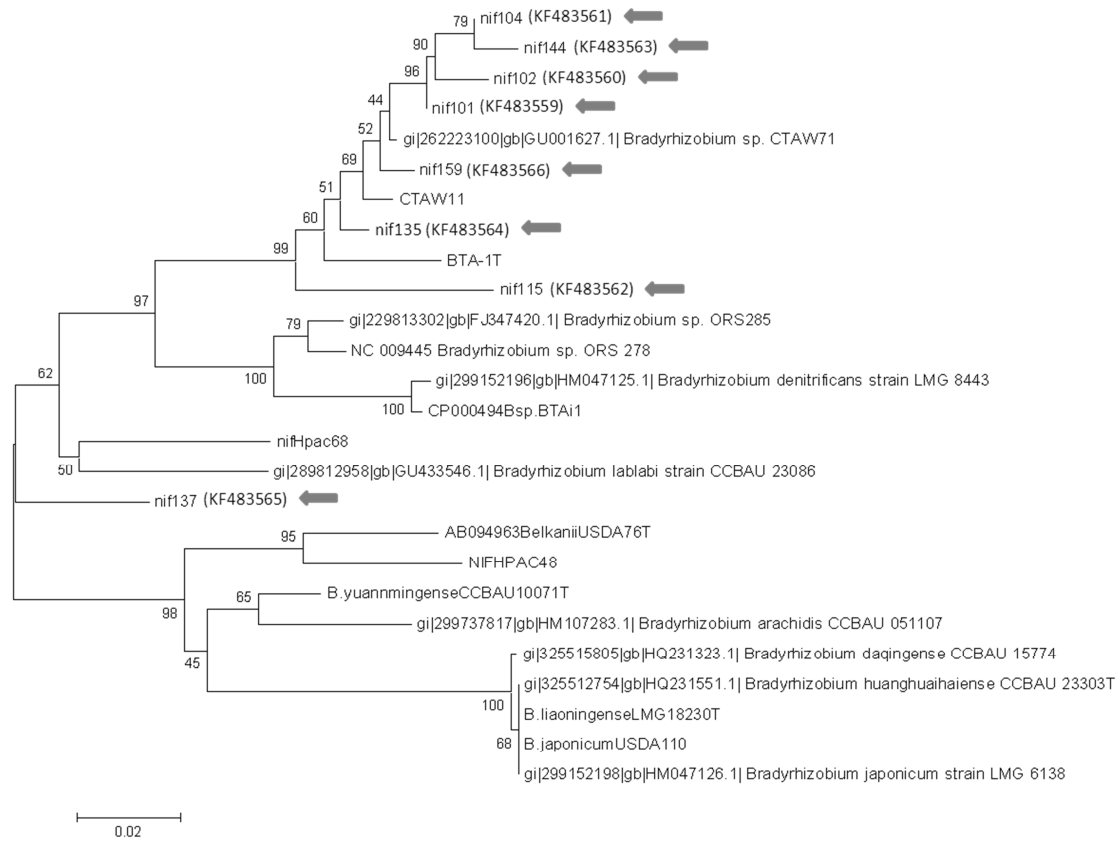


Figura 1-8. Árbol filogenético de Máxima Probabilidad basado en las secuencias del gen *nifH*, mostrando la posición de las cepas representativas de cada uno de los grupos obtenidos en RAPD. Se indican los valores de bootstrap calculados para 1000 réplicas. La barra muestra la distancia de la sustitución de 2 nucleótidos de cada 100. Entre barras se dan los números de acceso para el Genbank.

7. EXPERIMENTOS DE RANGO DE PLANTAS HOSPEDADORAS.

Los experimentos de rango de plantas hospedadoras se realizaron con las cepas GV 101, CV 135 y GV 137, por ser representantes de cada uno de los 3 grupos formados al analizar la secuencia parcial del gen *nodC*. Dos meses después de la inoculación de estas cepas en diferentes especies de plantas, se observó que las 3 son capaces de formar nódulos en individuos de las especies *Adenocarpus decorticans* (rascaviejas) y *Retama sphaerocarpa* (retama) (Fig. 1.9), pero ninguna de estas cepas fue capaz de nodular plantas de la especie *Glycine max* (soja).

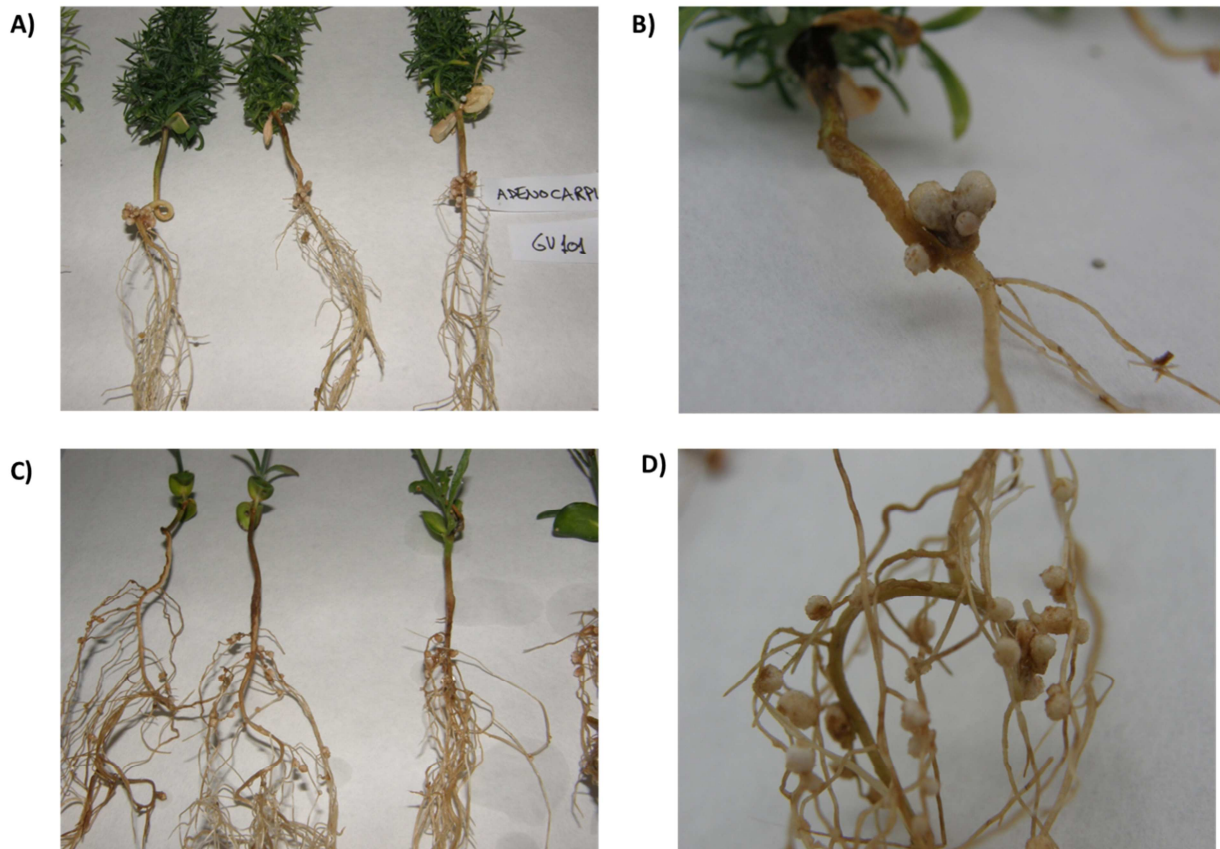


Figura 1.9. Plantas de *Adenocarpus decorticans* tras crecer inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium* GV101 (A) y detalle de los nódulos (B). Plantas de *Retama sphaerocarpa* tras crecer inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium* GV101 (C) y detalle de los nódulos (D).

Resultados Capítulo 1

En el caso de *Vigna unguiculata* (frijol cabecita negra) se observa cierta disparidad entre cepas. La cepa GV101 mostró capacidad de nodular dicha especie (Nod+) pero no se apreciaron caracteres fenotípicos asociados a la fijación de nitrógeno ya que los nódulos presentaban un color blanco (Fig. 1.11-A) y la planta tenía poco desarrollo y un color verde claro (Fig. 1.10), por lo que se consideró un fenotipo Fix-. Cuando se realizó la inoculación con la cepa GV135, el 8,3 % de las plantas mostraron un fenotipo Nod-, el 25 % de las plantas un fenotipo Nod+, Fix- (Fig. 1.11-B), y el resto de las plantas (un 66,7 %) mostraron un engrosamiento en las raíces que indica la existencia de una infección bacteriana pero sin formación de nódulo (Fig. 1.11-C). Y por último, la cepa GV137 mostró un fenotipo Nod- en plantas de *V. unguiculata* (Fig. 1.11-D).



Figura 1.10. Plantas de *Vigna unguiculata* crecidas tras ser inoculadas con la cepa GV101 de *Bradyrhizobium*.

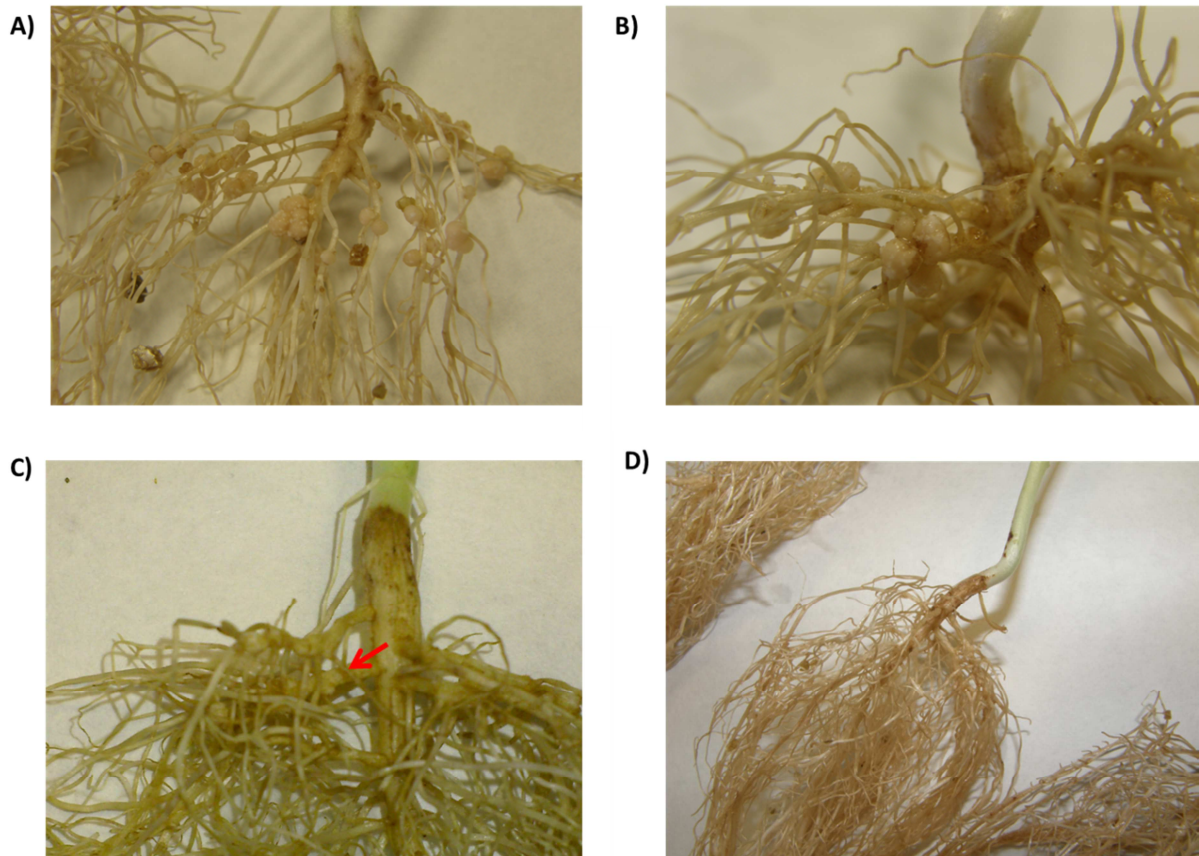


Figura 1.11. Detalle de los nódulos obtenidos en plantas de *Vigna unguiculata* tras crecer inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium* GV101 (A) y la cepa GV135 (B). Engrosamientos obtenidos al inocular la cepa GV135 (C) y raíces sin engrosamiento ni nódulos tras crecer inoculadas con la cepa GV137.

**CAPÍTULO 2.1: INFLUENCIA DE LA ESPECIE ARBÓREA EN LA ESTRUCTURA Y
COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS.**

La influencia de la especie arbórea en la estructura y composición de las comunidades diazotróficas del suelo se determinó analizando la rizosfera de roble (*Q. pyrenaica*) frente a la de encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*). Para ello se muestrearon robledales (CNA, CNB, CTR) y encinares (LJN, CTE) de Sierra Nevada a distintas altitudes y localizaciones geográficas.

1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS DE LAS ZONAS DE ESTUDIO.

Los suelos de las zonas de muestreo son suelos con textura de tipo franco, excepto CNB que es franco-arenoso (Tabla 2.1-1), y todos están clasificados como de tipo phaeozem háplico con origen silíceo. El pH es ligeramente ácido en el suelo de LNJ (6,1) mientras que en el resto de suelos el pH es neutro (Tabla 2.1-1), siendo los valores de pH de los suelos de la rizosfera de los robles de la cara sur (con valores de 7,2 y 7,1 en CNB y CNA respectivamente) más altos que los de los suelos en la rizosfera de encinas de la cara sur (LJN). Por su parte en la Dehesa del Camarate, ladera Norte de Sierra Nevada, no hay diferencias entre los valores de pH asociados a robles y encinas. Los valores de agua útil y contenido de materia orgánica son menores en CNB, con un 11,1 % de agua útil frente al 16,52 % - 20,01 % del resto de suelos, y un valor de 3,88 % de materia orgánica frente al 6,07 % - 9,24 % del resto de suelos (Tabla 2.1-1). Existen diferencias entre los suelos muestreados en los valores de nitrógeno total, siendo CTR con un 0,145 % de N total un suelo medianamente rico en nitrógeno, CNB con un 0,206 % un suelo rico y el resto de suelos son muy ricos en nitrógeno, con valores de 0,301 % a 0,427 % de N total (Tabla 2.1-1). La proporción C/N es muy elevada en CTR, con un valor de 36,62, mientras que no muestra diferencias entre el resto de suelos muestreados, donde existen valores de entre 10,82 y 11,97 (Tabla 2.1-1). El suelo de CNB muestra un valor bajo de fósforo asimilable, con 4 ppm, mientras que por otro lado CNA tiene un valor muy alto, con 27 ppm. El resto de suelos muestran valores medios de fósforo asimilable, con valores de 7 y 8 ppm (Tabla 2.1-1).

Tabla 2.1-1. Características físico-químicas de los suelos muestreados.

Parámetros	CTR	CNB	CNA	LJN	CTE
Arcilla (%)	24,1	16,35	22,25	21	21,7
Arena (%)	40,76	63,5	44,25	45,74	43,6
Limo (%)	35,44	20,15	33,5	33,26	34,7
Tipo de suelo	Franco	Franco-arenoso	Franco	Franco	Franco
pH (H ₂ O)	6,6	7,2	7,1	6,1	6,6
pH (ClK)	5,9	6,4	6,4	5,7	6
Agua útil (%)	17,14	11,1	16,52	17,11	20,01
Salinidad (mmhos/cm ³)	0,14	0,12	0,16	0,14	0,11
Materia Orgánica Total (%)	9,24	3,88	6,07	7,61	8,3
N total (%)	0,145	0,206	0,301	0,366	0,427
Proporción C/N	36,62	10,82	11,59	11,95	11,17
Fósforo asimilable (ppm)	8	4	27	8	7
Potasio asimilable (ppm)	355	205	365	445	265
Sodio (ppm)	0,065	0,052	0,61	0,06	0,05
Magnesio (ppm)	3,05	1,93	2,51	4,36	2,47
Calcio (%)	15,03	8,75	12,94	12,65	15,40
Hierro (ppm)	74	28	51	122	59

2. ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS.

Se obtuvieron un total de 256 secuencias parciales (~370 bp) del gen *nifH*, con al menos 50 secuencias para cada muestra. Este número de clones secuenciados fue suficiente para obtener una representación de la diversidad del gen *nifH*, según las curvas de rarefacción (Fig. 2.1-1) y el índice de cobertura obtenido, que va desde un 71 % en CTR a un 88 % en CTE (Tabla 2.1-2).

Tabla 2.1-2. Índice de cobertura de Good de las librerías génicas del gen *nifH*.

Muestra	CTR	CNB	CNA	LJN	CTE
Cobertura (%)	71,15	78,43	78,85	84,00	88,24

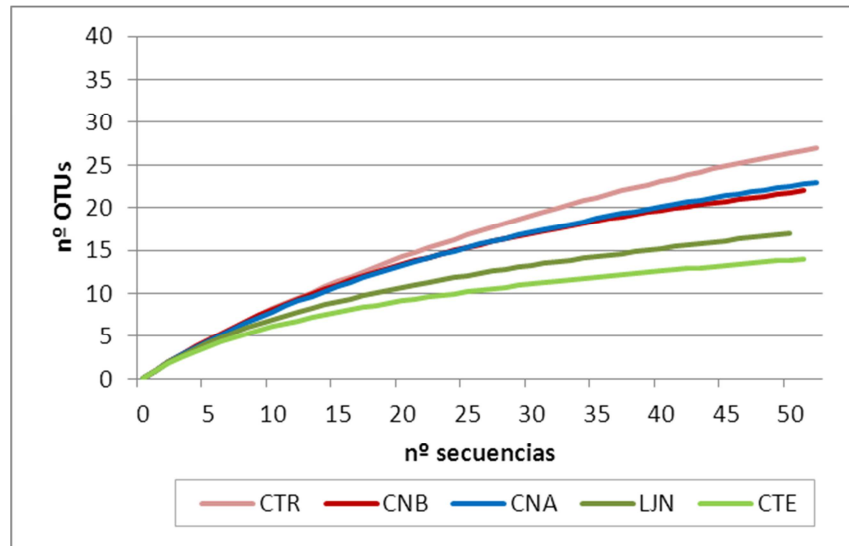
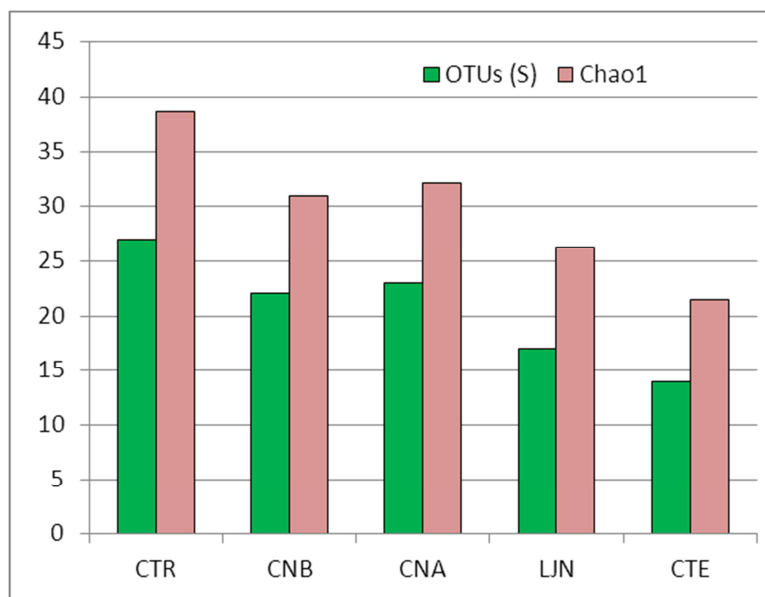


Figura 2.1-1. Curvas de rarefacción de las librerías génicas del gen *nifH*.

Existen diferencias en los valores de los índices de riqueza y diversidad entre las muestras de la rizosfera de bosques de robles (CNA, CNB y CTR) y las de bosques de encinas (LJA y CTE), existiendo también diferencias dentro de cada tipo de bosque según la orientación de la ladera. Por un lado los suelos de robles poseen mayores valores de riqueza, riqueza estimada según el índice de Chao1, diversidad según el índice de Shannon y equidad según el índice de Pielou que los suelos de encinas. Pero dentro de los suelos de robles el que está situado en la cara norte posee los mayores valores, con una riqueza de 27 OTUs (frente a los 22 y 23 OTUs de CNB y CNA, respectivamente), una estimación de riqueza de 38,67 OTUs (frente a 31 y 32,17 OTUs de CNB y CNA, respectivamente) y un índice de Shannon de 3,01 (ligeramente superior al de CNB y CNA, con valores de 2,88 y 2,84 respectivamente) (Fig. 2.1-2). En cuanto al índice de Pielou, en suelos de robles se observan unos valores de en torno a 0,92 mientras que en suelos de encinas tiene un valor de 0,87 en LJA y 0,82 en CTE (Fig. 2.1-2). Esta diferencia entre LJA y CTE también se observa en el resto de parámetros de riqueza y diversidad, siendo siempre el menor valor el de CTE, con una riqueza de 14 OTUs frente a 17 OTUs en LJA y al menos 22 OTUs en robles; una riqueza estimada de 21,5 OTUs frente a 26,33 OTUs en LJA y al menos 31 OTUs en robles; y un índice de Shannon de 2,17 frente a 2,48 en LJA y al menos 2,84 en robles (Fig. 2.1-2).

A)



B)

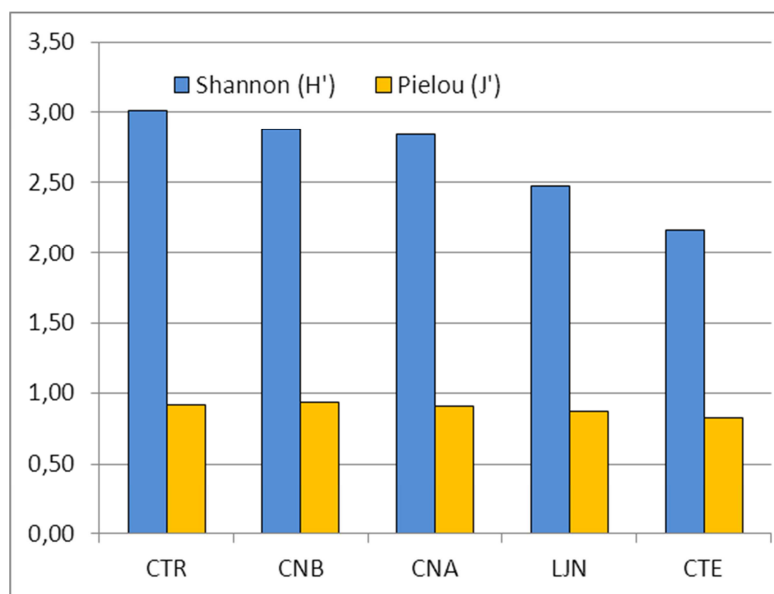


Figura 2.1-2 . A) Riqueza observada y estimada (por el índice de Chao1) de OTUs del gen *nifH* para cada una de las muestras. B) Índice de diversidad de Shannon e índice de equidad de Pielou de las librerías génicas del gen *nifH*. OTUs está definido con un 93 % de corte de similitud. OTUs, unidad taxonómica operativa.

Estos valores de riqueza y diversidad están fuertemente relacionados con el contenido de nitrógeno total del suelo, existiendo una correlación negativa entre el valor de nitrógeno total y los valores de número de OTUs, índice de Shannon e índice de Pielou, con valores de correlación mayores al 76 % (Fig. 2.1-3). Con el resto de parámetros físico-químicos analizados no se ha hallado ninguna correlación.

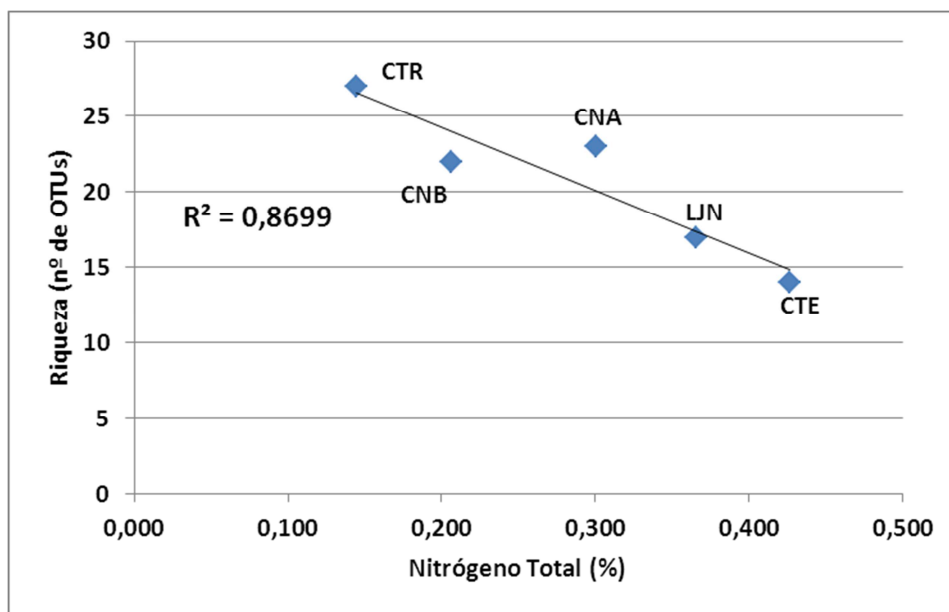


Figura 2.1-3. Línea de correlación entre nitrógeno total y número de OTUs en las diferentes muestras.

Al aplicar el análisis estadístico de Libshuff se obtiene que todas las muestras son poblaciones independientes y diferentes entre sí. Estas diferencias entre las comunidades microbianas fijadoras de nitrógeno en suelos de encinares y suelos de robledales se ve claramente reflejada en el análisis de Clústering Jerárquico Aglomerativo de la abundancia de OTUs, realizado con las secuencias aminoacídicas. Este análisis muestra que las dos comunidades más similares son las de robles de la cara Sur (CNA y CNB), con un 17 % de distancia. A estas dos muestras se agrupa el otro suelo de robles, el de la cara Norte (CTR), con un 18,64 % de distancia. Tras este se agrupa el suelo de encinas de la cara sur (LNJ) con un 20,55 % de distancia y por último está el suelo de encinas de la cara norte (CTE) con un 23,2 % de distancia (Fig. 2.1-4).

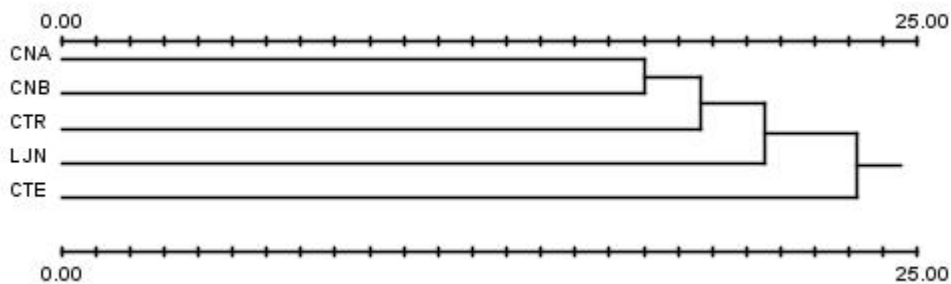


Figura 2.1-4. Clústering jerárquico aglomerativo usando la matriz de distancia euclídea y el algoritmo UPGMA para las secuencias aminoacídicas de NifH obtenidas a partir de las librerías génicas. Análisis realizado con respecto a la abundancia relativa de cada OTU. OTUs definidos con un corte de un 93% de similitud de secuencia.

El análisis de la homología de secuencias de NifH muestra que la mayoría de las secuencias pertenecen a los *phyla* Proteobacteria, Firmicutes y Cyanobacteria, para todas las muestras, formando al menos el 92,16 % del total de secuencias del gen *nifH* obtenidas. La muestra del robledal de la zona baja (CNB) presenta una menor dominancia a nivel de *phylum*, y tiene como grupo mayoritario el *phylum* Cyanobacteria, con un 35,29 % de abundancia relativa, seguido por los *phyla* Proteobacteria y Firmicutes con un 33,33% y un 23,53% de abundancia relativa, respectivamente (Fig. 2.1-5). En el resto de muestras el *phylum* mayoritario es Proteobacteria, con abundancias de 52,94 % en CTE a 94,00 % en LJN, siendo el segundo en abundancia el *phylum* Firmicutes, con abundancias de 4,00 % en LJN a 43,14% en CTE, siendo en esta última muestra donde los dos grupos mayoritarios tienen una abundancia relativa más similar. (Fig. 2.1-5).

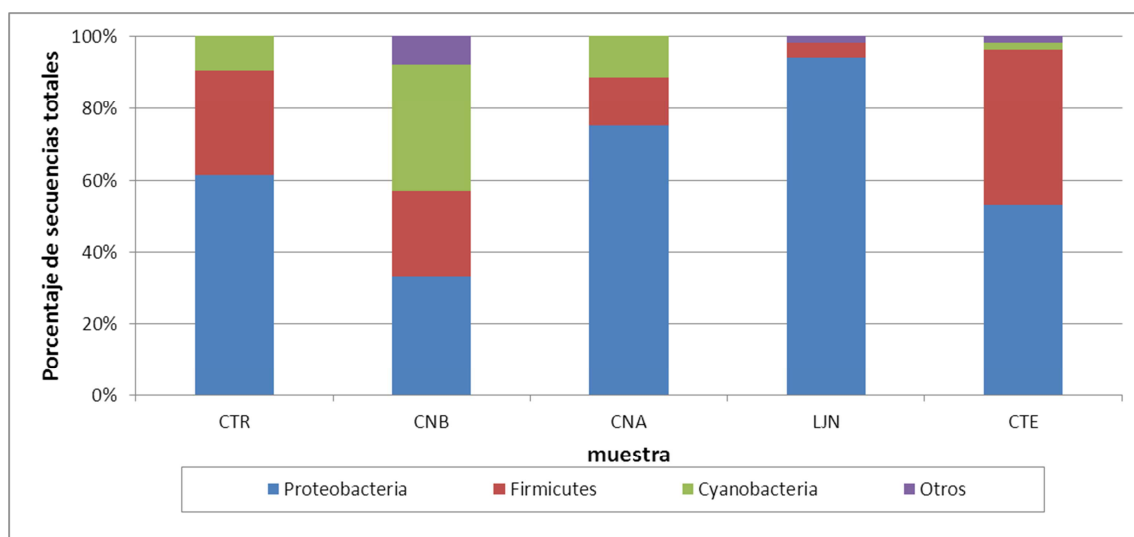


Figura 2.1-5. Distribución de *phyla* en los diferentes ecosistemas según la homología de las secuencias de NifH.

RESULTADOS Capítulo 2

El análisis detallado de la homología de las secuencias de *nifH* a nivel de género muestra que el género *Methylobacterium* es el único género mayoritario en el robledal de la zona alta (CNA), con un 28,85 % del total de secuencias, siendo este género también el más abundante en el encinar de la cara Sur (LJN), con un 24,00 % del total de secuencias (Tabla 2.1-3). La muestra del robledal de la zona baja (CNB) tiene a la Cyanobacteria *Nostoc* como el género más abundante, con un 27,45 % del total de secuencias, seguido por el Firmicutes *Paenibacillus*, con un 13,73 % (Tabla 2.1-3). En la muestra del robledal de la cara Norte (CTR) los géneros más abundantes son la β -Proteobacteria *Geobacter* y el Firmicutes *Pelosinus*, con un 28,85 % y un 21,15 % del total de secuencias respectivamente. En CTE el género *Paenibacillus* es, con un 33,33 % del total secuencias, el más abundante (Tabla 2.1-3).

Tabla 2.1-3. Clasificación taxonómica de las secuencias del gen *nifH*.

Phyla	Genus	CTR	CNB	CNA	LJN	CTE
α -Proteobacteria	Azospirillum	0	3,92	3,85	18,00	5,88
	Bradyrhizobium	5,77	5,88	9,62	14,00	1,96
	Rhodopseudomonas	3,85	1,96	7,69	14,00	11,76
	Rhizobium	0	1,96	11,54	0	5,88
	Ensifer	0	3,92	0	0	1,96
	Methylobacterium	0	5,88	28,85	24,00	11,76
	Zymomonas	0	0	1,92	2,00	0
	Azorhizobium	0	3,92	0	2,00	0
	Amorphomonas	0	1,96	0	0	0
	Methylocella	1,92	0	0	0	0
	Rhodocista	0	0	0	0	1,96
	Skermanella	0	0	0	4,00	0
	Sphingomonas	0	0	0	0	7,84
	Pseudomonas	0	0	0	0	1,96
	Phaeospirillum	0	0	5,77	0	0
Sinorhizobium	3,85	0	0	0	0	
β -Proteobacteria	Burkholderia	1,92	0	0	0	0
	Geobacter	28,85	1,96	5,77	14,00	0
	Dechloromonas	1,92	0	0	0	0
	Cupriavidus	0	0	0	2,00	1,96
δ -Proteobacteria	Pelobacter	9,62	0	0	0	0
γ -Proteobacteria	Methylococcus	3,85	0	0	0	0
	Thiorhodovibrio	0	1,96	0	0	0
Cyanobacteria	Nodularia	1,92	7,84	0	0	0
	Nostoc	7,69	27,45	11,54	0	1,96
Firmicutes	Paenibacillus	3,85	13,73	0	2,00	33,33
	Clostridium	3,85	7,84	7,69	2,00	9,80
	Syntrophobotulus	0	1,96	3,85	0	0
	Pelosinus	21,15	0	0	0	0
	Heliobacterium	0	0	1,92	0	0
Actinobacteria	Arthrobacter	0	0	0	2,00	0
	Kocuria	0	0	0	0	1,96
Spirochaetes	Treponema	0	7,84	0	0	0

En cuanto a los géneros que abundan de manera significativamente diferente entre las muestras de suelos rizosféricos de robles y de encinas, según el análisis con *Metastat* (Ver tabla 2.1-4), se observa que en el robledal de la ladera Norte (CTR) las secuencias del género *Pelosinus* son más abundantes en estos suelos rizosféricos que en suelos rizosféricos de encinas (CTE y LJN), y las del género *Geobacter* abundan más en robledales de la cara Norte (CTR) que en encinares de la cara Norte (CTE). Con respecto a los robledales de la cara sur, se observa que el género *Nostoc* es más abundante en estos suelos (CNA y CNB) con respecto al suelo del encinar de la cara sur (LJN), y en el caso de la muestra de la zona baja del robledal (CNB) también tiene una mayor abundancia de secuencias de este género con respecto a la muestra del encinar de la cara norte (CTE). Aparte de la citada abundancia del género *Nostoc* en robledales de la cara sur, las diferencias entre encinas de la ladera sur y robledales de ambas laderas vienen determinadas por la mayor abundancia del género *Azospirillum* en el encinar de la cara sur (LJN) y del género *Paenibacillus* en el encinar de la cara norte (CTE) con respecto a las diferentes muestras de suelos rizosféricos de robles (CNA, CNB y CTR). También se observan algunas diferencias más entre el encinar de la cara sur (LJN) y la zona baja del robledal de la cara sur (CNB), donde el número de secuencias de los géneros *Rhodopseudomonas* y *Geobacter* son significativamente más abundantes en el encinar (LJN), mientras que el género *Rhizobium* es más abundante en la zona alta del robledal (CNA) con respecto al encinar de la cara Sur (LJN). Las secuencias asociadas al género *Methylobacterium* son más abundantes en la zona baja del robledal (CNA) con respecto al encinar de la ladera norte (CTE), mientras que es más abundante en la muestra del encinar de la ladera norte (CTE) con respecto al robledal de la ladera norte (CTR) y también abunda más en el encinar de la ladera Sur (LJN) con respecto a la parte baja del robledal de la ladera sur (CNB) y al robledal de la ladera norte (CTR).

Tabla 2.1-4. Géneros con abundancia significativamente diferente entre muestras, según el análisis realizado con *Metastat*. El color del nombre se corresponde con el color de la muestra en la cual es más abundante.

	CTE	LJN
CNB	<i>Paenibacillus</i> <i>Nostoc</i>	<i>Azospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Geobacter</i> <i>Nostoc</i>
CNA	<i>Paenibacillus</i> <i>Methylobacterium</i>	<i>Azospirillum</i> <i>Rhizobium</i> <i>Nostoc</i>
CTR	<i>Methylobacterium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Geobacter</i> <i>Pelosinus</i>	<i>Azospirillum</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Pelosinus</i>

CAPÍTULO 2.2: EFECTO DE UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE ROBLE MELOJO (*Q. PYRENAICA* WILLD.).

La influencia del gradiente altitudinal en la composición de las comunidades diazotróficas se determinó analizando la rizosfera de robles a 3 altitudes distintas: 1.482 m sobre el nivel del mar (CNB), 1.823 m (CNA) y 1.945 m (CNX), muestreada en la primavera del año 2008. En la última altitud también se muestreo el suelo suelto (CNR) ya que los robles aparecen como pies aislados y las comunidades de microorganismos pueden ser más diferentes que en los 3 casos anteriores.

1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS DE LAS ZONAS DE ESTUDIO.

Los suelos de las zonas de muestreo tienen una textura de tipo franco-arenoso, excepto CNA que es franco, y todos están clasificados como de tipo phaeozem háplico con origen silíceo. El pH es ligeramente ácido en los suelos que no pertenecen a muestras de rizosfera de bosques (6,6 en CNX y 6,2 en CNR) mientras que en los suelos rizosféricos de bosques el pH es neutro (7,1 en CNA y 7,2 en CNB) (Tabla 2.2-1). Los valores de agua útil y contenido de materia orgánica son mayores en CNA, con un 16,52 % de agua útil frente al 10,39-13,25 % del resto de suelos (Tabla 2.2-1). Un valor de 6,07 % de materia orgánica en CNA es bajo, pero es aún menor en los demás suelos (de 3,44 % en CNR a 3,88 % en CNB) (Tabla 2.2-1). No existen diferencias significativas en los valores de nitrógeno total entre los suelos muestreados, pero la proporción C/N es significativamente menor en los suelos sin bosque, con valores de 7,87 y 7,66 para CNX y CNR respectivamente, mientras que CNA y CNB tienen valores de 11,59 y 10,82 respectivamente (Tabla 2.2-1). Los suelos de CNA y CNX muestran valores de fósforo asimilable de 27 y 20 ppm, mucho más altos que en los demás suelos, que tienen 4 y 6 ppm para CNB y CNR respectivamente (Tabla 2.2-1).

Tabla 2.2-1. Características físico-químicas de los suelos muestreados.

Parámetros	CNB	CNA	CNX	CNR
Arcilla (%)	16.35	22.25	11,75	13,7
Arena (%)	63.50	44.25	62,44	54,53
Limo (%)	20.15	33.50	25,81	31,77
Tipo de suelo	Franco-arenoso	Franco	Franco-arenoso	Franco-arenoso
pH (H ₂ O)	7.2	7.1	6,6	6,2
pH (ClK)	6.4	6.4	5,8	5,4
Agua útil (%)	11.10	16.52	10,39	13,25
Salinidad (mmhos/cm ³)	0.12	0.16	0,07	0,046
Materia Orgánica Total (%)	3.88	6.07	3,82	3,44
N Total (%)	0.206	0.301	0,279	0,258
Proporción C/N	10,82	11,59	7,87	7,66
Fósforo asimilable (ppm)	4	27	20	6
Potasio asimilable (ppm)	205	365	205	90
Sodio (ppm)	0.052	0.610	0,043	0,13
Magnesio (ppm)	1,933	2,508	1,283	0,623
Calcio (%)	8,748	12,939	6,942	4,35
Hierro (ppm)	28	51	37	29

2. ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS.

Se obtuvieron un total de 211 secuencias parciales (370 bp) del gen *nifH*, con al menos 51 secuencias para cada muestra. Este número de clones secuenciados fue suficiente para obtener una representación de la diversidad del gen *nifH*, según las curvas de rarefacción (Figura 2.2-1) y el índice de cobertura obtenido, que va desde un 78 % en CNA y CNB a un 91 % en CNR y CNX (Tabla 2.2-2).

Tabla 2.2-2. Índice de cobertura de Good de las librerías génicas del gen *nifH*.

Muestra	CNB	CNA	CNX	CNR
Cobertura (%)	78,43	78,85	90,91	90,57

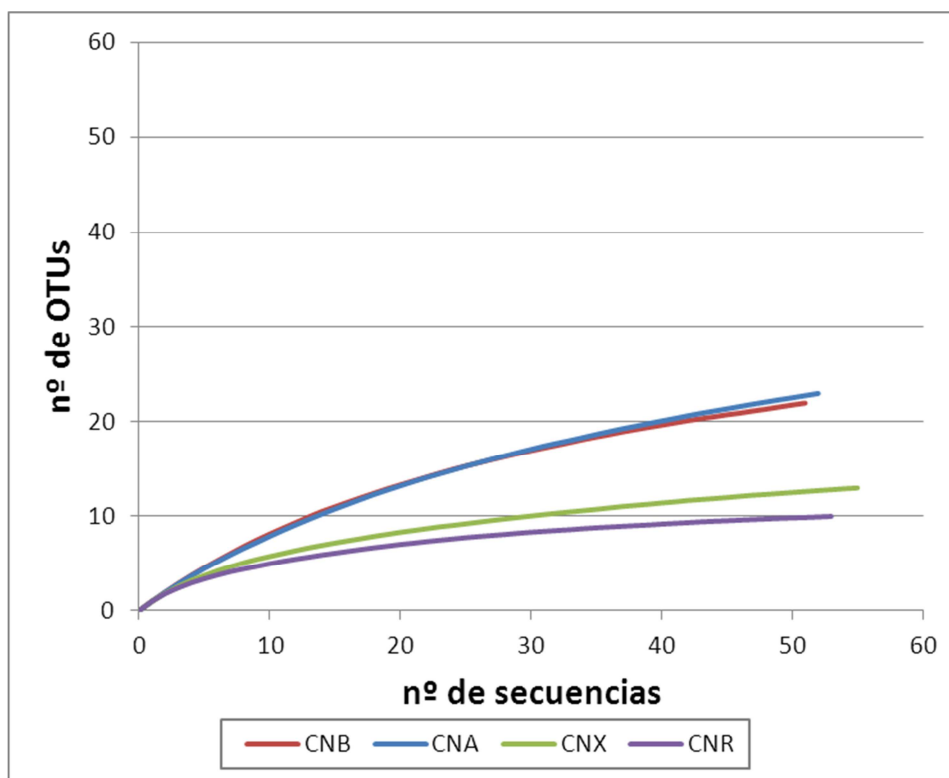
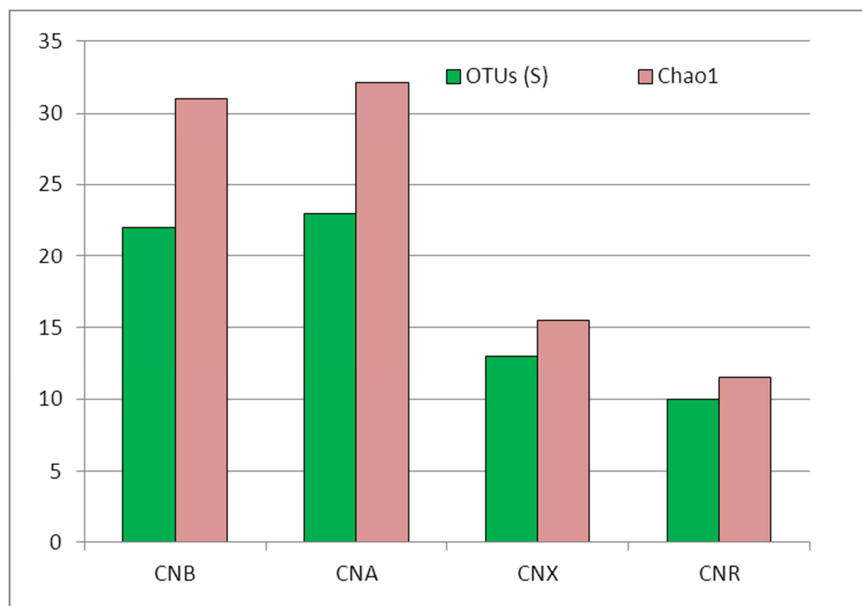


Figura 2.2-1. Curvas de rarefacción de las librerías génicas del gen *nifH*.

