

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Exploring the microbiome composition of the rhizosphere associated with the wild Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*, Kunth) in the highlands of Ecuador.

Andrea Janeth Pinos León

María de Lourdes Torres, PhD

Director de Trabajo de Titulación

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito para la obtención del título de Magíster en Microbiología

Quito, 17 de enero de 2020

Universidad San Francisco de Quito USFQ
Colegio de Posgrados

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Exploring the microbiome composition of the rhizosphere associated with the wild Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*, Kunth) in the highlands of Ecuador.

Andrea Janeth Pinos León

Firmas

María de Lourdes Torres, PhD.

Directora del Trabajo de Titulación

Gabriel Trueba, PhD

Director del Programa de Posgrados del
Instituto de Microbiología

Hugo Burgos, PhD

Decano del Colegio de Posgrados

Quito, 17 de enero de 2020

© Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombre: Andrea Janeth Pinos Leon

Código de estudiante: 00141011

C. I.: 1721073417

Lugar, Fecha: Quito, 17 de enero de 2020

DEDICATORIA

A mi esposo, por acompañarme y apoyarme siempre durante este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis, María De Lourdes Torres, por guiarme durante todo este proceso y abrirme las puertas para crecer en mi carrera profesional, a los miembros de mi tribunal, Paúl Cárdenas y Antonio León, por sus valiosos comentarios y sugerencias. A Belén Prado por su guía en los análisis de mi tesis, a Darío Ramírez y Pamela Vega por su colaboración en la parte de colección de muestras, a las personas que trabajan en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, al Instituto de Microbiología y a la Universidad San Francisco de Quito por financiar mi investigación. También quiero agradecer a Gerardo Nuñez investigador de la Universidad de Florida por permitirme realizar una estancia en su laboratorio. A mi familia por su apoyo, principalmente a mi esposo por su paciencia y cariño. Finalmente agradezco a mis amigos, a los que estuvieron en su momento, y a los que siguen hasta ahora, especialmente a Pablo Egas, Ani Cárdenas Silvia Metz y Andrés Recalde.

RESUMEN

ARTÍCULO 1

La rizósfera es la interfaz entre las raíces de las plantas y el suelo. Aquí, las interacciones entre las raíces y microorganismos influyen en el desarrollo, crecimiento y adaptación de la planta al estrés biótico y abiótico. La rizósfera es un ambiente complejo y dinámico debido a la diversidad de microorganismos que habitan en este ambiente; por lo que, descifrar su composición es clave para entender cómo ocurren las adaptaciones de las plantas en sus hábitats silvestres. El conocimiento actual sobre microorganismos asociados a especies de plantas silvestres es limitado, particularmente en la región andina. En esta revisión se analiza y discute la información disponible en la literatura sobre las interacciones planta-microbioma con el objetivo de comprender el avance de los estudios del microbioma en ambientes de alta montaña. Primeramente, se describe la estructura del suelo enfocándonos principalmente en la rizósfera. Más adelante, nos centramos en los factores ambientales relevantes que se han descrito como moduladores de la estructura del microbioma de la rizósfera. Adicionalmente, se discute sobre las técnicas moleculares que se utilizan actualmente para acceder y caracterizar el microbioma. Después, se describen los principales hallazgos de los estudios actuales sobre el análisis del microbioma en suelos de páramo y alta montaña, en cultivos comerciales, así como en cultivos silvestres. Finalmente, nos enfocamos en los estudios disponibles para el género *Vaccinium* y en la información reportada sobre estudios en el mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt, Ericaceae) en páramos del Ecuador.

Palabras clave: interacciones, ensamblaje, microorganismos, mortiño páramos, plantas, rizósfera, *Vaccinium floribundum*,