Existen diferencias en los valores de los índices de riqueza y diversidad entre las muestras de bosques de robles (CNA y CNB) y el resto de muestras (CNR y CNX). La muestra sin presencia de robles (CNR) tiene el menor número de OTUs, con un valor de 10 para el 93 % de similitud de secuencia nucleotídica, seguida de la muestra que tiene presencia de robles pero que no forma bosques (CNX), con 13 OTUs (Fig. 2.2-2) Por otro lado, hay 23 y 22 OTUs en CNA y CNB respectivamente, que son las muestras que sí forman robledales. Algo similar se observa en el índice de riqueza de Chao1, el cual estima 11,5 y 15,5 OTUs para CNR y CNX respectivamente, mientras que para las muestras de bosques

estima un mayor número de OTUs, con 32 y 31 OTUs para CNA y CNB, respectivamente (Fig. 2.2-2). El índice de diversidad de Shannon también tiene valores mayores en las muestras de suelos de bosques, con valores de 2,84 y 2,88 para CNA y CNB respectivamente, mientras que para CNX y CNR tiene valores de 2,08 y 1,78 (Fig. 2.2-2). Algo similar ocurre con los valores del índice de equidad de Pielou, que tiene mayores valores en suelos de bosques (0,91 y 0,93 en CNA y CNB respectivamente) que en el resto de suelos (0,81 y 0,77 en CNX y CNR (Fig. 2.2-2).

A)



B)

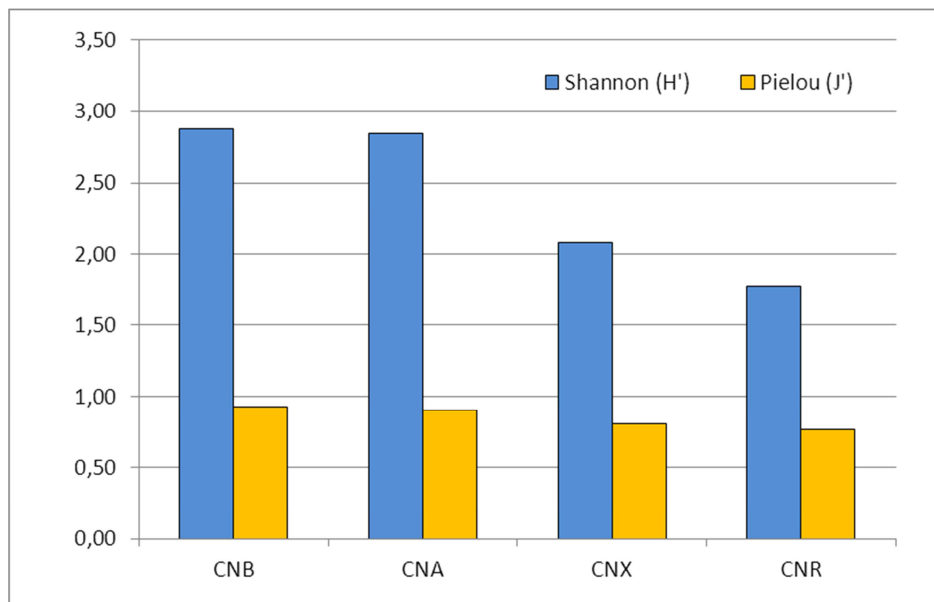


Figura 2.2-2. A) Riqueza observada y estimada (por el índice de Chao1) de OTUs del gen *nifH* para cada una de las muestras. B) Índice de diversidad de Shannon e índice de equidad de Pielou de las librerías génicas del gen *nifH*. OTUs está definido con un 93% de corte de similitud. OTUs, unidad taxonómica operativa.

Estos valores de riqueza están fuertemente relacionados con el pH del suelo, existiendo una correlación positiva entre el valor del pH y los valores de número de OTUs, índice de Shannon e índice de Pielou, con valores de correlación mayores al 94 % (Fig. 2.2-3). También existe una correlación positiva entre los diferentes índices de riqueza y diversidad frente a algunos parámetros químicos del suelo, como son la salinidad, la proporción C/N, el magnesio asimilable y el calcio asimilable, con valores de correlación que van desde el 74,46 % al 93,51 % (Fig. 2.2-4), mientras que con el resto de parámetros físico-químicos analizados no se ha hallado ninguna correlación. También se observa que el aumento de valores de riqueza y diversidad se corresponde con el gradiente altitudinal o de desarrollo de la cubierta vegetal de la zona muestreada, siendo menores los valores de la muestra sin robles, ubicada en la parte alta de la ladera, y los mayores los de los robles bien formados.

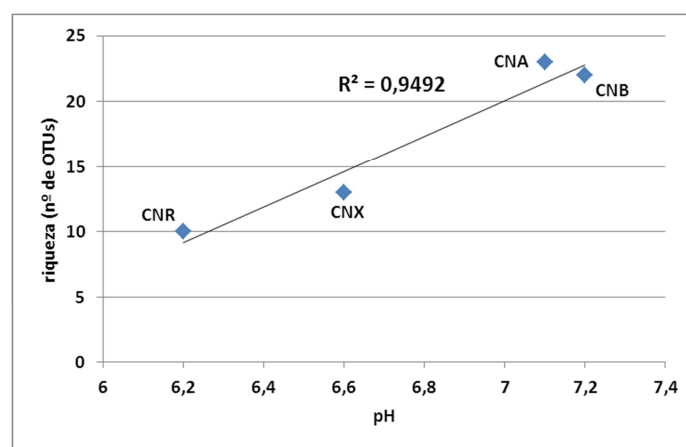


Figura 2.2-3. Línea de correlación entre pH y número de OTUs en las diferentes muestras.

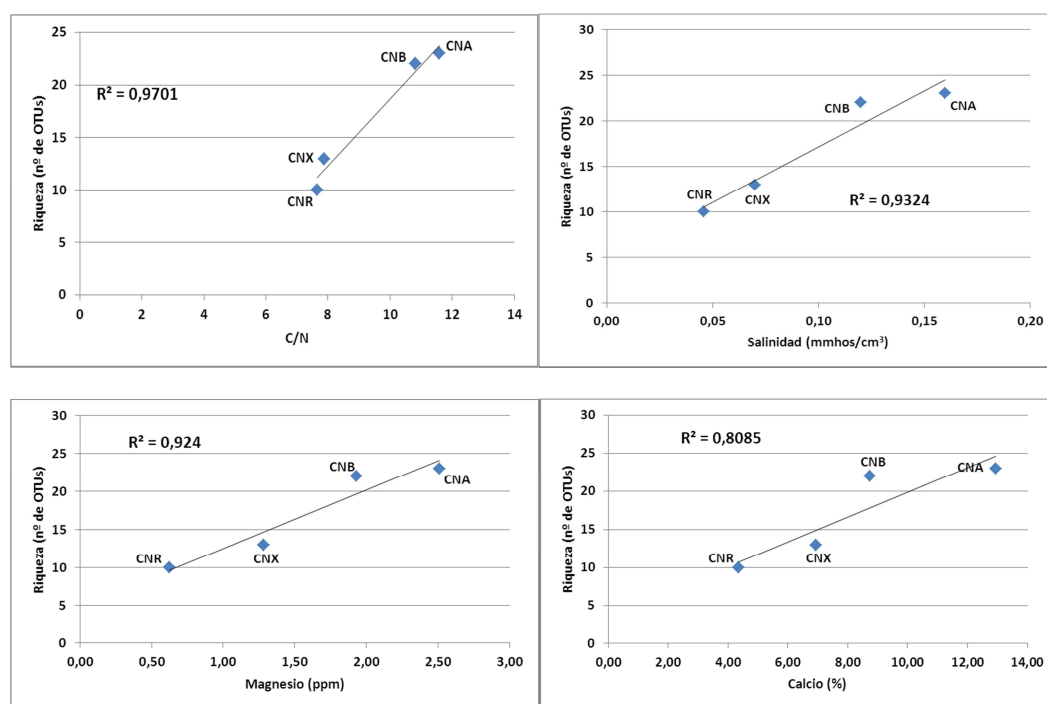


Figura 2.2-4. Líneas de correlación la riqueza y diferentes características físico-químicas en las diferentes muestras.

Atendiendo a los índices de riqueza y diversidad de las comunidades diazotróficas se puede decir que existen dos grupos de muestras claramente diferenciados, las de suelos de bosques y las de suelos que no pertenecen a bosques, con mayores valores de riqueza y diversidad en las primeras. Estas diferencias no se observan de igual manera en el análisis de Clústering Jerárquico Aglomerativo de la abundancia de OTUs, realizado con las secuencias aminioacídicas de NifH. Las 4 muestras presentan poblaciones diferentes según los resultados obtenidos con el estadístico de Libshuff; y en el Clústering Jerárquico Aglomerativo se muestra que las muestras donde existen robles en zonas elevadas (CNA y CNX) son las que se agrupan en primer lugar, con 19,72 % de distancia (Fig. 2.2-5). A este primer agrupamiento se une la otra muestra con presencia de robles (CNB), aunque en este caso los robles están siendo desplazados por encinas, con un valor de distancia de 24,46 %. Y por último se agrupa la muestra donde no hay presencia de robles (CNR), con un valor de distancia de 27,48 % (Fig. 2.2-5). Por lo tanto, se puede deducir que aunque los suelos de bosques presentan mayores valores de riqueza y diversidad de organismos diazotróficos (debido seguramente al propio desarrollo del bosque), existen determinadas diferencias a nivel taxonómico que pueden deberse a un proceso de deterioro del robledal de la zona baja, ya que la muestra del robledal de la zona alta tiene una mayor similitud con la muestra de robles en expansión, donde se supone que a largo plazo se desplazará el robledal buscando condiciones óptimas para su desarrollo.

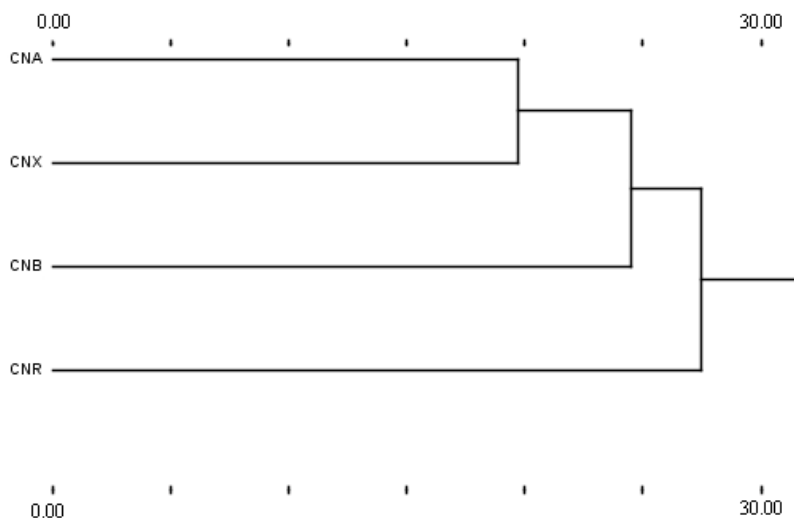


Fig. 2.2-5. Clústering jerárquico aglomerativo usando la matriz de distancia euclídea y el algoritmo UPGMA para las secuencias aminoacídicas de NifH obtenidas a partir de las librerías génicas. Análisis realizado con respecto a la abundancia relativa de cada OTU. OTUs definidos con un corte de un 93% de similitud de secuencia.

El análisis de la homología de secuencias de NifH muestra que la mayoría de las secuencias pertenecen a los *phyla* Proteobacteria, Firmicutes y Cyanobacteria, para todas las muestras. El *phylum* mayoritario en CNA, CNR y CNX es Proteobacteria, con abundancias de entre 62,26 y 92,73 % del total de secuencias NifH (Fig. 2.2-6), seguido por el *phylum* Firmicutes, que tiene una abundancia de entre el 3,64 y el 30,19 % del total de secuencias NifH. El *phylum* Cyanobacteria sólo aparece en los suelos de bosques, siendo el mayor *phylum* en CNB, con un 35,29 % del total de secuencias de NifH, seguido por el *phylum* Proteobacteria, con un 33,33 % de abundancia relativa (Fig. 2.2-6). Se observa entonces, a nivel de *phylum*, que el robledal de la zona baja difiere mucho del resto, lo cual puede ser un indicador de alteración de esta formación boscosa.

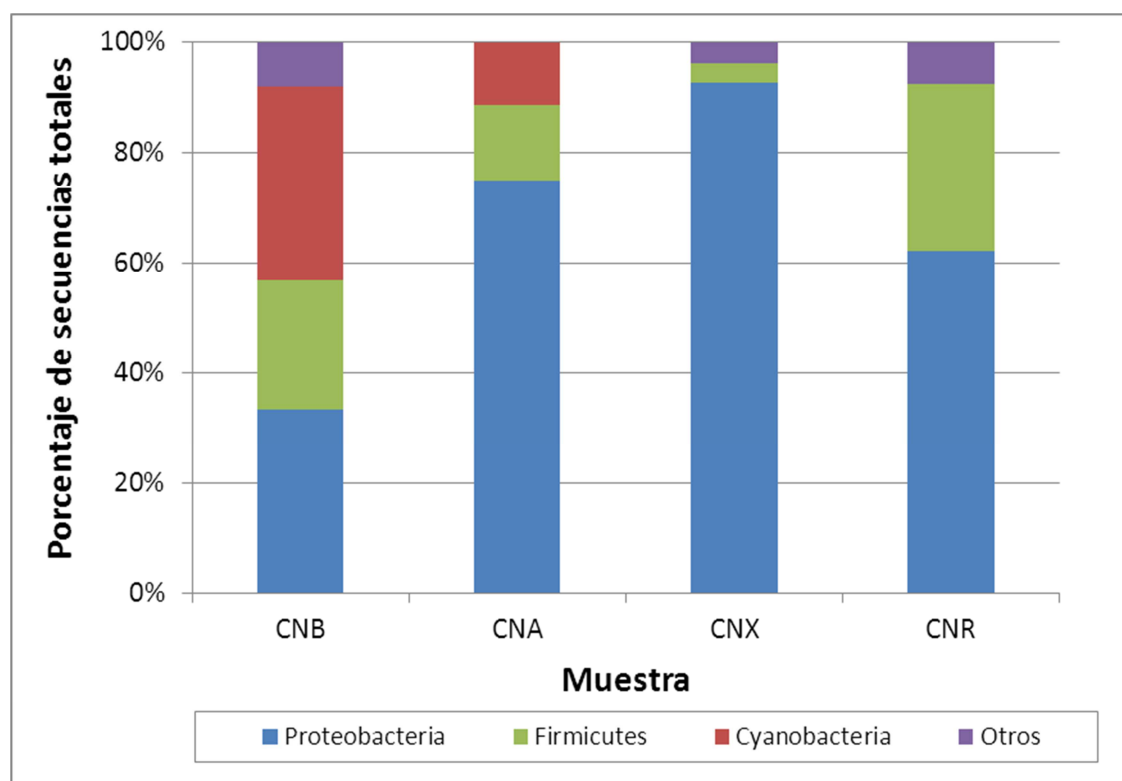


Figura 2.2-6. Distribución de *phyla* de las secuencias de NifH.

El análisis detallado de la homología de las secuencias de NifH a nivel de género muestra que 3 géneros del *phylum* α -Proteobacteria son los más abundantes en CNX: *Rhodopseudomonas*, *Methylobacterium* y *Sinorhizobium*, con un 18,87 %, 24,53 % y 30,19 % del total de secuencias respectivamente (Tabla 2.2-3). El género *Methylobacterium* es el único género mayoritario en CNA, con un 28,85 % de las secuencias, mientras que el género *Sinorhizobium* es el más abundante en CNR (con un 36,36 % del total de secuencias), seguido por el género *Pelosinus*, del *phylum* Firmicutes, que presenta un 23,64 % del total de secuencias en esta muestra y está ausente en el resto de muestras (Tabla 2.2-3). La muestra CNB tiene a la Cyanobacteria *Nostoc* como el género más abundante, con un 27,45 % del total de secuencias, seguido por *Paenibacillus* del *phylum* Firmicutes, con un 13,73 % del total de secuencias (Tabla 2.2-3).

Tabla 2.2-3. Clasificación taxonómica de las secuencias del gen *nifH*.

Phyla	Género	CNB	CNA	CNX	CNR
α -Proteobacteria	Gluconacetobacter	0	0	7,55	0
	Azospirillum	3,92	3,85	7,55	1,82
	Bradyrhizobium	5,88	9,62	3,77	1,82
	Rhodopseudomonas	1,96	7,69	18,87	1,82
	Rhizobium	1,96	11,54	0	7,27
	Ensifer	3,92	0	0	0
	Methylobacterium	5,88	28,85	24,53	0
	Zymomonas	0	1,92	0	5,45
	Azorhizobium	3,92	0	0	0
	Amorphomonas	1,96	0	0	0
	Phaeospirillum	0	5,77	0	0
	Rhodobacter	0	0	3,77	0
Sinorhizobium	0	0	30,19	36,36	
β -Proteobacteria	Burkholderia	0	0	0	5,45
	Geobacter	1,96	5,77	0	0
γ -Proteobacteria	Thiorhodovibrio	1,96	0	0	0
Cyanobacteria	Nodularia	7,84	0	0	0
	Nostoc	27,45	11,54	0	0
Firmicutes	Paenibacillus	13,73	0	0	5,45
	Clostridium	7,84	7,69	3,77	0
	Syntrophobotulus	1,96	3,85	0	0
	Pelosinus	0	0	0	23,64
	Heliobacterium	0	1,92	0	0
Actinobacteria	Arthrobacter	0	0	1,89	0
Bacteroidetes/Chlorobi	Dysgonomonas	0	0	1,89	7,27
Spirochaetes	Treponema	7,84	0	0	0

Empleando la herramienta estadística *Metastat* se observan diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de OTUs entre las distintas comunidades diazotróficas estudiadas. El género *Nostoc* es significativamente más abundante en la muestra de robledal de la zona baja (CNB) que en el resto de las muestras, y también en la muestra de robledal de la zona alta (CNA) con respecto al robledal en expansión (CNX) y la muestra sin robles (CNR) (Tabla 2.2-4). Se puede decir que a mayor altitud menor abundancia de este género, aunque no se puede determinar que sea la altitud el factor que determina este gradiente. El género *Paenibacillus* también tiene una mayor abundancia de secuencias del gen *nifH* en el robledal de la zona baja (CNB), pero esta vez sólo con respecto al resto de suelos rizosféricos de robles (CNA y CNX) (Tabla 2.2-4). El número de secuencias del género *Methylobacterium* es significativamente más abundante en las zonas con robles en condiciones favorables, como son el robledal en la zona alta (CNA) y los robles en expansión por encima del robledal (CNX) con respecto al resto de las muestras, siendo mayor la abundancia de secuencias de los géneros *Rhizobium* y *Nostoc* en CNA y del género *Sinorhizobium* en CNX las únicas diferencias significativas entre estos dos sitios (Tabla 2.2-4). En CNR es característica la abundante presencia de los géneros *Pelosinus* y *Sinorhizobium*, siendo este último también abundante en la otra muestra de suelo donde el robledal no está bien formado (Tabla 2.2-4).

Tabla 2.2-4. Géneros con abundancia significativamente diferente entre muestras, según el análisis realizado con *Metastat*. El color del nombre se corresponde con el color de la muestra en la cual es más abundante.

	CNA	CNX	CNR
CNB	<p><i>Methylobacterium</i></p> <p><i>Nostoc</i></p> <p><i>Paenibacillus</i></p>	<p><i>Rhodopseudomonas</i></p> <p><i>Methylobacterium</i></p> <p><i>Sinorhizobium</i></p> <p><i>Nostoc</i></p> <p><i>Paenibacillus</i></p>	<p><i>Sinorhizobium</i></p> <p><i>Pelosinus</i></p> <p><i>Nostoc</i></p>
CNA		<p><i>Sinorhizobium</i></p> <p><i>Rhizobium</i></p> <p><i>Nostoc</i></p>	<p><i>Sinorhizobium</i></p> <p><i>Pelosinus</i></p> <p><i>Nostoc</i></p> <p><i>Methylobacterium</i></p>
CNX			<p><i>Pelosinus</i></p> <p><i>Rhodopseudomonas</i></p> <p><i>Methylobacterium</i></p>

CAPÍTULO 2.3: EFECTO DE UN INCENDIO FORESTAL EN LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE *QUERCUS ILEX* SUBSP. *BALLOTA*.

Los efectos de un incendio forestal en la estructura y composición de las comunidades diazotróficas se determinaron analizando la rizosfera de un encinar quemado (LJQ), de un sitio de matorral en la que 6 años después del incendio aparecen encinas (LJR y LJRE) y dos encinares que no sufrieron los efectos del incendio ubicados uno en la cara norte de la sierra (CTE) y otro en la cara sur (LJN). Para ver la evolución de las comunidades diazotróficas después de sufrir un incendio, en todos estos sitios se realizaron dos muestreos, uno 3 años después del incendio (3LJQ, 3LJR, 3LJN y 3CTE) en el año 2008, y otro en el año 2011 (6LJQ, 6LJR, 6LJRE, 6LJN y 6CTE) 6 años después del incendio.

1. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS DE LAS ZONAS DE ESTUDIO.

Los suelos de los diferentes sitios de muestreo son suelos con textura de tipo franco, excepto el de LJR, cuya textura es de tipo franco-arenoso; y todos están clasificados como de tipo phaeozem háplico con origen silíceo (Tabla 2.3-1). El pH es más alcalino en LJQ (pH 7,6) que en el resto de suelos, donde el pH es ligeramente ácido (de pH 6,1 en LJN a 6,6 en CTE) (Tabla 2.3-1). El nitrógeno total y el contenido de materia orgánica es menor en los suelos que fueron afectados por el incendio (LJQ y LJR, con valores de 0,233 y 0,250 % de N total, respectivamente, y de 4,54 % de contenido de materia orgánica para ambas muestras) (Tabla 2.3-1) pero la proporción C/N no se ve alterada en estos sitios respecto a la del control de las zonas no quemadas. El suelo del sitio quemado y con cenizas (LJQ) tiene el mayor nivel de salinidad (0,22 mmhos/cm) y el menor valor de fósforo asimilable (5,2 ppm), mientras que el otro suelo afectado por el incendio (LJR) tiene la salinidad más baja (0,08 mmhos/cm) y el mayor valor de fósforo asimilable (20 ppm) (Tabla 2.3-1), debido seguramente a la gran densidad de la leguminosa arbustiva fijadora de nitrógeno *Adenocarpus decorticans* (rascaviejas) presente en la zona.

Tabla 2.3-1. Características físico-químicas de los suelos muestreados.

Parámetro	CTE	LJN	LJQ	LJR
Arcilla (%)	21,70	21,00	20,50	12,05
Arena (%)	43,60	45,74	49,54	56,08
Limo (%)	34,70	33,26	29,96	31,87
Tipo de suelo	Franco	Franco	Franco	Franco-arenoso
pH (H ₂ O)	6,6	6,1	7,6	6,5
pH (ClK)	6,0	5,7	7,0	6,0
Agua útil (%)	20,01	17,11	16,43	15,20
Salinidad (mmhos/cm ³)	0,11	0,14	0,22	0,08
Materia Orgánica Total (%)	8,30	7,61	4,54	4,54
N Total (%)	0,427	0,366	0,233	0,250
Proporción C/N	11,17	11,95	11,19	10,44
Fósforo asimilable (ppm)	7	8	5,2	20
Potasio asimilable (ppm)	265	445	330	170
Sodio (ppm)	0,05	0,06	0,06	0,04
Magnesio (ppm)	2,47	4,36	7,20	1,48
Calcio (%)	15,40	12,65	17,97	8,65
Hierro (ppm)	59	122	42	40

2. ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS.

Se obtuvieron un total de 461 secuencias parciales (370 bp) del gen *nifH*, con al menos 50 secuencias para cada muestra. Este número de clones secuenciados fue suficiente para obtener una representación de la diversidad del gen *nifH*, según se observa en las curvas de rarefacción (Fig. 2.3-1) y en los valores del índice de cobertura de Good, que van desde un 84 % de cobertura en 3LJN hasta un 96 % en 6LJR y 6LJRE (Tabla 2.3-2).

Tabla 2.3-2. Índice de cobertura de Good de las librerías génicas del gen *nifH*.

Muestra	3LJR	6LJR	6LJRE	3LJQ	6LJQ	3LJN	6LJN	3CTE	6CTE
Cobertura (%)	94,12	88,24	96	90,57	92,45	84	96	88,24	86,54

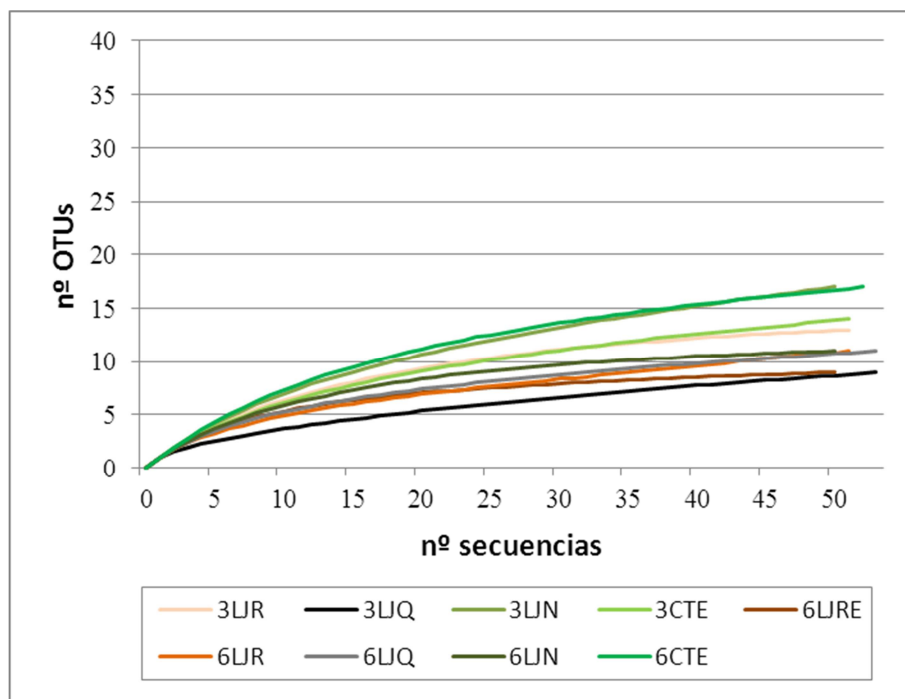


Figura 2.3-1. Curvas de rarefacción de las librerías génicas del gen *nifH*.

El mayor número de OTUs observados está en las muestras 3LJN y 6CTE (Fig. 2.3-2), con una riqueza de 17 OTUs al 93% de similitud de las secuencias nucleotídicas, mientras que 3LJQ y 6LJRE tiene los menores valores de riqueza (S=9, Fig. 2.3-2), con una tendencia general a un mayor valor de riqueza en los suelos no quemados. Las muestras de suelos rizosféricos del bosque silvestre de Lanjarón (LJN) y de los suelos quemados donde no había encinas (LJR) muestran una disminución de su riqueza después

de 3 años, de 17 a 11 OTUs y de 13 a 11 OTUs respectivamente (Fig. 2.3-2). En cambio, las muestras de suelos rizosféricos del bosque silvestre de la cara norte (CTE) y las de encinas quemadas (LJQ) muestran un incremento de los valores de riqueza, de 14 a 17 OTUs y de 9 a 11 OTUs respectivamente (Fig. 2.3-2). La riqueza estimada, obtenida con el índice de Chao1, muestra un incremento desde el año 2008 al 2011 para las muestras de CTE y LJR, de 22 a 28 OTUs y de 14 a 19 OTUs respectivamente (Fig. 2.3-2) pero para las muestras con encinas de la cara sur presenta una disminución, de 14 a 13 en LJQ y de 26,3 a 11,5 en LJN (Fig. 2.3-2). El índice de diversidad de Shannon es siempre mayor en los sitios no quemados, con un rango de valores de entre 2,05 y 2,58 (Fig. 2.3-2). En las muestras quemadas hay una diferencia en la tendencia a lo largo del tiempo, con un incremento en LJQ de 1,23 a 1,84 y una disminución en LJR de 2,23 a 1,76 (Fig. 2.3-2), seguramente debido a la proliferación de arbustos. La equidad, obtenida con el índice de Pielou, también disminuye en esta muestra (LJR), de 0,87 a 0,73, mientras que aumenta en CTE y LJQ (de 0,82 a 0,91 y de 0,56 a 0,79 respectivamente), teniendo el valor más bajo (0,56) en LJQ 2008, donde los efectos del incendio fueron más intensos (Fig. 2.3-2).

A)



B)

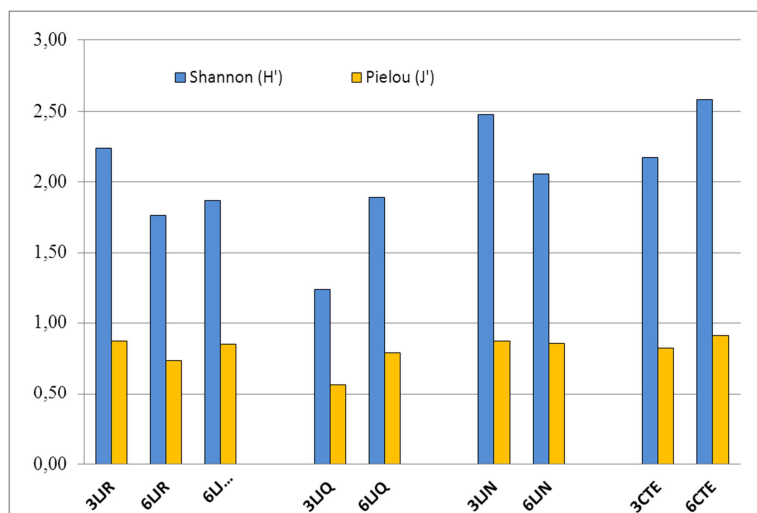


Figura 2.3-2. A) Riqueza observada y estimada (por el índice de Chao1) de OTUs del gen *nifH* para cada una de las muestras. B) Índice de diversidad de Shannon e índice de equidad de Pielou de las librerías génicas del gen *nifH*. OTUs está definido con un 93% de corte de similitud. OTU, unidad taxonómica operativa.

Estos valores de riqueza están fuertemente relacionados con el pH del suelo, existiendo una correlación negativa entre el valor del pH y los valores de número de OTUs, índice de Shannon e índice de Pielou, con valores de correlación mayores al 93 % (Fig. 2.3-3); no existiendo correlación con ninguno de los demás parámetros físico-químicos del suelo analizados. Si se compara esta correlación con la obtenida en el capítulo de resultados 2.2, donde se estudia el gradiente altitudinal en la estructura y composición de las comunidades diazotróficas asociadas a la rizosfera de *Quercus pyrenaica*, se observa un efecto contrario: en la rizosfera de encinas el aumento de pH está correlacionado con una disminución de la riqueza y diversidad mientras que en la de robles el aumento de pH se correlaciona con un aumento de riqueza y diversidad de las comunidades diazotróficas.

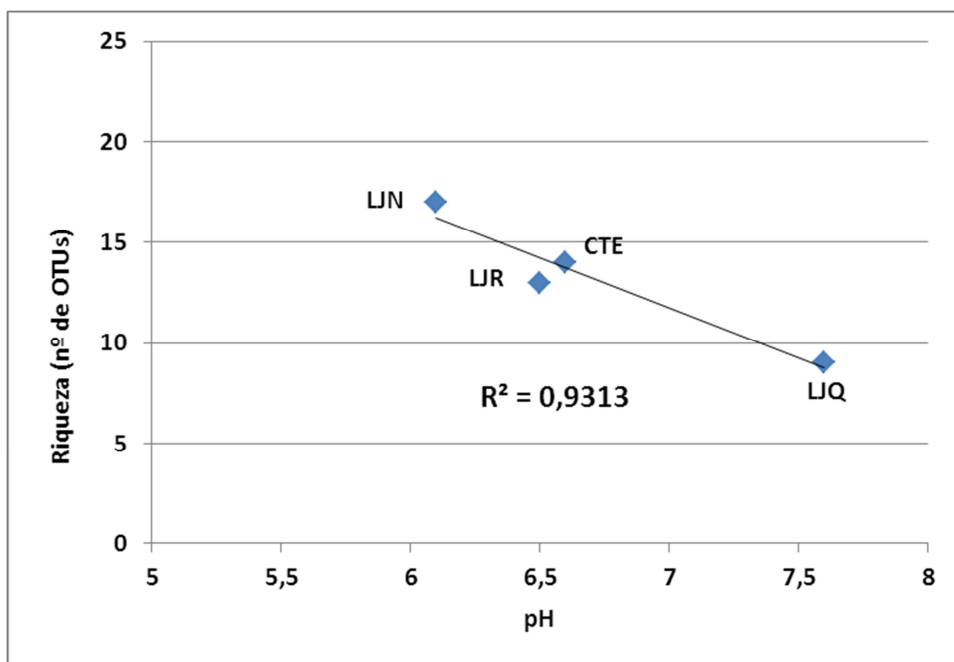


Figura 2.3-3. Líneas de correlación entre pH y número de OTUs en las diferentes muestras.

Al aplicar el programa estadístico Libshuff se observa que hay diferencias significativas entre todas las muestras, aunque dos de ellas son sub-poblaciones de otras muestras. La comunidad diazotrófica del suelo rizosférico del encinar quemado tomada 3 años después del incendio (3LJQ) es una subpoblación de las comunidades diazotróficas tanto del suelo rizosférico del encinar sin quemar de la ladera sur y como del suelo no rizosférico de encinas que se quemó de ese mismo año (3LJN y 3LJR, respectivamente). Por otro lado, según este mismo análisis estadístico, la comunidad diazotrófica del suelo no rizosférico que se quemó, y tras 6 años del incendio (6LJR) es una subpoblación de los suelos tomados en ese mismo sitio pero a los 3 años del incendio (3LJR) y de la muestra con presencia de encinas 6 años después del incendio (6LJRE).

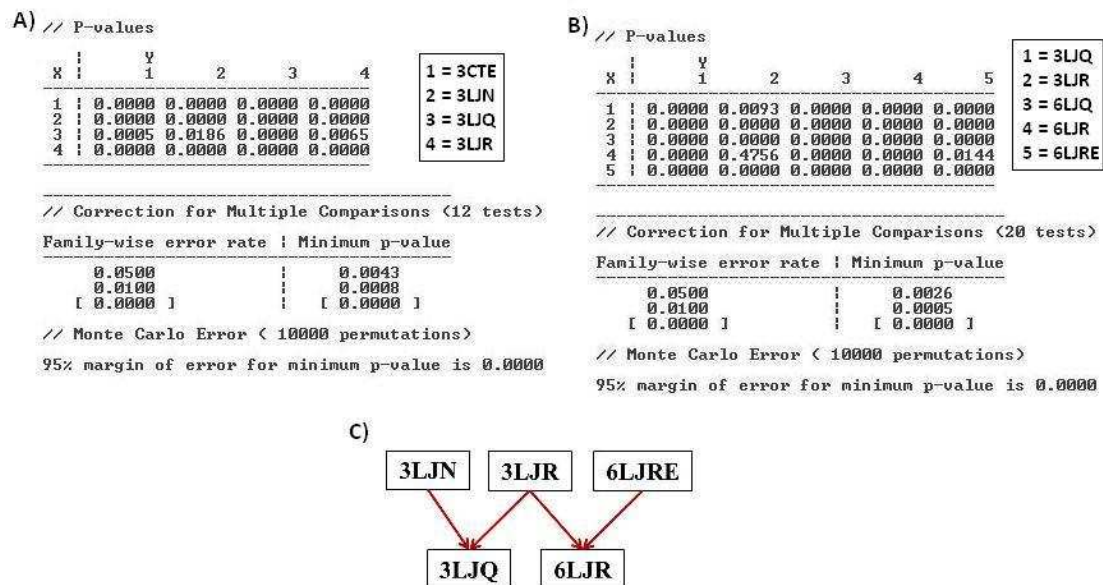


Figura 2.3-4. P-valores obtenidos al emplear el programa estadístico Libshuff en las muestras de los suelos tomados 3 años después del incendio (A) y en las de aquellos que se quemaron durante el incendio (B). Tomando como corte de error un valor de 0,05 (un mínimo p-valor de 0,0043 en A y de 0,0026 en B) se obtiene el esquema de subpoblaciones mostrado (C), donde el final de una flecha indica qué muestra es subpoblación de la muestra ubicada al inicio de la flecha.

Por lo tanto, y aunque existen dos subpoblaciones dentro del conjunto de comunidades diazotróficas empleadas en este estudio, al ser comunidades diferentes según este análisis estadístico se puede proceder a realizar un Clústering Jerárquico Aglomerativo para así conocer qué comunidades se asemejan más entre sí. Este Clústering Jerárquico Aglomerativo, realizado con la abundancia relativa de cada OTU, muestra la presencia de 3 grupos de comunidades diazotróficas (Fig. 2.3-5). El primer grupo lo forman las muestras de los suelos herbáceos quemados (3LJR, 6LJR y 6LJRE) con una distancia entre ellos de un 18 %. El segundo grupo lo forman las muestras tomadas ambos años en los sitios no quemados (3LJN, 3CTE, 6LJN y 6CTE), con una distancia de un 27 % (Fig. 2.3-5). Las ramas “output” están constituidas por las muestras obtenidas en rizosferas quemadas (LJQ), con una distancia del 38 % en 3LJQ y del 30 % en 6LJQ (Fig. 2.3-5), pudiendo ser esta disminución de la distancia una señal de la recuperación del ecosistema.

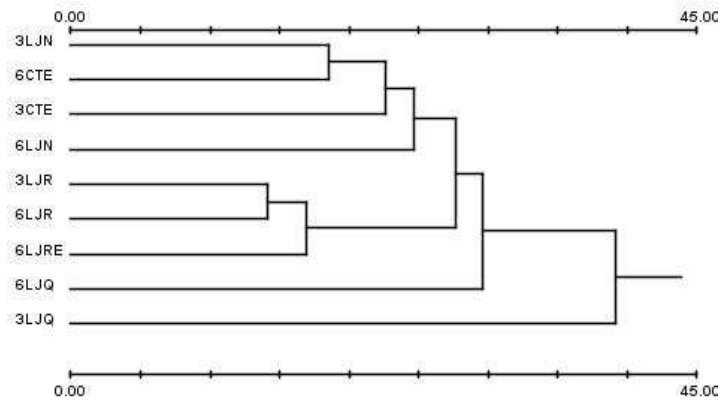


Fig. 2.3-5. Clústering jerárquico aglomerativo usando la matriz de distancia euclídea y el algoritmo UPGMA para las secuencias aminoacídicas de NifH obtenidas a partir de las librerías génicas. Análisis realizado con respecto a la abundancia relativa de cada OTU. OTUs definidos con un corte de un 93% de similitud de secuencia.

Con el análisis de la homología de secuencias de NifH se observa que, para todas las muestras, la mayoría de las secuencias muestran una fuerte homología con los *phyla* Proteobacteria y Firmicutes. La suma de secuencias relacionadas con ambos *phyla* varía desde un 70,0 % del total de secuencias en 6LJN 2011 al 100,0 % que se da en 6LJQ (Fig. 2.3-6). En la cara sur de la sierra se observa una disminución, a lo largo del tiempo, del porcentaje de secuencias NifH asociadas a Proteobacteria y un incremento de las asociadas a Firmicutes. Por otro lado, en la cara norte de la sierra el porcentaje del primer *phyla* se mantiene mientras que el de Firmicutes disminuye significativamente a lo largo del tiempo (Fig. 2.3-6).

La dinámica de las comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno de la zona sur está bajo la influencia de efectos generales debido a las condiciones ambientales, que además se refuerzan en combinación con otros dos factores: el incendio y la presencia de encinas. Tanto la muestra 6LJQ como la 6LJRE muestran que las secuencias de NifH relacionadas con Firmicutes forman el grupo principal (83,0 % y 54,0 % del total de secuencias, respectivamente), mientras que en 6LJR y 6LJN presenta un 23,53 % y 34,0 % del total de la población, respectivamente, siendo las secuencias relacionadas con Proteobacteria el grupo principal de estas muestras, con un 74,51 % y un 36 % para 6LJR y 6LJN respectivamente (Fig. 2.3-6). En este sentido hay una correlación inversa entre la abundancia relativa de secuencias NifH de ambos *phyla* para las muestras de la cara sur ($R^2 = 0.8713$, ver Fig. 2.3-7), con Proteobacteria como el *phylum* mayoritario de las comunidades diazotróficas de los suelos muestreados 3 años después del incendio, el cual es sustituido por el *phylum* Firmicutes en las muestras tomadas 6 años después del incendio, reforzándose este aumento de secuencias del *phylum* Firmicutes cuando hay presencia de encinas (Fig. 2.3-6). Una característica común de las rizosferas no quemadas es el aumento, desde los 3 a los 6 años después del incendio, de la proporción de secuencias

de NifH asociadas al *phylum* Cyanobacteria, con un porcentaje del total de la población superior a 20 % tanto en LJN como en CTE (Fig. 2.3-6).

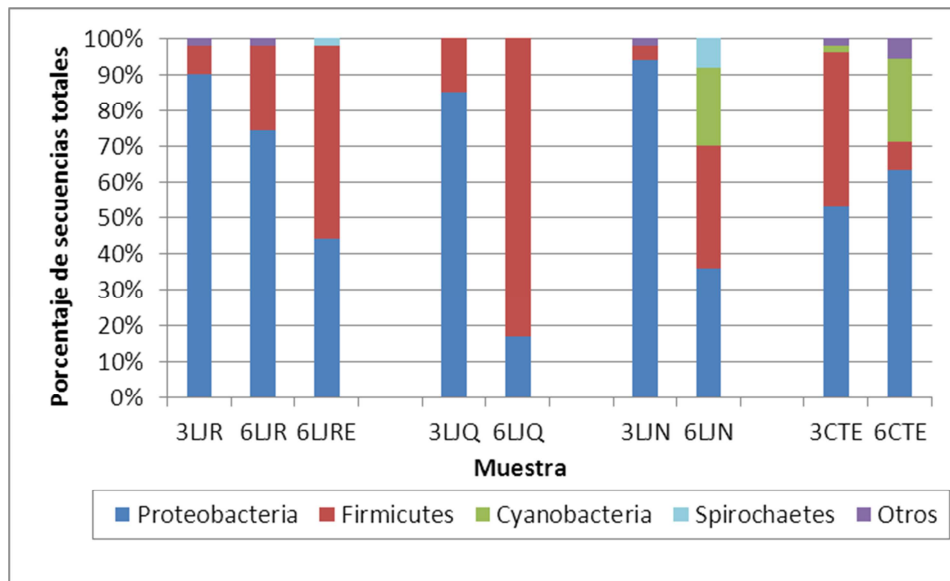


Figura 2.3-6. Distribución de *phyla* de las secuencias de NifH.

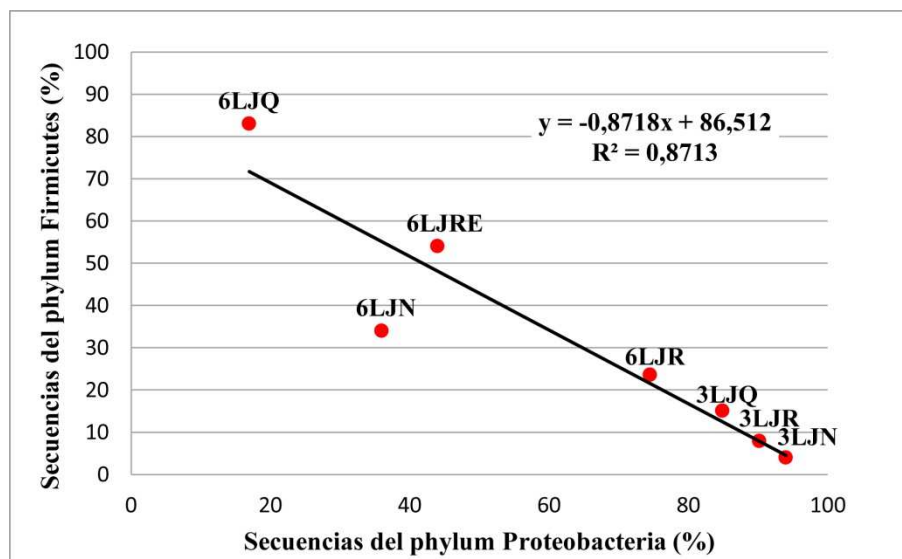


Figura 2.3-7. Correlación entre la abundancia de secuencias de NifH de los *phylum* Firmicutes y Proteobacterias en las muestras tomadas en la cara sur de la ladera (LJ).

El análisis detallado de la homología de las secuencias de NifH, a nivel de género, muestra que las que están relacionadas con el género *Paenibacillus* son las únicas comunes a todas las muestras, observándose un incremento de su abundancia en las muestras de la cara sur de la montaña entre los 3 y 6 años después del incendio, mientras que en la cara norte (CTE) su número disminuye (Tabla 2.3-3). En este sentido, ya que estas secuencias también están presentes en las muestras de LJR, se puede

argumentar que este género no es específico de ningún sitio, sino que es un fijador de nitrógeno común en estos suelos. Secuencias de NifH más específicas de la interacción con raíces de encinas y recuperación post-incendio son aquellas relacionadas con el género *Pelosinus*, del *phylum* Firmicutes, que aparece sólo en las muestras de LJRE y LJQ, con un 26,0 % de las secuencias en 6LJRE, un 1,89 % en 3LJQ y un 7,55 % en 6LJQ (Tabla 2.3-3), donde nuevos árboles están creciendo o rebrotando, respectivamente. También hay cierta especificidad en las secuencias de NifH relacionadas con el género *Azospirillum* en 3LJQ (62,26 % del total secuencias en 3LJQ), aunque muestran un cambio muy brusco en 6LJQ, donde este género es sustituido por el género *Clostridium*, predominando con un 56,6 % del total de secuencias (Tabla 2.3-3). En el otro sitio que sufrió el incendio, LJR y LJRE, las secuencias con homología con el gen NifH del género *Rhizobium* son las mayoritarias, con el 43,14 %, el 54,90 % y el 34,0 % del total de las secuencias en 3LJR, 6LJR y 6LJRE respectivamente (Tabla 2.3-3); pudiendo deberse esta predominancia a la presencia de gran cantidad de arbustos de la leguminosa *Adenocarpus decorticans*. En los suelos rizosféricos que no sufrieron el incendio (LJN y CTE) las secuencias de NifH relacionadas con el *phylum* Cyanobacteria muestran una homología con los géneros *Nostoc* y *Nodularia*, con abundancias con respecto al total de secuencias del 10,00 % en 6LJN, el 1,96 % en 3CTE y el 15,38 % en 6CTE para el género *Nostoc*, y del 12,00 % en 6LJN y del 7,69 % en 6CTE para el género *Nodularia* (Tabla 2.3-3). En estas áreas es también importante la presencia de secuencias relacionadas con la α -Proteobacteria *Rhodopseudomonas*, con el 14,00 % del total de secuencias en 3LJN, el 24,00 % en 6LJN, el 11,76 % en 3CTE y el 28,85 % en 6CTE (Tabla 2.3-3).

Tabla 2.3-3. Clasificación taxonómica de las secuencias NifH.

Phylum	Género	3LJR	6LJR	6LJRE	3LJQ	6LJQ	3LJN	6LJN	3CTE	6CTE
α-Proteobacteria	<i>Gluconacetobacter</i>	3,92	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Azospirillum</i>	1,96	0	0	62,26	0	18,00	0	5,88	3,85
	<i>Bradyrhizobium</i>	11,76	0	4	0	0	14,00	0	1,96	13,46
	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	1,96	0
	<i>Rhodopseudomonas</i>	3,92	0	0	1,89	3,77	14,00	24,00	11,76	28,85
	<i>Rhizobium</i>	43,14	54,90	34	3,77	13,21	0	0	5,88	0
	<i>Ensifer</i>	3,92	0	0	1,89	0	0	6,00	1,96	1,92
	<i>Methylobacterium</i>	13,73	11,76	6	0	0	24,00	0	11,76	7,69
	<i>Zymomonas</i>	0	0	0	0	0	2,00	0	0	0
	<i>Azorhizobium</i>	0	1,96	0	5,66	0	2,00	0	0	1,92
	<i>Azohydromonas</i>	0	1,96	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Skermanella</i>	5,88	1,96	0	3,77	0	4,00	0	0	0
	<i>Methylocystis</i>	0	0	0	1,89	0	0	0	0	0
	<i>Methylovirgula</i>	0	0	0	1,89	0	0	0	0	0
	β-Proteobacteria	<i>Rhodocista</i>	1,96	0	0	0	0	0	0	1,96
<i>Rhodospirillum</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	1,92
<i>Sphingomonas</i>		0	0	0	0	0	0	0	7,84	0
γ-Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	0	0	0	0	0	0	4,00	0	0
	<i>Cupriavidus</i>	0	0	0	1,89	0	2,00	0	1,96	0
Cyanobacteria	<i>Geobacter</i>	0	0	0	0	0	14,00	0	0	0
	<i>Methylococcus</i>	0	0	0	0	0	0	2,00	0	0
Firmicutes	<i>Pantoea</i>	0	1,96	0	0	0	0	0	0	1,92
	<i>Nostoc</i>	0	0	0	0	0	0	10,00	1,96	15,38
Firmicutes	<i>Nodularia</i>	0	0	0	0	0	0	12,00	0	7,69
	<i>Paenibacillus</i>	7,84	23,53	28,00	13,21	16,98	2,00	34,00	33,33	3,85
	<i>Clostridium</i>	0	0	0	0	56,60	2,00	0	9,80	3,85
	<i>Syntrophobotulus</i>	0	0	0	0	1,89	0	0	0	0
Fusobacteria	<i>Pelosinus</i>	0	0	26,00	1,89	7,55	0	0	0	0
	<i>Fusobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5,77
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0	1,96	0	0	0	2,00	0	0	0
	<i>Kocuria</i>	0	0	0	0	0	0	0	1,96	0
Bacteroidetes/Chlorobi	<i>Dysgonomonas</i>	1,96	0	0	0	0	0	0	0	0
Spirochaetes	<i>Treponema</i>	0	0	2,00	0	0	0	8,00	0	0

Al emplear la herramienta estadística *Metastat* se pueden observar diferencias estadísticamente significativas de la abundancia de determinados géneros entre las distintas comunidades diazotróficas estudiadas.

De los resultados expuestos hasta ahora, se deduce que hay una diferencia importante entre los sitios muestreados debido a la orientación de la ladera (Norte o Sur), y esto se ve claramente reflejado al comparar estadísticamente, mediante el programa *Metastat*, la abundancia de géneros de los encinares no alterados, cada uno ubicado en una cara del sistema montañoso. Mientras que en el año 2008, 3 años después del incendio, se observa una mayor abundancia de secuencias del género *Bradyrhizobium* en la ladera Sur (LJN) y del género *Paenibacillus* en la ladera Norte (CTE), a los 6 años del incendio ocurre lo contrario, abunda más el género *Bradyrhizobium* en la ladera Norte y *Paenibacillus* en la ladera Sur (Tabla 2.3-4). Lo cual indica grandes cambios en la abundancia de estos géneros, la del género *Paenibacillus* en la muestra de la ladera norte tras 3 y 6 años después del incendio cambia de un 33,33 % a un 3,85 %, mientras que el género *Bradyrhizobium* pasa de un 1,96 % a un 13,46 % (Tabla 2.3-4). En el caso de la ladera sur se observa justo lo contrario, a los 3 y 6 años del

incendio la abundancia del género *Paenibacillus* cambia desde de un 2 % a un 34 %, y la del género *Bradyrhizobium* va de un 14 % a un 0 % (Tabla 2.3-4).

Tabla 2.3-4. Géneros con abundancia significativamente diferente entre muestras de ladera Norte y de ladera Sur, según el análisis realizado con *Metastat*. El color del nombre indica en qué muestra es más abundante.

	3LJN	6LJN
3CTE	Bradyrhizobium Geobacter Paenibacillus	
6CTE		Paenibacillus Bradyrhizobium

Al analizar el efecto del incendio forestal no se hace uso de la muestra de ladera Norte (CTE) porque, como hemos visto, difiere en su composición y evolución de la zona control más específica de la ladera Sur (LJN). En las diferentes muestras realizadas en el año 2008 se pueden observar la existencia de algunos géneros característicos de cada sitio (Ver tabla 2.3-5). En primer lugar se observa que el género *Azospirillum* es característico de sitios quemados con presencia de encinas (3LJQ), teniendo a su vez una mayor abundancia en el sitio donde el incendio fue más intenso (3LJQ) que en la que menos intensidad tuvo (3LJR). Además, tanto la muestra menos afectada por el incendio (3LJR) como la que no lo sufrió (3LJN) tienen una mayor abundancia de secuencias asociadas a los géneros *Bradyrhizobium* y *Methylobacterium* que la muestra más afectada por el incendio (3LJQ), existiendo dos géneros más, *Rhodopseudomonas* y *Geobacter*, con mayor abundancia en el suelo que no sufrió incendio (3LJN) con respecto al que lo sufrió más severamente (3LJQ). También se observa que en el suelo silvestre (3LJN) tiene una mayor abundancia de secuencias del género *Geobacter* con respecto al suelo menos quemado (3LJR), mientras que en éste el género *Rhizobium* abunda más que en las otras dos muestras.

Si se comparan entre los mismos sitios de muestreo pero en diferentes años se observan algunos cambios significativos en la composición de las comunidades diazotróficas, tanto en los suelos afectados por el incendio (LJQ y LJR) como el que no (LJN) (Ver tabla 2.3-5). Encontrar diferencias en la comunidad nativa conlleva a pensar en la existencia de cambios o diferencias en las condiciones ambientales de los dos años de muestreo. En el sitio no afectado por el incendio de la cara sur de la ladera (LJN), aumenta la proporción de las secuencias de los géneros *Nodularia* y *Paenibacillus*, mientras que disminuye la cantidad de secuencias de los géneros *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium* y *Geobacter*. En las muestras afectadas por el incendio se observan menos cambios,

ya que en LJR sólo se ve que disminuye la abundancia del género *Bradyrhizobium* cuando no hay presencia de encinas y aumentan el número de secuencias de los géneros *Paenibacillus* y *Pelosinus* cuando hay presencia de encinas germinadas recientemente. En el sitio más afectado por el incendio sólo se observa una disminución en la abundancia del género *Azospirillum* y un aumento en la abundancia del género *Clostridium*.

Al comparar las comunidades diazotróficas obtenidas en el muestreo del año 2011 se observan también notables diferencias (Ver tabla 2.3-5). Al comparar la muestra no afectada por el incendio (6LJN) con las que fueron afectadas por el incendio (6LJR, 6LJRE y 6LJQ) se observa una mayor abundancia de los géneros *Rhodopseudomonas*, *Nodularia* y *Nostoc* (exceptuando el género *Nostoc* que sí está presente en la muestra donde hay crecimiento de nuevas encinas después del incendio) mientras que el género *Rhizobium* es significativamente más abundante en las tres muestras de suelos afectados por el incendio. Aparte de este género, para cada uno de las tres muestras existe otro género con mayor abundancia que en el suelo de 6LJN, siendo el género *Methylobacterium* más abundante en el sitio donde el incendio fue menos intenso (6LJR), el género *Pelosinus* en las muestras donde crecieron nuevas encinas (6LJRE) y el género *Clostridium* en el sitio más afectado por el incendio (6LJQ).

Tabla 2.3-5. Géneros con abundancia significativamente diferente entre muestras, según el análisis realizado con *Metastat*. El color del nombre indica en qué muestra es más abundante.

	3LJR	3LJQ	6LJN	6LJR	6LJRE	6LJQ
3LJN	Rhizobium Azospirillum Geobacter	Azospirillum Bradyrhizobium Rhodopseudomonas Methylobacterium Geobacter	Nodularia Paenibacillus Azospirillum Bradyrhizobium Methylobacterium Geobacter			
3LJR		Azospirillum Bradyrhizobium Rhizobium Methylobacterium		Bradyrhizobium	Paenibacillus Pelosinus	
3LJQ						Clostridium Azospirillum
6LJN				Rhizobium Methylobacterium Rhodopseudomonas Nostoc Nodularia	Rhizobium Pelosinus Rhodopseudomonas Nodularia	Rhizobium Clostridium Rhodopseudomonas Nostoc Nodularia
6LJR					Pelosinus	Clostridium Rhizobium Methylobacterium
6LJRE						Clostridium Rhizobium Pelosinus

**CAPÍTULO 3.1: ANÁLISIS GLOBAL DE LOS METAGENOMAS
RIZOSFÉRICOS.**

El número de secuencias o de contigs que se han obtenido tras la limpieza y ensamblaje de las lecturas generadas por secuenciación masiva varía según la muestra, pero es similar en los 2 tipos de tecnologías de secuenciación empleadas. En pirosecuenciación 454 se han obtenido entre 167.219 y 412.302 lecturas por muestra, con un número de bases totales que oscilan entre 64.800.059 y 159.918.596, siendo la longitud media de secuencia de entre 371 y 388 bp (Tabla 3.1-1). En el caso de la secuenciación por Illumina, existen entre 205.095 y 383.979 contigs (siendo un contig un conjunto de lecturas ensambladas que forman una secuencia sin espacios en blanco) por muestra, con un número total de bases que oscila entre 65.818.061 y 150.681.372, siendo la longitud media de contig de entre 320 y 420 bp (Tabla 3.1-1). Hay que tener en cuenta que para obtener estos contigs de Illumina se parte de un total de entre 171.236.955 y 192.242.088 lecturas (Tabla 3.1-1) de entre 50 y 190 bp de longitud, con las cuales se realizó un ensamblaje obteniéndose el número de contigs antes indicado, con un tamaño máximo de contig que en la muestra de CNB es de 6.579 bp, de 18.512 bp en CNA, de 38.045 bp en LJN, de 53.753 bp en LJQ y de 91.563 bp en CNX.

Tabla 3.1-1. Metadatos de las diferentes muestras de secuenciación masiva. El número total de secuencias que se indica es el que obtiene tras el paso de limpieza (y el de ensamblaje, en las secuencias obtenidas con Illumina). * El número de lecturas es el de lecturas pareadas que se obtiene antes de ensamblar las secuencias de Illumina. ** En las muestras de Illumina es el número de contigs obtenidos tras el ensamblaje.

Muestra	Método de secuenciación	nº de lecturas	nº total de secuencias	nº bps	longitud media
LJQ	454	316.973	253.660	93.867.971	370
LJN	454	520.430	412.302	159.918.596	388
CNB	454	247.846	222.689	82.556.863	371
CNA	454	193.004	167.219	64.800.059	388
LJQ	Illumina	186.654.779 *	383.979 **	150.681.372	392
LJN	Illumina	180.589.099 *	269.321 **	113.210.578	420
CNB	Illumina	173.277.220 *	205.779 **	65.818.061	320
CNA	Illumina	171.236.955 *	205.095 **	71.972.462	351
CNX	Illumina	192.242.088 *	246.663 **	84.493.363	343

Al enfrentar las secuencias obtenidas, por los diferentes métodos de secuenciación masiva empleados en el presente estudio, con la base de datos de subsistemas de SEED se observan diferencias en los resultados obtenidos. Por un lado en las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 se observa que los grupos metabólicos con mayor porcentaje de secuencias son *Carbohydrates*, *Clustering-based subsystems* y *Amino Acids and Derivates*, con valores de abundancia de entre el 15,97 y el 17,27 %, entre el 16,33 y el 16,78 % y entre el 11,42 y el 11,71 %, respectivamente (Fig. 3.1-1). Por otra parte en los contigs obtenidas por tecnología Illumina los grupos metabólicos más abundantes son los mismos que para las muestras de 454, excepto el tercero más abundante, que es *Miscellaneous*. Aun así, los valores de abundancia de estos grupos mayoritarios son menores, con entre el 10,76 y el 11,70 % de abundancia en *Carbohydrates*; entre el 10,06 y el 10,45 % en *Clustering-based subsystems*; y entre el 9,87 y el 10,18 % de abundancia relativa en *Miscellaneous* (Fig. 3.1-1). En ninguno de los 2 casos (secuenciación 454 y secuenciación Illumina) se observan diferencias estadísticamente significativas

RESULTADOS Capítulo 3

entre muestras en la abundancia de secuencias de alguno de los grupos metabólicos del nivel 1 de la base de datos de KEGG Orthology.

Pero sí se observan diferencias en el agrupamiento de muestras obtenido a partir de la matriz de abundancia relativa de secuencias de cada grupo metabólico en cada muestra. En el agrupamiento obtenido a partir de las secuencias 454 se observa que las muestras del encinar sano y la zona baja del robleal (LJN y CNB) se agrupan en primer lugar, seguidos por la muestra del encinar quemado (LJQ) con unos valores de similitud superiores al 0,999. Por último se agrupa la muestra de la zona alta del robleal (CNA), con un valor de similitud del 0,998 (Fig. 3.1-1). Estos valores tan elevados indican que, a este nivel, no existen diferencias significativas entre muestras. En el caso de los contigs obtenidos por Illumina también se dan valores elevados de similitud (mayores al 0,997), agrupándose en primer lugar las muestras de robledales (CNA y CNB) junto con la muestra de encinar sano (LJN), mientras que en otra rama se encuentra la muestra de encinar quemado (LJQ) y la de la zona de expansión del robleal (CNX) (Fig. 3.1-1). Aunque entre muestras no existen diferencias, al realizar un agrupamiento de todos los grupos de datos, tanto los obtenidos con 454 como los obtenidos con Illumina, se forman 2 grupos con un valor de similitud del 0,87 (dato no mostrado), siendo el tipo de secuenciación empleada el factor determinante para la separación de estos 2 grupos.

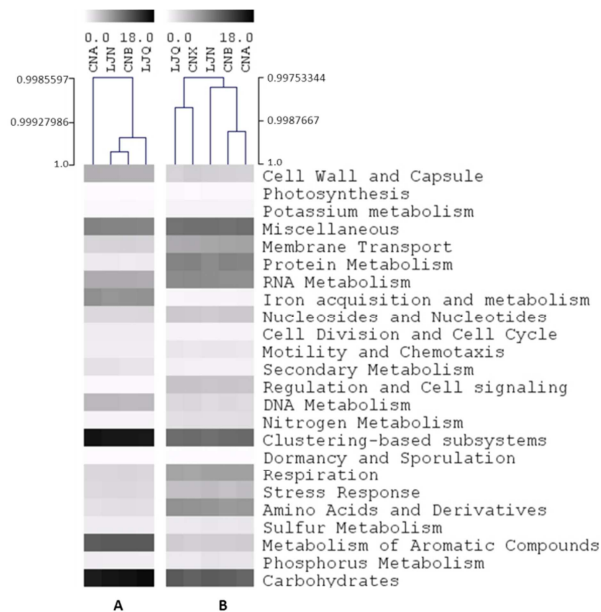


Figura 3.1-1. Heatmaps realizados con la matriz de abundancia relativa de secuencias de cada grupo metabólico en cada muestra. A) Secuenciación realizada con el sistema 454 Titanium de Roche. B) Secuenciación realizada con el sistema de Illumina. Para el agrupamiento jerárquico se he empleado el coeficiente de correlación de Pearson y el agrupamiento por uniones promedio (Average Linkage Clustering).

1. EFECTO DE UN INCENDIO FORESTAL.

Al comparar entre la muestra de encinas que sufrió el incendio (LJQ) y la que no (LJN) se observan algunas diferencias en la abundancia de secuencias obtenidas para determinadas rutas metabólicas, según lo obtenido con el programa informático STAMP empleando la base de datos de subsistemas de SEED. Dentro del nivel 1 del sistema de jerarquización de esta base de datos se observa que para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 los grupos metabólicos *Phosphorus Metabolism* y *Carbohydrates* tienen mayor abundancia de secuencias en la muestra de encinas quemadas, mientras que el grupo de *Virulence, Disease and Defense* tiene mayor proporción de secuencias en la muestra de encinas no quemadas (Fig. 3.1-1). Estos 3 grupos metabólicos también presentan diferencias al analizar los contigs obtenidos por secuenciación Illumina, pero el grupo de *Phosphorus Metabolism* pasa a ser más abundante en la muestra no quemada (LJN), mientras que con los datos de pirosecuenciación 454 se ha obtenido que abunda más en la muestra quemada (LJQ) (Fig. 3.1-1). A parte de estos 3 grupos metabólicos, también se ha obtenido que los grupos de *Iron acquisition and metabolism, Sulfur Metabolism, Potassium metabolism, Cell Wall and Capsule, Stress Response, Membrane Transport* y *Respiration* tienen mayor abundancia de contigs en la muestra de encinas sanas; mientras que los grupos metabólicos de *Protein Metabolism, Amino Acids and Derivates, Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments, DNA Metabolism, Metabolism of Aromatic Compounds, Nucleosides and Nucleotides* y *Secondary Metabolism* tienen mayor abundancia en la muestra de encinas que se quemaron con el incendio (Fig. 3.1-1).

RESULTADOS Capítulo 3

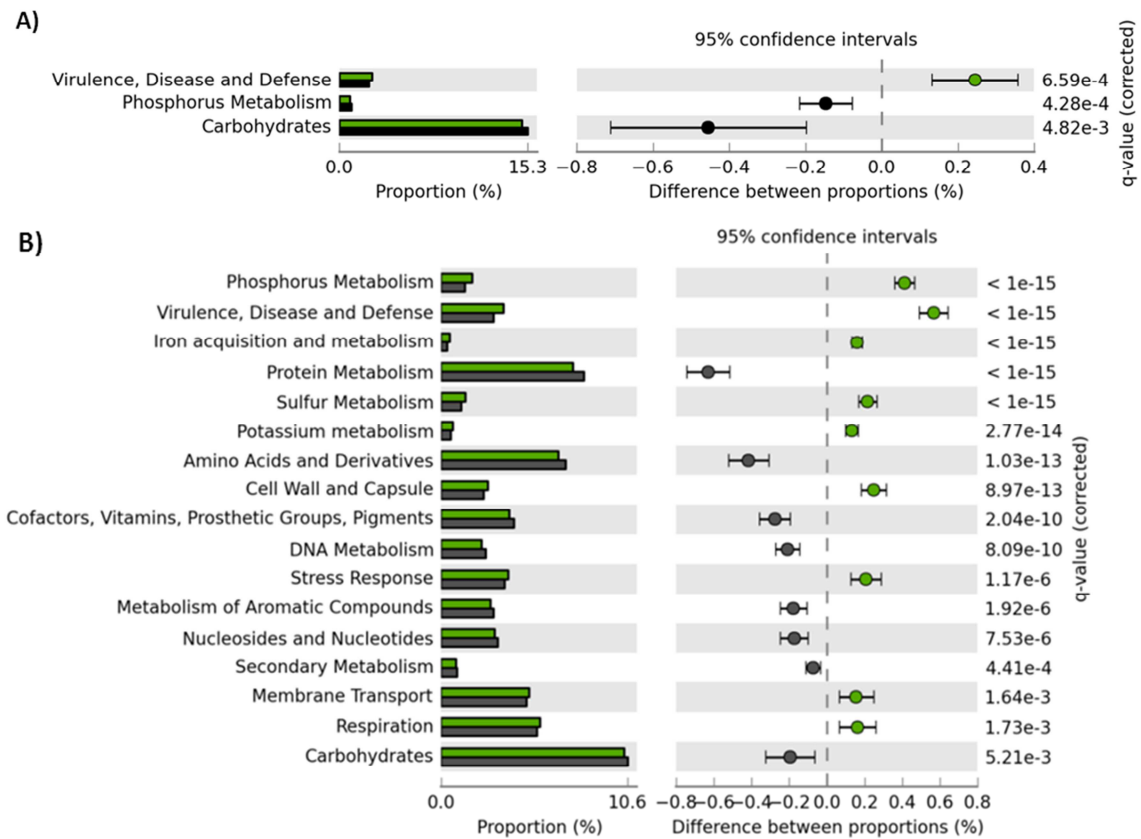
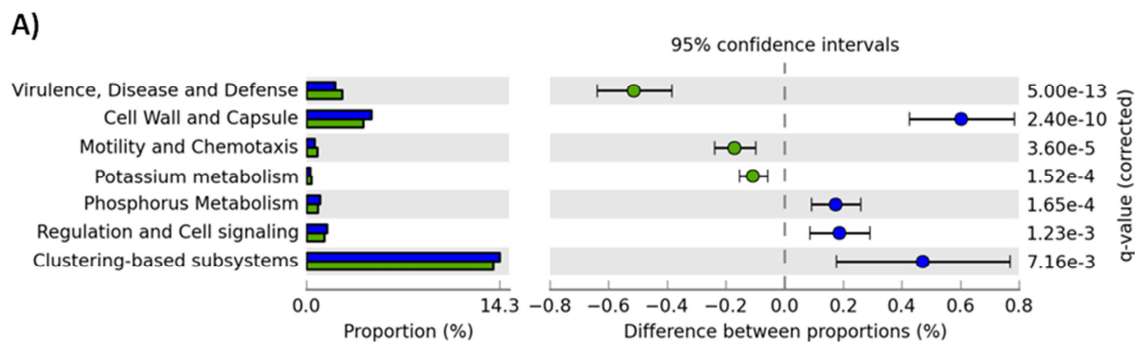


Figura 3.1-1. Grupos metabólicos, a nivel 1 de la base de datos de subsistemas de SEED, con diferencias significativas de abundancia de secuencias entre LJN y LQ, para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 (A) y para los contigs obtenidos por secuenciación Illumina (B).

2. INFLUENCIA DEL DESARROLLO DE LA CUBIERTA VEGETAL.

Comparando entre la muestra de la zona alta del robleal (CNA) y la muestra de encinar sano (LJN), se observa que los grupos metabólicos de *Cell Wall and Capsule*, *Phosphorus Metabolism*, *Regulation and Cell signaling* y *Clustering-based subsystems* contienen mayor porcentaje de secuencias en CNA que en LJN, según las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454; mientras que los grupos metabólicos de *Virulence*, *Disease and Defense*, *Motility and Chemotaxis* y *Potassium metabolism* tienen mayor porcentaje de secuencias en LJN que en CNA (Fig. 3.1-2). Con los contigs obtenidos tras la secuenciación por Illumina se observan ciertas diferencias con respecto a lo obtenido por 454. Por ejemplo, y como ocurrió al comparar las dos muestras de encinas, los grupos metabólicos *Phosphorus Metabolism* y *Cell Wall and Capsule* son más abundantes en CNA para las secuencias obtenidas por 454 mientras que con los contigs obtenidos por Illumina lo son en LJN. Entre los grupos con mayor porcentaje de contigs en LJN se mantiene el de *Virulence*, *Disease and Defense* obtenido también con la secuenciación 454, y aparecen el de *Carbohydrates*, mientras que los de *Motility and Chemotaxis* y *Potassium metabolism* no muestran diferencias significativas con los contigs obtenidos por Illumina (Fig. 3.1-2). Con los grupos con mayor abundancia en CNA se observa que en Illumina no hay diferencias en *Regulation and Cell signaling*, se mantiene *Clustering-based subsystems* y aparecen como nuevas (con respecto a lo obtenido en 454) *Nucleosides and Nucleotides*, *Protein metabolism*, *Metabolism of Aromatic Compounds*, *Membrane Transport* y *Nitrogen Metabolism* (Fig. 3.1-2).



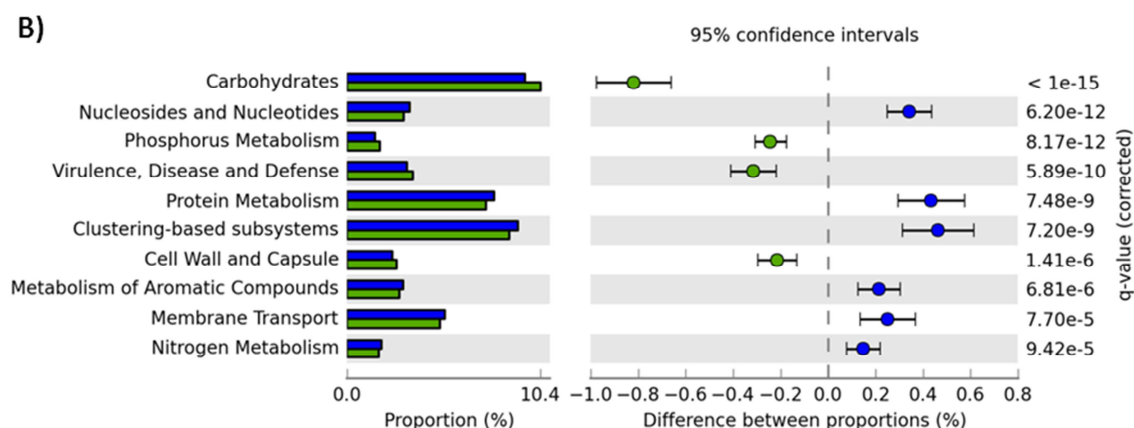
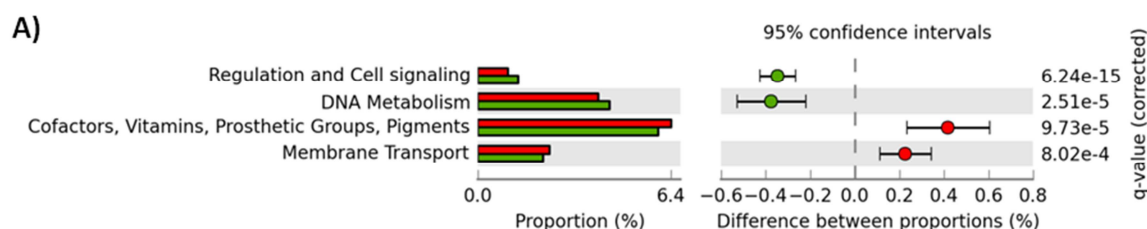


Figura 3.1-2. Grupos metabólicos, a nivel 1 de la base de datos de subsistemas de SEED, con diferencias significativas de abundancia de secuencias entre CNA y LJN, para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 (A) y para los contigs obtenidos por secuenciación Illumina (B).

Comparando entre la muestra de la zona baja del robleal (CNB) y la muestra de encinar sano (LJN), se observa que los grupos metabólicos de *Cofactors*, *Vitamins*, *Prosthetic Groups*, *Pigments* y *Membrane Transport* contienen mayor porcentaje de secuencias en CNB que en LJN, según las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454; mientras que los grupos metabólicos de *Regulation and Cell signaling* y *DNA Metabolism* tienen mayor porcentaje de secuencias en LJN que en CNB (Fig. 3.1-3). Con los contigs obtenidos tras la secuenciación por Illumina se observa ciertas diferencias con respecto a lo obtenido por 454. De hecho, sólo la diferencia observada para el grupo *Membrane Transport* se mantiene con los contigs obtenidos mediante secuenciación Illumina. Aparte de éste, existen otros grupos metabólicos con mayor abundancia de contigs en CNB: *Protein Metabolism*, *Clustering-based subsystem*, *Nucleosides and Nucleotides* y *Dormancy and Sporulation* (Fig. 3.1-3). Por otro lado, los grupos metabólicos de *Stress Response*, *Fatty Acids*, *Lipids and Isoprenoids*, *Amino Acids and Derivates*, *Phosphorus Metabolism*, *Carbohydrates* y *Virulence, Disease and Defense* (Fig. 3.1-3).



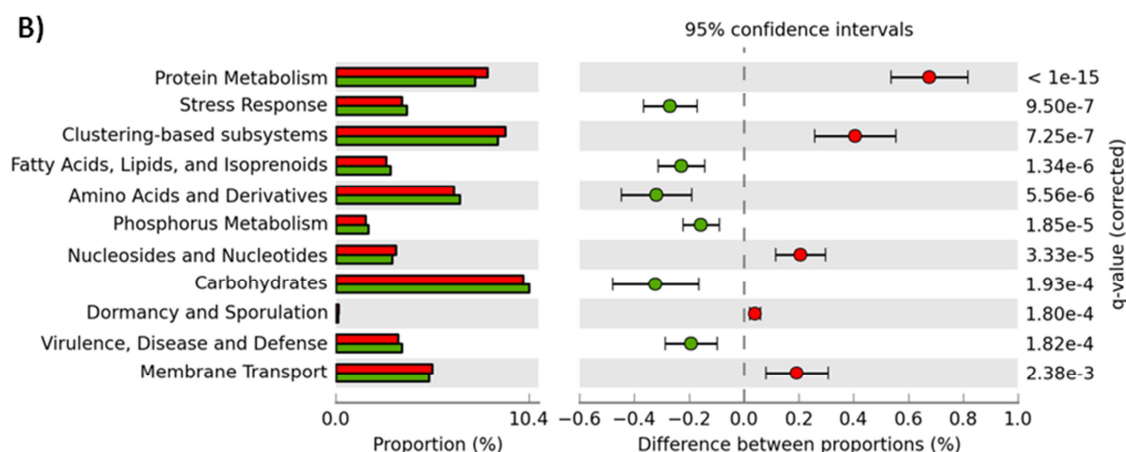


Figura 3.1-3. Grupos metabólicos, a nivel 1 de la base de datos de subsistemas de SEED, con diferencias significativas de abundancia de secuencias entre CNB y LJN, para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 (A) y para los contigs obtenidos por secuenciación Illumina (B).

Por lo tanto, se puede decir que en las muestras de robledales (CNA y CNB) abundan con respecto a la muestra de encinar (LJN) las secuencias pertenecientes a los grupos metabólicos de *Nucleosides and Nucleotides*, *Protein metabolism*, *Membrane Transport* y *Clustering-based subsystems*, según los datos obtenidos por secuenciación Illumina, mientras que en los obtenidos por pirosecuenciación 454 no existe ningún grupo con mayor abundancia en las dos muestras de robledal con respecto a la de encinar ni al revés, con mayor abundancia en la muestra del encinar que en las de robledales. Con lo obtenido por secuenciación Illumina se observa que en la muestra de encinar (LJN) son más abundantes, con respecto a las muestra de robledales (CNA y CNB), los contigs pertenecientes a los grupos metabólicos de *Phosphorus Metabolism*, *Carbohydrates* y *Virulence, Disease and Defense*.

3. INFLUENCIA DEL GRADIENTE ALTITUDINAL.

Comparando, dentro del gradiente altitudinal, entre la muestra de la zona alta del robledal (CNA) y la de la zona baja (CNB) se observan algunas diferencias en la abundancia de secuencias obtenidas para determinadas rutas metabólicas, según lo obtenido con el programa informático STAMP empleando la base de datos de subsistemas de SEED. Dentro del nivel 1 del sistema de jerarquización de esta base de datos se observa que para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 los grupos metabólicos *Regulation and Cell signaling*, *Cell Wall and Capsule* y *Clustering-based subsystems* tienen mayor porcentaje de secuencias en CNA que en CNB, mientras que *Virulence, Disease and Defense*, *Potassium metabolism*, *Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments, Motility and Chemotaxis* y *Carbohydrates* tienen mayor abundancia de secuencias en CNB que en CNA (Fig. 3.1-4). Al realizar la misma comparación con los contigs obtenidos de la secuenciación Illumina se observa que los grupos metabólicos con mayor abundancia en CNA que en CNB son *Iron acquisition and metabolism* y *Stress Response* (Fig. 3.1-4), los cuales no aparecen en lo obtenido con pirosecuenciación 454. El grupo de *Regulation and Cell signaling* pasa a ser más abundante en CNB, cuando con las secuencias de 454 lo es en CNA. También son más abundantes en CNB los grupos de *Carbohydrates*, *DNA Metabolism* y *Protein Metabolism* (Fig. 3.1-4), siendo el primero el único que también aparece como más abundante en CNB en las secuencias obtenidas por 454.

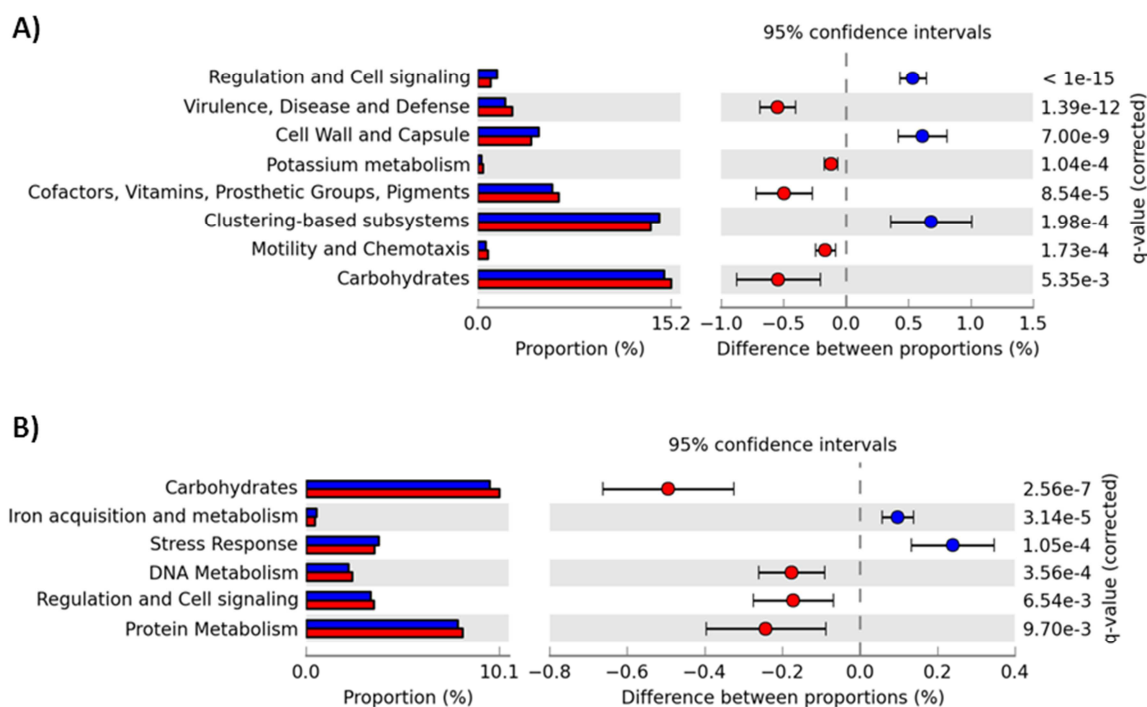


Figura 3.1-4. Grupos metabólicos, a nivel 1 de la base de datos de subsistemas de SEED, con diferencias significativas de abundancia de secuencias entre CNA y CNB, para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 (A) y para los contigs obtenidos por secuenciación Illumina (B).

Al comparar la zona de expansión del robleal (CNX) con las muestras de robledales bien formados (CNA y CNB) se observa que los grupos metabólicos de *Cell Wall and Capsule*, *DNA Metabolism*, *Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids, Aminoacids and derivates* y *RNA Metabolism* tienen mayor porcentaje de contigs en CNX que en las muestras de robledales; mientras que los grupos de *Phosphorus Metabolism*, *Respiration* y *Membrane Transport* tienen mayor porcentaje de contigs en las muestras de robledales que en CNX (Fig. 3.1-5). Por otro lado, se observa que los grupos metabólicos de *Regulation and Cell signaling* y *Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids* tienen mayor abundancia de contigs en CNX con respecto a CNA y CNB, respectivamente; mientras que *Metabolism of Aromatic Compounds*, *Iron acquisition and metabolism* y *Nucleosides and Nucleotides* son más abundantes en CNA que en CNX y *Virulence, Disease and Defense* y *Carbohydrates* lo son en CNB con respecto a CNX (Fig. 3.1-5).

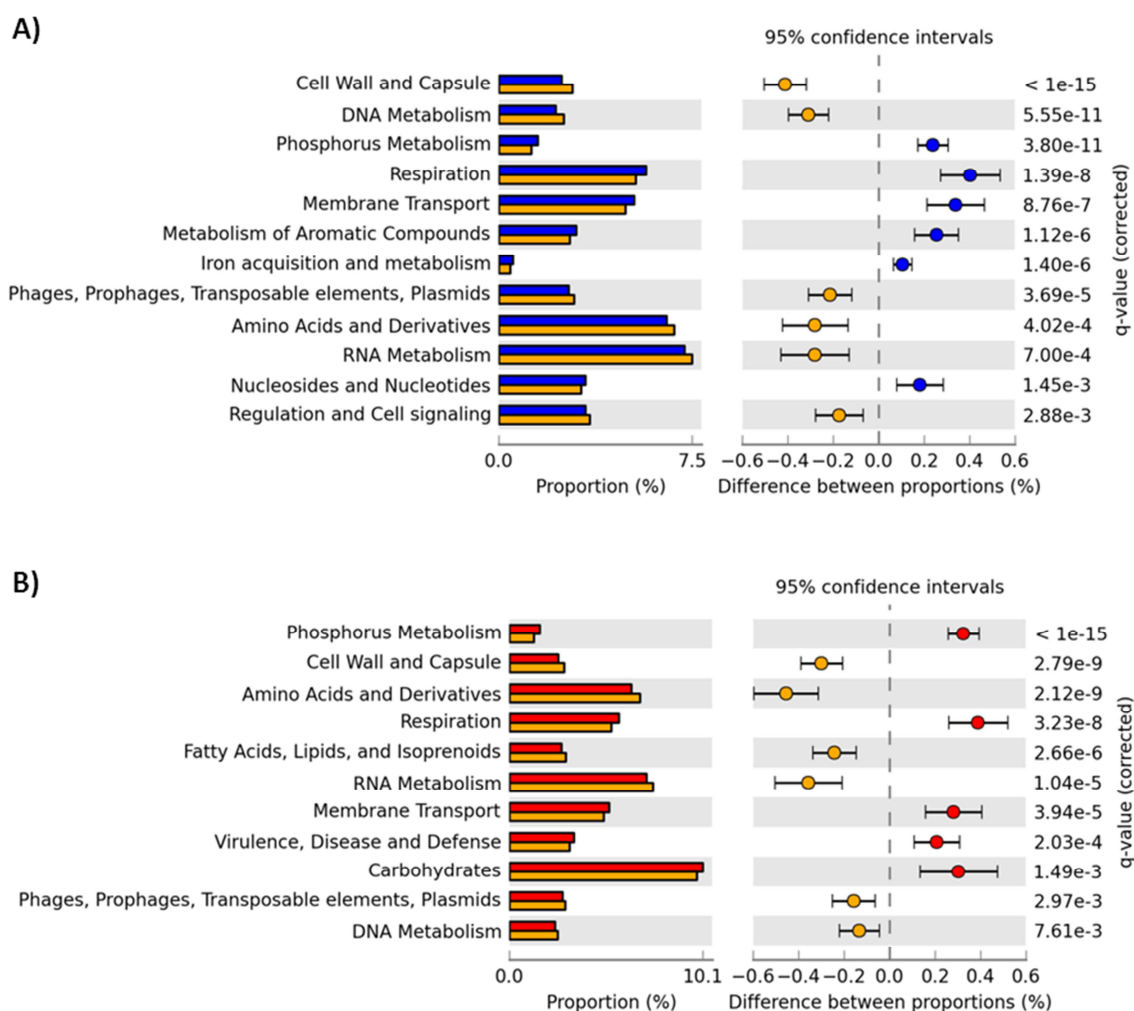


Figura 3.1-5. Grupos metabólicos, a nivel 1 de la base de datos de subsistemas de SEED, con diferencias significativas de abundancia de contigs entre CNA y CNX (A) y entre CNB y CNX (B), para los contigs obtenidos por secuenciación Illumina.

RESULTADOS Capítulo 3

Aunque las aquí presentadas son las diferencias estadísticamente significativas entre las rizosferas de las distintas situaciones, el presente estudio se va a centrar en las secuencias que dan homología con alguna proteína del metabolismo del nitrógeno, debido a la importancia de éste en el desarrollo y mantenimiento de ecosistemas, y se van a presentar los datos comparando entre las distintas técnicas de secuenciación masiva empleadas. Además se va a dividir en 3 apartados, en el primero se comparará las 2 muestras de encinas, con el objetivo de comprobar el impacto del incendio en el metabolismo del nitrógeno. En el segundo apartado se compararán la muestra de encinar no quemado frente a las de robledales bien formados, con el objetivo de comprobar si existen diferencias en el metabolismo del nitrógeno debidas al tipo de vegetación. Y en el tercer y último apartado se compararán las diferentes muestras de robles (la zona baja, la zona alta y la zona de expansión del robledal) para ver si existen diferencias en las rutas bioquímicas del metabolismo del nitrógeno debidas al gradiente altitudinal.

**CAPÍTULO 3.2: EFECTO DE UN INCENDIO FORESTAL EN LAS RUTAS
METABÓLICAS DEL NITRÓGENO DE LAS COMUNIDADES
BACTERIANAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE *QUERCUS ILEX*
SUBSP. *BALLOTA*.**

1.

2. BASE DE DATOS DE SUBSISTEMAS DE SEED.

De la secuenciación masiva mediante el sistema de pirosecuenciación 454 de Roche™ del DNA obtenido de las rizosferas de encinas en la primavera de 2008, 3 años después del incendio forestal, y tras realizar los correspondientes filtrados de las lecturas obtenidas, se ha obtenido un total de 253.660 secuencias para la muestra LJQ y 412.302 secuencias para LJN, con una longitud media de secuencia de 370 y 388 bp, respectivamente (Tabla 3.2-1). Al enfrentar estas secuencias a la base de datos de subsistemas de SEED se obtuvo que un total de 69.975 secuencias en LJQ y 100.814 secuencias en LJN (Tabla 3.2-1) daban homología con un corte de máximo e-valor de 10^{-5} , un corte de identidad mínima del 60 % y una longitud mínima de alineamiento de 50 bp. De todas estas secuencias que han dado homología con alguna proteína de la base de datos de subsistemas de SEED, el 0,98 % en LJQ y el 1,04 % en LJN lo hacen para proteínas pertenecientes al metabolismo del nitrógeno (Tabla 3.2-1), no existiendo diferencias estadísticamente significativas, según el análisis realizado con el programa informático STAMP, entre muestras en cuanto al porcentaje de secuencias pertenecientes al ciclo del nitrógeno.

Tabla 3.2-1. Metadatos de las muestras de encinas obtenidas por secuenciación 454.

Muestra	LJQ	LJN
nº bps	93.867.971	159.918.596
nº total de secuencias	253.660	412.302
longitud media de secuencia (bps)	370	388
nº de secuencias con homología en SEED	69.975	100.814
nº de secuencias del metabolismo del N en SEED	684 (0,98 %)	1046 (1,04 %)
nº de secuencias con homología en KO	30.530	44.266
nº de secuencias del metabolismo del N en KO	105 (6,24 %)	190 (7,40 %)

De la secuenciación masiva por síntesis, mediante el sistema de Illumina, del DNA obtenido de las rizosferas de encinas en la primavera de 2008, y tras realizar los correspondientes filtrados de las lecturas obtenidas y ensamblarlas con el programa SOAP de novo, se ha obtenido un total de 383.979 contigs (conjuntos de lecturas ensambladas) para la muestra LJQ y 269.321 para LJN, con una longitud media de contig de 392 y 420 bp, respectivamente (Tabla 3.2-2). Al enfrentar estos contigs a la base de datos de subsistemas de SEED se obtuvo que un total de 404.095 hits en LJQ y 238.370 hits en LJN con un corte de máximo e-valor de 10^{-5} , un corte de identidad mínima del 60% y una longitud mínima de alineamiento de 50 bp (Tabla 3.2-2). Este número elevado de hits, incluso superior al número total de contigs, se debe a que, debido a la gran longitud de algunos contigs, un contig puede contener más de un origen de transcripción o más de una proteína. Esta es una de las razones por las que, comparando con las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454, en la secuenciación por Illumina se obtiene una

RESULTADOS Capítulo 3

elevada cantidad de hits. La otra razón es el proceso de obtención de estas secuencias, ya que, como se ha dicho en el capítulo 3.1, para los contigs de Illumina se ha realizado un ensamblaje a partir de las lecturas obtenidas, que vienen a ser de unas 180 millones por muestra, y al ensamblar se hace de forma indirecta una limpieza de todas aquellas lecturas de elementos repetitivos. De los contigs que muestran homología con alguna proteína de la base de datos de subsistemas de SEED, el 2,21 y el 2,26 % en LJQ y LJN respectivamente lo hacen para proteínas involucradas en el metabolismo del nitrógeno (Tabla 3.2-2), no observándose diferencias estadísticamente significativas, según el programa STAMP, entre muestras en cuanto al porcentaje de contigs pertenecientes al metabolismo del nitrógeno. Por lo tanto, con la secuenciación por Illumina se duplica, respecto a la pirosecuenciación, el porcentaje de secuencias del metabolismo del nitrógeno obtenidas, en referencia al total de secuencias que dan homología con alguna proteína de la base de datos de subsistemas de SEED.

Tabla 3.2-2. Metadatos de la muestra de encinas obtenidas por secuenciación Illumina.

Muestra	LJQ	LJN
nº bps	150.681.372	113.210.578
nº total de contigs	383.979	269.321
longitud media de contig (bps)	392	420
nº de contigs con homología en SEED	404.095	238.370
nº de contigs del metabolismo del N en SEED	8949 (2,21 %)	5398 (2,26 %)
nº de contigs con homología en KO	227.732	130.397
nº de contigs del metabolismo del N en KO	1450 (7,98 %)	774 (7,44 %)

Para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454, dentro del nivel 3 del sistema de clasificación del MG-Rast para la base de datos de subsistemas de SEED se observa que las funciones con mayor número de secuencias, dentro del metabolismo del nitrógeno, son: en primer lugar la asimilación de amonio y la amonificación de nitrato y nitrito, con abundancias del 56,98 % y del 55,13 % del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno para LJQ y LJN respectivamente, para la asimilación de amonio (Fig. 3.2-1), y con abundancias del 16,34 % y del 16,15 % para LJQ y LJN, respectivamente, para la amonificación de nitrato y nitrito. Y en tercer lugar están la óxido nítrico sintasa y la hidrólisis del cianato, con abundancias del 6,56 y 6,3 % y del 6,28 y 5,98 % para LJQ y LJN respectivamente con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.2-1). A pesar de ser las 4 funciones más abundantes, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre muestras. Aunque la función que sí muestra diferencias estadísticamente significativas entre muestras es la utilización de alantoína, con una mayor cantidad de secuencias en la muestra LJQ, con el 6,01 % del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, mientras que en LJN es del 4,46 % (Fig. 3.2-1). Respecto a la

función de fijación de nitrógeno, esta es minoritaria en ambos ecosistemas, siendo la novena en abundancia con unos porcentajes de 0,80 en LJN y 0,70 en LQ. Dentro de esta función, las secuencias muestran homología con las proteínas *Cysteine desulfurase*, *NifS subfamily Nitrogenase (iron-iron) transcriptional regulator* y *Nitrogenase (molybdenum-iron)-specific transcriptional regulator NifA*. Hay que señalar que en ningún caso se encontraron secuencias con homología al gen *nifH*.

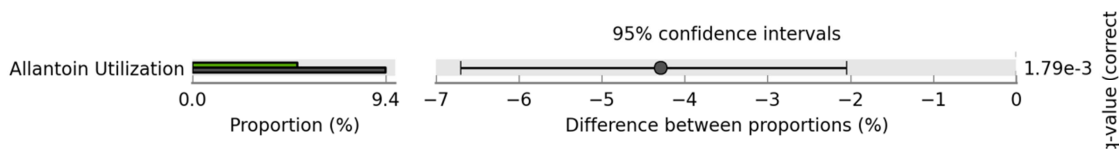
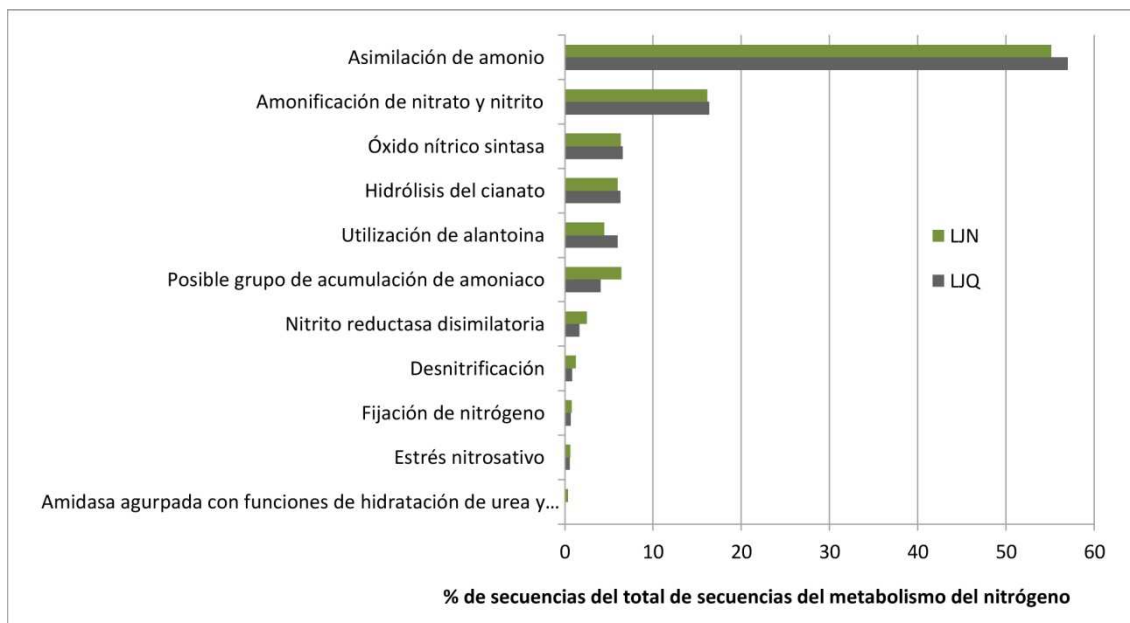


Figura 3.2-1. Porcentaje de abundancia de secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 relacionadas con los diferentes grupos funcionales (nivel 3 de la base de datos de subsistemas de SEED) del metabolismo de nitrógeno con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno.

Para los contigs obtenidos por Illumina, dentro del nivel 3 del sistema de clasificación del MG-Rast para la base de datos de subsistemas de SEED se observa que las funciones con mayor número de contigs dentro del metabolismo del nitrógeno son: en primer lugar la amonificación de nitrato y nitrito, con abundancias del 34,09 y 32,54 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno en LQ y LJN, respectivamente (Fig. 3.2-2). En segundo lugar está la asimilación de amonio, con abundancias del 24,45 y 23,01 % en LQ y LJN, respectivamente (Fig. 3.2-2). Estas 2 funciones muestran un orden de abundancia inverso al obtenido en las secuencias obtenidas por 454, con menor abundancia de secuencias asociadas a la asimilación de amonio y mayor de las asociadas a la amonificación de nitrato y nitrito. En tercer y cuarto lugar están la fijación de nitrógeno y la utilización de alantoína, con abundancias del 16,27 y 16,31 % y del 9,56 y 7,42 % para LQ y LJN respectivamente (Fig. 3.2-2) con

respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno. En el caso de la fijación del nitrógeno, en las secuencias de 454 sólo existe un 0,70 % y un 0,80 % de secuencias en LJQ y LJN, respectivamente, por lo que en los contigs de Illumina se obtiene mucha más información acerca de este proceso metabólico. Mientras que mediante secuenciación 454 se han obtenido secuencias con homología con 3 proteínas pertenecientes a la fijación de nitrógeno, mediante secuenciación Illumina se han encontrado contigs homólogos a 30 de las proteínas implicadas en este proceso metabólico, dentro de las cuales se presentan 7 tipos diferentes de subunidades de la enzima nitrogenasa, según sea con molibdeno, hierro o vanadio.. Las subunidades de la enzima nitrogenasa halladas son *Nitrogenase (iron-iron) alpha chain*, *Nitrogenase (iron-iron) beta chain*, *Nitrogenase (iron-iron) delta chain*, *Nitrogenase (molybdenum-iron) alpha chain*, *Nitrogenase (molybdenum-iron) beta chain*, *Nitrogenase (vanadium-iron) alpha chain* y *Nitrogenase (vanadium-iron) beta chain*.

De las 12 funciones consignadas dentro del metabolismo del nitrógeno, en 3 de ellas existen diferencias estadísticamente significativas, según el análisis realizado con el programa informático STAMP, de abundancia de contigs entre muestras, mientras que en las secuencias de 454 sólo existen diferencias estadísticamente significativas en la función de la utilización de la alantoína. Por un lado en la muestra no quemada (LJN) se ha detectado una mayor abundancia de contigs asociados a la nitrito reductasa disimilatoria (con un 7,78 % de secuencias frente al 3,62 % de LJQ) y a la óxido nítrico sintasa (con un 6,16 % frente al 4,42 % en LJQ) (Fig. 3.2-4); mientras que en la muestra quemada (LJQ) son más abundantes los contigs asociados a la utilización de alantoína, con un 9,56 % frente al 7,42 % en LJN (Fig. 3.2-2).

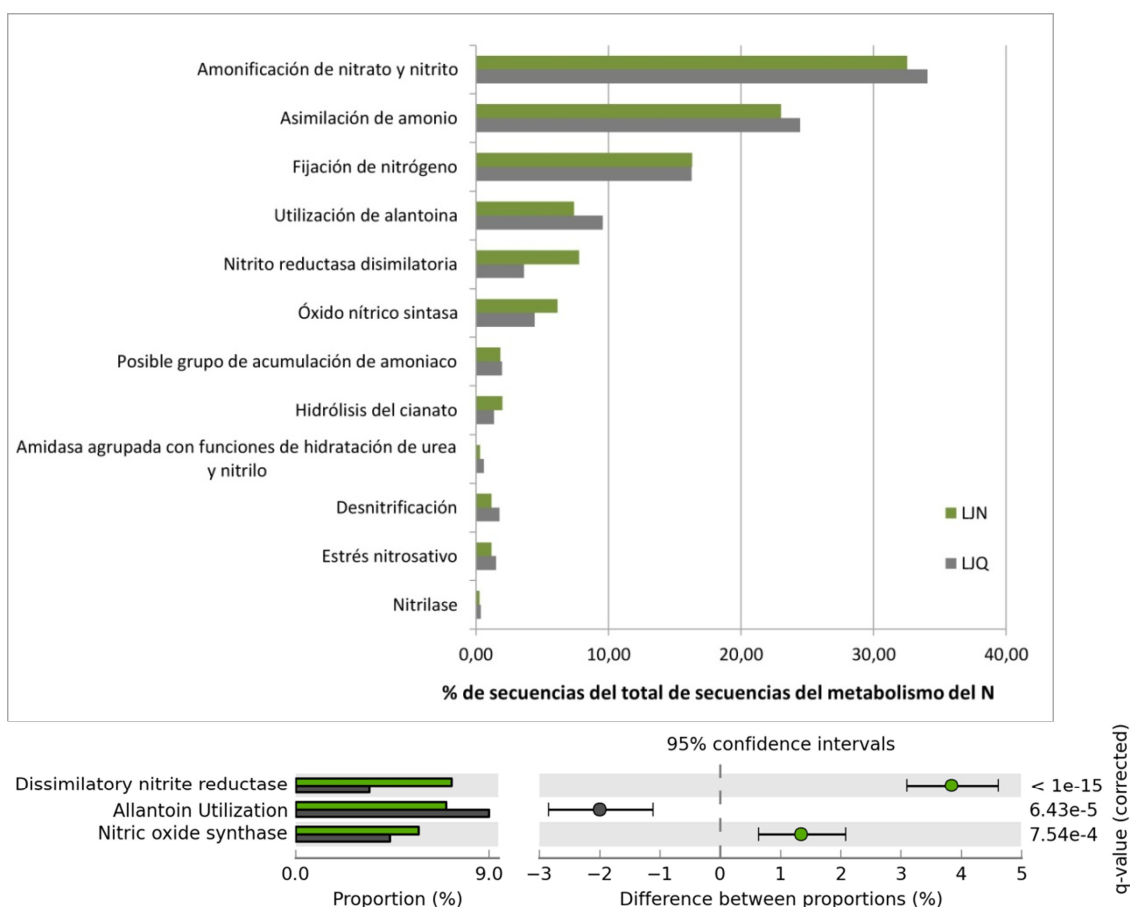
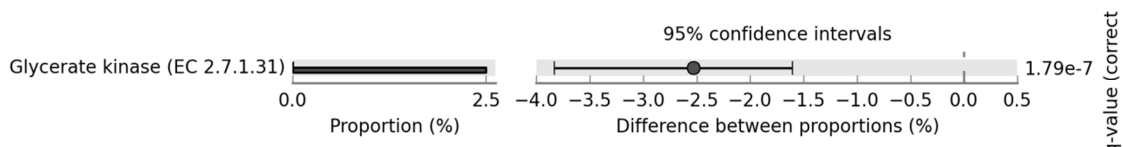


Figura 3.2-2. Porcentaje de abundancia de contigs obtenidos por secuenciación Illumina relacionados con los diferentes grupos funcionales (nivel 3 de la base de datos de subsistemas de SEED) del metabolismo de nitrógeno con respecto al total de contigs del metabolismo del nitrógeno.

A nivel de función dentro de la base de datos de subsistemas de SEED, o de proteínas, sólo existe una proteína cuya abundancia es significativamente diferente entre muestras, según el análisis realizado con el programa STAMP para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454. Esta proteína es la *Glycerate kinase*, con mayor abundancia en LQ, con un 2,53 % de abundancia con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno mientras que en LQN no se ha detectado. La proteína *Glycerate kinase* pertenece al grupo funcional de la utilización de la alantoina y está relacionada con el metabolismo del glioxilato. En el caso de los contigs obtenidos por secuenciación Illumina, existen 19 proteínas del metabolismo del nitrógeno que muestran abundancias con diferencias estadísticamente significativas entre las 2 muestras, al analizarlas con el programa informático STAMP. Dentro de éstas se han hallado 9 que son más abundantes en el suelo quemado (LQ): *Ferredoxin-dependent glutamate synthase* (asimilación de amonio), con una abundancia del 3,08 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno, frente al 1,65 % en LQN; *Glycerate kinase* (utilización de

RESULTADOS Capítulo 3

alantoína), con una abundancia del 1,05 % frente al 0,29 % en LJN; *Nitrite reductase accessory protein NirV* (desnitrificación), con una abundancia del 0,25 % frente al 0,00 % en LJN; *Nitric-oxide synthase* (síntesis de óxido nítrico), con una abundancia del 0,23 % frente al 0,00 % en LJN; *Flavoheмоprotein* (estrés nitrosativo), con una abundancia del 0,51 % frente al 0,14 % en LJN; *Nitrogenase vanadium-cofactor synthesis protein VnfN* (fijación de nitrógeno), con una abundancia del 0,15 % frente al 0,00 % en LJN; y por último 3 proteínas pertenecientes a la función de la amonificación de nitrato y nitrito: *Nitrite reductase probable electron transfer 4Fe-S subunit*, *Cytochrome c nitrite reductase, small subunit NrfH* y *Cytochrome c552 precursor*, con abundancias del 8,74 %, 0,95 % y 2,99 % en LJQ, respectivamente, frente al 7,00 %, 0,48 % y 2,12 % de abundancia en LJN, respectivamente (Fig. 3.2-3). Para la muestra que no sufrió el incendio (LJN), existen 10 proteínas con abundancias significativamente mayores que en la que sí sufrió el incendio, dentro de los contigs obtenidos por secuenciación Illumina. Estas proteínas son: *Uroporphyrinogen-III methyltransferase* (la única proteína hallada dentro de la función nitrato reductasa disimilatoria), con una abundancia del 7,22 % frente al 3,41 % en LJQ; *putative cytochrome P450 hydroxylase* (óxido nítrico sintasa), con una abundancia del 3,40 % frente al 1,99 % en LJQ; *Putative thiol:disulfide oxidoreductase, nitrite reductase complex assembly* (amonificación de nitrato y nitrito), con una abundancia del 5,38 % frente al 3,68 % en LJQ; *Nitrogenase stabilizing/protective protein NifW* (fijación de nitrógeno), con una abundancia del 0,46 % frente al 0,07 % en LJQ; *Respiratory nitrate reductase gamma chain* (amonificación de nitrato y nitrito), con una abundancia del 0,73 % frente al 0,25 % en LJQ; *Cyanate ABC transporter, substrate binding protein* (hidrólisis de cianato), con una abundancia del 0,25 % frente al 0,04 % en LJQ; y por último 4 proteínas pertenecientes a la función de la asimilación de amonio: *Glutamate synthase [NADH]*, *Glutamine synthetase type II*, *Nitrogen regulation protein NR(I)* y *Nitrogen regulatory protein P-II*, con abundancias del 0,56 %, 0,27 %, 0,68 % y 1,12 % en LJN, respectivamente, frente al 0,21 %, 0,05 %, 0,29 % y 0,64 % de abundancia en LJQ, respectivamente (Fig. 3.2-3).



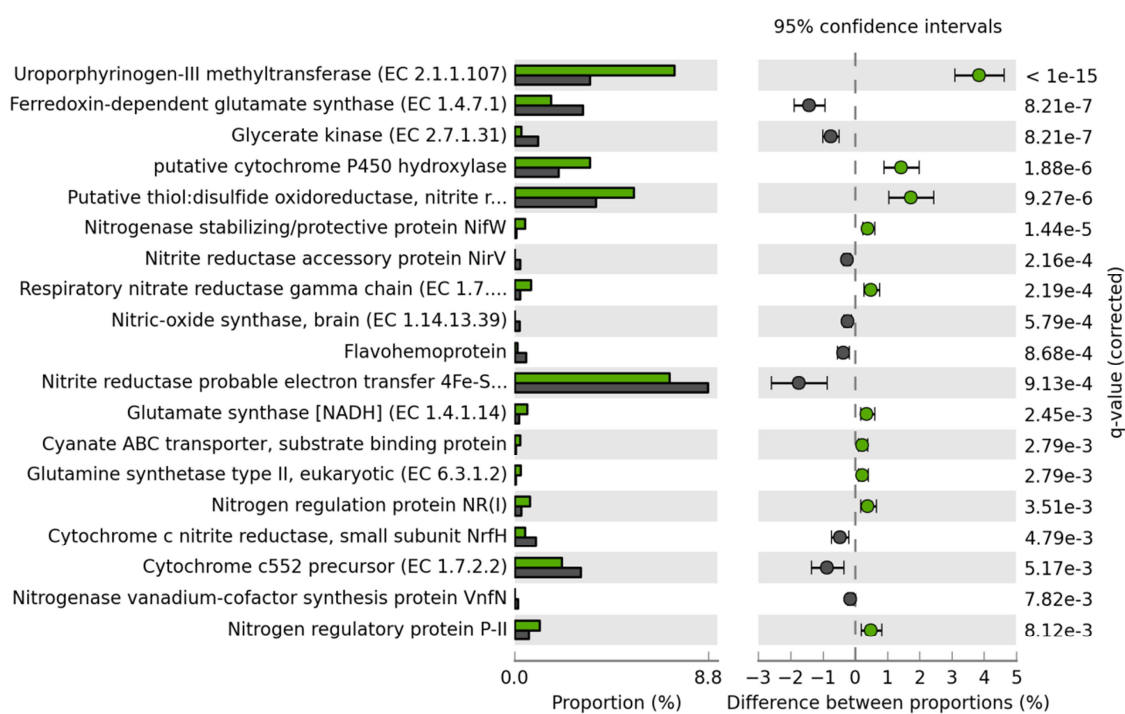


Figura 3.2-3. Porcentaje de abundancia de contigs obtenidos por secuenciación Illumina relacionadas con los diferentes grupos funcionales (nivel 3 de la base de datos de subsistemas de SEED) del metabolismo de nitrógeno con respecto al total de contigs del metabolismo del nitrógeno.

3. BASE DE DATOS KEGG ORTHOLOGY (KO) DE “KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES” (KEGG).

De la secuenciación masiva mediante el sistema de pirosecuenciación 454 de Roche™, un total de 30.530 secuencias en LJQ y 44.266 secuencias en LJN mostraron homología con alguna proteína de la base de datos KO de KEGG (Tabla 3.2-1). De este total de secuencias, el 60,9 y 60,28 % para LJQ y LJN respectivamente tienen homología con proteínas del metabolismo, y de éstas el 9,11 y un 9,65 % para LJQ y LJN respectivamente pertenecen al metabolismo energético, dentro del cual se encuentra el metabolismo del nitrógeno. La cantidad de secuencias que se engloban en el metabolismo del nitrógeno son un 6,24 % en LJQ y un 7,40 % en LJN, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas. De la secuenciación masiva por síntesis, mediante el sistema de Illumina, un total de 227.732 contigs en LJQ y 130.397 en LJN dan homología con alguna proteína de la base de datos KO de KEGG. De este número total de contigs, el 39,11 y 38,84 % para LJQ y LJN, respectivamente, dan homología con proteínas implicadas en el metabolismo, y de éstas el 11,96 y un 12,16 % para LJQ y LJN respectivamente pertenecen al metabolismo energético, dentro del cual se encuentra el metabolismo del nitrógeno. La cantidad de hits que se engloban en el metabolismo del nitrógeno son un 7,98 % en LJQ y un 7,44 % en LJN, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas, según el análisis realizado con STAMP. Al igual que ocurría al enfrentar las secuencias a la base de datos de subsistemas de SEED, con la base de datos de Kegg Orthology se obtiene un mayor número de hits en los contigs obtenidos por Illumina, partiendo de un número de secuencias similar, llegando a obtenerse hasta 7 veces más número de hits en la muestra de LJQ de Illumina que en la misma muestra con secuenciación 454.

En las secuencias obtenidas por tecnología de pirosecuenciación 454™, dentro de la ruta metabólica del metabolismo del nitrógeno (cuyo código es KO 00910) no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, según el análisis realizado con el programa estadístico STAMP, en la abundancia relativa de las proteínas pertenecientes a esta ruta entre muestras. Al contrario de lo que ocurre con las secuencias obtenidas por secuenciación 454™, con los contigs obtenidos por Illumina se han encontrado 6 proteínas del metabolismo del nitrógeno con diferencias estadísticamente significativas en su abundancia relativa entre muestras, según el análisis realizado con el programa STAMP (Fig. 3.2-5). Por un lado las proteínas con mayores abundancias en LJQ son, por orden de significancia de esta diferencia, *nrfD*: *formate-dependent nitrate reductase complex, transmembrane protein*, con una abundancia del 3,94 % frente al 0,70 % en LJN; y *nitrate reductase (NADH)*, con una abundancia del 1,33 % frente al 0,10 % en LJN. Las proteínas que con más abundancia en LJN son, por orden de significancia de la diferencia entre muestras, *napG*; *ferredoxin-type protein NapG*, con una abundancia del 8,75 % frente al 2,78 % en LJQ; *nifK*; *nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain*, con una abundancia del 2,68 % frente al 0,52 % en LJQ; *napC*; *cytochrome c-type protein NapC*, con una

abundancia del 0,80 % frente al 0,00 % en LJQ; y *carbonic anhydrase*, con una abundancia del 4,08 % frente al 1,78 % en LJQ (Fig. 3.2-4). Por lo tanto, y según estos datos, en el suelo quemado tiene una mayor proporción de proteínas relacionadas con la disimilación de nitrato, mientras que en el suelo no quemado hay mayor cantidad de proteínas relacionadas con la fijación de nitrógeno y la asimilación de nitrato.

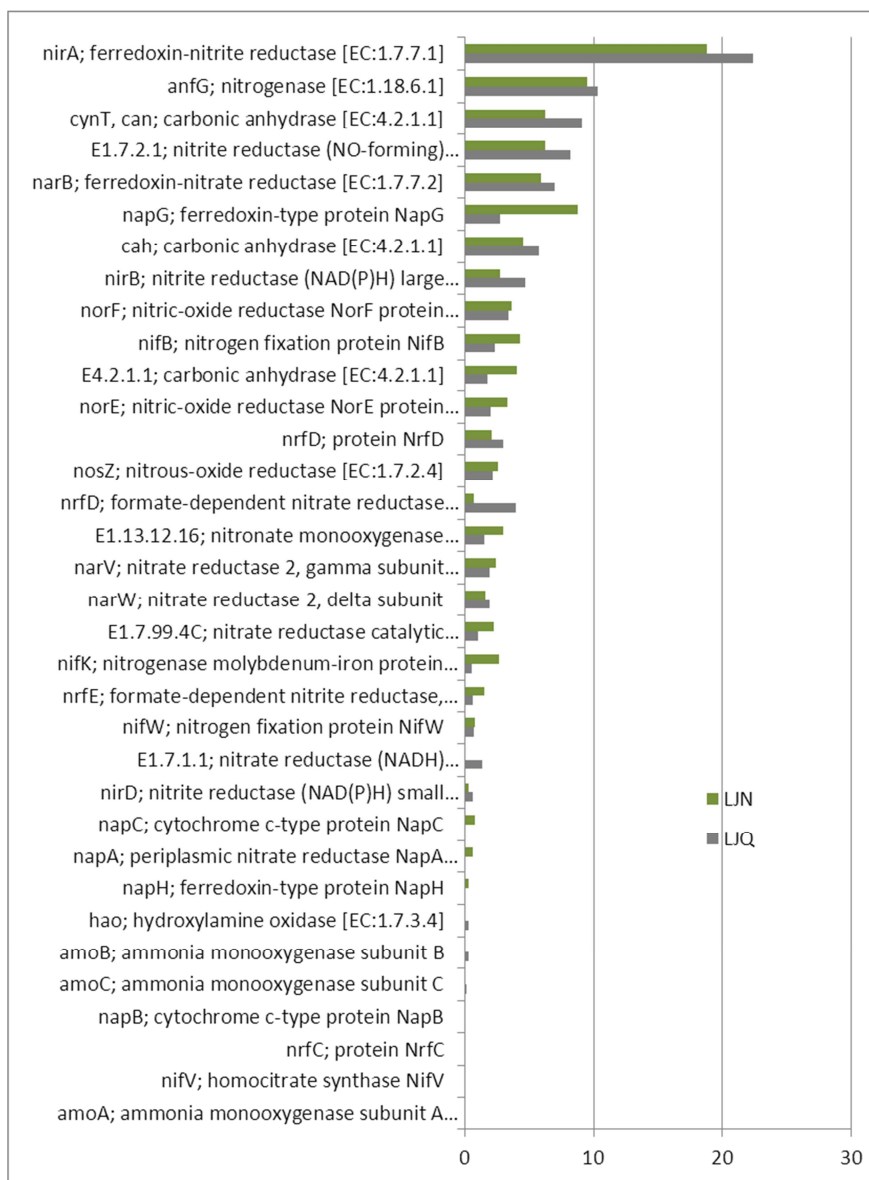


Figura 3.2-4. Abundancia relativa, con respecto al total de proteínas del metabolismo del nitrógeno, de las diferentes proteínas halladas al enfrentar los contigs obtenidos mediante secuenciación Illumina con la base de datos KO de KEGG.

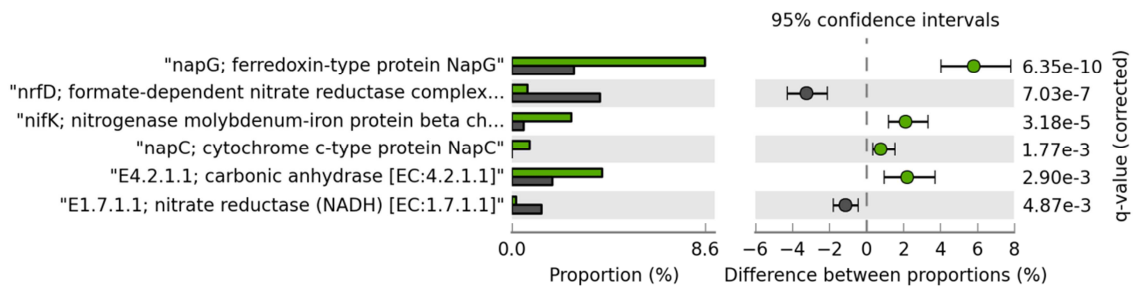


Figura 3.2-5. Proteínas con abundancias estadísticamente diferentes entre las muestras LJN y LJQ según lo obtenido con secuenciación Illumina.

Al realizar un BlastX frente a la base de datos nr (no redundante del NCBI) con las secuencias del metabolismo del nitrógeno obtenidas con el MG-Rast al enfrentar las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 a la base de datos de Kegg Orthology, se observa que existen ciertas diferencias entre muestras. Al analizar la adscripción taxonómica de estas secuencias, se observa que los *phyla* más abundantes son Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria, sumando entre los 3 un 79,75 y un 82,13 % del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno en LJQ y LJN, respectivamente (Fig. 3.2-6). De los 13 *phyla* representados, sólo 3 tienen diferencias significativas de abundancia entre las dos muestras de encinas, según el análisis realizado con *Metastat*, siendo en los 3 casos más abundantes en la muestra LJQ. Éstos son el *phylum* Actinobacteria, con un 22,78 % de abundancia relativa en LJQ y un 13,06 % en LJN; el *phylum* Firmicutes, con un 6,33 % de abundancia relativa en LJQ y un 1,37 % en LJN; y el *phylum* Deinococcus-Thermus, con un 1,9 % de abundancia relativa en LJQ y un 0 % en LJN (Fig. 3.2-6).

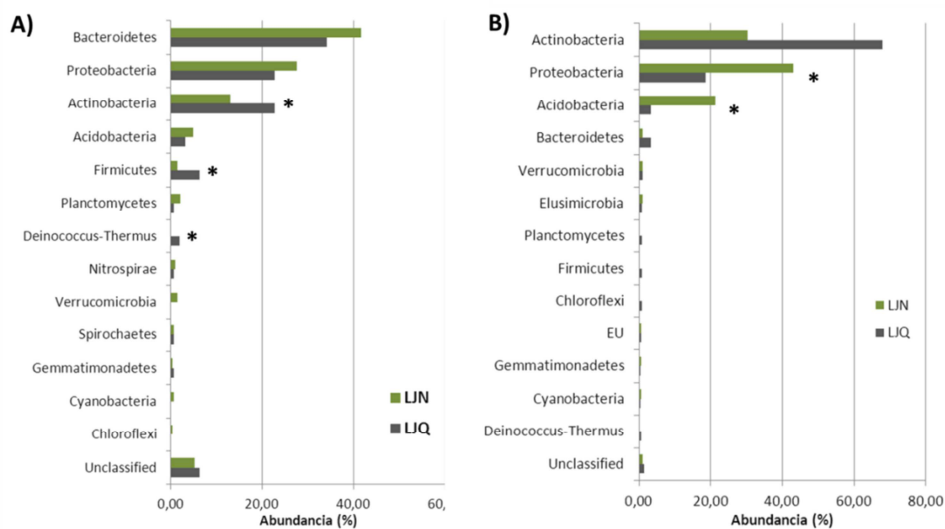


Figura 3.2-6. Abundancia relativa, con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, de los diferentes *phyla* hallados al realizar un BlastX frente a la base de datos nr con las secuencias que dan homología con proteínas del metabolismo del nitrógeno en la base de datos KO de KEGG, para las secuencias de 454 (A) y los contigs de illumina (B). Con asterisco se indica los *phyla* con diferencias significativas entre muestras.

Al realizar el mismo procedimiento con los contigs obtenidos por secuenciación Illumina, se observa que al analizar la adscripción taxonómica de estos contigs los *phyla* más abundantes son Actinobacteria, Proteobacteria y Acidobacteria, sumando entre los 3 un 89,54 y un 94,55 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno en LJQ y LJN, respectivamente. Esto difiere con lo obtenido a partir de las secuencias obtenidas por 454, donde los *phyla* más abundantes son Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria, siendo los *phyla* Actinobacteria, Firmicutes y Deinococcus-Thermus significativamente más abundantes en LJQ. Además, en los contigs obtenidos por Illumina, los 3 *phyla* más abundantes son los únicos que presentan diferencias estadísticamente significativas en su abundancia entre muestras, según el análisis realizado con *Metastat*. Por un lado el *phylum* Actinobacteria es más abundante en el suelo quemado (LJQ), con un 67,83 % de abundancia relativa frente al 30,20 % en LJN (Fig. 3.2-6), lo cual también se observa en las secuencias obtenidas por 454. Por otro lado, tanto el *phylum* Proteobacteria como el *phylum* Acidobacteria son más abundantes en el suelo no quemado (LJN), con un 43,07 % y 21,29 % de abundancia relativa, respectivamente, frente al 18,50 % y 3,22 % de abundancia en LJN, respectivamente para cada *phylum* (Fig. 3.2-6).

A)				B)			
Phylum	Género	LJN	LJQ	Phylum	Género	LJN	LJQ
Bacteroidetes	Niastella	11,34	10,13	Actinobacteria	Arthrobacter *	0,50	25,74
Proteobacteria	Bradyrhizobium *	7,22	1,27	Actinobacteria	Mycobacterium *	13,37	3,22
Bacteroidetes	Flavobacterium	5,84	2,53	Proteobacteria	Bradyrhizobium *	12,38	2,68
Actinobacteria	Arthrobacter *	0,00	6,96	Acidobacteria	Granulicella *	10,40	0,00
Bacteroidetes	Chitinophaga	1,72	4,43	Actinobacteria	Modestobacter *	0,00	7,51
Bacteroidetes	Mucilaginibacter	2,75	2,53	Actinobacteria	Blastococcus *	0,00	6,17
Actinobacteria	Mycobacterium	1,37	3,16	Actinobacteria	Conexibacter	3,47	2,14
Bacteroidetes	Pedobacter *	3,44	0,63	Acidobacteria	Acidobacterium	4,46	1,07
Bacteroidetes	Solitalea	2,75	1,27	Actinobacteria	Pseudonocardia	0,99	4,29
Proteobacteria	Burkholderia	2,41	1,27	Actinobacteria	Geodermatophilus	0,00	5,09
Bacteroidetes	Niabella	2,41	1,27	Proteobacteria	Rhodopseudomonas	4,46	0,54
Firmicutes	Bacillus *	0,34	3,16	Acidobacteria	Candidatus_Chloracidobacterium	1,49	1,88
Actinobacteria	Streptomyces	2,06	1,27	Proteobacteria	Nitrospira	0,00	3,22
Actinobacteria	Blastococcus *	0,00	2,53	Acidobacteria	Terriglobus	2,48	0,27
Bacteroidetes	Spirosoma *	0,00	2,53				

Figura 3.2-7. Abundancia relativa, con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, de los diferentes géneros hallados al realizar un BlastX frente a la base de datos nr con las secuencias que dan homología con proteínas del metabolismo del nitrógeno en la base de datos KO de KEGG, para las secuencias de 454 (A) y los contigs de illumina (B). Con asterisco se indica los géneros con diferencias significativas entre muestras.

En la clasificación taxonómica a nivel de género de las secuencias obtenidas por 454 perteneciente al metabolismo del nitrógeno se tiene un total de 159 géneros diferentes, pero sólo 15 de ellos tienen una abundancia superior al 2 % en al menos una de las dos muestras (Fig. 3.2-7). De estos 15 géneros, 6 tienen abundancias significativamente diferentes entre muestras, según el análisis realizado con *Metastat*. En LJN son significativamente más abundantes los géneros *Bradyrhizobium* (Proteobacteria) y *Pedobacter* (Bacteroidetes), con abundancias del 7,22 y 3,44 % respectivamente

RESULTADOS Capítulo 3

frente a 1,27 y 0,63 % de abundancia en LJQ. En LJQ, la rizosfera quemada, son más abundantes los géneros *Bacillus* (Firmicutes), con un 3,16 % de abundancia frente al 0,34 % en LJN, *Arthrobacter* (Actinobacteria), *Blastococcus* (Actinobacteria) y *Spirosoma* (Bacteroidetes), con abundancias del 6,96 %, 2,53 % y 2,53 % respectivamente, no habiendo sido detectados en la muestra LJN (Fig. 3.2-7). Con los contigs obtenidos por Illumina se determinan un total de 131 géneros diferentes, de los cuales 14 tienen una abundancia superior al 2 % en al menos una de las muestras (Fig. 3.2-7). De estos 14 géneros, los 6 más abundantes tienen diferencias estadísticamente significativas entre muestras. En el suelo no quemado (LJN) son significativamente más abundantes los géneros *Mycobacterium* (Actinobacteria), *Bradyrhizobium* (Proteobacteria), y *Granulicella* (Acidobacteria), con abundancias del 13,37 %, 12,38 % y 10,40 % respectivamente, frente al 3,22 %, 2,68 % y 0,00 % de abundancia en LJQ, respectivamente (Fig. 3.2-7). En el suelo quemado (LJQ) son más abundantes los géneros *Arthrobacter*, *Modestobacter* y *Blastococcus*, pertenecientes al *phylum* Actinobacteria, y con abundancias del 25,74 %, 7,51 % y 6,17 % respectivamente, frente al 0,50 %, 0,00 % y 0,00 % de abundancia en LJN, respectivamente (Fig. 3.2-7).

**CAPÍTULO 3.3: INFLUENCIA DEL DESARROLLO DE LA CUBIERTA
VEGETAL EN LAS RUTAS METABÓLICAS DEL CICLO DEL
NITRÓGENO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A LA
RIZOSFERA DE QUERCÍNEAS.**

1. BASE DE DATOS SUBSISTEMAS DE SEED.

De la secuenciación masiva mediante pirosecuenciación 454 de Roche™, del DNA obtenido de las rizosferas de encinas y robles en la primavera de 2008, y tras realizar los correspondientes filtrados de las lecturas obtenidas, se ha obtenido un total de 412.302 secuencias para LJN, 222.689 secuencias para CNB y 167.219 secuencias para CNA, con una longitud media de secuencia de entre 370 y 388 bp (Tabla 3.3-1). Al enfrentar estas secuencias a la base de datos de subsistemas de SEED se obtuvo que un total de 100.814 secuencias en LJN, 48.897 secuencias en CNB y 36.276 secuencias en CNA (Tabla 3.3-1) daban homología con alguna proteína, utilizando como criterios de homología un corte de máximo e-valor de 10^{-5} , un corte de identidad mínima del 60% y una longitud mínima de alineamiento de 50 bp. De todas estas secuencias que han dado homología con alguna proteína de la base de datos de subsistemas de SEED, entre el 1,04 y el 1,09 % lo hacen para proteínas pertenecientes al metabolismo del nitrógeno (Tabla 3.3-1), no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre muestras en cuanto al porcentaje de secuencias pertenecientes al ciclo del nitrógeno.

Tabla 3.3-1. Metadatos de las muestras de robles y encinas en 454.

Muestra	LJN	CNB	CNA
nº bps	159.918.596	82.556.863	64.800.059
nº total de secuencias	412.302	222.689	167.219
longitud media de secuencia (bps)	388	370	387
nº de secuencias con homología en SEED	100.814	48.897	36.276
nº de secuencias del metabolismo del N en SEED	1.046 (1,04 %)	512 (1,05 %)	395 (1,09 %)
nº de secuencias con homología en KO	44.266	21.271	15.562
nº de secuencias del metabolismo del N en KO	190 (7,40 %)	72 (5,63 %)	63 (7,18 %)

De la secuenciación masiva por síntesis, mediante el sistema de Illumina, del DNA obtenido de las rizosferas de encinas y robles en la primavera de 2008, y tras realizar los correspondientes filtrados de las lecturas obtenidas y ensamblarlas con SOAP de novo, se ha obtenido un total de 269.321 contigs para LJN, 205.779 contigs para CNB y 205.095 contigs para CNA, con una longitud media de contig de entre 320 y 420 bp (Tabla 3.3-2). Al enfrentar estos contigs a la base de datos de subsistemas de SEED se obtuvo que un total de 238.370 contigs en LJN, 164.958 contigs en CNB, y 158.901 contigs en CNA (Tabla 3.3-2) dan homología con alguna proteína, utilizando los mismos criterios de corte que para las secuencias obtenidas mediante pirosecuenciación. Como también ocurría en las muestras de encinas (LJQ y LJN) presentadas en el apartado anterior, con la secuenciación Illumina se obtiene, del total de contigs, un mayor porcentaje de contigs que dan homología con alguna proteína de la base de datos de subsistemas de SEED. Además, existen diferencias estadísticamente significativas, según el análisis realizado con el programa STAMP, entre muestras en cuanto al porcentaje contigs pertenecientes al

RESULTADOS Capítulo 3

metabolismo del nitrógeno. De todas las contigs que han dado homología con alguna proteína de la base de datos subsistemas de SEED, el 2,26 y 2,27 % lo hacen para proteínas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en las muestras de suelo rizosférico de encinar y de la zona baja del robledal (LJN y CNB), respectivamente; las cuales difieren de la otra muestra, la de la zona alta del robledal (CNA), donde el 2,39 % de las contigs pertenecen al metabolismo del nitrógeno (Tabla 3.3-2). Esta diferencia en cuanto a la cantidad de contigs pertenecientes al metabolismo del nitrógeno no se observa para los datos obtenidos de la pirosecuenciación 454TM, siendo este porcentaje de secuencias mayor para las secuencias obtenidas por Illumina que para las que se han obtenido por pirosecuenciación 454TM.

Tabla 3.3-2. Metadatos de las muestra de encinas en Illumina.

Muestra	LJN	CNB	CNA
nº bps	113.210.578	65.818.061	71.972.462
nº total de contigs	269.321	205.779	205.095
longitud media de contig (bps)	420	320	351
nº de contigs con homología en SEED	238.370	164.958	158.901
nº de contigs del metabolismo del N en SEED	5.398 (2,26 %)	3.741 (2,27 %)	3.805 (2,39 %)
nº de contigs con homología en KO	130.397	90.144	84.893
nº de contigs del metabolismo del N en KO	774 (7,44 %)	554 (7,80 %)	511 (7,74 %)

Para las secuencias obtenidas por 454, dentro del nivel 3 del sistema de clasificación del MGRast de la base de datos de subsistemas de SEED, se observa que las funciones con mayor número de secuencias dentro del metabolismo del nitrógeno son: en primer lugar la asimilación de amonio, con abundancias de entre el 54,19 y el 56,37 % del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.3-1). En segundo lugar está la amonificación de nitrato y nitrito, con abundancias de entre el 13,11 y el 16,15 % (Fig. 3.3-1). Y en tercer lugar están la óxido nítrico sintasa y la hidrólisis del cianato, con abundancias de entre el 6,05 y el 7,68 % y de entre el 5,98 y el 6,55 % respectivamente con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.3-1). No existen diferencias estadísticamente significativas entre muestras con respecto a la abundancia relativa de secuencias de una función metabólica determinada.

En el caso de los contigs obtenidos por secuenciación de síntesis Illumina se observa que las funciones con mayor número de contigs son: en primer lugar la amonificación de nitrato y nitrito, con abundancias de entre el 29,74 y el 33,15 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.3-2), siendo estos valores el doble de lo obtenido por secuenciación 454. En segundo lugar está la asimilación de amonio, con abundancias de entre el 21,53 y el 23,01 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.3-2), siendo estos valores la mitad de lo obtenido con las secuencias de 454. Y en tercer lugar están la fijación de nitrógeno y la utilización de alantoína, con abundancias de

entre 15,06 y 16,31 % y de entre 7,42 y 7,79 % respectivamente con respecto al total de contigs del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.3-2). De nuevo se observa que con la secuenciación por Illumina se obtiene mayor porcentaje de contigs pertenecientes a la fijación de nitrógeno. Existen 2 funciones que presentan diferencias significativas entre muestras, para los contigs obtenidos por Illumina. La función nitrito reductasa disimilatoria es más abundante en la muestra de la zona alta del robledal (CNA), con un 12,68 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno, que en el resto de muestras, donde hay abundancias del 7,51 % y del 9,23 % (Fig. 3.3-2). Por otro lado, el número de contigs de la función de desnitrificación es significativamente más abundante en la muestra de la zona alta del robledal (CNA), con una abundancia del 2,17 %, mientras que en la muestra de encinas (LJN) tiene una abundancia del 1,18 % (Fig. 3.3-2).

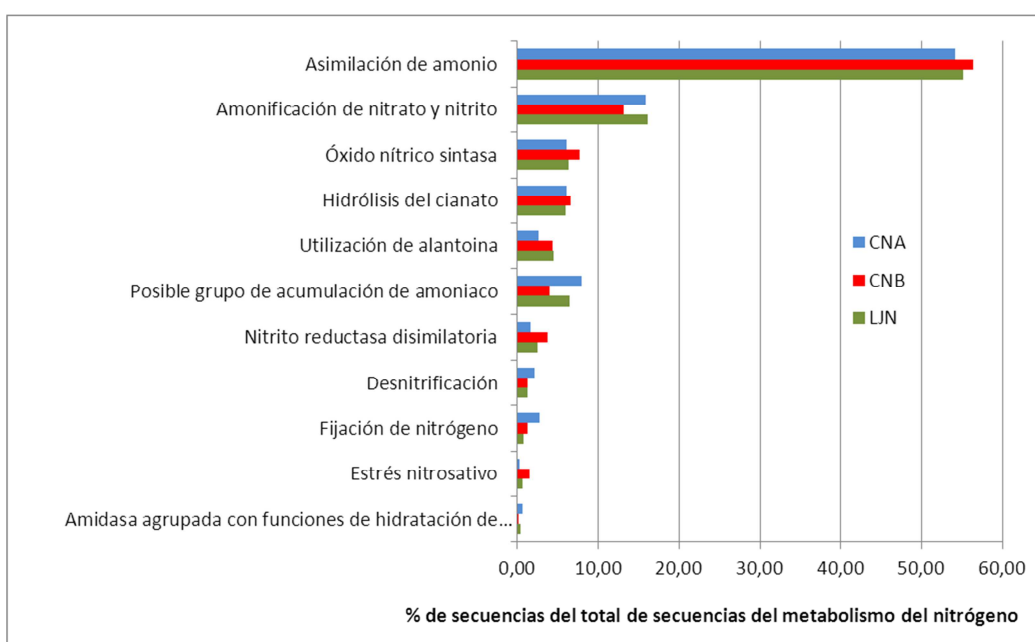


Figura 3.3-1. Porcentaje de abundancia de secuencias obtenidas por secuenciación 454 relacionadas con los diferentes grupos funcionales (nivel 3 de la base de datos de subsistemas de SEED) del metabolismo de nitrógeno con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno.

RESULTADOS Capítulo 3

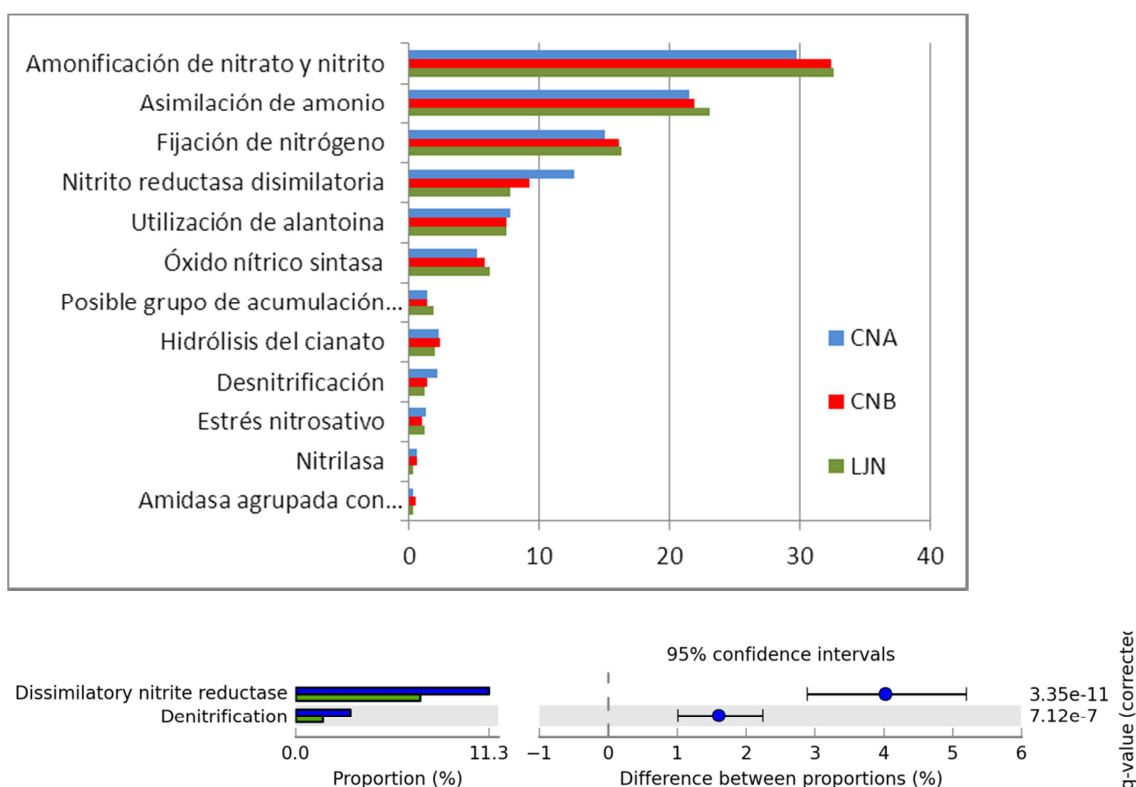


Figura 3.3-2. Porcentaje de abundancia de contigs obtenidos por secuenciación Illumina relacionadas con los diferentes grupos funcionales (Level 3 de la base de datos de subsistemas de SEED) del metabolismo de nitrógeno con respecto al total de contigs del metabolismo del nitrógeno. Se indican los que muestran diferencias estadísticamente significativas.

A nivel de función dentro de las bases de datos de subsistemas de SEED, o de proteínas, del total de 74 proteínas halladas en las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454TM sólo existe una que presenta abundancias significativamente diferentes entre alguna muestra de robles y la de encinas. Se trata de la proteína *Allantoicase*, más abundante en la muestra de la zona alta del robledal (CNA), con un 1,01 % de secuencias del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, que en la de encinas (LJN), donde no se ha detectado.

Del total de las 145 proteínas del metabolismo del nitrógeno halladas al enfrentar los contigs obtenidos por Illumina con la base de datos de subsistemas de SEED, 5 de estas proteínas muestran diferencias, en su abundancia, estadísticamente significativas entre algunas de las muestras de robledal y la muestra de encinar (Fig. 3.3-3). De estas proteínas la *Uroporphyrinogen-III methyltransferase*, que actúa en la nitrito reductasa disimilatoria, tiene una mayor abundancia en la muestra de la zona alta del robledal (CNA), con un 12,11 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno, que en el resto de muestras, donde los porcentajes son del 7,47 y del 8,93 % (Fig. 3.3-3). El grupo funcional de la amonificación de nitrato y nitrito tiene diferencias de abundancia entre muestras en una de sus proteínas, la *Cytochrome c-type protein NrfB precursor*, que tiene mayor abundancia en la muestra de la

zona baja del robledal (CNB), con el 1,03 % de abundancia, que en la muestra de encinar (LJN), donde la abundancia es del 0,37 % (Fig. 3.3-3). En el grupo funcional de la desnitrificación la proteína *Nitrite reductase accessory protein NirV* presenta diferencias estadísticamente significativas entre muestras en su abundancia, ya que no ha sido detectada en la muestra de encinar (LJN) mientras que en el resto de muestras tiene valores de abundancia del 0,23 % (Fig. 3.3-3). Por último, dentro del grupo funcional de la fijación de nitrógeno existen 2 proteínas con abundancias significativamente diferentes entre muestras. La proteína *nitrogenase (iron-iron) reductase and maturation protein AnfH* tiene menor abundancia en la muestra de robledal de la zona baja (CNB) que en el resto de muestras, ya que en CNB no se ha obtenido ningún contig mientras que en el resto de muestras existen abundancias del 0,23 % en CNA y del 0,37 en LJN (Fig. 3.3-3). En el caso de la proteína *Nitrogenase (iron-iron) beta chain* se observa una abundancia significativamente mayor en la muestra de encinar (LJN) que en el resto de muestras, con una abundancia del 0,25 % en LJN mientras que en el resto de muestras no se ha obtenido ningún contig de esta proteína (Fig. 3.3-3).

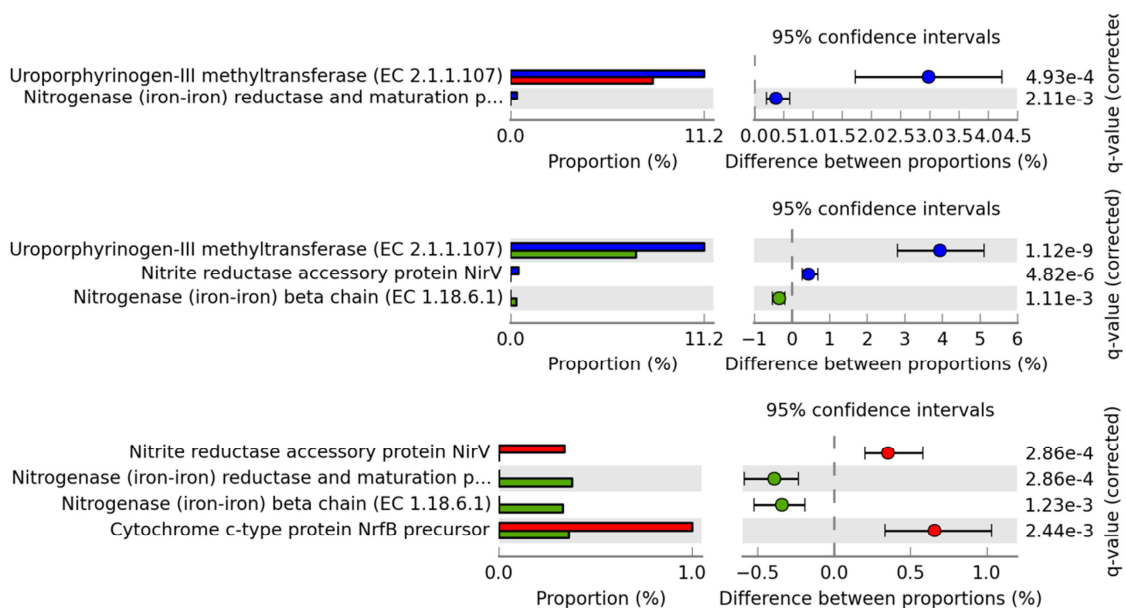
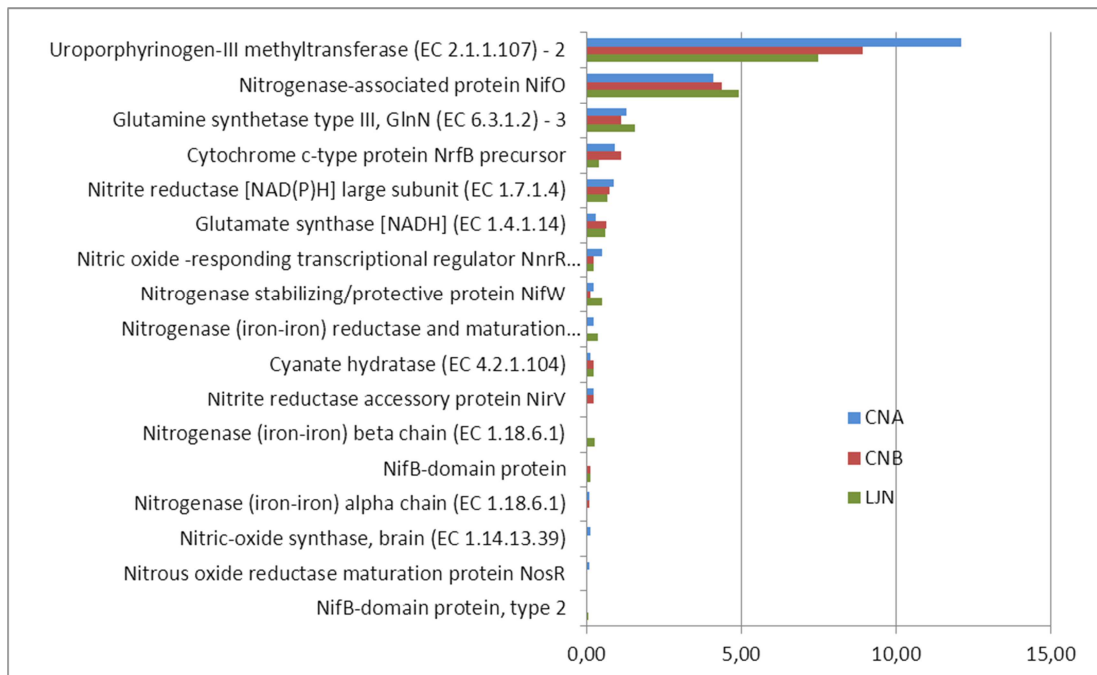


Figura 3.3-3. Abundancia relativa, con respecto al total de proteínas del metabolismo del nitrógeno, de las diferentes proteínas que han mostrado diferencias entre muestras estadísticamente significativas halladas al enfrentar los contigs obtenidos mediante secuenciación Illumina con la base de datos de subsistemas de SEED.

2. BASE DE DATOS KEGG ORTHOLOGY (KO) DEL “KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES” (KEGG).

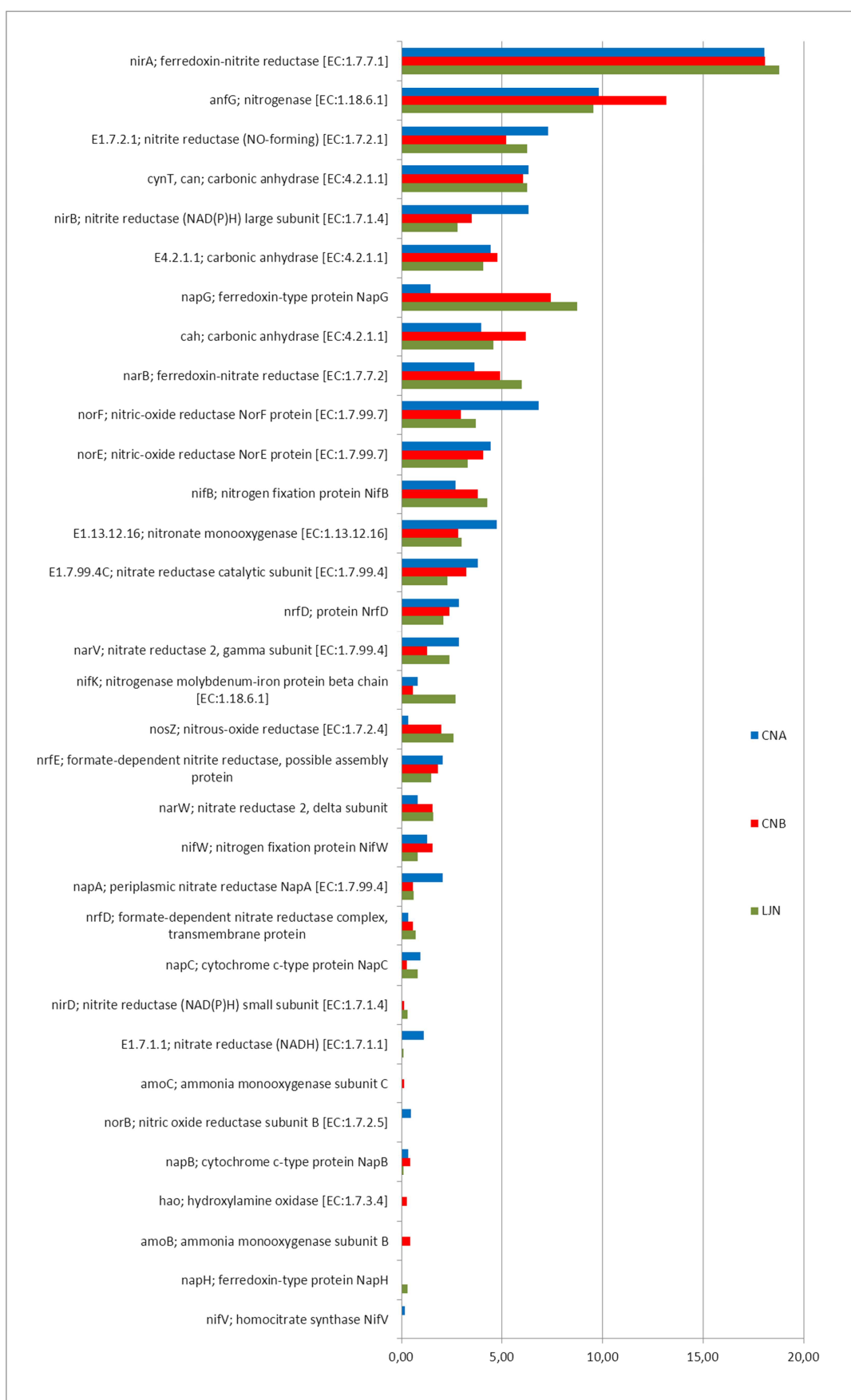
De las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454TM, un total de 44.266 secuencias en LNJ, 15.562 secuencias en CNA y 21.271 secuencias en CNB mostraron homología con alguna proteína de la base de datos KO de KEGG (Tabla 3.3-1). De este total de secuencias, un porcentaje de entre el 59,77 % al 60,43 % dan homología con proteínas implicadas en el metabolismo, y de éstas entre un 9,48 y un 9,96 % pertenecen al metabolismo energético, dentro del cual se encuentra el metabolismo del nitrógeno. La cantidad de secuencias que se engloban en el metabolismo del nitrógeno dentro del grupo funcional del metabolismo energético varía desde un 5,63 % en CNB a un 7,40 % en LNJ (Tabla 3.3-1), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

De la secuenciación masiva por síntesis, mediante el sistema de Illumina, un total de 130.397 contigs en LNJ, 90.144 contigs en CNB y 84. contigs en CNA han dado homología con alguna proteína de la base de datos KO de KEGG (Tabla 3.3-2). De este total de contigs, un porcentaje de entre el 37,56 % al 38,84 % dan homología con proteínas implicadas en el metabolismo, y de éstas entre un 11,96 y un 12,46 % pertenecen al metabolismo energético, dentro del cual se encuentra el metabolismo del nitrógeno. La cantidad de contigs que se engloban en el metabolismo del nitrógeno dentro del grupo funcional del metabolismo energético es de entre el 7,44 % en LNJ y el 7,80 % en CNB (Tabla 3.3-2).

Para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454TM, dentro de la ruta metabólica del metabolismo del nitrógeno (cuyo código es KO 00910) no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa de las proteínas pertenecientes a esta ruta entre muestras.

En el caso de los contigs obtenidos por Illumina se han encontrado 3 proteínas del metabolismo de nitrógeno con diferencias estadísticamente significativas en su abundancia relativa entre alguna de las muestras de robledales y la muestra del encinar. En primer lugar, la proteína *nosZ; nitrous-oxide reductase* muestra diferencias entre el suelo de la zona alta del robledal (CNA) y el del encinar (LNJ), siendo menos abundante en CNA, con el 0,32 % de abundancia relativa frente al 2,58 % en LNJ (Fig. 3.3-5). La proteína *napG; ferredoxin-type protein napG* muestra diferencias en su abundancia entre la muestras de encinar (LNJ) y la de la zona alta del robledal (CNA), con abundancias del 8,75 % y del 1,42 %, respectivamente (Fig. 3.3-5). Por otro lado, la proteína *nirB; nitrite reductase (NAD(P)H) large subunit* es más abundante en la muestra de zona alta (CNA), con un valor del 6,33 %, mientras que en LNJ presenta una abundancia del 2,78 % (Fig. 3.3-5).

RESULTADOS Capítulo 3



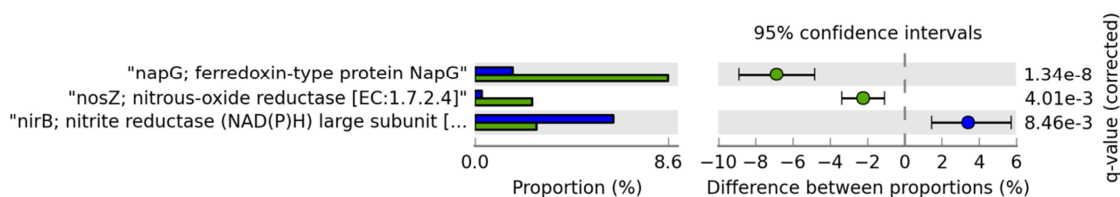


Figura 3.3-5. Abundancia relativa, con respecto al total de proteínas del metabolismo del nitrógeno, de las diferentes proteínas halladas al enfrentar los contigs obtenidos mediante secuenciación Illumina con la base de datos KO de KEGG. Se marcan con asterisco aquellas proteínas con diferencias estadísticamente significativas entre muestras.

Al realizar un BlastX con las secuencias del metabolismo del nitrógeno obtenidas con el MG-Rast al enfrentar las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 a la base de datos KO, se observa que existen ciertas diferencias entre muestras. Al analizar la adscripción taxonómica de estas secuencias, se observa que los phyla más abundantes son Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria, sumando entre los 3 el 81,94 %, el 80,68 % y el 83,50 % del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno en LJN, CNB y CNA, respectivamente (Fig. 3.3-6). De los 13 phyla representados sólo 2 muestran diferencias estadísticamente significativas de abundancia entre muestras, según lo obtenido con el programa informático Metastat. El phylum Proteobacteria presenta mayor abundancia en suelos rizosféricos de robles que en encinas, con el 42,19 % y el 41,76 % frente al 27,36 % del total de secuencias en CNB, CNA y LJN, respectivamente (Fig. 3.3-6). El otro phylum que muestra diferencias estadísticamente significativas es Bacteroidetes, con una mayor abundancia en la muestra de rizosfera de encina (LJN), con el 41,56 % del total de secuencias, que en la muestra de la zona baja del robledal (CNB), con el 26,65 % del total de secuencias (Fig. 3.3-6). La muestra de la zona alta del robledal (CNA) muestra un valor intermedio en la abundancia de este *phylum* (el 33,38 %), sin ser estadísticamente significativa su diferencia con respecto a las otras dos muestras (Fig. 3.3-6). Al realizar este mismo análisis en los contigs obtenidos por secuenciación Illumina también se observan ciertas diferencias entre muestras. Al analizar la adscripción taxonómica de estos contigs, se observa que los *phyla* más abundantes son Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria, lo cual difiere con lo obtenido por secuenciación 454, donde los *phyla* más abundantes son Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria. Esta diferencia de abundancia de *phyla* según el método de secuenciación empleado también se observa al comparar las muestras de suelos rizosféricos de encinas (ver Capítulo 3.2). Además, al igual que ocurre al comparar entre muestras de encinas, estos 3 *phyla* mayoritarios muestran diferencias estadísticamente significativas en su abundancia entre muestras, según lo obtenido al emplear el programa informático Metastat. En primer lugar en cuanto a abundancia está el *phylum* Proteobacteria, con valores de abundancia de entre el 43,07 % en la muestra de encinar (LJN) y el 68,40 % en la muestra de la zona alta del robledal (CNA), siendo en CNA significativamente más abundante que en la muestra de encinar (LJN), con una abundancia del 43,07 % (Fig. 3.3-6). El segundo *phylum* en abundancia es Actinobacteria, con abundancias de entre el 12,26 % en la muestra de la zona

RESULTADOS Capítulo 3

alta del robledal (CNA) y el 30,20 % en la muestra de encinar (LJN), siendo significativamente más abundante en LJN que en CNA (Fig. 3.3-6). Por último está el *phylum* Acidobacteria, que presenta diferencias significativas en cuanto a su abundancia entre la muestra de suelo rizosférico de encina (LJN), con una abundancia del 21,29 %, y el resto de muestras, donde los valores de abundancia son del 6,13 % en CNA y del 7,91 % en CNB (Fig. 3.3-6).

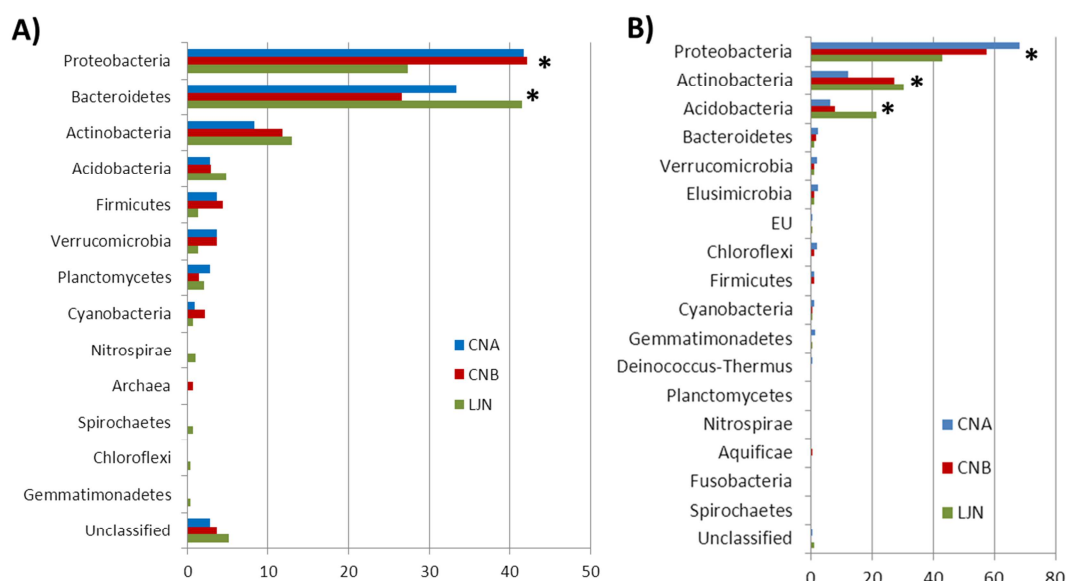


Figura 3.3-6. Abundancia relativa, con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, de los diferentes *phyla* hallados al realizar un BlastX frente a la base de datos nr con las secuencias que dan homología con proteínas del metabolismo del nitrógeno en la base de datos KO de KEGG, para las secuencias de 454 (A) y para los contigs de illumina (B). Con asterisco se indica los *phyla* con diferencias significativas entre muestras.

En la clasificación taxonómica a nivel de género de las secuencias del metabolismo de nitrógeno obtenidas por pirosecuenciación 454TM se han detectado un total de 195 géneros diferentes, pero sólo 13 géneros tienen una abundancia superior al 2 % en al menos una de las dos muestras (Fig. 3.1-3). De estos 13 géneros, ninguno presenta abundancias significativamente diferentes entre muestras según el análisis realizado con *Metastat*. En el caso de los contigs obtenidos por secuenciación Illumina se han detectado un total de 188 géneros diferentes, de los cuales sólo 20 tienen una abundancia superior al 2 % en al menos una de las dos muestras (Fig. 3.3-7). De estos 20 géneros sólo 2 muestran diferencias estadísticamente significativas, según el análisis con *Metastat*, entre muestras a nivel de abundancia relativa, con respecto al total de contigs del metabolismo del nitrógeno obtenidas. El género *Mycobacterium*, perteneciente al *phylum* Actinobacteria, es más abundante en la muestra de encinar (LJN), donde presenta una abundancia del 13,37 %, con respecto a la muestra de la zona alta del

robleal (CNA), donde tiene una abundancia del 3,77 % (Fig. 3.3-7). El género *Granulicella*, perteneciente al *phylum* Acidobacteria, también es más abundante en la muestra del encinar (LJN), con el 10,40 % de abundancia, que en el resto de muestras, donde sólo se ha detectado en CNB, con una abundancia del 1,69 % (Fig. 3.3-7).

A)

Phylum	Género	LJN	CNB	CNA
Bacteroidetes	Niastella	11,34	7,41	11,11
Proteobacteria	Bradyrhizobium	7,22	5,93	4,63
Proteobacteria	Rhodopseudomonas	1,03	2,96	6,48
Bacteroidetes	Flavobacterium	5,84	2,96	0,93
Proteobacteria	Burkholderia	2,41	1,48	2,78
Bacteroidetes	Pedobacter	3,44	2,22	0,93
Bacteroidetes	Mucilagibacter	2,75	0,74	2,78
Bacteroidetes	Niabella	2,41	1,48	1,85
Bacteroidetes	Chitinophaga	1,72	2,96	0,93
Bacteroidetes	Solitalea	2,75	0,00	2,78
Actinobacteria	Mycobacterium	1,37	2,96	0,93
Firmicutes	Paenibacillus	1,03	1,48	1,85
Proteobacteria	Sorangium	0,00	1,48	2,78
Actinobacteria	Streptomyces	2,06	0,74	0,93

B)

Phylum	Género	LJN	CNB	CNA
Proteobacteria	Bradyrhizobium	12,38	18,64	23,11
Actinobacteria	Mycobacterium *	13,37	10,17	3,77
Proteobacteria	Rhodopseudomonas	4,46	10,73	8,02
Acidobacteria	Granulicella *	10,40	1,69	0,00
Proteobacteria	Burkholderia	0,99	0,56	2,36
Proteobacteria	Afipia	1,98	2,26	4,25
Proteobacteria	Nitrospira	0,00	2,26	0,00
Acidobacteria	Candidatus_Chloracidobac	1,49	1,69	4,25
Acidobacteria	Acidobacterium	4,46	0,56	0,00
Actinobacteria	Conexibacter	3,47	0,56	1,42
Proteobacteria	Sorangium	1,49	0,00	0,00
Proteobacteria	Rhizobium	1,49	2,26	0,94
Actinobacteria	Kribbella	0,99	1,13	2,36
Actinobacteria	Pseudonocardia	0,99	3,39	0,00
Acidobacteria	Candidatus_Koribacter	1,98	2,26	0,00
Acidobacteria	Terriglobus	2,48	1,69	0,47
Proteobacteria	Nitrobacter	0,00	3,39	0,94
Actinobacteria	Frankia	0,99	2,26	0,47

Figura 3.3-7. Abundancia relativa, con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, de los diferentes géneros hallados al realizar un BlastX frente a la base de datos nr con las secuencias que dan homología con proteínas del metabolismo del nitrógeno en la base de datos KO de KEGG, para las secuencias de 454 (A) y los contigs de illumina (B). Con asterisco se indica los géneros con diferencias significativas entre muestras.

Al realizar el clústering jerárquico para las secuencias obtenidas por 454, empleando el “average linkage clustering” y la distancia euclídea de la matriz de abundancia de género en cada muestra se observa que las dos muestras de robles (CNA y CNB) son las que mayor similitud tienen (8,22 % de distancia), y a éstas se le une la muestra de encinas sin quemar (LJN) con un 10,36 % de distancia (Fig. 3.3-8). Para el clústering realizado con los contigs obtenidos con la secuenciación por Illumina se observa el mismo patrón de agrupamiento. Primero se agrupan las dos muestras de robles (CNA y CNB) con una distancia del 11,54 %, y a éstas se le une la muestra de encinar (LJN) con una distancia del 17,21 % (Fig. 3.3-9).

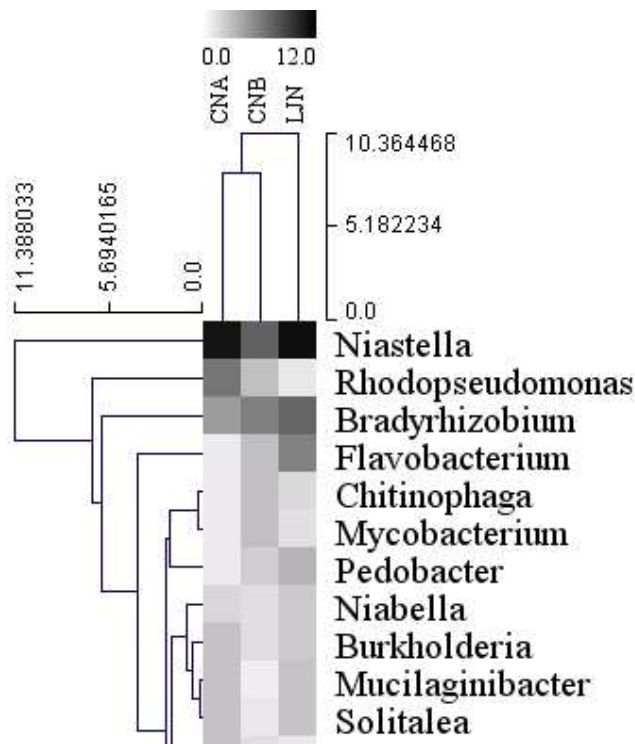


Figura 3.3-8. Heatmap realizado con la matriz de abundancia relativa (con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno) de cada género en cada muestra. Secuencias obtenidas por 454.

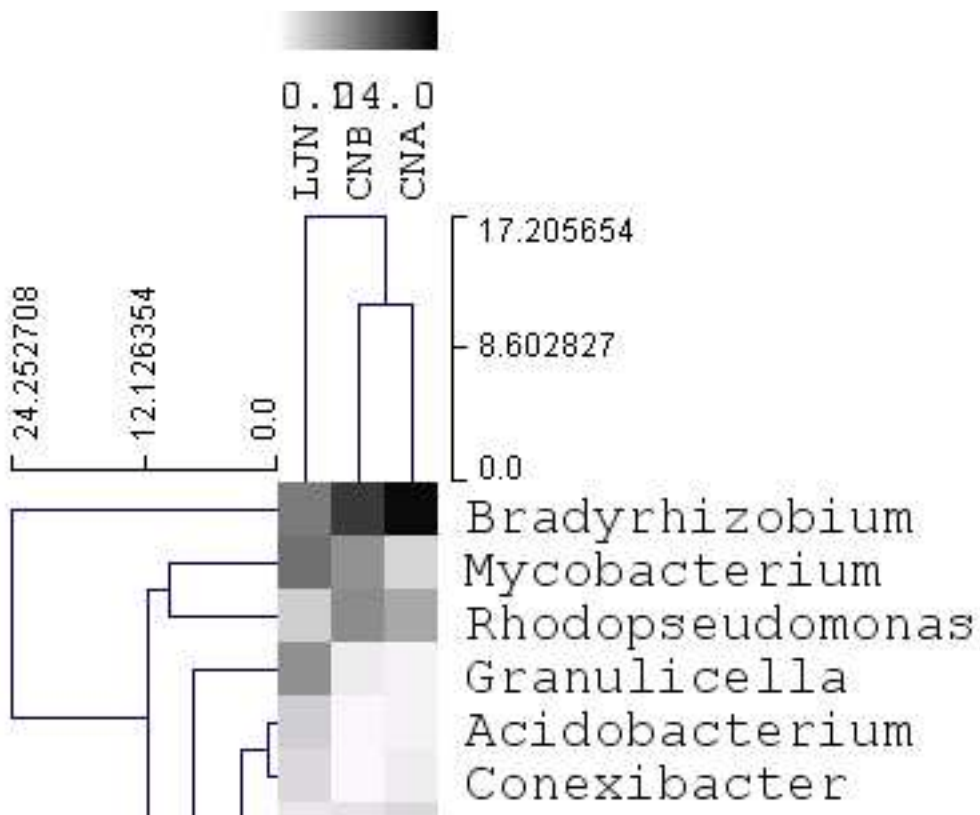


Figura 3.3-9. Heatmap realizado con la matriz de abundancia relativa (con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno) de cada género en cada muestra. Contigs obtenidos por Illumina.

Al realizar el clústering con la matriz de abundancia de proteínas por sitios se vuelve a obtener el mismo árbol que con los géneros: primero se agrupan las muestras de robles, con un 9,07 % de distancia, y luego la muestra de encinas sin quemar, con un 10,03 % de distancia (Fig. 3.3-10). Con los contigs obtenidos por Illumina se genera un agrupamiento diferente al obtenido con las secuencias de 454. Las primeras muestras que se agrupan son las de la zona baja del robledal (CNB) y la del encinar (LJN) con una distancia del 7,44 %, y a éstas se le une la muestra de la zona alta del robledal (CNA), con una distancia del 10,82 % (Fig. 3.3-11).

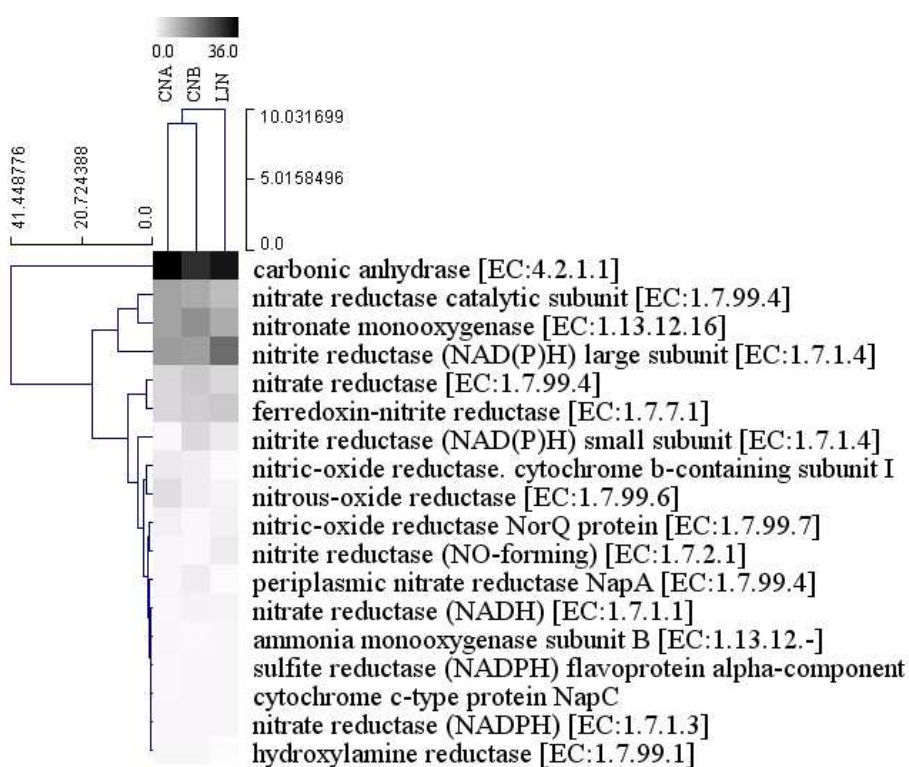


Figura 3.3-10. Heatmap realizado con la matriz de abundancia relativa (con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno) de cada género en cada muestra. Secuencias obtenidas por 454.

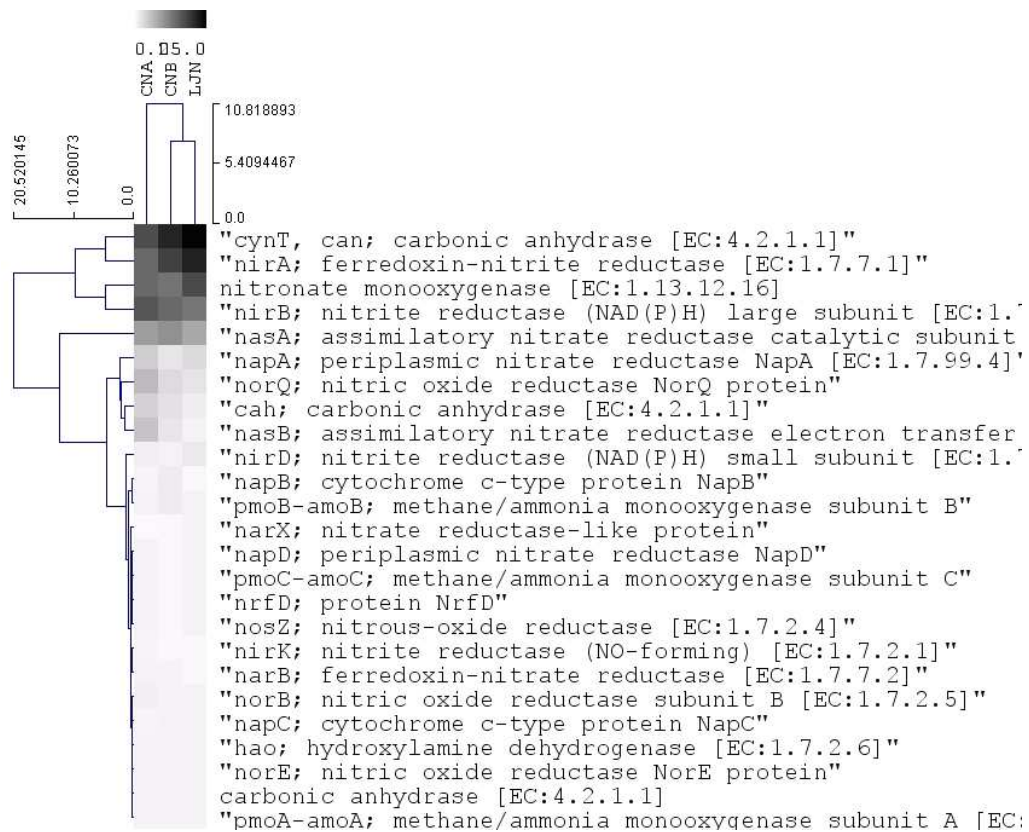


Figura 3.3-11. Heatmap realizado con la matriz de abundancia relativa (con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno) de cada género en cada muestra. Contigs obtenidas por Illumina.

**CAPÍTULO 3.4: INFLUENCIA DEL GRADIENTE ALTITUDINAL EN LAS
RUTAS METABÓLICAS DEL NITRÓGENO DE LAS COMUNIDADES
BACTERIANAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE QUERCÍNEAS.**

1. BASE DE DATOS SUBSISTEMAS DE SEED.

De la secuenciación masiva mediante pirosecuenciación 454 de Roche™, del DNA obtenido de las rizosferas de encinas y robles en la primavera de 2008, y tras realizar los correspondientes filtrados de las lecturas obtenidas, se dispone de un total de 222.689 secuencias para CNB y 167.219 secuencias para CNA, con una longitud media de secuencia de 370 y 387 bp, respectivamente (Tabla 3.4-1). Al enfrentar estas secuencias a la base de datos de subsistemas de SEED se obtuvo que un total de 48.897 secuencias en CNB y 36.276 secuencias en CNA (Tabla 3.4-1) daban homología con alguna proteína, utilizando los criterios de un corte de máximo e-valor de 10^{-5} , un corte de identidad mínima del 60% y una longitud mínima de alineamiento de 50 bp. De todas estas secuencias que han dado homología con alguna proteína de la base de datos de subsistemas de SEED, el 1,05 y el 1,09 %, en CNB y CNA respectivamente, lo hacen para proteínas pertenecientes al metabolismo del nitrógeno (Tabla 3.4-1), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre muestras en cuanto al porcentaje de secuencias pertenecientes al ciclo del nitrógeno.

Tabla 3.4-1. Metadatos de las muestras de robles y encinas en 454.

Muestra	CNB	CNA
nº bps	82.556.863	64.800.059
nº total de secuencias	222.689	167.219
longitud media de secuencia (bps)	370	387
nº de secuencias con homología en SEED	48.897	36.276
nº de secuencias del metabolismo del N en SEED	512 (1,05 %)	395 (1,09 %)
nº de secuencias con homología en KO	21.271	15.562
nº de secuencias del metabolismo del N en KO	72 (5,63 %)	63 (7,18 %)

De la secuenciación masiva por síntesis, mediante el sistema de Illumina, del DNA obtenido de las rizosferas de robles en la primavera de 2008, y tras realizar los correspondientes filtrados de las lecturas obtenidas y ensamblarlas con SOAP de novo, se ha obtenido un total de 205.779 contigs para CNB, 205.095 contigs para CNA y 246.663 contigs para CNX, con una longitud media de contig de entre 320 y 351 bp (Tabla 3.4-2). Al enfrentar estos contigs a la base de datos de subsistemas de SEED se obtuvo que un total de 164.958 contigs en CNB, 158.901 contigs en CNA y 151.680 contigs en CNX (Tabla 3.4-2) dan homología con alguna proteína, utilizando los mismos criterios de corte que para la pirosecuenciación. Como también ocurría en las muestras de encinas (LIQ y LJN) presentadas en el apartado anterior, con la secuenciación Illumina se obtiene, del total de contigs, un mayor porcentaje de contigs que dan homología con alguna proteína de la base de datos de subsistemas de SEED. Además, existen diferencias estadísticamente significativas, según el análisis realizado con el programa STAMP, entre muestras en cuanto al porcentaje de contigs pertenecientes al metabolismo del nitrógeno. De todas los contigs que han dado homología con alguna proteína de la base de datos subsistemas de SEED

RESULTADOS Capítulo 3

el 2,27 % lo hacen para proteínas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en la muestra de la zona baja del robleal (CNB), la cual difiere de las otras dos muestras, las de la zona alta del robleal y la zona de expansión de éste (CNA y CNX), donde el 2,39 y 2,43 % de los contigs pertenecen al metabolismo del nitrógeno, respectivamente (Tabla 3.4-2). Esta diferencia en cuanto a la cantidad de contigs pertenecientes al metabolismo del nitrógeno no se observa para los datos obtenidos de la pirosecuenciación 454TM, siendo este porcentaje de secuencias mayor para las secuencias obtenidas por Illumina que para las que se han obtenido por pirosecuenciación 454TM.

Tabla 3.4-2. Metadatos de las muestra de encinas en Illumina.

Muestra	CNB	CNA	CNX
nº bps	65.818.061	71.972.462	84.493.363
nº total de contigs	205.779	205.095	246.663
longitud media de contig (bps)	320	351	343
nº de contigs con homología en SEED	164.958	158.901	151.680
nº de contigs del metabolismo del N en SEED	3.741 (2,27 %)	3.805 (2,39 %)	3.683 (2,43 %)
nº de contigs con homología en KO	90.144	84.893	82.342
nº de contigs del metabolismo del N en KO	554 (7,80 %)	511 (7,74 %)	618 (9,15 %)

Para las secuencias obtenidas por 454, dentro del nivel 3 del sistema de clasificación del MGRast de la base de datos de subsistemas de SEED, se observa que las funciones con mayor número de secuencias dentro del metabolismo del nitrógeno son: en primer lugar la asimilación de amonio, con abundancias del 54,19 y del 56,37 %, en CNA y CNB, del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.4-1). En segundo lugar está la amonificación de nitrato y nitrito, con abundancias del 15,81 y el 13,11 % en CNA y en CNB (Fig. 3.4-1). Y en tercer lugar están la sintasa de óxido nítrico y la hidrólisis del cianato, con abundancias del 6,05 y el 7,68 %; y del 6,05 y el 6,55 % para CNA y CNB respectivamente con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.4-1). No existen diferencias estadísticamente significativas entre muestras con respecto a la abundancia relativa de secuencias de una función metabólica determinada. En el caso de los contigs obtenidos por secuenciación de síntesis Illumina se observa que las funciones con mayor número de contigs son: en primer lugar la amonificación de nitrato y nitrito, con abundancias de entre el 29,74 y el 33,15 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.4-2), siendo estos valores el doble de lo obtenido por secuenciación 454. En segundo lugar está la asimilación de amonio, con abundancias de entre el 21,53 y el 22,95 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.4-2), siendo estos valores la mitad de lo obtenido con las secuencias de 454. Y en tercer lugar están la fijación de nitrógeno y la utilización de alantoína, con abundancias de entre 15,06 y 16,08 % y de entre 7,46 y 7,79 % respectivamente con respecto al total de contigs del metabolismo del nitrógeno (Fig. 3.4-2). De nuevo se observa que con la secuenciación por Illumina se obtiene mayor porcentaje de contigs pertenecientes a la fijación de nitrógeno. Existe 1 función que presentan diferencias significativas entre muestras, para

los contigs obtenidos por Illumina, esta es la nitrito reductasa disimilatoria. Esta función es más abundante en la muestra de la zona alta del robleal (CNA), con un 12,68 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno, que en el resto de muestras, donde hay abundancias del 7,51 % y del 9,23 %, en CNX y CNB, respectivamente (Fig. 3.4-2).

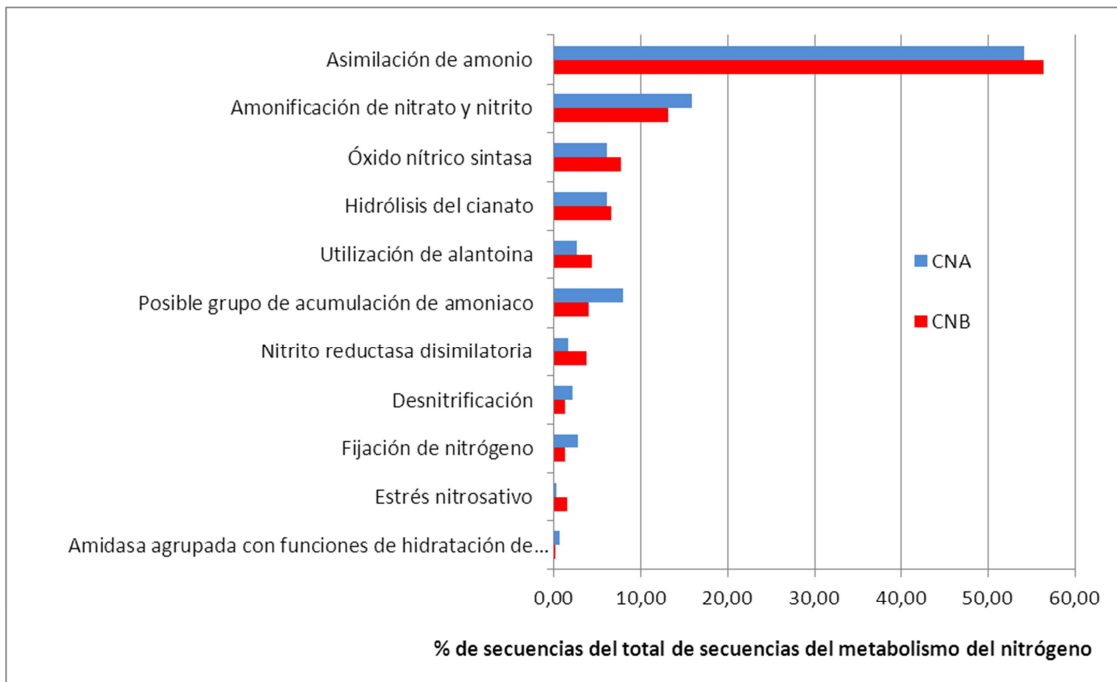
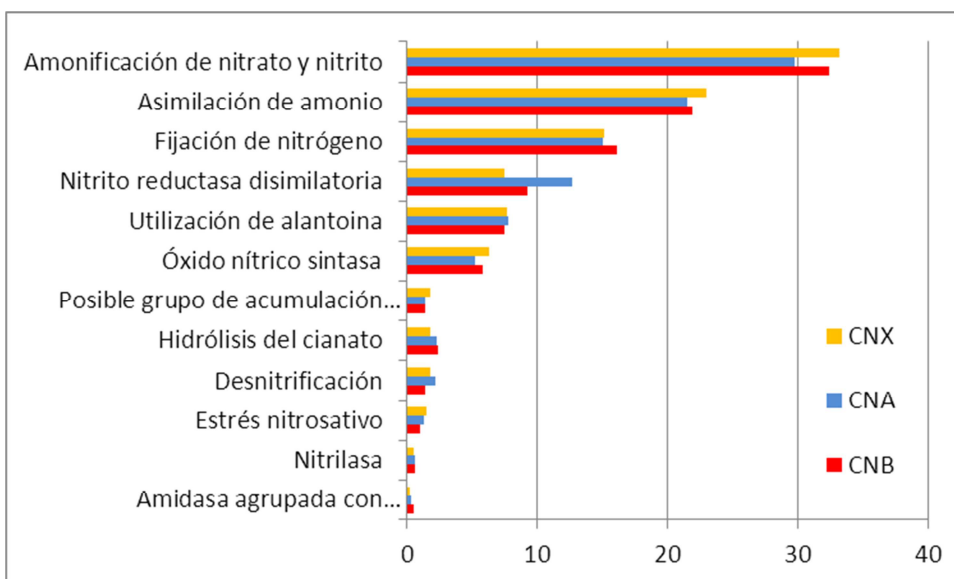


Figura 3.4-1. Porcentaje de abundancia de secuencias obtenidas por secuenciación 454 relacionadas con los diferentes grupos funcionales (nivel 3 de la base de datos de subsistemas de SEED) del metabolismo de nitrógeno con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno.



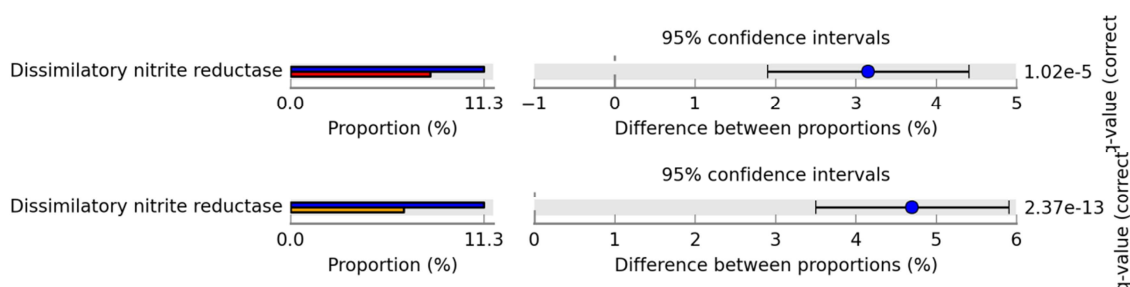


Figura 3.4-2. Porcentaje de abundancia de contigs obtenidos por secuenciación Illumina relacionadas con los diferentes grupos funcionales (Level 3 de la base de datos de subsistemas de SEED) del metabolismo de nitrógeno con respecto al total de contigs del metabolismo del nitrógeno. Se indican las que muestran diferencias estadísticamente significativas.

A nivel de función dentro de las base de datos de subsistemas de SEED, o de proteínas, no existen proteínas con abundancias diferentes que sean estadísticamente significativas entre las muestras según las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454TM. Del total de las 145 proteínas del metabolismo del nitrógeno halladas al enfrentar los contigs obtenidos por Illumina con la base de datos de subsistemas de SEED, 4 de estas proteínas muestran diferencias en su abundancia estadísticamente significativas entre algunas de las muestras (Fig. 3.4-3). De estas proteínas la *Uroporphyrinogen-III methyltransferase*, que actúa en la nitrito reductasa disimilatoria, tiene una mayor abundancia en la muestra de la zona alta del robledal (CNA), con un 12,11 % del total de contigs del metabolismo del nitrógeno, que en el resto de muestras, donde los porcentajes son del 7,17 y del 8,93 % en CNX y CNB, respectivamente (Fig. 3.4-3). En el grupo funcional de la asimilación de amonio existe una proteína con diferencias estadísticamente significativas entre muestras, la proteína *Glutamine synthetase type III, GlnN*, para la cual la muestra de robles en expansión (CNX) tiene mayor abundancia (2,25 %) que la de la zona baja del robledal (CNB), con una abundancia del 1,10 % (Fig. 3.4-3). En el grupo funcional de la desnitrificación la proteína *Nitric oxide -responding transcriptional regulator NnrR (Crp/Fnr family)* muestra diferencias estadísticamente significativas, ya que no ha sido detectada en la muestra de robles en expansión (CNX) mientras que en el resto de muestras tiene valores del 0,20 y 0,50 % en CNB y CNA, respectivamente (Fig. 3.4-3). Por último, dentro del grupo funcional de la fijación de nitrógeno existen 2 proteínas con abundancias significativamente diferentes entre muestras. Por un lado está la proteína *nitrogenase (iron-iron) reductase and maturation protein AnfH*, que tiene menor abundancia en la muestra de robledal de la zona baja (CNB) que en el resto de muestras, ya que en CNB no se ha obtenido ningún contig mientras que en el resto de muestras las abundancias son del 0,23 % en CNA y del 0,49 % en CNX. Y la proteína *NifB-domain, type 2* presenta mayor abundancia en CNX, con un valor del 0,28 %, que en CNA, donde no se ha detectado (Fig. 3.4-3).

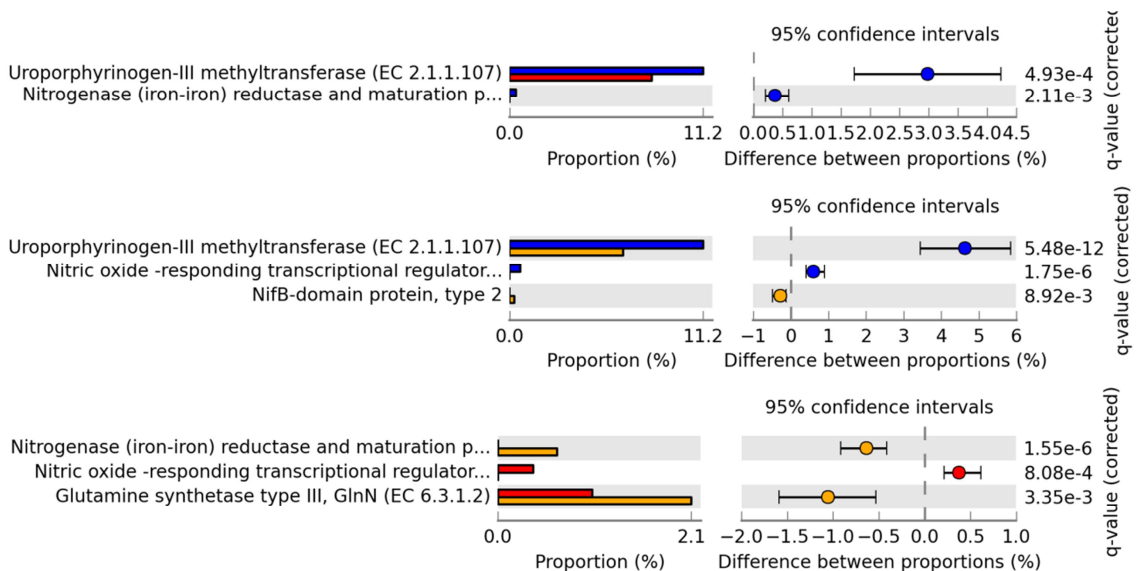
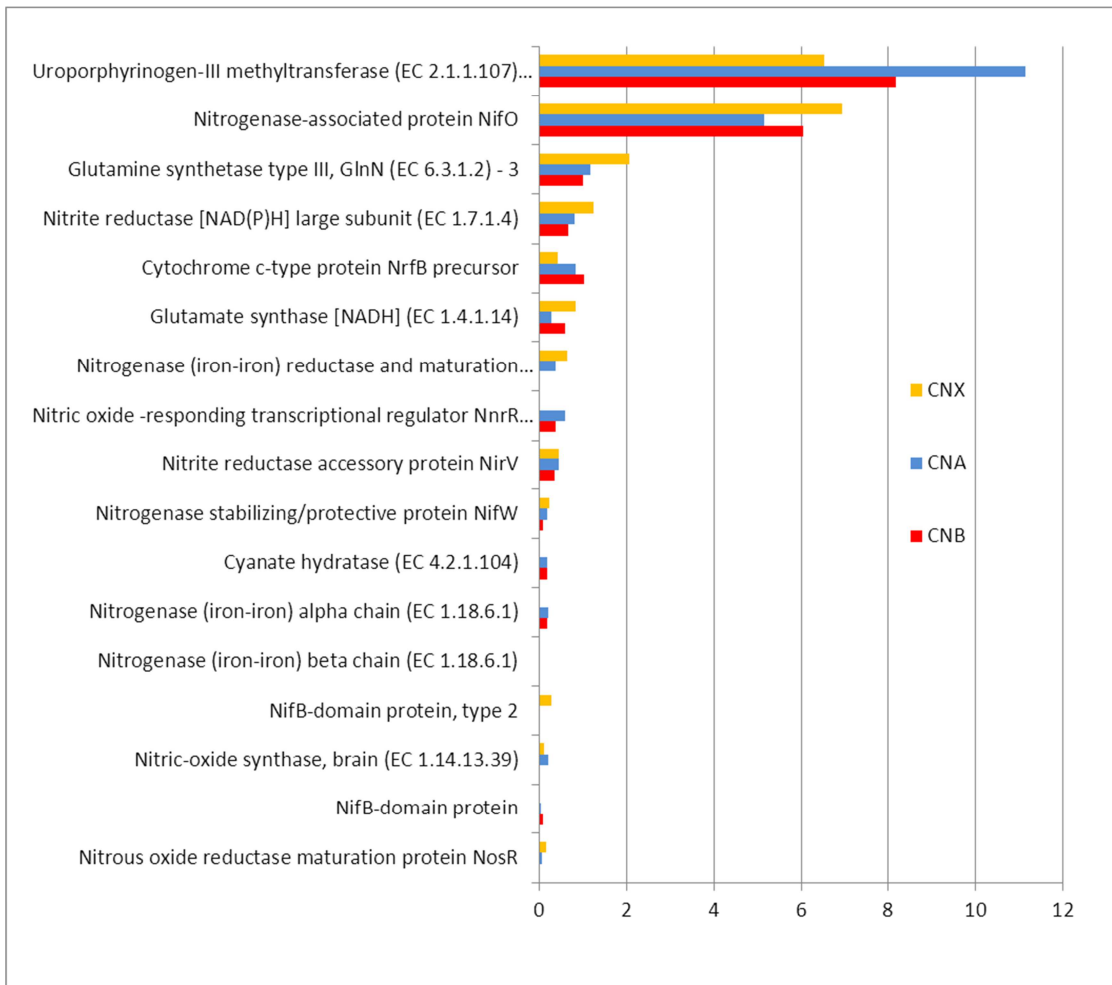


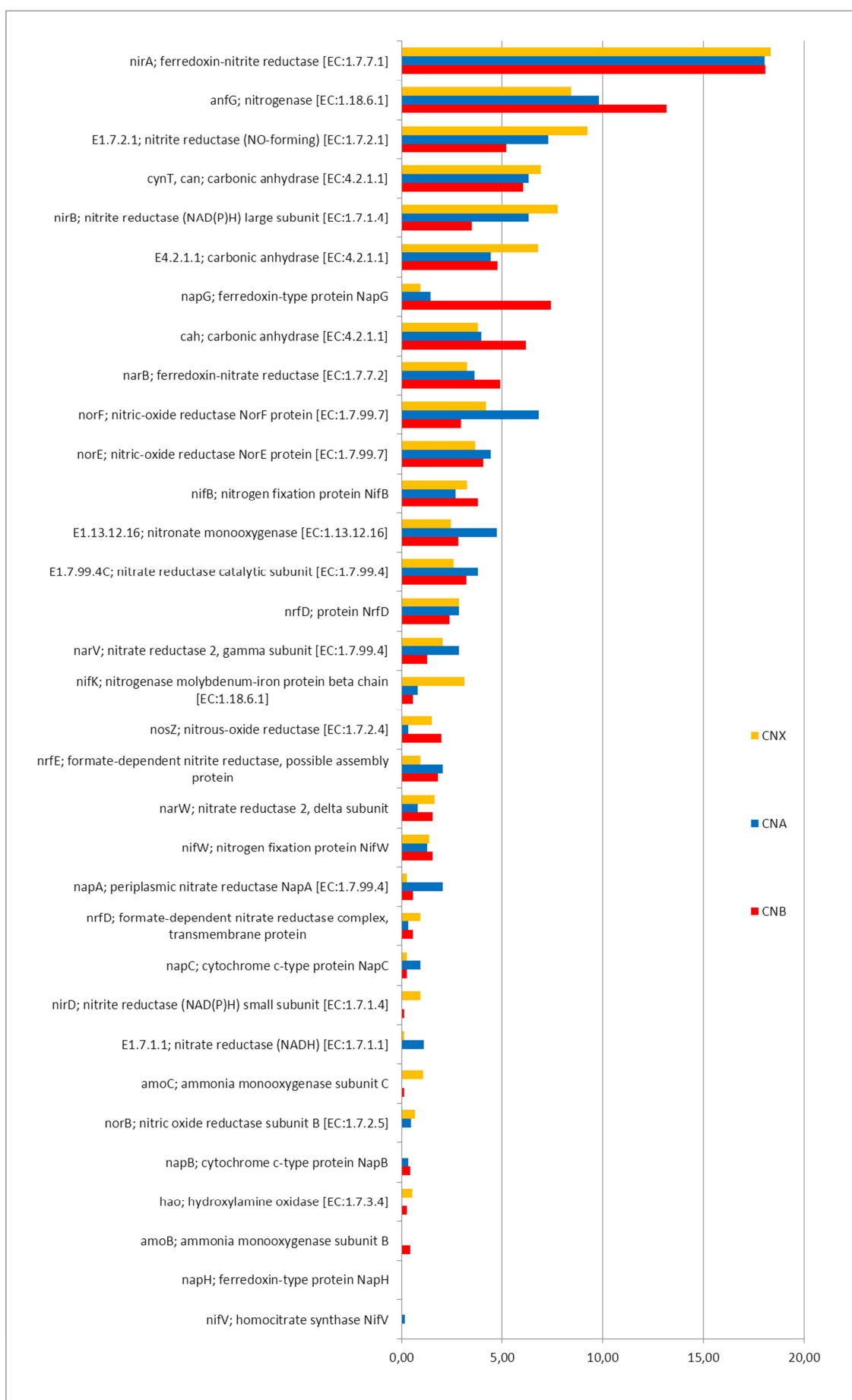
Figura 3.4-3. Abundancia relativa, con respecto al total de proteínas del metabolismo del nitrógeno, de las diferentes proteínas que han mostrado diferencias entre muestras estadísticamente significativas halladas al enfrentar los contigs obtenidos mediante secuenciación Illumina con la base de datos de subsistemas de SEED.

2. BASE DE DATOS KEGG ORTHOLOGY (KO) DE “KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES” (KEGG).

De las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454TM, un total de 15.562 secuencias en CNA y 21.271 secuencias en CNB mostraron homología con alguna proteína de la base de datos KO de KEGG (Tabla 3.4-1). De este total de secuencias, un porcentaje del 59,77 % en CNA y del 60,43 % en CNB dan homología con proteínas implicadas en el metabolismo, y de éstas el 9,48 y el 9,96 %, respectivamente, pertenecen al metabolismo energético, dentro del cual se encuentra el metabolismo del nitrógeno. La cantidad de secuencias que se engloban en el metabolismo del nitrógeno es del 7,18 % en CNA y del 5,63 % en CNB (Tabla 3.4-1), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

De la secuenciación masiva por síntesis, mediante el sistema de Illumina, un total de 90.144 contigs en CNB, 84.893 contigs en CNA y 82.342 contigs en CNX han dado homología con alguna proteína de la base de datos KO de KEGG (Tabla 3.4-2). De este total de contigs, un porcentaje del 37,56 % al 38,04 % dan homología con proteínas implicadas en el metabolismo, y de éstas entre un 12,21 y un 12,60 % (Tabla 3.4-2) pertenecen al metabolismo energético, dentro del cual se encuentra el metabolismo del nitrógeno. La cantidad de contigs que se engloban en el metabolismo del nitrógeno es de un 9,15 % en la muestra de robles en expansión (CNX), teniendo esta muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de muestras, cuyos valores de abundancia de contigs pertenecientes al metabolismo del nitrógeno son del 7,74 % en CNA y el 7,80 % en CNB (Tabla 3.4-2).

Para las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454TM, dentro de la ruta metabólica del metabolismo del nitrógeno (cuyo código es KO 00910) no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa de las proteínas pertenecientes a esta ruta entre muestras. En el caso de los contigs obtenidos por Illumina se han encontrado 3 proteínas del metabolismo de nitrógeno con diferencias estadísticamente significativas en su abundancia relativa entre muestras. La proteína *napG*; *ferredoxin-type protein napG* muestra diferencias en su abundancia, formando dos grupos de muestras. En el primer grupo está la muestra ubicada a menor altitud CNB, con una abundancia del 7,43 %, que tiene mayor abundancia que las muestras ubicadas a mayor altitud, CNA y CNX, con valores del 1,42 % y del 0,95 % de abundancia, respectivamente (Fig. 3.4-5). Por otro lado, la proteína *nirB*; *nitrite reductase (NAD(P)H) large subunit* es más abundante en las muestras de zonas altas (CNA y CNX), con valores del 6,33 % y del 7,44 % respectivamente, mientras que en CNB presenta una abundancia del 3,51 % (Fig. 3.3-5). La última proteína que muestra diferencias entre sitios es la *nifK*; *nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain*, con menor abundancia en la muestra de la zona baja del robledal (CNB), con un 0,56 %, que en CNX, donde existe un 3,13 % de abundancia (Fig. 3.4-5).



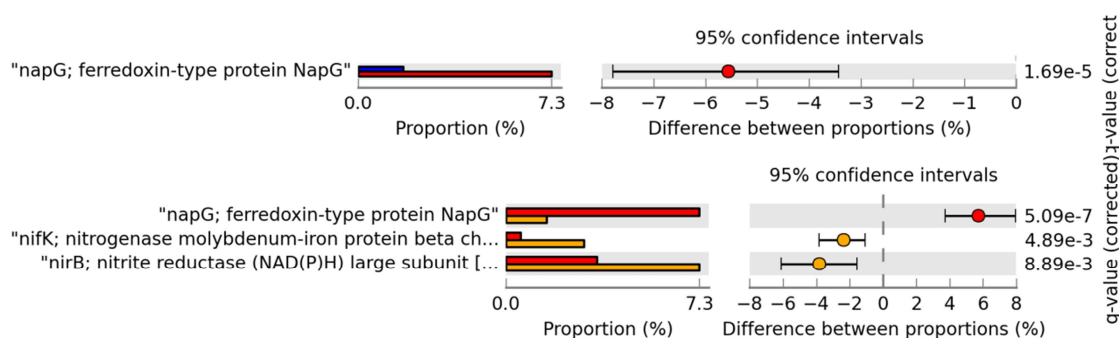


Figura 3.4-5. Abundancia relativa, con respecto al total de proteínas del metabolismo del nitrógeno, de las diferentes proteínas halladas al enfrentar las secuencias obtenidas mediante secuenciación Illumina con la base de datos KO de KEGG. Se marcan con asterisco aquellas proteínas con diferencias estadísticamente significativas entre muestras.

Al realizar un BlastX con las secuencias del metabolismo del nitrógeno obtenidas con el MG-Rast al enfrentar las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454 a la base de datos KO, se observa que existen ciertas diferencias entre muestras. Al analizar la adscripción taxonómica de estas secuencias, se observa que los *phyla* más abundantes son Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria, sumando entre los 3 el 80,68 % y el 83,50 % del total de secuencias del metabolismo del nitrógeno en CNB y CNA, respectivamente (Fig. 3.4-6). De los 13 *phyla* representados ninguno muestra diferencias estadísticamente significativas de abundancia entre muestras, según lo obtenido con el programa informático *Metastat*. Al realizar este mismo análisis en los contigs obtenidos por secuenciación Illumina también se observan ciertas diferencias entre muestras. Al analizar la adscripción taxonómica de estos contigs, se observa que los *phyla* más abundantes son Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria, lo cual difiere con lo obtenido por secuenciación 454, donde los *phyla* más abundantes son Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria. Esta diferencia de abundancia de *phyla* según el método de secuenciación empleado también se observa al comparar las muestras de suelos rizosféricos de encinas (ver Capítulo 3.2). Además de estos 3 *phyla* mayoritarios hay 2 que muestran diferencias estadísticamente significativas en su abundancia entre muestras, según lo obtenido al emplear el programa informático *Metastat*. En primer lugar en cuanto a abundancia está el *phylum* Proteobacteria, con valores de abundancia de entre el 45,70 % en la muestra de robles en expansión (CNX) y el 68,40 % en la muestra de la zona alta del robledal (CNA), siendo en CNA significativamente más abundante que en CNX (Fig. 3.4-6). El segundo *phylum* en abundancia es el *phylum* Actinobacteria, con abundancias de entre el 12,26 % en la muestra de la zona alta del robledal (CNA) y el 27,60 % en la muestra de robles en expansión (CNX), siendo significativamente menos abundante en CNA que en el resto de muestras, donde los valores son del 27,12 % en CNB y del 27,60 % en CNX (Fig. 3.4-6).

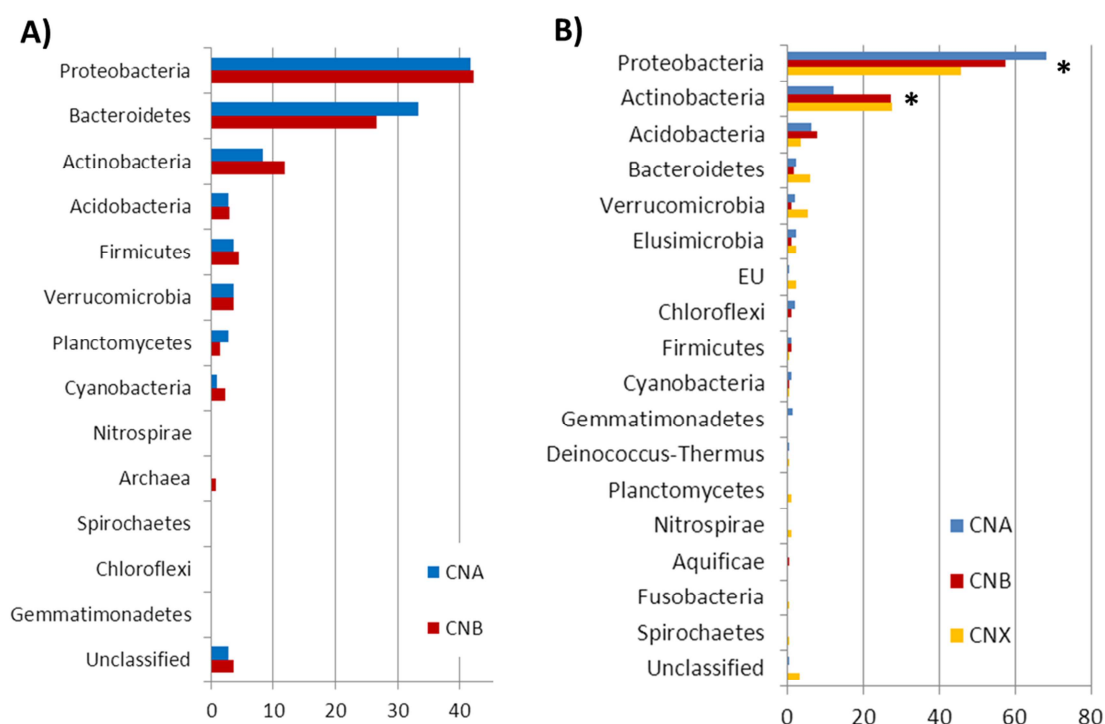


Figura 3.3-6. Abundancia relativa, con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, de los diferentes *phyla* hallados al realizar un BlastX frente a la base de datos nr con las secuencias que dan homología con proteínas del metabolismo del nitrógeno en la base de datos KO de KEGG, para las secuencias de 454 (A) y los contigs de illumina (B). Con asterisco se indica los *phyla* con diferencias significativas entre muestras.

En la clasificación taxonómica a nivel de género de las secuencias del metabolismo de nitrógeno obtenidas por pirosecuenciación 454TM se han detectado un total de 121 géneros diferentes, pero sólo 11 géneros tienen una abundancia superior al 2 % en al menos una de las dos muestras (Fig. 3.4-7). De estos 11 géneros, ninguno presenta abundancias significativamente diferentes entre muestras según el análisis realizado con *Metastat*. En el caso de los contigs obtenidos por secuenciación Illumina se han detectado un total de 170 géneros diferentes, de los cuales sólo 16 tienen una abundancia superior al 2 % en al menos una de las dos muestras (Fig. 3.4-7). De estos 16 géneros sólo 4 muestran diferencias estadísticamente significativas, según lo obtenido con *Metastat*, entre muestras a nivel de abundancia relativa, con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno obtenidas. El género *Mycobacterium*, perteneciente al *phylum* Actinobacteria, es más abundante en la muestra de robles en expansión (CNX), donde presenta una abundancia del 22,62 %, con respecto a la muestra de la zona alta del robledal (CNA), donde tiene una abundancia del 3,77 % (Fig. 3.4-7). Además, también es significativa la diferencia de abundancia de este género entre CNB y CNX, con abundancias del 10,17 % y del 22,62 %, respectivamente (Fig. 3.4-7). Por último, dentro del *phylum* Proteobacteria existen 3 géneros que muestran diferencias significativas entre muestras en su abundancia. Por un lado están los género *Bradyrhizobium* y *Rhodopseudomonas*, que presentan una abundancia menor en la muestra de suelo de

RESULTADOS Capítulo 3

robles en expansión (CNX), con una abundancia del 2,71 % y del 0,45 %, respectivamente; mientras que el resto de muestras la abundancia es del 18,64 % en CNB y del 23,11 % en CNA para *Bradyrhizobium* y del 10,73 % en CNB y el 8,02 % en CNA para *Rhodopseudomonas* (Fig. 3.4-7). Por otro lado, el género *Nitrospira* es más abundante en el suelo de robles en expansión (CNX), con un valor de abundancia del 5,88 %, mientras que en resto de muestras son del 0,00 % y el 2,26 % en CNB y CNA, respectivamente (Fig. 3.4-7).

Phylum	Género	CNB	CNA
Bacteroidetes	Niastella	7,41	11,11
Proteobacteria	Bradyrhizobium	5,93	4,63
Proteobacteria	Rhodopseudomonas	2,96	6,48
Bacteroidetes	Flavobacterium	2,96	0,93
Proteobacteria	Burkholderia	1,48	2,78
Bacteroidetes	Pedobacter	2,22	0,93
Bacteroidetes	Mucilaginibacter	0,74	2,78
Bacteroidetes	Niabella	1,48	1,85
Bacteroidetes	Chitinophaga	2,96	0,93
Bacteroidetes	Solitaea	0,00	2,78
Actinobacteria	Mycobacterium	2,96	0,93
Firmicutes	Paenibacillus	1,48	1,85
Proteobacteria	Sorangium	1,48	2,78
Actinobacteria	Streptomyces	0,74	0,93

Phylum	Género	CNB	CNA	CNX
Proteobacteria	Bradyrhizobium *	18,64	23,11	2,71
Actinobacteria	Mycobacterium *	10,17	3,77	22,62
Proteobacteria	Rhodopseudomonas *	10,73	8,02	0,45
Acidobacteria	Granulicella	1,69	0,00	0,00
Proteobacteria	Burkholderia	0,56	2,36	6,33
Proteobacteria	Afipia	2,26	4,25	0,45
Proteobacteria	Nitrospira *	2,26	0,00	5,88
Acidobacteria	Candidatus_Chloracidobac	1,69	4,25	0,45
Acidobacteria	Acidobacterium	0,56	0,00	1,36
Actinobacteria	Conexibacter	0,56	1,42	0,45
Proteobacteria	Sorangium	0,00	0,00	4,07
Proteobacteria	Rhizobium	2,26	0,94	0,45
Actinobacteria	Kribbella	1,13	2,36	0,45
Actinobacteria	Pseudonocardia	3,39	0,00	0,45
Acidobacteria	Candidatus_Koribacter	2,26	0,00	0,45
Acidobacteria	Terriglobus	1,69	0,47	0,00
Proteobacteria	Nitrobacter	3,39	0,94	0,00
Actinobacteria	Frankia	2,26	0,47	0,45

Figura 3.3-7. Abundancia relativa, con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno, de los diferentes géneros hallados al realizar un BlastX frente a la base de datos nr con las secuencias que dan homología con proteínas del metabolismo del nitrógeno en la base de datos KO de KEGG, para las secuencias de 454 (A) y los contigs de illumina (B). Con asterisco se indica los géneros con diferencias significativas entre muestras.

Para el clústering realizado con los contigs obtenidos con la secuenciación por Illumina se observa que primero se agrupan, considerando la abundancia de los diferentes géneros con los que dan homología las proteínas obtenidas del metabolismo del nitrógeno dentro de la base de datos de KEGG Orthology las dos muestras de robledales (CNA y CNB) con una distancia del 11,55 % y por último se une la muestra de robles aislados (CNX) con una distancia del 28,14 % (Fig. 3.3-8).

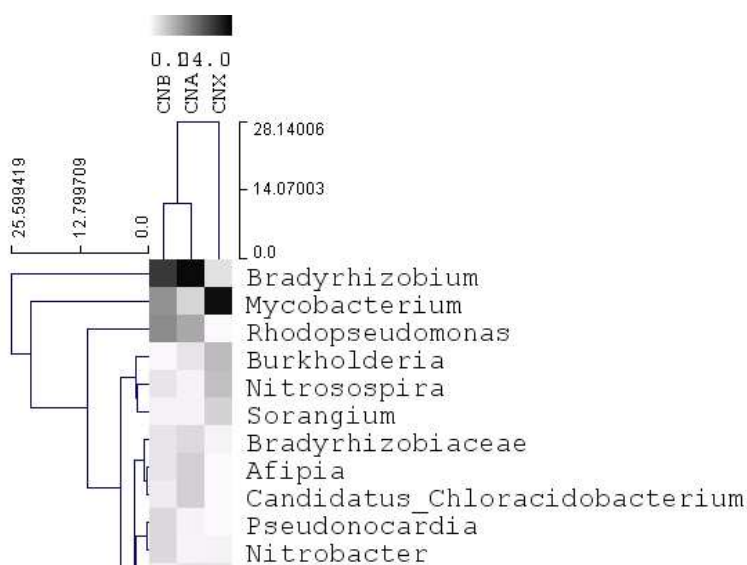


Figura 3.3-9. Heatmap realizado con la matriz de abundancia relativa (con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno) de cada género en cada muestra. Secuencias obtenidas por Illumina.

Con los contigs obtenidos por Illumina las primeras muestras que se agrupan, considerando la abundancia de las diferentes proteínas del metabolismo del nitrógeno dentro de la base de datos de KEEG Orthology, son las de la zona baja del robledal (CNB) y la de la zona alta del robledal (CNA) con una distancia del 8,41 % y por último está la muestra de los robles en expansión (CNX), que se agrupa al resto de muestras con una distancia del 12,36 % (Fig. 3.3-11).

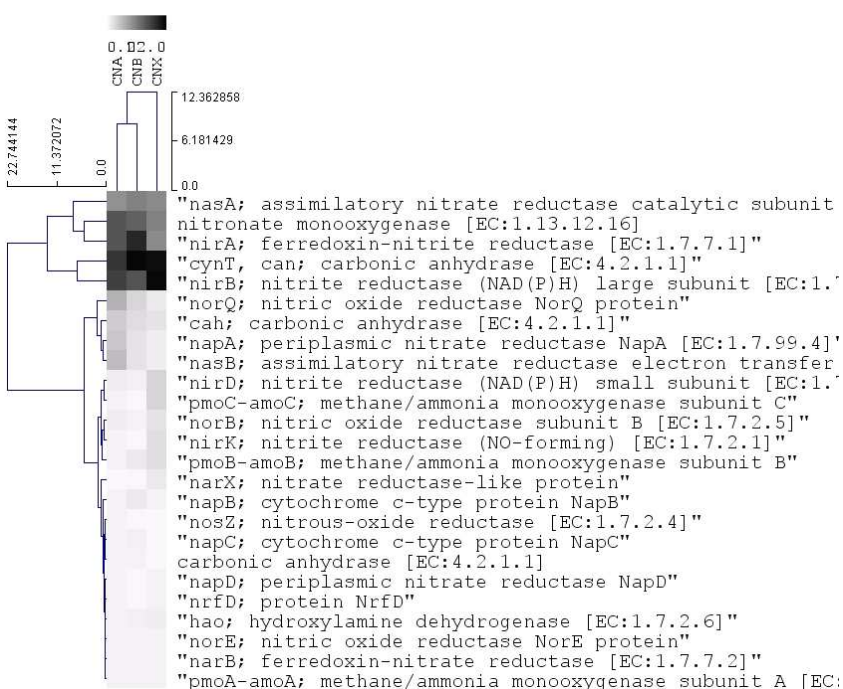


Figura 3.3-11. Heatmap realizado con la matriz de abundancia relativa (con respecto al total de secuencias del metabolismo del nitrógeno) de cada género en cada muestra. Secuencias obtenidas por Illumina.

DISCUSIÓN

1. ASPECTOS GENERALES A TENER EN CUENTA.

En el presente trabajo se pretende discriminar cómo 3 factores principales (vegetación arbórea, gradiente altitudinal y el efecto de un incendio) pueden influir en las características físico-químicas del suelo, en la estructura y composición de las comunidades de los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo, y en las rutas metabólicas del nitrógeno de las comunidades bacterianas del suelo, así como determinar si existe alguna correlación entre algunos de estos factores. Dentro del muestreo realizado para el estudio de cada uno de estos 3 factores hay que tener en cuenta una serie de consideraciones. Primeramente, en el muestreo de suelos rizosféricos de robles y de encinas realizado para ver las posibles diferencias debidas a la vegetación dominante, se tomaron muestras tanto en la cara Norte como en la cara Sur de la ladera.

Para estudiar el efecto del incendio, tanto en las características físico-químicas como en las comunidades diazotróficas del suelo, hay que tener en cuenta que existen diferencias entre los sitios quemados (LJQ y LJR/LJRE) debido principalmente a dos factores principales. El primero es que el fuego ha sido más intenso en LJQ debido a la presencia de árboles de encina, lo que conlleva que se alcancen mayores temperaturas durante el incendio y que estas temperaturas más altas persistan durante más tiempo. El segundo factor es que LJQ está localizado en una pendiente pronunciada mientras que LJR/LJRE se localizan en una ladera con una pendiente menor, por lo que podría haber diferencias en los procesos de erosión y lavado de nutrientes entre ambos sitios. Una excesiva erosión y un incremento de la pérdida de nutrientes por lixiviación y volatilización son factores que limitan la recuperación de las poblaciones microbianas del suelo después de un incendio (Neary *et al.* 1999). Por lo tanto, podría haber diferencias en las comunidades microbianas debidas a los dos factores, la intensidad del incendio (Certini, 2005; DeBano *et al.* 1998; Mataix-Solera *et al.* 2009; Neary *et al.* 2005; Busse and DeBano, 2005; Wells *et al.* 1979) y la inclinación de la ladera (Mabuhay *et al.* 2005; Mabuhay *et al.* 2006).

Por último, en el estudio del gradiente altitudinal es conveniente recordar que la muestra de la zona baja del robledal (CNB) se encuentra en un bosque degradado que está siendo desplazado por un encinar (*Q. ilex* subsp. *ballota*), la muestra de la zona alta del robledal (CNA) se encuentra en un bosque bien formado sin invasión de encinas, la muestra de robles aislados (CNX) se ubica en una zona de expansión del robledal hacia cotas más altas pero sin formación de verdadero bosque, y la muestra sin robles (CNR) se ubica en un matorral dominado por *G. versicolor*, en el cual, si las predicciones de cambio climático se hacen realidad, podrá llegar a desplazarse el robledal buscando temperaturas más apropiadas y condiciones de mayor humedad. Todos estos muestreos se realizaron en el robledal de Cáñar, el cual está cerca del límite de las condiciones microclimáticas que puede resistir esta especie arbórea, como se refleja en el trabajo realizado por Leal García (2013). En dicho trabajo también se observa que las condiciones en la parte inferior del gradiente altitudinal ocupado por el melojo, tanto en

el robledal de Cáñar como en otros dos robledales muestreados, son más limitantes en recursos hídricos y temperatura, mientras que las cotas cercanas al límite superior de su distribución son mucho más adecuadas para el mantenimiento del robledal. Por lo tanto, la progresión en altitud del robledal parece ser la mejor opción a largo plazo para mejorar la supervivencia de esta masa boscosa.

2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO

Existen diferencias en las características físico-químicas de los diferentes suelos estudiados en el presente trabajo. En un principio, resulta lógico que estas diferencias se deban al tipo de vegetación presente, habiendo 3 tipos de muestras respecto a su tipo de vegetación: muestras de suelos rizosféricos de robles, muestras de suelos rizosféricos de encinas y muestras de suelos sin vegetación arbórea, aunque con vegetación arbustiva, como es el caso de *A. decorticans* en la muestra LJR/LJRE y de *G. versicolor* en la muestra CNR.

Las diferencias según el tipo de árbol se pueden deber a que la encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*) es un árbol de hoja perenne mientras que el roble melojo (*Q. pyrenaica*) posee hojas marcescentes, lo cual genera un gran aporte de nutrientes y materia orgánica al suelo durante el otoño, con la caída de su hoja. El aporte de nutrientes y materia orgánica provocado por la caída de la hoja tiene una gran influencia en la estructura y composición de las comunidades microbianas de suelos forestales. Aunque en el presente estudio los diferentes suelos muestreados no presentan diferencias notables tanto en el contenido en materia orgánica como en el resto de características físico-químicas analizadas, sí se observan diferencias en la estructura y composición de las comunidades diazotróficas, como será discutido más adelante.

Por otro lado, el robledal de la Dehesa del Camarate (CTR) presenta una proporción C/N muy alta, seguramente debido a la importante explotación de cría de ganado vacuno que se dio en el pasado en esta zona, siendo el aporte de excrementos el causante de un aumento de la cantidad de materia orgánica presente en este suelo muestreado. Además, se observa que los valores de materia orgánica en CTE y CTR son muy parecidos, aunque existe una diferencia en el contenido de nitrógeno, que es 3 veces mayor en CTE que en CTR, pudiendo deberse esta diferencia a una mayor actividad de pasto en los robles que en encinares, ya que el ganado prefiere pastar los brotes de los robles jóvenes más que las encinas.

Uno de los efectos más notables en los gradientes altitudinales es una gradación de las comunidades vegetales a lo largo éstos, lo cual puede conllevar diferencias en las características físico-químicas de los suelos asociados a dicha vegetación. En el presente estudio sólo la zona más alta (CNR)

presenta un tipo de vegetación diferente del resto, aunque en las muestras con mismo tipo de vegetación dominante (*Q. pyrenaica*) existen diferencias en cuanto al tipo de desarrollo del robleal. Según los datos físico-químicos obtenidos, la zona alta del robleal de Cáñar parece tener mejores condiciones para el mantenimiento del bosque, con valores de agua útil y materia orgánica mayores que en resto de muestras, así como mayor cantidad de algunos nutrientes, como son el fósforo, el potasio, el sodio, el magnesio y el calcio. Esto apoya, en parte, los resultados obtenidos por Leal (2013), donde, mediante un análisis del crecimiento vegetativo e inversión reproductiva de *Q. pyrenaica*, determina que la zona baja del robleal de Cáñar, entre otros, presenta condiciones desfavorables para el mantenimiento a largo plazo de este bosque.

La alteración de las características físico-químicas del suelo es uno de los principales efectos del fuego sobre los ecosistemas, y estos cambios junto con la modificación de las comunidades microbianas determinarán otros cambios a largo plazo. La disminución del contenido de materia orgánica y el nitrógeno total es algo predecible en suelos quemados durante años después del incendio (Prieto-Fernández *et al.* 1998; Fernández *et al.* 1999; Acea *et al.* 2003; Williams *et al.* 2012; Switzer *et al.* 2012), como ocurre en el presente estudio. Sin embargo, en un meta-análisis realizado a partir de los datos de 76 artículos científicos (Wang *et al.* 2012) se concluyó que hay un incremento del nitrógeno total en un primer periodo después del fuego, pero este nitrógeno se puede perder dependiendo del tipo de bosque y las características del sitio. En el presente estudio, las muestras de las zonas quemadas están localizadas en una ladera y el incendio ocurrió justo antes de la temporada de lluvias, por lo que se puede concluir que un posible incremento de nitrógeno total pudo haberse perdido por lavado y lixiviación. Algo diferente se observa en la proporción C/N, la cual no difiere entre suelos quemados y no quemados. Este resultado contrasta con otros estudios, donde se detectaron incrementos en esta proporción (Marañón-Jiménez y Castro, 2012; Williams *et al.* 2012) o disminución (Parker *et al.* 2001; Acea *et al.* 2003) después de un incendio. El que se mantenga unos valores similares de la proporción C/N se puede deber a la compensación de la pérdida de carbono con el lavado de nitrógeno durante la época de lluvias, o puede ser un indicador de la recuperación del suelo inicial 32 meses después del incendio, ya que esta relación C/N es siempre elevada para las materias orgánicas frescas y desciende durante el proceso de humificación hasta estabilizarse en valores próximos a 10, como ocurre en los suelos analizados.

Por otro lado, la existencia de un mayor valor de fósforo asimilable en el sitio afectado por el incendio sin árboles de encinas (LJR) se puede deber más a la proliferación de arbustos de la leguminosa *Adenocarpus decorticans* que al propio efecto del incendio en esta zona, existiendo evidencias de altos valores de fósforo asimilable asociado a arbustos, tanto antes (Rau *et al.* 2007) como después de un incendio (Rau *et al.* 2007; Rodríguez *et al.* 2009; Switzer *et al.* 2012).

DISCUSIÓN

Un segundo factor que está claramente afectado por el fuego es el pH del suelo, el cual es mayor en suelos quemados. Se ha descrito anteriormente que el carbón de los árboles quemados causa este incremento del pH del suelo (Acea *et al.* 2003; Certini, 2005; Jiménez-Esquilín y Castro, 2008), el cual es incluso mayor en presencia de árboles vivos que en madera cortada (Switzer *et al.* 2012; Kennedy y Egger, 2010). Así, la presencia de árboles de encinas causa una mayor alcalinización de los suelos (pH 7,6), mientras que la presencia de vegetación herbácea y el tiempo transcurrido después del incendio resulta en un pH similar a los suelos no quemados en LJR, existiendo un patrón similar en la salinidad del suelo y en la presencia de magnesio.

En trabajos anteriores se ha observado que tanto el tamaño de la comunidad microbiana como su composición y actividad están correlacionadas con el pH del suelo y la proporción de C/N (Djukic *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013), siendo mayor el tamaño de la comunidad, en términos de biomasa bacteriana, en suelos con mayor pH (Bååth *et al.* 2003, Djukic *et al.* 2010), y encontrándose esta correlación en gradientes altitudinales tanto en el mismo tipo de vegetación, como se da en arbustos de la especie *Silene acaulis* (Roy *et al.* 2013), como con un gradiente de vegetación asociado al gradiente altitudinal (Shen *et al.* 2013). En el trabajo realizado por Shen y colaboradores (2013) se observa el mismo patrón de aumento de valores de diversidad y riqueza con aumento de pH y C/N en un gradiente altitudinal de una tundra con diferencias en la composición vegetal entre los diferentes puntos de muestreo, aunque en este caso el estudio se realizó mediante la secuenciación de amplicones del gen 16S *rRNA*, y no mediante la construcción de librerías del gen *nifH*, como es el caso del presente estudio, por lo que estaríamos en una aproximación pionera en el estudio de ecología microbiana en gradientes altitudinales.

La correlación entre riqueza o diversidad bacteriana y el pH del suelo ha sido constatada en gran cantidad de trabajos, tanto a una escala regional (Bååth *et al.* 1995; Lauber *et al.* 2009) como a escalas espaciales más amplias (Fierer *et al.* 2011), pero no siempre se da el mismo tipo de correlación. En el caso del presente estudio existe correlación entre el pH y la riqueza o diversidad de las comunidades diazotróficas dependiendo del tipo de vegetación muestreada. Por un lado tenemos que en el gradiente altitudinal del robledal se observa una correlación positiva, donde las muestras de robledal presentan mayores valores de pH y riqueza de organismos diazotróficos y las muestras de robles en expansión y de zona sin robles (CNX y CNR) presentan menores valores de ambos parámetros de acuerdo a lo descrito por otros autores (Bååth *et al.* 2003; Shen *et al.* 2013). Al contrario, en las muestras de encinas se observa una correlación negativa entre el pH y la riqueza de organismos diazotróficos, seguramente debido a que las muestras con mayor valor de pH o han sufrido un incendio (LJR y LJQ) o las encinas presentaban signos de enfermedad (CTE), por lo que aunque se haya obtenido esta correlación negativa, seguramente el pH no sea el factor determinante de estos bajos valores de riqueza y diversidad de organismos fijadores de nitrógeno asociados a la rizosfera de encinas.

3. COMUNIDADES DIAZOTRÓFICAS

Un mejor conocimiento de los patrones de diversidad biológica en un gradiente altitudinal es indispensable para una comprensión global de las influencias del cambio climático en los ecosistemas (Lomolino, 2001; Rahbek, 2005; Grytnes y McCain, 2007; Malhi *et al.* 2010), pudiéndose extender esto al conocimiento de las comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno. A pesar de la importancia del estudio de la diversidad de comunidades diazotróficas como posibles bioindicadores de la calidad del suelo, hasta hoy muy pocos trabajos han empleado este tipo de estudios para caracterizar gradientes altitudinales; y la casi totalidad de los trabajos de ecología bacteriana en gradientes altitudinales se han realizado con estudios de amplicones del gen 16S *rRNA* o mediante alguna técnica de fingerprinting. En el gradiente altitudinal del robleal de Cáñar se observa una disminución de los índices de riqueza y diversidad de las comunidades diazotróficas al ascender dentro del gradiente altitudinal, formándose dos grupos atendiendo a estos valores: uno formado por las muestras tomadas a 1.400 y 1.800 m de altitud, y otro formado por las muestras tomadas en los puntos más elevados, una de ellas en presencia de robles y la otra no. Por lo tanto, parece ser que las diferencias en la riqueza y diversidad de organismos diazotróficos no son debidas a la presencia o no de robles, sino a que sea un robleal maduro donde hay una relación C/N más alta. Existen diversos trabajos con diferentes patrones altitudinales en cuanto a la riqueza taxonómica total, como decrecimiento (Bryant *et al.* 2008), incremento (Wang *et al.* 2011) o riqueza unimodal (Singh *et al.* 2011) con incremento de altitud, o ningún patrón o diferencias a diferentes altitudes (Fierer *et al.* 2011). En nuestro caso se trata de un decrecimiento de la riqueza taxonómica de las secuencias del gen *nifH*, pero no de la riqueza taxonómica total. Aunque se observen patrones de distribución de determinados grupos taxonómicos o de la biomasa bacteriana total a lo largo de un gradiente altitudinal, es importante saber qué factores causan estos patrones de distribución, y estos patrones no tienen por qué darse siempre. Así, por ejemplo, existen trabajos donde se observa un descenso en la abundancia de las acidobacterias con la elevación debido a cambios en el pH (Bryant *et al.* 2008) o en la proporción C/N (Singh *et al.* 2012), mientras que en otros se observa un incremento de la abundancia de este *phylum* con la elevación debido a aportes de carbono (Wang *et al.* 2011).

Atendiendo al clústering jerárquico aglomerativo de las secuencias aminoácidas de NifH, se observó que las muestras más parecidas son las que poseen robles a mayores altitudes, tanto formando bosques (CNA) como pequeños agrupamientos o árboles aislados (CNX). A éstas se le asemeja más la otra muestra con robles (CNB) y por último la que no los tiene (CNR). Teniendo en cuenta que la zona alta del robleal es la que presenta mejores condiciones ambientales para el mantenimiento del bosque a largo plazo (Leal, 2013), este agrupamiento puede indicarnos que en la zona baja del robleal existe cierta degradación del hábitat mientras que en la zona de expansión del robleal las condiciones

DISCUSIÓN

parecen más favorables, atendiendo a la composición de las comunidades diazotróficas, a pesar de que pueda haber diferencias en la composición físico-química del suelo. Además debe de haber algún factor o factores asociados al gradiente altitudinal que determinen estas diferencias entre muestras, como son los factores físico-químicos que se han indicado en el apartado anterior, un mayor desarrollo en la formación del suelo o las condiciones climáticas con menor temperatura y mayor humedad del suelo en las zonas más elevadas. Por lo tanto, hay que discernir con claridad que aunque las muestras tomadas en suelos rizosféricos de bosques maduros tienen mayores valores de riqueza y diversidad del gen *nifH*, al observar la composición y estructura de la comunidad diazotrófica difieren entre sí, siendo la muestra de robles en expansión (CNX) la que más se asemeja a la de la zona del robledal que no sufre estrés ambiental (CNA). Además, como CNR y CNX están a la misma altura y sólo difieren por la presencia o no de robles, se puede decir que este factor influye en que un suelo sea más favorable para el mantenimiento del bosque, atendiendo a la composición de su comunidad diazotrófica. A nivel taxonómico estas dos muestras difieren en que CNR presenta un mayor porcentaje de secuencias *NifH* pertenecientes al *phylum* Firmicutes, y dentro éste del género *Pelosinus*; mientras que en CNX existen más secuencias del *phylum* Proteobacteria y de los géneros *Rhodopseudomonas* y *Methylobacterium*, ambos pertenecientes a este mismo *phylum*. Del género *Pelosinus* se desconoce muchos aspectos de su biología y ecología, pero dentro del *phylum* Firmicutes existen muchas especies que producen endosporas, que las hacen resistentes a la desecación y pueden sobrevivir en condiciones extremas, como las que se pueden dar en suelos de la zona de alta montaña sin la protección de alguna especie arbórea. Por otro lado el género *Rhodopseudomonas*, más abundante en presencia de árboles, se caracteriza por su capacidad para degradar y reciclar diferentes compuestos aromáticos, como puede ser la lignina presente en los restos de origen vegetal o los taninos típicos de las quercíneas. El otro género que abunda en presencia de árboles, el género *Methylobacterium*, se caracteriza por su capacidad para estimular la germinación de semillas y el desarrollo de la planta mediante la producción de fitohormonas (Menna *et al.* 2012). Además de abundar en la zona de expansión del robledal, este género también abunda en la muestra de la zona alta del robledal (CNA) y en la del encinar sano (LJN), tratándose en ambos casos de bosques en buen estado de conservación. Por lo tanto, el género *Methylobacterium* puede ser un indicador de calidad de este tipo de suelos, ya que en ambos casos se trata de los puntos de muestreos más idóneos para el desarrollo de la respectiva especie arbórea, y para el caso de la zona de expansión del robledal puede estar indicando un correcto desarrollo del suelo o unas adecuadas características físico-químicas o ambientales.

Los eventos de incendios tienen un mayor efecto sobre las comunidades bacterianas totales, así como las de aquellas que son fijadoras de nitrógeno. Dentro del muestreo realizado para el estudio del efecto del incendio, la principal diferencia entre las comunidades diazotróficas se encuentra entre los suelos quemados y los suelos no quemados, pero también existen diferencias entre el resto de condiciones (Norte vs. Sur, intensidad del incendio, tiempo transcurrido desde el incendio). La

determinación del número de OTUs y del índice de Chao1 muestra que el análisis de 50 clones por sitio es suficiente para describir la diversidad de organismos diazotróficos, coincidiendo con otros estudios de librerías del gen *nifH* después de un incendio (Yeager *et al.* 2005). Está descrito que los incendios afectan negativamente a las bacterias del suelo disminuyendo su diversidad, riqueza y biomasa (Mabuhay *et al.* 2006; Sun *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012), existiendo trabajos en los que se observa lo mismo para las comunidades diazotróficas del suelo (Shaffer *et al.* 2000; Yeager *et al.* 2005; Kennedy y Egger, 2010). Nuestros resultados muestran que la riqueza y diversidad de secuencias del gen *nifH* son menores en suelos quemados que en no quemados, con el menor valor en el sitio más afectado por el incendio (LJQ) 32 meses después del mismo. Los resultados de Kennedy y Egger (2010) sugieren que la presencia de árboles vivos durante el incendio tiene cierta influencia en las comunidades microbianas del suelo, y esta observación fue corroborada en el trabajo de Switzer *et al.* (2012), en el cual se demuestra que en los suelos con pies de árboles quemados disminuyen las poblaciones bacterianas más que en suelos con árboles cortados o con pilas de madera. Por lo tanto, la rizosfera de encina (LJQ) se ve más afectada que suelos con vegetación herbácea como son LJR/LJRE.

Por otro lado, se observó un incremento en el número de OTUs en LJQ entre los años 2008 y 2011, lo cual puede ser un indicador de la recuperación de las comunidades diazotróficas. El menor número de OTUs en LJRE con respecto a LJR del año 2008 puede ser debido al establecimiento de una nueva comunidad específica de encinas en el año 2011, a partir de la germinación de bellotas en un suelo que antes del incendio presentaba vegetación de herbáceas. Se puede decir que, al igual que ocurre en la muestra de robles en expansión (CNX) con respecto a la del piornal ubicado a la misma altitud (CNR), la existencia de árboles jóvenes está provocando una selección de la comunidad diazotrófica. Mientras que en el caso de los robles existe una selección del *phylum* Proteobacteria, en concreto los géneros *Methylobacterium* y *Rhodopseudomonas*; en las encinas germinadas de bellota se está seleccionando el *phylum* Firmicutes, y sobretodo el género *Pelosinus*. En el clústering jerárquico aglomerativo realizado con las muestras de encinas se observa que las comunidades diazotróficas de los sitios LJR y LJRE se parecen más a las de rizosferas de encinas que no han sido quemadas que las que sí lo fueron, por lo que el efecto de la presencia de árboles resulta en mayores diferencias de las comunidades diazotróficas. En la muestra de LJQ del año 2011, 6 años después del incendio, las comunidades diazotróficas se asemejan más a las de las muestras no quemadas (LJN) de lo que se asemejaba en la muestra del año 2008, lo cual puede ser un indicador de la recuperación de este suelo tras sufrir el incendio.

Los mayores índices de riqueza y diversidad de las comunidades diazotróficas en suelos de robledales pueden ser debidos a la propia fisiología de este árbol. Puede ser que el roble aporte mayor cantidad de biomasa vegetal, que se acumula en invierno bajo la nieve y se humedece, para ser degradada en primavera cuando suben las temperaturas. En el caso de la encina, la hoja cae todo el año, es más seca y puede ser movilizadada por el viento y otros factores antes de ser degradada bajo el árbol.

DISCUSIÓN

Además hay que tener en cuenta que el roble durante el invierno esta en dormancia y casi no tiene metabolismo, el cual se tiene que activar al máximo en la primavera, mientras que la encina mantiene su metabolismo y secreción de exudados radiculares todo el año a una tasa variable. De modo que, tanto diferencias en el aporte de nutrientes por la caída de la hoja como en la actividad metabólica del árbol pueden ocasionar que existan diferencias en las comunidades microbianas asociadas a las raíces de éstos. Los patrones espaciales de distribución de las comunidades bacterianas están asociados a la composición y riqueza de las especies vegetales y su biomasa como se ha demostrado en bosques de coníferas (Pennanen *et al.*, 1999), bosques mixtos de abeto y abedul (Saetre, 1999; Saetre y Bååth, 2000) y en pinares (Pietikainen *et al.*, 2007).

La correlación entre los índices de riqueza y diversidad con el contenido de nitrógeno total hallado al comparar muestras de encinas y de robles indica que a mayor cantidad de nitrógeno la comunidad de bacterias diazotróficas es menos diversa. Por lo tanto, se puede concluir que aunque sólo se haya encontrado correlación entre la estructura de la comunidad diazotrófica y el contenido de nitrógeno total, no se puede generalizar esto a otros tipos de suelo porque existe multitud de factores que influyen en la estructura de las comunidades microbianas.

El análisis filogenético se realizó con la traslación de las secuencias nucleotídicas del gen *nifH* a su correspondiente secuencia aminoacídica. Aunque hay varios artículos que abordan este tipo de aproximación, existen pocos relacionados con incendios, gradientes altitudinales y comparación de formaciones vegetales similares, ya que la mayoría de estos estudios están centrados en sistemas agrícolas o en silvicultura. Nuestros resultados muestran que los *phyla* Proteobacteria y Firmicutes son los más abundantes de las librerías de NifH, llegando a ser el 100% de las secuencias en las muestras de suelos quemados (Ver Fig. 2.3-6, en la página 123). El *phylum* Cyanobacteria es el tercero más abundante, pero sólo está presente en el año 2011 de los sitios no quemados. Estos resultados concuerdan con los que obtuvieron Yeager *et al.* (2005), los cuales encontraron secuencias de NifH sólo para estos 3 *phyla* en suelos de un bosque mixto de pino ponderosa (*Pinus ponderosa*) y abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), entre 1 y 14 meses después de un incendio. Por otro lado, en nuestros resultados se observa una correlación inversa entre la proporción de secuencias pertenecientes al *phylum* Proteobacteria y el de las pertenecientes al *phylum* Firmicutes en los suelos quemados, siendo el *phylum* Proteobacteria más abundante en las muestras tomadas 32 meses después del incendio mientras que la cantidad de secuencias del *phyla* Firmicutes se incrementa después de 6 años del incendio. Así, en los suelos quemados con influencia de raíces de árboles, tanto en las encinas rebrotadas como en las que germinaron a partir de bellotas, las secuencias NifH de Firmicutes son predominantes 6 años después del incendio, por lo que se puede decir que hay una selección de este *phylum* por parte de la planta. Aunque un incremento similar se observó en otros sitios de la cara Sur de la sierra, el *phylum* Proteobacteria siguió siendo el mayoritario 6 años después del incendio en LNJ. Sin embargo, en la cara Norte el *phylum* Firmicutes disminuyó el año 2011, por lo que las comunidades

microbianas de esta área no se pueden considerar como un punto de control correcto para seguir la recuperación post-incendio, siendo el sitio LNJ de la cara Sur de la sierra el que se puede utilizar como control. La presencia del *phylum* Cyanobacteria en sitios no quemados en el año 2011 se puede deber a diferentes causas: i) la escasez de precipitaciones durante el año hidrológico 2007-2008, o ii) los suelos quemados no han recuperado las características que le permiten retener el agua procedente de las precipitaciones. Según datos recogidos por la estación PSN07, perteneciente al Observatorio de Cambio Global de Sierra Nevada y localizada en el robledal de Cañar, en los 6 meses antes del muestreo las precipitaciones fueron de 538,7 litros para el muestreo del 2008 mientras que para el del 2011 fueron de 1.099,6 litros; y la temperatura media del suelo durante el mes en el que se realizó el muestreo fue de 7,9 °C en abril de 2008 y de 10,6 °C en abril de 2011. Por tanto es posible que la menor cantidad de precipitaciones antes del primer muestreo, sumado a una menor temperatura, condicione la presencia o detección de microorganismos diazotróficos pertenecientes al *phylum* Cyanobacteria, cuya presencia depende de la disponibilidad de agua en el medio. Aunque el incendio es el factor que más ha influido en las comunidades microbianas, no se puede descartar que existan otros factores que afectan a la estructura y composición de las comunidades microbianas. Por lo tanto, las características ambientales a nivel microclimático y la orientación e inclinación de la ladera pueden estar influyendo en la microbiota del suelo.

La adscripción taxonómica de las secuencias de NifH a nivel de género nos permite determinar que existen secuencias de la enzima nitrogenasa similares a la nitrogenasa de *Paenibacillus* en todas las muestras de encinas, por lo que este género debe ser un organismo diazotrófico general y no específico de ninguna muestra. Al mismo tiempo, no se ha observado un patrón común en la distribución de géneros entre los diferentes tipos de muestras, aunque en LJQ el género *Azospirillum* del *phylum* α -Proteobacteria fue reemplazado por el género *Clostridium* del *phylum* Firmicutes en el año 2011. Yeager *et al.* (2005) también encontró una dominancia de secuencias de NifH del género *Clostridium* en sitios incendiados pero al mes siguiente de haber sido quemados. El género *Azospirillum* ha sido descrito como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, que incrementa el desarrollo de las raíces (Lugtenberg y Kamilova, 2009), por lo que este género puede ser importante para el inicio de la recuperación del ecosistema después de un incendio. En las zonas quemadas se mantienen o incrementan las secuencias de NifH asociadas al género *Rhizobium*. En las zonas quemadas sin encinas (LJR) esto puede deberse a la presencia de arbustos de *Adenocarpus decorticans* y otras leguminosas herbáceas. En el sitio LJRE, asociado a la germinación de bellotas, es remarcable la abundancia de secuencias de NifH relacionadas con el género *Pelosinus*. Este género ha sido encontrado en otros hábitats como una bacteria reductora de hierro en arcillas de caolín (Shelobolina, 2007), o envueltos en la reducción de cromo y uranio (Mosher *et al.* 2012), por lo que es complicado explicar su papel en estas muestras de suelos quemados. Sin embargo, tanto el género *Pelosinus* como el género *Clostridium* pertenecen al *phylum* Firmicutes, por lo que es posible que en LJRE *Pelosinus* tenga un papel similar a

DISCUSIÓN

Clostridium en LJQ. Las secuencias *nifH* del *phylum* Cyanobacteria pertenecen a los géneros *Nostoc* y *Nodularia*, y están presentes sólo en suelos no quemados. Pero este *phylum* no se puede considerar un buen marcador de la recuperación del ecosistema porque no está presente en el año 2008, seguramente debido a la escasez de lluvias que sufrió la zona en los meses previos al muestreo. Por otro lado, existen pruebas de la capacidad de las cianobacterias para formar asociaciones con raíces de plantas (Torres-Cortes *et al.* 2012), y este puede ser el caso de las rizosferas de quercíneas, donde pueden estar actuando como fijadores de nitrógeno beneficiosos para la planta. El género *Nostoc* también es más abundante en las muestras con bosques bien formados con respecto al resto de muestras del gradiente altitudinal, siendo estos organismos conocidos por su habilidad de permanecer en un estado de dormancia durante largos periodos de tiempo y poder recuperar de forma rápida su actividad metabólica cuando son rehidratados con agua. Por lo tanto, su presencia en zonas de robledales bien formados puede indicar la existencia de unas adecuadas condiciones de disponibilidad de agua en el suelo.

Los géneros característicos de la rizosfera de robles en la Dehesa del Camarate (CTR) son *Geobacter* y *Pelosinus*, siendo este último muy representado también en las muestras de encinas germinadas después del incendio y en la zona del piornal ubicada en el límite superior del robledal. El género *Geobacter* es de gran interés industrial por su capacidad para degradar compuestos aromáticos (Butler *et al.* 2007), como pueden ser los propios de las hojas y raíces de los robles.

En la muestra de la zona baja del robledal hay menor cantidad de secuencias *nifH* del *phylum* Proteobacteria, aunque aumenta el de Cyanobacteria. El género *Methylobacterium* es significativamente más abundante en la zona alta, mientras que en la zona baja lo son los géneros *Nostoc* (Cyanobacteria) y *Paenibacillus* (Firmicutes). La presencia de un considerable porcentaje de secuencias *nifH* del género *Paenibacillus* en la zona baja del robledal puede ser un indicador de deterioro del hábitat, ya que no aparece en el resto de muestras rizosféricas pero sí en la muestra tomada en suelo de piornal que puede tener otro tipo de estreses. El género *Paenibacillus*, perteneciente al *phylum* Firmicutes, se caracteriza por formar endosporas y tener capacidad de promover el crecimiento vegetal, por lo que juegan un papel importante en el funcionamiento del ecosistema (Lal y Tabacchioni, 2009). Por otro lado, la abundancia de secuencias *nifH* del género *Sinorhizobium* en los suelos no pertenecientes a bosques puede deberse a la vegetación presente en estas zonas, que al no estar dominada por el roble presenta una mayor cantidad de gramíneas y leguminosas, y posiblemente enriquecida en bacterias fijadoras de nitrógeno. Aunque en este mismo trabajo hemos mostrado que los microorganismos noduladores de *Genista* presentes en esta zona pertenecen al género *Bradyrhizobium* y no a *Sinorhizobium*.

Los resultados de aislamiento de bacterias capaces de nodular *G. versicolor* muestran que esta especie vegetal tiene nódulos formados tanto por *B. canariense* como por posibles nuevas especies de

Bradyrhizobium, y el hecho de que varios simbiovares de este género sean capaces de formar nódulos en esta planta apoya la idea de que las especies vegetales pertenecientes a la tribu Genisteeae sean más promiscuas de lo que se pensaba, ya que los géneros *Genista* y *Retama* presentan al menos dos simbiovares de *Bradyrhizobium* con capacidad para formar nódulos en dichas plantas. Por otro lado, el conocimiento de la existencia de más de una cepa capaz de formar nódulos en raíces de *Genista versicolor*, una planta endémica de Sierra Nevada, Sierra de Baza y Sierra de Los Filabres y de gran importancia en la formación del piornal dominante en el piso oromediterráneo de Sierra Nevada, puede suponer una importante herramienta de gestión de estos ecosistemas, ya que se pueden emplear dichas cepas para favorecer el crecimiento y desarrollo de estas plantas en periodos de estrés o después de algún evento catastrófico. También resulta muy importante el papel de estos matorrales en la formación de suelo en zonas elevadas, donde la escasez de nutrientes suele limitar el avance de masas boscosas, preparándose así el terreno para un futuro avance de los bosques mediterráneos hacia zonas más elevadas. Estos matorrales también pueden favorecer la germinación de nuevos robles, y su expansión a zonas de mayor altitud, ya que la propia estructura espinosa de *G. versicolor* puede proteger frente a hervíboros tanto la bellota como la planta en sus primeros años de vida. Existe un trabajo en el que se demuestra que el empleo de matorrales como “cuidador” de la bellota favorece el porcentaje de éxito de una repoblación (Castro *et al.* 2006). Además, el hecho de que exista más de una especie bacteriana con capacidad para nodular *G. versicolor* puede suponer una ventaja añadida, porque el rango de condiciones óptimas para la formación de nódulos se puede ver incrementado al incrementarse el número de cepas diferentes capaces de formar nódulos en una determinada especie vegetal.

Los resultados de distintos autores apoyan la idea de que diferencias en el tipo de hábitat influyen en la distribución de los microorganismos del suelo (Fierer *et al.* 2011; Hovatter *et al.* 2011; Roy *et al.* 2013) y que su respuesta a gradientes ambientales depende del taxón y del dominio microbiano investigado (Singh *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012).

4. CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA DEBIDO A LA METODOLOGÍA METAGENÓMICA EMPLEADA.

En el presente trabajo se ha pretendido realizar un estudio de las rutas metabólicas del nitrógeno desde un acercamiento metagenómico, empleando para ello 2 tipos de técnicas de secuenciación masiva y empleando para cada tipo de técnica un procesamiento diferente de las secuencias obtenidas. En primer lugar se realizó una pirosecuenciación 454 del DNA extraído de una alícuota de suelo, y para el total de las secuencias obtenidas no se realizó ningún tipo de ensamblaje debido a la escasa cobertura obtenida del total del metagenoma a estudiar, siendo este el procedimiento usual con esta aproximación. Pero, debido a este bajo porcentaje de cobertura se decidió realizar una nueva secuenciación masiva de las mismas muestras, pero esta vez empleando la tecnología Illumina, ya que permite obtener del orden de entre 100 y 1000 veces más cantidad de Mb de información con un coste similar, aunque con un tamaño de lectura 3 veces menor. Con las lecturas obtenidas por secuenciación Illumina sí se realizó un ensamblaje, obteniéndose finalmente un número de contigs similar al número de lecturas obtenidas por pirosecuenciación 454, e incluso con un tamaño medio de secuencia similar. Además, este proceso de ensamblaje permite depurar ciertas secuencias repetitivas que no dan homología con regiones génicas, y esto viene demostrado por el mayor porcentaje de secuencias con una buena homología con alguna de las proteínas contenidas en las diferentes bases de datos empleadas en el presente estudio.

Por lo tanto, a la hora de interpretar los resultados obtenidos hay que tener en cuenta que el método de secuenciación y tratamiento de las lecturas obtenidas es el factor que mayores diferencias provoca entre muestras. Por lo general, con los contigs obtenidos por Illumina se observan mayores diferencias entre muestras que con las lecturas obtenidas por 454, seguramente debido al mayor filtrado de la calidad de las secuencias realizado con el ensamblaje y también a una mayor cantidad de secuencias con homología con las proteínas contenidas en las bases de datos empleadas.

También es cierto que algunas diferencias entre los datos de 454 y los de Illumina se pueden deber a sesgos propios de la técnica empleada o del tratamiento de las lecturas. Como ejemplo notable, se observa que dentro del metabolismo del nitrógeno, al enfrentar las secuencias 454 y los contigs Illumina con la base de datos de subsistemas de SEED, hay diferencias en la proporción de secuencias (o contigs) pertenecientes a los diferentes grupos funcionales existentes. Con las secuencias 454 siempre salen como grupos mayoritarios, y por orden de abundancia, la asimilación de amonio, la amonificación de nitrato y nitrito, la síntesis de óxido nítrico y la hidrólisis de cianato, mientras que con los contigs de Illumina obtenemos como grupos mayoritarios, y según su abundancia, la amonificación de nitrato y nitrito, la asimilación de amonio, la fijación de nitrógeno, la utilización de alantoína y la nitrato reductasa disimilatoria. También se observa que dentro de las secuencias que dan homología con alguna

proteína del metabolismo del nitrógeno, para la base de datos KO de KEGG, al realizar la adscripción taxonómica de estas secuencias hay diferencias a nivel de *phylum* entre los datos obtenidos por 454 y los obtenidos por Illumina. Así, con las secuencias de 454 se obtienen los *phylum* Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria como los más abundantes, mientras que con los contigs de Illumina lo son los *phylum* Proteobacteria y Acidobacteria, con diferencias en la abundancia relativa de cada uno de estos *phylum* al comparar entre los diferentes tipos de secuenciación, obteniéndose además mayores diferencias entre muestras con los datos obtenidos por secuenciación Illumina.

En Urich *et al.* (2008) abundan los *phyla* Actinobacteria y Proteobacteria en suelos de arena de jardín o césped. Es también importante tener en cuenta cierto sesgo existente al emplear bases de datos para la adscripción taxonómica de secuencias génicas, ya que aquellos *phyla* o grupos taxonómicos determinados que hayan sido estudiados con mayor intensidad, como es el caso de Proteobacteria y Firmicutes, por ejemplo, estarán mejor representados en las diferentes bases de datos existentes, y esto genera cierto sesgo a favor de estos grupos mejor estudiados y en contra de los menos representados en las bases de datos cuando se realiza la adscripción taxonómica de las secuencias de cualquier muestra. Una demostración clara de la existencia de este sesgo la encontramos en Urich *et al.* (2008), donde se muestra que la diferencia de la proporción %mRNA / %rRNA de cada *phylum* obtenido con los datos metagenómicos empleados en su trabajo está fuertemente correlacionado con la cantidad de genomas secuenciados en cada *phylum*. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que este problema de sesgo es inherente a todos los estudios metagenómicos, aunque se hará menos acusado conforme se vayan secuenciando más genomas de los grupos o *phyla* menos representados.

DISCUSIÓN

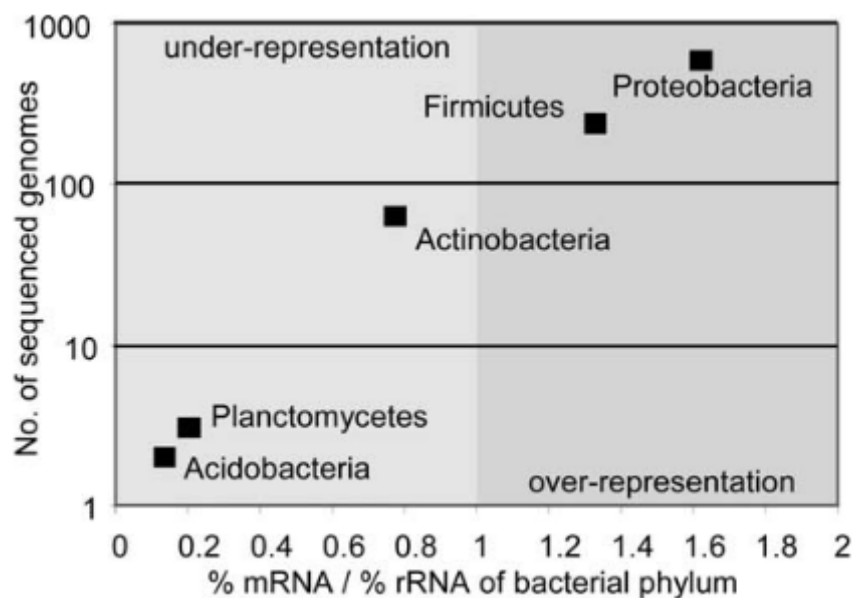


Figura 1. Dibujo de la bi-varianza logarítmica del número de genomas públicos disponibles (en Septiembre del 2007) de los 5 *phyla* de bacterias más abundantes, según los ribotags, frente a la sobrerrepresentación y sub-representación basada en mRNA-tag comparado con la media de las fracciones SSU (subunidad pequeña del ribosoma) y LSU (subunidad grande del ribosoma) del ribo-tag. Un valor de 1 significa que mRNA y ribo-tags aportan la misma fracción para el *phylum* correspondiente. Figura tomada de Urich *et al.* 2008.

Las categorías más abundantes dentro de los ecosistemas de suelo muestreados, en el nivel 1 de la base de datos de subsistemas de SEED, son *Carbohydrates*, *Clustering-based subsystem*, *Amino Acids and Derivates* y *Miscellaneous*, lo cual tiene cierta concordancia con los resultados obtenidos en otros trabajos, como el de Zu y Zhang (2012), donde aparte de los grupos ya citados, también encuentran que *Protein metabolism* es el más abundante en los lodos activos que analizaron. En el trabajo de Urich *et al.* (2008), realizado en suelo arenoso de césped, también se observan las categorías de *Carbohydrates*, *Amino Acids and Derivates* y *Protein metabolism* como las más representadas en los metagenomas obtenidos, por lo que estos 3 grupos se pueden considerar los más representados en diferentes tipos de suelos. En Andreote *et al.* (2012), analizando el metagenoma de manglares y empleando la base de datos KEGG, se encuentra una gran cantidad de secuencias asociadas al metabolismo de aminoácidos, al metabolismo energético, al metabolismo de cofactores y vitaminas y al metabolismo de carbohidratos.

5. RUTAS METABÓLICAS DEL CICLO DEL NITRÓGENO

Al centrar el análisis metagenómico en el metabolismo del nitrógeno, lo primero que se observa es que el porcentaje de secuencias asociadas a este metabolismo es mayor en los suelos de robles de zonas altas, lo cual puede indicar un mayor desarrollo o evolución del ciclo del nitrógeno en este sitio.

La asimilación de amonio y la amonificación de nitrato y nitrito son los dos grupos funcionales del metabolismo del nitrógeno más abundantes en todos los suelos analizados en el presente estudio, tanto para las secuencias obtenidas por 454 como para las obtenidas por Illumina, aunque difiere su abundancia según el método empleado para la obtención de las secuencias. Mientras que en las secuencias de 454 se obtienen valores abundancia de secuencias relacionadas con la asimilación de amonio de en torno al 55 %, en los contigs de Illumina no llegan a representar el 25 % de abundancia. Con las secuencias asociadas a la amonificación de nitrato y nitrito pasa lo contrario, con las secuencias 454 se han obtenido valores de abundancia de en torno al 15 % mientras que con los contigs de Illumina son de un 30 %. El hecho de que estos dos grupos metabólicos sean los mayoritarios dentro del metabolismo del nitrógeno puede indicar la importancia de la incorporación de amonio en compuestos orgánicos o su liberación a partir de éstos, lo cual es una de las características que presentan aquellos ecosistemas bien desarrollados (Ollivier *et al.* 2011). Otras diferencias en la abundancia de grupos metabólicos según la metodología empleada también se ven reflejada en los que ocupan el tercer puesto en abundancia, ya que para la secuenciación 454 encontramos la síntesis de óxido nítrico y la hidrólisis de cianato, mientras que para la secuenciación Illumina los grupos más abundantes (después de la asimilación de amonio y la amonificación de nitrato y nitrito) son la fijación de nitrógeno, la utilización de alantoína y la nitrato reductasa disimilatoria.

La utilización de la alantoína es, según los datos tanto de secuenciación 454 como de Illumina, más abundante en la muestra de encinar quemado que en la de encinar no quemado; mientras que las funciones de la nitrito reductasa disimilatoria y de la óxido nítrico sintasa son más abundantes en la zona no quemada, según los datos obtenidos mediante secuenciación Illumina.

Con los resultados obtenidos al comparar entre metagenomas de diferentes muestras resulta obvio que, de las 2 metodologías metagenómicas empleadas, con la tecnología Illumina se obtiene una mayor cantidad de información, ya que se parte del orden de 10^8 reads de unas 150 bp por muestra mientras que con la tecnología 454 hemos obtenidos unos valores del orden de 10^5 reads de unas 400 bp por muestra. Esto implica haber alcanzado una mayor cobertura del total del metagenoma, y se ve reflejado en que en muchos casos (abundancia de géneros dentro del metabolismo del nitrógeno, abundancia de las proteínas del metabolismo del nitrógeno...) del presente estudio se han encontrado

DISCUSIÓN

diferencias entre muestras a partir de los contigs obtenidos por Illumina mientras que a partir de las secuencias obtenidas por 454 estas diferencias han sido menores o inexistentes.

En la muestra tomada en la zona alta del robledal (CNA) se observa un mayor porcentaje de proteínas asociadas a la desnitrificación con respecto a la muestra del encinar sano (LJN), mientras que para la función de la nitrito reductasa disimilatoria presenta mayor abundancia con respecto a la muestra de la zona baja del robledal (CNB), a la del encinar sano (LJN) y a la de robles en expansión (CNX). La mayor abundancia de nitrito reductasa disimilatoria y en general del proceso de desnitrificación en la zona alta del robledal, puede estar reflejando una rizosfera con alta disponibilidad de fuentes nitrogenadas. Esta diferencia, estadísticamente significativa, también se observa en la comparación encinar quemado frente a no quemado, siendo más abundantes en la última situación. Así tendríamos que las rutas bioquímicas de las 2 formaciones boscosas maduras y en condiciones óptimas, son las que tendrían mayor disponibilidad de fuentes nitrogenadas. Siendo la disponibilidad de este elemento todavía mayor en la parte alta del robledal, que puede estar aprovechando la abundante materia orgánica presente bajo su dosel junto con el N fijado por las formaciones próximas de piornal, a diferencia del encinar maduro que no posee una formación vegetal de leguminosas que esté próxima para aportarle un extra de N.

Con la utilización de la base de datos de subsistemas de SEED, se observa que la proteína *Glycerate kinase* (utilización de alantoína) es más abundante en la zona quemada, junto con otras 8 proteínas asociadas a diferentes procesos metabólicos dentro del metabolismo del nitrógeno, destacando la existencia de 3 proteínas de la amonificación de nitrato y nitrito: *Nitrite reductase probable electron transfer 4Fe-S subunit*, *Cytochrome c nitrite reductase, small subunit NrfH* y *Cytochrome c552 precursor*. Por otra parte, en la zona no quemada se han detectado una mayor abundancia de 10 proteínas, de las cuales 4 están asociadas a la asimilación de amonio (*Glutamate synthase [NADH]*, *Glutamine synthetase type II*, *Nitrogen regulation protein NR(I)* y *Nitrogen regulatory protein P-II*).

Todo esto nos refleja una situación en la que la rizosfera de un encinar quemado destacan, dentro del metabolismo del nitrógeno, algunas proteínas implicadas en la obtención de nitrógeno desde fuentes inorgánicas; mientras que en el encinar no quemado la diferencia significativa la dan proteínas implicadas en la captación de nitrógeno desde fuentes orgánicas. Esto demuestra que la pérdida de materia orgánica originada por el efecto del incendio alteró notablemente el ciclo del nitrógeno de estos suelos, ya que incluso 3 años después del incendio dicho ciclo está centrado en obtener N a partir de compuestos inorgánicos, lo cual también es un indicativo de que el ecosistema no está todavía bien desarrollado.

La proteína *Allantoicase* es más abundante en la zona alta del robledal (CNA) que en la muestra del encinar sano (LJN). La proteína *Uroporphyrinogen-III methyltransferase*, que actúa en la nitrito

reductasa disimilatoria, tiene una mayor abundancia en la muestra de la zona alta del robledal (CNA) que en el resto de muestras. El grupo funcional de la amonificación de nitrato y nitrito la proteína *Cytochrome c-type protein NrfB precursor*, tiene mayor abundancia en la muestra de la zona baja del robledal (CNB) que en la muestra de encinar (LJN). En el grupo funcional de la desnitrificación la proteína *Nitrite reductase accessory protein NirV* es más abundante en las muestras de robledales (CNA y CNB) que en la de encinar (LJN). Por último, dentro del grupo funcional de la fijación de nitrógeno la proteína *nitrogenase (iron-iron) reductase and maturation protein AnfH* tiene mayor abundancia en la muestra de robledal de la zona alta (CNA) y en la de encinar (LJN) que en la zona baja del robledal (CNB); y la proteína *Nitrogenase (iron-iron) beta chain* es más abundante en la muestra de encinar (LJN) que en las muestras de robledal (CNA y CNB). Estos datos nos estarían reflejando que los microorganismos rizosféricos del encinar maduro (LJN) proporcionan un aporte de N extra mediante el proceso de fijación biológica, aunque en una cantidad muy ajustada, ya que como hemos visto el potencial de desnitrificación y presencia de nitrito reductasa disimilatoria en LJN es menor que el de robledal maduro en la zona alta.

En el grupo funcional de la asimilación de amonio existe la proteína *Glutamine synthetase type III, GlnN*, tiene mayor abundancia en la muestra de robles en expansión (CNX) que la de la zona baja del robledal (CNB). En el grupo funcional de la desnitrificación la proteína *Nitric oxide -responding transcriptional regulator NnrR (Crp/Fnr family)* es más abundante en las muestras de robledales (CNA y CNB) que en la muestra de robles en expansión (CNX). Y la proteína *NifB-domain, type 2* presenta mayor abundancia en CNX que en CNA. Esto nos refleja que los microorganismos rizosféricos de los pies de roble de la zona de expansión están aportando N al ecosistema a través de la fijación biológica como muestra la abundancia de secuencias de los genes *nifB* y *glnN*, y además se tiende a evitar la pérdida de N como se observa en el menor número de secuencias de la ruta de desnitrificación (NnrR y nitrito reductasa disimilatoria).

Empleando la base de datos KO se observa que las proteínas *nrfD: nitrate reductase* y *nitrate reductase (NADH)* son más abundantes en el suelo quemado (LJQ), mientras que en el no quemado (LJN) lo son la proteína *carbonic anhydrase* y las codificadas por los genes *napG*, *nifK* y *NapC*. También se observa que las proteínas codificadas por los genes *nosZ* y *napG* son más abundantes en la rizosfera de encinas (LJN), mientras que la *nitrite reductase*, codificada por el gen *nirB*, abunda más en la zona alta del robledal (CNA). La proteína codificada por el gen *napG* también es más abundante en la zona baja del robledal con respecto al resto de muestras de robles (CNA y CNX), mientras que las codificadas por los genes *nifK* y *nirB* son más abundantes en la zona de expansión (CNX) que en la zona baja (CNB).

Al realizar la adscripción taxonómica a nivel de *phylum* con las secuencias que han dado homología con alguna proteína del metabolismo del nitrógeno, dentro de la base de datos de KEGG Orthology, se hallan diferencias notables según la metodología empleada. En todas las muestras

DISCUSIÓN

analizadas en el presente trabajo se observa que los *phyla* más abundantes son Proteobacteria, Bacteroidetes y Acidobacteria para las secuencias obtenidas por 454, mientras que los *phyla* Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria los son para los contigs obtenidos a partir de la secuenciación por Illumina.

A nivel de *phylum*, dentro del metabolismo del nitrógeno, los *phyla* Actinobacteria, Firmicutes y Deinococcus-Thermus son más abundantes en la muestra de encinas quemadas que en las no quemadas, mientras que en la muestra de encinas no quemadas abundan más las Proteobacterias y las Acidobacterias. Al comparar entre diferentes especies arbóreas, se observa que el *phylum* Proteobacteria es más abundante en las muestras de robles (CNA y CNB) que en la de encinas (LJN), mientras que los *phyla* Bacteroidetes, Acidobacteria y Actinobacteria presentan una mayor abundancia en la muestra de encinar, aunque en el caso del *phylum* Actinobacteria no existe diferencias entre LJN y CNB. Si se compara la muestra de la zona alta de robledal (CNA) con la de la expansión de éste (CNX) se obtiene que, dentro del metabolismo del nitrógeno, el *phylum* Proteobacteria tiene una mayor abundancia en CNA mientras que el de Actinobacterias es más abundante en CNX.

A nivel de género, en la zona quemada abundan *Arthrobacter* (Actinobacteria), *Modestobacter* (Actinobacteria), *Blastococcus* (Actinobacteria), *Bacillus* (Firmicutes) y *Spirisoma* (Bacteroidetes). Estos géneros pertenecen a grupos donde existe una gran resistencia a estreses y a factores ambientales adversos, como son los Gram-positivos formadores de esporas. Esto junto a la capacidad de crecer en medios oligotróficos hace que este tipo de organismos puedan superar el efecto de un incendio en forma de spora y subsistir tras este a partir de los escasos nutrientes presentes en el medio, y con la ventaja de la escasa competencia frente a otro tipo de bacterias. En la zona no quemada son más abundantes los géneros *Bradyrhizobium* (Proteobacteria), *Pedobacter* (Bacteroidetes), *Mycobacterium* (Actinobacteria) y *Granulicella* (Acidobacteria). Estas bacterias son organismos heterótrofos característicos de suelos con gran cantidad de nutrientes, por lo que su presencia en la muestra de suelos quemados es escasa. Además, los géneros *Mycobacterium* (Actinobacteria) y *Granulicella* (Acidobacteria) también presentan mayor abundancia en encinas que en robles, dentro de las secuencias del metabolismo del nitrógeno obtenidas, y *Mycobacterium* también presenta mayor cantidad de secuencias en la muestra de robles aislados, sin formación de bosque, por lo que se puede decir que es característico de encinares y de robles en expansión.

Dentro del *phylum* Proteobacteria existen géneros más abundantes en suelos de bosques, como son *Bradyrhizobium* y *Rhodopseudomonas*, cuya importancia en el desarrollo de las plantas y en la degradación de compuestos aromáticos ha sido comentada anteriormente; mientras que el género *Nitrospira* es más abundante en la zona donde no existen suelos de bosques y están los robles migrando hacia mayores altitudes. Este género es un típico nitrificante que aporta N en forma de nitrato a las

plantas a través del enriquecimiento del suelo en este compuesto, por lo que su presencia en esta zona se puede deber a la falta de nutrientes y materia orgánica en el suelo.

La mayor cantidad de secuencias del metabolismo del nitrógeno asociadas al *phylum* Proteobacteria en el suelo de la zona alta del robledal puede ser un indicativo de un ecosistema maduro, con un ciclo del nitrógeno centrado en la utilización y reciclaje de N de origen orgánico, mientras que la mayor cantidad de secuencias del *phylum* Actinobacteria en el resto de muestras del gradiente altitudinal puede indicar cierto grado de degradación o de estreses ambientales o falta de nutrientes lo que favorece el desarrollo de microorganismos oligotrofos.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

1. La leguminosa arbustiva *Genista versicolor* es nodulada por bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, siendo predominante la presencia de *B. canariense* biovar *genistearum*. Además *G. versicolor* es una planta promiscua, ya que puede ser nodulada por otras 2 especies de *Bradyrhizobium*, perteneciendo una de ellas a un nuevo simbiovar que hemos denominado sierranevadense.
2. Como consecuencia de un incendio forestal se produce una disminución de la riqueza y diversidad de microorganismos diazotróficos asociados a la rizosfera de encinas. Tres años después del incendio el género bacteriano predominante es la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Azospirillum*, que es sustituido por *Clostridium* seis años después del mismo, en el caso de las encinas quemadas y rebrotadas; y por *Pelosinus* cuando éstas proceden de nuevas germinaciones.
3. En la rizosfera de robles se observa una correlación positiva entre la riqueza y diversidad de microorganismos diazotróficos y la relación C/N, la concentración de Mg_2^+ y Ca_2^+ , la salinidad y el pH del suelo. De acuerdo al análisis de diversidad del gen *nifH* el *phylum* Cyanobacteria es el más abundante. En la zona de expansión del robledal predomina *Sinorhizobium* y en las zonas menos alteradas abunda *Methylobacterium*.
4. En la rizosfera de las formaciones boscosas de quercíneas mínimamente alteradas la abundancia relativa del género *Methylobacterium* podría ser un indicador de la calidad del suelo.
5. El estudio metagenómico de los microorganismos rizosféricos requiere de una profundidad de secuenciación extensa, siendo la pirosecuenciación una técnica limitada.

CONCLUSIONES

6. En la rizosfera de las formaciones boscosas de quercíneas mínimamente alteradas el potencial genético del ciclo del nitrógeno nos muestra un ecosistema desarrollado en el caso del robledal, y en fase de alcanzarlo en el caso del encinar. El *phylum* Proteobacteria es diferencialmente predominante en el robledal, y el de Acidobacteria en la rizosfera del encinar.
7. Los microorganismos rizosféricos del robledal en la zona de expansión presentan un ciclo del nitrógeno con bajas pérdidas y altas entradas de este elemento, lo cual es característico de un ecosistema en desarrollo. Además, el *phylum* Proteobacteria, con microorganismos típicamente heterótrofos, presenta una menor abundancia.
8. Cuando se produce un incendio forestal la microbiota asociada a la raíz potencia la obtención de nitrógeno desde fuentes inorgánicas, mientras que en el ecosistema no alterado lo obtiene de compuestos orgánicos. Los *phyla* bacterianos típicos del ecosistema no alterado, Proteobacteria y Acidobacteria, son reemplazados por el *phylum* Actinobacteria, destacando la presencia de los géneros *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Modestobacter* y *Blastococcus*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acea M, Prieto-Fernández A, Diz-Cid N. 2003. Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 513-524.
- Acea MJ, Carballas T. 1996. Changes in physiological groups of microorganisms in soil following wildfire. *FEMS Microbiology Ecology* 20, 33-39.
- Ainsworth EA, Long SP. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol.* 165(2): 351-71.
- Alexandrian D, Esnault F, Calabri G. 1999. Forest fires in the Mediterranean area. *Unasylva* 197(50):35-41.
- Allen CD, Savage M, Falk DA, Suckling KF, Swetnam TW, Schulke T, Stacey PB, Morgan P, Hoffman M, Klingel JT. 2002. Ecological restoration of Southwestern ponderosa pine ecosystems: A broad perspective. *Ecological Applications* 12, 1418-1433.
- Allison SD, Wallenstein MD, Bradford MA. 2010. Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nature Geosci.* 3, 336-340.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anderson JM. 1975. The enigma of soil animal species diversity. En: *Progress In Soil Zoology*, (J. Vanek, Ed.) Proc. 5^o Int. Coll. Soil Zool., 51-58 pp. *Appl Environ Microbiol* 70: 4748-4755.
- Andreote FD, Jiménez DJ, Chaves D, Días ACF, Luvizotto DM, Dini-Andreote F, Fasanella CC, Lopez MV, Baena S, Taketani RG, Soares de Melo I. 2012. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *PLoS ONE* 7: e38600.
- Bååth E, Anderson TH. 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol Biochem* 35: 955-963.
- Bååth E, Frostegård Å, Pennanen T, Fritze H. 1995. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 229-240.
- Bach LH, Grytnes JA, Halvorsen R, Ohlson M. 2010. Tree influence on soil microbial community structure. *Soil Biol Biochem* 42: 1934-1943.
- Bárcenas-Moreno G, García-Orenes F, Mataix-Solera J, Mataix-Beneyto J, Bååth E. 2011. Soil microbial recolonisation after a fire in a Mediterranean forest. *Biology and Fertility of Soils* 47, 261-272.
- Bardgett RD. 2002. Causes and consequences of biological diversity in soil. *Zoology*, 105: 367-374

BIBLIOGRAFÍA

Benito M, Sánchez de Dios R, Sáinz H. 2008. Effects of climate change on the distribution of Iberian tree species. *Appl. Veg. Sci.* 11, 169–178.

Benito B, Lorite J, Penas J, *Clim. Change* 108, 471 (2011).

Biddle JF, Fitz-Gibbon S, Schuster SC, Brenchley JE, Huse CH. 2008. Metagenomics signatures of the Peru Margin seafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(30): 10583-11058.

Bobbink R, Hicks K, Galloway J, Spranger T, Alkemade R, Ashmore M, Bustamante M, Cinderby S, Davidson E, Dentener F, Emmet B, Erismann J-W, Fenn M, Gilliam F, Nordin A, Pardo L, De Vries W. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications* 20, 30e59.

Bossio DA, Scow KM, Gunapala N, Graham KJ. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb Ecol* 36: 1-12.

Brockett BFT, Prescott CE, Grayston SJ. 2012. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biol Biochem* 44: 9-20.

Brown JH. 2001. Mammals on mountainsides: elevational patterns of diversity. *Glob Ecol Biogeogr* 10:101–109

Bryant JA, Lamanna C, Morlon H, Kerkhoff AJ, Enquist BJ, Green JL. 2008. Microbes on mountain sides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 11505-11511.

Busse MD, DeBano LF. 2005. Chapter 4: Soil Biology. In: Neary DG, Ryan KC, DeBano LF(Eds.), *Wildland Fire in Ecosystems: Effects of Fire on Soil and Water*. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-42-vol. 4. USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Ogden, UT, 73-91.

Butler JE, He Q, Nevin KP, He Z, Zhou J, Lovley DR. 2007. Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics* 8

Campbell CD, Cameron CM, Bastias BA, Chen C, Cairney JWG. 2008. Long term repeated burning in a wet sclerophyll forest reduces fungal and bacterial biomass and responses to carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2246-2252.

Carney KM, Hungate BA, Drake BG, Megonigal JP. 2007. Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *PNAS (USA)* 104(12): 4990-4995.

Carroll JA, Caporn SJM, Johnson D, Morecroft MD, Lee JA. 2003. The interactions between plant growth, vegetation structure and soil processes in seminatural acidic and calcareous grasslands receiving long-term inputs of simulated pollutant nitrogen deposition. *Environmental Pollution* 121, 363-376.

Castro J, Zamora R, Hódar JA. 2006. Restoring *Quercus pyrenaica* forests using pioneer shrubs as nurse plants. *Applied Vegetation Science* 9: 137-142.

Certini G. 2005. Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia* 143, 1-10.

Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar EJ. 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2922-2927.

Chahboune R, Carro L, Peix A, Ramírez-Bahena MH, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar, EJ. 2012. *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 302-305.

Chao A. 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scan. J. Stat.* 11, 265-270.

Choromanska U, DeLuca TH. 2002. Microbial activity and nitrogen mineralization in forest mineral soils following heating: evaluation of post-fire effects. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 263-271.

Christensen JH, Hewitson B, Busuioc A, Chen A, Gao X, Held I, Jones R, Kolli RK, Kwon W-T, Laprise R, Rueda VM, Mearns L, Menéndez CG, Räisänen J, Rinke A, Sarr A, Whetton P. 2007. Regional climate projections. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom/New York, NY, USA, pp. 847–940.

Clark SC. 1996. Mediterranean ecology and an ecological synthesis of the field sites. In: *Mediterranean desertification and land use*. C.J. Brandt y J.B. Thornes (Eds.). ISBN978-0-471-94250-4, 271-301. John Wiley and sons, Ltd.

Cleveland CC, Nemergut DR, Schmidt SK, Townsend AR. 2007. Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. *Biogeochem.* 82: 229-240.

Craine JM, Morrow C, Fierer N. 2007. Microbial nitrogen limitation increases decomposition. *Ecology* 88: 2105-2113.

Dale VH, Joyce LA, McNulty S, Neilson RP, Ayres MP, Flannigan MD, Hanson PJ, Irland LC, Lugo AE, Peterson CJ, Simberloff D, Swanson FJ, Stocks BJ, Wotton BM. 2001. Climate change and forest disturbances. *Bioscience* 51, 723-734.

Daniel R. 2005. The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* 3: 470-478.

BIBLIOGRAFÍA

De Cáceres M, Font X, Gracia R, Oiva F. 2003. VEGANA, un paquete de programas para la gestión y análisis de datos ecológicos. VII Congreso Nacional de la Asociación Española de Ecología Terrestre, 1484-1497.

De Cáceres M, Font X, Oliva F, Vives S. 2007. GINKGO, a program for non-standard multivariate fuzzy analysis. *Adv Fuzzy Sets Systems* 2(1): 41-56.

De Graaff MA, van Groenigen KJ, Six J, Hungate, B., van Kessel, C. 2006. Interactions between plant growth and soil nutrient cycling under elevated CO₂: a meta-analysis. *Global Change Biology* 12: 2077-2091.

De Marco A, Gentile AE, Arena C, De Santo AV. 2005. Organic matter, nutrient content and biological activity in burned and unburned soils of a Mediterranean maquis area of southern Italy. *International Journal of Wildland Fire* 14, 365-377.

DeBano LF, Neary DG, Folliott PF. 1998. *Fire's Effects on Ecosystems*. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.

Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M. 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 15, ijs.0.049130-0

Della-Marta PM, Haylock MR, Lutterbacher J, Wanner H. 2007. Doubled length of western European summer heat waves since 1880. *Journal of Geophysical Research* 112, D15103. <http://dx.doi.org/10.1029/2007JD008510>.

DeLong EF, Pace NR. 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic Biology*, 50:470–478.

Diaz HF, Grosjean M, Graumlich L. 2003. Climate variability and change in high elevation regions: Past, present and future. *Climatic Change* 59: 1-4.

Djukic I, Zehetner F, Mentler A, Gerzabek MH. 2010. Microbial community composition and activity in different Alpine vegetation zones. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 155-161.

Doran JW, Sarrantonio M, Liebig MA. 1996. Soil health and sustainability. *Advances in Agronomy*, 56: 2–54.

Drake BG, Long SP, González-Meler M. 1997. Increased plant efficiency: a consequence of elevated atmospheric CO₂?. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 48:609-639.

Dullinger S, Dirnböck T, Grabherr G. 2003. Patterns of shrub invasion into high mountain grasslands of the Northern Calcareous Alps, Austria. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35, 434e441.

Durán D, Rey L, Sánchez-Cañizares C, Navarro A, Imperial J, Ruiz-Argueso T. 2013. Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 128-136. doi: 10.1016/j.syapm.2012.10.008.

Edwards RA, Rodriguez-Brito B, Wegley L, Haynes M, Breitbart M et al. 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* 7: 57.

Edwards A, Voss H, Rice P, Civitello A, Stegemann J, Schwager C, Zimmermann J, Erfle H, Caskey CT, Ansorge W. 1990. Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics* 6: 593-608.

Eskelinen A, Stark S, Mannisto M. 2009. Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats. *Oecologia* 161, 113-123.

Falgueras J, Lara AJ, Fernández-Pozo N, Cantón FR, Pérez-Trabado G, Claros MG. 2010. SeqTrim: a high-throughput pipeline for preprocessing any type of sequence read. *BMC Bioinformatics* 11: 38.

Feely RA, Sabine CL, Lee K, et al., 2004. Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science* 305, 362-366.

Felicísimo ÁM, Muñoz J, Villalba CJ, Mateo RG. 2011. Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático de la biodiversidad española. 1. Flora y vegetación. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.

Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.

Felsenstein J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.

Fierer N, Schimel JP, Holden PA. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol Biochem* 35: 167-176.

Fierer N, Jackson R B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 626-631.

Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88: 1354-1364.

Fierer N, McCain CM, Meir P, Zimmermann M, Rapp JM, Silman MR, et al. 2011. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* 92, 797-804.

Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA, Karl DM, Michaels AF, Porter JH, Townsend AR, Vöosmarty CJ. 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, 153-226.

BIBLIOGRAFÍA

- Galloway JN, Townsend AR, Erismán JW, Bekunda M, Cai ZC, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889–892.
- Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387-1390.
- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. 2004. Microbial Diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42: 243–270.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp SA, Young JP. 2001. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2037-2048.
- Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W. et al. 2008. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *Plos ONE* 3: e3042.
- Giller PS. 1996. The diversity of soil communities, the poor man's tropical rainforest. *Biodiversity and Conservation*, 5: 135-168.
- Giorgi F, Lionello P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob. Planet. Change* 63, 90-104.
- Gomez-Alvarez V, Teal TK, Schmidt TM. 2009. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *The ISME Journal* 3, 1314-1317.
- Gómez-Zotano J, Moreno-Sánchez JJ, Rodríguez-Martínez F. 2005. El incendio de Sierra Nevada (22-24 de septiembre de 2005). Una catástrofe ecológica. *Cuadernos Geográficos* 037, 205-214.
- Good P, Moriondo M, Giannakopoulos C, Bindi M. 2008. The meteorological conditions associated with extreme fire risk in Italy and Greece: relevance to climate models studies. *International Journal of Wildland Fire* 17, 1e11.
- Goodale CL, Aber JD. 2001. The long-term effects of land-use history on nitrogen cycling in northern hardwood forests. *Ecological Applications* 11, 253-267.
- Green ER, Ellis RJ, Gadsdon SRM, Milcu A, Power SA. 2013. How does N deposition affect belowground heathland recovery following wildfire? *Soil Biology and Biochemistry* 57: 775-783.
- Grogan P, Bruns TD, Chapin FS. 2000. Fire effects on ecosystem nitrogen cycling in a Californian bishop pine forest. *Oecologia* 122, 537-544.
- Gruber N, Galloway JN. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen-cycle. *Nature*, 451: 293-296.

Guénon R, Vennetier M, Dupuy N, Ziarelli F, Gros R. 2011. Soil organic matter quality and microbial catabolic functions along a gradient of wildfire history in a Mediterranean ecosystem. *Applied Soil Ecology* 48, 81e93.

Guerrouj K, Ruíz-Díez B, Chahboune R, Ramírez-Bahena MH, Abdelmoumen H, Quiñones MA, El Idrissi MM, Velázquez E, Fernández-Pascual M, Bedmar EJ, Peix A. 2013. Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 218-223.

Hackl E, Pfeffer M, Donat C, Bachmann G, Zechmeister-Boltenstern S. 2005. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil Biol Biochem* 37: 661-671.

Hamman ST, Burke IC, Stromberger ME. 2007. Relationships between microbial community structure and soil environmental conditions in a recently burned system. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1703-1711.

Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biology access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5: R245-R249.

Hanewinkel M, Cullmann DA, Schelhass M-J, Nabuurs G-J, Zimmermann NE. 2013. Climate change may cause severe loss in the economic value of European forest land. *Nature Climate Change* 3, Issue 3: 203-207.

Harrison KA, Bol R, Bardgett RD. 2007. Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. *Ecology* 88:989-99.

Hernández T, García C, Reinhardt I. 1997. Short-term effect of wildfire on the chemical, biochemical and microbiological properties of Mediterranean pine forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 25, 109-116.

Houghton JT, Ding Y. 2001. IPCC-report. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

<http://www.juntadeandalucia.es>

<http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/defensa-contra-incendios-forestales/estadisticas-de-incendios-forestales/>

<http://www.maweb.org>

<http://reddeparquesnacionales.mma.es>

Hugenholtz P, Tyson GW. 2008. Microbiology: Metagenomics. *Nature* 455:481-483.

Hungate BA, Dijkstra P, Johnson DW, Hinkle CR, Drake BG. 1999. Elevated CO₂ increases nitrogen fixation and decreases soil nitrogen mineralization in Florida scrub oak. *Global Change Biol.* 5: 781-789.

BIBLIOGRAFÍA

IPCC, 2007. Fourth Assessment Report, Climate Change 2007: Synthesis Report. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

IPCC, 2007: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Sek, T. 2008. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (6), 1416-29.

Isobe K, Otsuka S, Sudiana I, Nurkanto A, Senoo K. 2009. Community composition of soil bacteria nearly a decade after a fire in a tropical rainforest in East Kalimantan, Indonesia. *Journal of General and Applied Microbiology* 55, 329-337.

Jackson LE, Burger M, Cavagnaro TR. 2008. Roots, Nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:341-63.

Jastrow JD, Miller RM, Matamala R, Norby RJ, Boutton TW, Rice CW, Owensby CE. 2005. Elevated atmospheric carbon dioxide increases soil carbon. *Golbal Change Biol.* 11(12): 2057-2064.

Jiménez Esquilín AE, Stromberger ME, Shepperd WD. 2008. Soil Scarification and Wildfire Interactions and Effects on Microbial Communities and Carbon. *Soil Science Society of America Journal* 72, 111-118.

Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Sorensen S. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 33 (6): 443-453.

Kalita M, Ma?ek W. 2010. *Genista tinctoria* microsymbionts from Poland are new members of *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 252-259.

Kennedy N, Egger KN. 2010. Impact of wildfire intensity and logging on fungal and nitrogen-cycling bacterial communities in British Columbia forest soils. *Forest Ecology and Management* 260, 787-794.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58: 169-188

Klironomos JN. 2002 Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* 417, 67-70. (doi:10.1038/417067a)

Kowalchuk GA, Stephen JR. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55: 485-529.

Kowalchuk GA, Buma DS, DeBoer W, Klinkhamer PGL, Van Veen JA. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soilborne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 509-520.

LaBauer DS, Treseder KK. 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89: 371–379.

Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147, 981-993.

Lal S, Tabacchioni S. 2009. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian Journal of Microbiology*. 49(1): 2-10.

Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2407-2415.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5111-5120.

Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, et al. 2009. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods* 79: 266-271.

Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z, Li Y, Li S, Shan G, Kristiansen K, Li S, Yang H, Wang J, Wang J. 2010. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res* 2010, 20:265–272.

Liang C, Cheng G, Wixon DL, Balser TC. 2011. An Absorbing Markov Chain approach to understanding the microbial role in soil carbon stabilization. *Biogeochemistry* 106: 303-309.

Liang C, Jesus EC, Duncan DS, Jackson RD, Tiedje JM, et al. 2012. Soil microbial communities under model biofuel cropping systems in southern Wisconsin, USA: Impact of crop species and soil properties. *Appl Soil Ecol* 54: 24-31.

Lionello P, Malanotte-Rizzoli P, Boscolo R, Alpert P, Artale V, Li L, Luterbacher J, May W, Trigo RM, Tsimplis M, Ulbrich U, Xoplaki E. 2006. The Mediterranean climate: an overview of the main characteristics and issues. In: Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R. (Eds.), *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-26.

Lomolino MV. 2001. ELEVATIONAL GRADIENTS IN MAMMALS: SPECIAL ISSUE. Elevation gradients of species-density: historical and prospective views. *Global Ecology & Biogeography* (2001) 10, 3–13 Blackwell Science, Ltd

López-González GA. 2006. Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas. Editorial Mundi-Prensa libros, Madrid. ISBN 84-7114-995-8.

BIBLIOGRAFÍA

- Lucas RW, Casper BB, Jackson JK, Balsler TC. 2007. Soil microbial communities and extracellular enzyme activity in the New Jersey Pinelands. *Soil Biol Biochem* 39: 2508-2519.
- Mabuhay JA, Isagi Y, Nakagoshi N. 2006. Wildfire effects on microbial biomass and diversity in pine forests at three topographic positions. *Ecological Research* 21, 54-63.
- Mabuhay JA, Nakagoshi N, Isagi Y. 2006. Soil microbial biomass, abundance, and diversity in a Japanese red pine forest: first year after fire. *Journal of Forest Research* 11, 165-173.
- Marañón-Jiménez S, Castro J. 2012. Effect of decomposing post-fire coarse woody debris on soil fertility and nutrient availability in a Mediterranean ecosystem. *Biogeochemistry*
- Mataix-Solera J, Guerrero C, García-Orenes F, Bárcenas GM, Torres MP. 2009. Forest fire effects on soil microbiology. In: Cerdà, A., Robichaud, P.R. (Eds.), *Fire Effects on Soils and Restoration Strategies*. Land Reconstruction and Management Series, vol. 5. Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 133-175.
- Martínez-Parras JM, Molero-Mesa J. 1982. *Ecología y fitosociología de Quercus pyrenaica Willd. En la provincia Bética. Los melojares béticos y sus etapas de sustitución*. *Lazaroa* 4: 91-104.
- McCain CM. 2005. Elevational gradients in diversity of small mammals. *Ecology* 86, 366e372.
- Menna P, Barcellos FG, Hungria M. 2009. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2934-50.
- Meena KK, Kumar M, Kalyuzhnaya MG, Yandigeri MS, Singh DP, Saxena AK, Arora DK. 2012. Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012 May;101(4):777-86. doi: 10.1007/s10482-011-9692-9. Epub 2011 Dec 27.
- Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA. 2008. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9: 386.
- Mitchell CE, Power AG. 2003. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* 421, 625-627. (doi:10.1038/nature01317)
- Mosca E, Montecchio L, Sella L, Garbaye J. 2007. Short-term effect of removing tree competition on the ectomycorrhizal status of a declining pedunculate oak forest (*Quercus robur* L.). *Forest Ecol. Mang.* 244: 129-140.
- Myers RT, Zak DR, White DC, Peacock A. 2001. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. *Soil Science Society of America Journal* 65, 359e367.

Namiki T, Hachiya T, Tanaka H, Sakakibara Y. 2012. MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 20 e155 doi:10.1093/nar/gks678

Neary DG, Klopatek CC, DeBano LF, Folliott PF. 1999. Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis. *Forest Ecology and Management* 122, 51-71.

Neary DG, Ryan KC, DeBano LF. 2005. *Wildland Fire in Ecosystems Effects of Fire on Soil and Water*. 4,

Olivares FJ, Barea-Azcón JM, Pérez-López FJ, Tinaut A, Henares I. 2011. Sierra Nevada: una gran montaña, un pequeño continente. En: *Las mariposas diurnas de Sierra Nevada*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (Ed.). pp. 75-117.

Ollivier J, Töwe S, Bannert A, Hai B, Kastl EM, Meyer A, Su MX, Kleineidam K, Schloter M. 2011. Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiol Ecol* 78: 3-16.

Orr J, Fabry VJ, Olivier A, et al., 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681-686.

Pankhurst CE, Ophel-Keller K, Doube BM, Gupta VVSR. 1996. Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodiversity and Conservation*, 5: 197–209.

Parker JL, Fernandez IJ, Rustad LE, Norton SA. 2001. Effects of nitrogen enrichment, wildfire, and harvesting on forest-soil carbon and nitrogen. *Soil Science Society of America Journal* 65, 1248-1255.

Parks DH, Beiko RG. 2010. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 26: 715-721.

Pauli H, Gottfried M, Dullinger S, Abdaladze O, Akhalkatsi M, Alonso JLB, Coldea G, Dick J, Erschbamer B, Calzado RF, Ghosn D, Holten JJ, Kanka R, Kazakis G, Kollar J, Larsson P, Moiseev P, Moiseev D, Molau U, Mesa JM, Nagy L, Pelino G, Puskas M, Rossi G, Stanisci A, Syverhuset AO, Theurillat JP, Tomaselli M, Unterluggauer P, Villar L, Vittoz P, Grabherr G. 2012. Recent Plant Diversity Changes on Europe's Mountain Summits. *Science* 336: 353-355.

Pausas JG. 2006. Simulating Mediterranean landscape pattern and vegetation dynamics under different fire regimes. *Plant Ecology* 187, 249-259.

Pausas JG, Fernández-Muñoz S. 2011. Fire regime in the Western Mediterranean Basin: from fuel-limited to drought-driven fire regime. *Climatic Change*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10584-011-0060-6>.

Peix A, Rivas R, Velázquez E, Mateos PF, Martínez-Molina E, Muñoz-Herrera A, Gómez-Alonso A, Velázquez E. 2005. Application of horizontal staircase electrophoresis in agarose minigels to the random intergenic spacer analysis of clinical samples. *Electrophoresis*. 26, 4402-4410.

BIBLIOGRAFÍA

- Pennanen T, Liski J, Bååth E, Kitunen V, Uotila J, Westman CJ, Fritze H. 1999. Structure of the microbial communities in coniferous forest soils in relation to site fertility and stand development stage. *Microbial Ecology* 38, 168e179.
- Penton CR, Johnson TA, Quensen III JF, Iwai S, Cole JR, Tiedje JM. 2013. Functional genes to assess nitrogen cycling and aromatic hydrocarbon degradation: primers and processing matter. *Frontiers in Microbiology*, Volume 4, Article 279, doi: 10.3389/fmicb.2013.00279
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 180-201.
- Pettersson M, Bååth E. 2003. Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microb Ecol* 45: 13-21.
- Pietikainen J, Tikka PJ, Valkonen S, Isomaki A, Fritze H. 2007. Is the soil microbial community related to the basal area of trees in a Scots pine stand? *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1832e1834.
- Prieto P. 1975. Los bosques de Sierra Nevada. Algunas consideraciones históricas, ecológicas y fitosociológicas sobre las masas forestales autóctonas de las regiones más elevadas de la Penibética. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 32(2): 1099-1129.
- Prieto-Fernandez A, Acea MJ, Carballas T. 1998. Soil microbial and extractable C and N after wildfire. *Biology and Fertility of Soils* 27, 132-142.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugan M, Burgdorf KS, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65.
- Ramírez-Bahena MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Mateos PF, Martínez-Molina E, Willems A, Velázquez E. 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1929-34.
- Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Fernández-Santos F, Peix A, Martínez-Molina E, Mateos PF. 2009b. Phenotypic, genotypic and symbiotic diversity in strains nodulating clover in different soils in Spain. *Can. J. Microbiol.* 55, 1207-1216.
- Ramírez-Bahena MH, Chahboune R, Velázquez E, Gómez-Moriano A, Mora E, Peix A, Toro M. 2013. *Centrosema* is a promiscuous legume nodulated by several new putative species and symbiovars of *Bradyrhizobium* in various American countries. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, doi:pil: S0723-2020(13)00066-0. 10.1016/j.syapm.2013.03.007.
- Rau BM, Blank RR, Chambers JC, Johnson DW. 2007. Prescribed fire in a Great Basin sagebrush ecosystem: Dynamics of soil extractable nitrogen and phosphorus. *Journal of Arid Environments* 71, 362-375.

Reich PB, Bakken P, Carlson D, Frelich LE, Friedman SK, Grigal DF. 2001. Influence of logging, fire, and forest type on biodiversity and productivity in southern boreal forests. *Ecology* 82, 2731-2748.

Rigaud J, Puppo A. 1975. Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *J Gen Microbiol* 88, 223-228.

Rivas R, García-Fraile P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2007. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 181-187.

Rivas R, Laranjo M, Velázquez E, Mateos PF, Oliveira S, Martínez-Molina E. 2007b. Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *M. tianshanense* carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species constitute a novel biovar (*ciceri*) able to nodulate *Cicer arietinum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 412-418.

Rivas R, Peix A, Mateos PF, Trujillo ME, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2006. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* 287, 23-33.

Rivas R, Willems A, Palomo JL, García-Benavides P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Gillis M, Velázquez E. 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54,1271-1275.

Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debelle F, Ferro M, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. 1996. The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (26),15305-10.

Rodríguez A, Durán J, Fernández-Palacios JM, Gallardo A. 2009. Short-term wildfire effects on the spatial pattern and scale of labile organic-N and inorganic-N and P pools. *Forest Ecology and Management* 257, 739-746.

Rodríguez-Echeverría S, Pérez-Fernández MA, Vlaar S, Finan TM. 2003. Analysis of the legume-rhizobia symbiosis in shrubs from central western Spain. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1367-1374.

Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez Romero E. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 96-104.

Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD, Madico G, Gaydos CA, Walker T, Quinn TC. 2002. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis.* 2002;186:1677-1681.

Rousk J, Brookes PC, Bååth E. 2010. The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. *Soil Biol Biochem* 42: 516-520.

BIBLIOGRAFÍA

Ruiz-Labourdette D, Schmitz MF, Pineda FD. 2013. Changes in tree species composition in Mediterranean mountains under climate change: Indicators for conservation planning. *Ecological Indicators* 24: 310-323.

Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, et al. 2007. The sorcerer II global ocean sampling expedition: north-west Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol.* 5: 398-431

Ruser R, Flessa H, Russow R, Schmidt G, Buegger F, Munch JC. 2006. Emission of N₂O, N₂ and CO₂ from soil fertilized with nitrate: effect of compaction, soil moisture and rewetting. *Soil Biol Biochem* 38: 263-274.

Saetre P. 1999. Spatial patterns of ground vegetation, soil microbial biomass and activity in a mixed spruce-birch stand. *Ecography* 22, 183e192.

Saetre P, Bååth E. 2000. Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed spruce-birch stand. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 909e917.

Safronova V, Chizhevskaya E, Bullitta S, Andronov E, Belimov A, Charles TC, Lindstrom K. 2007. Presence of a novel 16S-23S rRNA gene intergenic spacer insert in *Bradyrhizobium canariense* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 269, 207-212.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Sanger F, Coulson A. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94, 441-448.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.

Sardans J, Peñuellas J. 2005. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 455-461.

Sardans J, Peñuellas J, Estiarte M. 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology* 39, 223e235.

Schimel JP, Gullede J. 1998. Microbial community structure and global trace gases. *Glob. Chang. Biol.* 4, 745-758.

Schlesinger WH. 2009. On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 203-208.

Schloss PD, Handelsman J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3):1501-1506.

Schloss PD, Larget BR, Handelsman J. 2004. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5485-5492.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microb* 75: 7537-7541.

Schloter M, Dilly O, Munch JC. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98: 255–262.

Schmidt IK, Emmett BA, Tietema A, Gundersen P, Williams DL, Beier C. 2004. Soil solution chemistry and element fluxes in three European heathlands and their responses to warming and drought. *Ecosystems* 2004, 7: 638–49.

Schopf JW, Packer BM. 1987. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237, 70–73.

Schröter D, Cramer W, Leemans R, Prentice IC, Araujo MB, Arnell NW, Bondeau A, Bugmann H, Carter TR, Gracia CA, De La Vega-Leinert AC, Erhard M, Ewert F, Glendining M, House JI, Kankaanpaa S, Klein RJT, Lavorel S, Lindner M, Metzger MJ, Meyer J, Mitchell TD, Reginster I, Rounsevell M, Sabate S, Sitch S, Smith B, Smith J, Smith P, Sykes MT, Thonicke K, Thuiller W, Tuck G, Zaehle S, Zierl B. 2005. Ecosystem service supply and vulnerability to global change in Europe. *Science* 310, 1333e1337.

Shaffer BT, Widmer F, Porteous LA, Seidler R.J. 2000. Temporal and spatial distribution of the nifH gene of N₂ fixing bacteria in forests and clear cuts in western Oregon. *Microbial Ecology* 39, 12-21.

Shelobolina ES, Nevin KP, Blakeney-Hayward JD, Johnsen CV, Plaia TW, Krader P, Woodard T, Holmes DE, Vanpraagh CG, Lovley DR. 2007. *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(Pt 1), 126-35.

Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zhang JB, He JZ. 2008. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol* 10: 1601-1611.

Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS. 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 779-790.

Singh D, Takahashi K, Kim M, Chun J, Adams JM. 2012. A hump-backed trend in bacterial diversity with elevation on Mount Fuji, Japan. *Microb. Ecol.* 63, 429-437.

Skogen KA, Holsinger KE, Cardon ZG. 2011. Nitrogen deposition, competition and the decline of a regionally threatened legume, *Desmodium cuspidatum*. *Oecologia* 165, 261e269.

BIBLIOGRAFÍA

- Smith NR, Kishchuk BE, Mohn WW. 2008. Effects of Wildfire and Harvest Disturbances on Forest Soil Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 216-224.
- Solomon SD, Qin M, Manning Z, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL. (Eds.), 2007. IPCC: Summary for Policymakers. *Climate Change 2007: the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Son Y. 2001. Non-symbiotic nitrogen fixation in forest ecosystems. *Ecological Research* 16: 183-196.
- Steele HL, Streit WR. 2005. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiol. Lett.* 247(2): 105-111.
- Stepkowski T, Hughes CE, Law IJ, Markiewicz, ?, Gurda D, Chlebicka A, Moulin L. 2007. Diversification of lupine Bradyrhizobium strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3254-3264.
- Strickland MS, Laubert C, Fierer N, Bradford MA. 2009. Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* 90: 441-451.
- Stroud JL, Paton GI, Semple KT. 2007. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: Implications for biodegradation and bioremediation. *J Appl Microbiol* 102: 1239-1253.
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM. 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Switzer JM, Hope GD, Grayston SJ, Prescott CE. 2012. Changes in soil chemical and biological properties after thinning and prescribed fire for ecosystem restoration in a Rocky Mountain Douglas-fir forest. *Forest Ecology and Management* 275, 1-13.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, Marsh TL, Flynn SJ. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13: 109–122.
- Torres-Cortés G, Millán V, Fernández-González AJ, Ramírez-Saad HC, Fernández-López M, Toro N, Martínez-Abarca F. 2012. Bacterial community in the rhizosphere of a cactus species during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. *Plant and Soil*, en prensa.

Tucker G. 2003. Review of the Impacts of Heather and Grassland Burning in the Uplands on Soils, Hydrology and Biodiversity. English Nature, Document Number 550.

Urich T, Lanzén A, Qi J, Huson DH, Schleper C, Schuster SC. 2008. Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. PLoS ONE 3: E2527.

Uroz S, Buee M, Murat C, Frey-Klett P, Martin F. 2010. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. Env. Microbiol. Rep. 2: 281-288.

Valle F. 2003. Mapa de series de vegetación de Andalucía. Ed. Rueda. ISBN: 84-7207-137-5.

Van der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecol. Lett. 11, 296-310.

Van der Putten WH, Van Dijk C, Peters BAM. 1993. Plant-specific soil-borne diseases contribute to succession in foredune vegetation. Nature 362, 53-56. (doi:10.1038/362053a0)

Van Dillewijn P, Villadas PJ, Toro N. 2002. Effect of a *Sinorhizobium meliloti* Strain with a Modified *putA* Gene on the Rhizosphere Microbial Community of Alfalfa. Applied and Environmental Microbiology 68, 4201-4208.

Velázquez E, Valverde A, Rivas R, Gomis V, Peix A, Gantois I, Igual JM, León-Barrios M, Willems A, Mateos PF, Martínez-Molina E. 2010. Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. Antonie Van Leeuwenhoek. 97, 363-376.

Villadas PJ, Fernández-López M, Ramírez-Saad H, Toro N. 2007. Rhizosphere-bacterial community in *Eperua falcata* (Caesalpinaceae) a putative nitrogen-fixing tree from French Guiana rainforest. Microbial Ecology 53(2), 317-27

Vinuesa P, León-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Pérez-Galdona R, Werner D, Martínez-Romero E. 2005a. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 569-575.

Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Werner D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2096-2104.

Vinuesa P, Silva C, Werner D, Martínez-Romero E. 2005b. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. Mol. Phylogenet. Evol. 34, 29-54.

BIBLIOGRAFÍA

- Vitousek PM, Howarth RW. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87e115.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman GD. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7, 737–750.
- Walley FL, Van Kessel C, Pennock DJ. 1996. Landscape-scale variability of N mineralization in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 383-391.
- Wan S, Hui D, Luo Y. 2001. Fire Effects on Nitrogen Pools and Dynamics in Terrestrial Ecosystems: A Meta-Analysis. *Ecological Applications* 11, 1349-1365.
- Wang JJ, Soininen J, Zhang Y, Wang BX, Yang XD, Shen J. 2012a. Patterns of elevational beta-diversity in micro- and macro- organisms. *Glob.Ecol.Biogeogr.* 21, 743-750.
- Wang Q, Zhong M, Wang S. 2012b. A meta-analysis on the response of microbial biomass, dissolved organic matter, respiration, and N mineralization in mineral soil to fire in forest ecosystems. *Forest Ecology and Management* 271, 91-97.
- Warren R, VanDerWal J, Price J, Welbergen JA, Atkinson I, Ramirez-Villegas J, Osborn TJ, Jarvis A, Shoo LP, Williams SE, Lowe J. 2013. Quantifying the benefit of early climate change mitigation in avoiding biodiversity loss. *Nature Climate Change* 3, July 2013: 678-682.
- Weand MP, Arthur MA, Lovett GM, McCulley RL, Weathers KC. 2010. Effects of tree species and N additions on forest floor microbial communities and extracellular enzyme activities. *Soil Biol Biochem* 42: 2161-2173.
- Wells CG, Campbell RE, DeBano LF, Lewis CE, Fredriksen RL, Franklin EC, Froelich RC, Dunn PH. 1979. Effects of fire on soil: a state-of-knowledge review. In: National Fire Effects Workshop. United States Department of Agriculture, Forest Service, General Technical Report WO-6, Washington, DC. pp. 34.
- Wessen E, Soderstrom M, et al. 2011. Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. *ISME J* 5(7): 1213-1225.
- Whelan RJ. 1995. *The Ecology of Fire*. Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Widmer F, Shaffer BT, Porteus LA, Seidler RJ. 1999. Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2), 374-380.
- Willems A, Munive A, de Lajudie P, Gillis M. 2003. In most Bradyrhizobium groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 203-210.

Williams RJ, Hallgren SW, Wilson GWT. 2012. Frequency of prescribed burning in an upland oak forest determines soil and litter properties and alters the soil microbial community. *Forest Ecology and Management* 265, 241-247.

Yeager CM, Northup DE, Grow CC, Barns SM, Kuske CR. 2005. Changes in Nitrogen-Fixing and Ammonia-Oxidizing Bacterial Communities in Soil of a Mixed Conifer Forest after Wildfire. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2713-2722.

Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* 27,

380–395.

Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiol* 5, 539-554.

Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.*, 18, 821–829.

Zinger L, Lejon DPH, Baptist F, Bouasria A, Aubert S, Geremia RA, et al. 2011. Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS ONE* 6:e19950. doi:10.1371/journal.pone.0019950