RESUMEN

ARTÍCULO 2

La rizósfera es un entorno complejo y dinámico donde las raíces de las plantas interactúan con los microorganismos, lo que influye en el crecimiento de las plantas y la tolerancia al estrés biótico y abiótico. Descifrar su composición es clave para comprender cómo ocurren las adaptaciones de las plantas en los hábitats silvestres. A pesar de ello, el conocimiento sobre los microorganismos asociados con las especies de plantas silvestres es limitado, particularmente en la región andina. En este estudio, analizamos el microbioma de la rizósfera asociado con el mortiño (*Vaccinium floribundum*), en los páramos ecuatorianos. Se analizaron cuarenta y tres muestras, colectadas en diez provincias de la Sierra, utilizando secuenciamiento de próxima generación (NGS) para explorar la composición bacteriana y fúngica. Nuestros datos revelaron que Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria fueron los phyla bacterianos dominantes, mientras que Ascomycota y Basidiomycota fueron los phyla fúngicos dominantes. Nuestro estudio identificó un microbioma central que incluye taxones con roles importantes en la interacción suelo y microbio de la planta, lo que sugiere que estos taxones podrían desempeñar un papel clave en la adaptación del mortiño a condiciones ambientales adversas. Separamos nuestras muestras en cuatro grupos (A, B, C y D); el Grupo A, compuesto por individuos de las provincias del norte (Carchi, Imbabura, Pichincha y la parte norte de Cotopaxi); Grupo B, compuesto por individuos de las provincias de la región central (la parte sur de Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Chimborazo); Grupo C, compuesto por individuos de las provincias de la región sur (Cañar, Azuay y Loja); y el Grupo D, un grupo atípico, compuesto por individuos que crecen en el rango de altitud más alto (la parte sur de las provincias de Cotopaxi y Azuay). Las métricas de diversidad filogenética mostraron que la diversidad de rizobacterias es similar dentro de los grupos, mientras que el grupo C mostró la mayor diversidad de hongos, este grupo representa muestras provenientes de la región Centro. Las diferencias encontradas en la diversidad y composición del microbioma podrían explicarse por los cambios en el pH y la concentración de elementos químicos del suelo como Fe, P, Cd, Cu y Co. Colectivamente, estos resultados mostraron similitudes con los patrones de diversidad genética encontrados en el mortiño en Ecuador, lo que sugiere que esta especie de planta y su microbioma asociado han interactuado para adaptarse a las condiciones ambientales particulares de los páramos andinos.

Palabras clave: adaptación, comunidades bacterianas, comunidades fúngicas, praderas, interacción planta-microbioma, mortiño, plantas silvestres.

ABSTRACT

MANUSCRIPT 1

Rhizosphere is the interface between plant roots and soil. Here, interactions between roots and microorganisms influence plant growth, development, and adaptation to biotic and abiotic stress. Rhizosphere is a complex and dynamic environment because of the biodiversity of microorganisms; therefore, deciphering its composition is key to understand how plant adaptations occur in wild habitats. However, the knowledge about microorganisms associated with wild plant species is limited, particularly in the Andean region. In this review, we discuss developments in plant-microbiome research, in order to understand the progress in the study of the microbiome in high-montane environments. First, the soil structure is described focusing primarily on the rhizosphere. Later, we focus on the relevant environmental factors that have been described as modulators of the structure of the rhizosphere microbiome. Then we discuss the molecular techniques that are currently used to access and to characterize the microbiome. The main findings of the current studies on the microbiome analysis in tundra-like ecosystems and high mountain soils, in commercial crops, as well as in wild crops are described too. Finally, we analyze the available studies for the genus *Vaccinium* and for *mortiño* (*Vaccinium floribundum* Kunt, Ericaceae) in the *páramos* of Ecuador.

Keywords: assembly, Ecuadorian highlands interactions, microorganisms, plants, rhizosphere, *Vaccinium floribundum*.

ABSTRACT

MANUSCRIPT 2

The rhizosphere is a complex and dynamic environment where plant roots interact with microorganisms, affecting plant growth and tolerance to biotic and abiotic stress. Deciphering its composition is key to understand how plant adaptations occur in wild habitats. In spite of it, the knowledge about microorganisms associated with wild plant species is limited, particularly in the Andean region. In this study, we analyzed the rhizosphere microbiome associated with the wild Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*), also known as “*mortiño*”, in the Ecuadorian highlands. Forty-three samples, across ten provinces, were analyzed using Next-generation sequencing (NGS) to explore bacterial and fungal composition. Our data revealed that *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* phyla were the dominant bacterial taxa, whereas *Ascomycota* and *Basidiomycota* were the dominant fungal taxa. Our study identified a core microbiome that includes taxa with important roles in soil and plant-microbe interaction, suggesting that it could play a key role in the adaptation of the wild Andean blueberry to harsh environmental conditions. We separated our samples into four groups (A, B, C, and D); the Group A, composed by individuals from the northern provinces (Carchi, Imbabura, Pichincha, and the north part of Cotopaxi); Group B, composed by individuals from the provinces of the central region (The south part of Cotopaxi, Tungurahua, Bolivar and Chimborazo); Group C, composed by individuals from the provinces of the southern region (Cañar, Azuay, and Loja); and Group D, an atypical group, composed by individuals growing at the highest altitude range (the south part of Cotopaxi and Azuay provinces) . Phylogenetic diversity metrics showed rhizobacterial diversity was similar within groups, whereas group C showed the highest diversity of fungi rhizospheres, which represent samples coming from the Center region. The differences found in the microbiome diversity and composition could be explained by the changes in pH and concentration of soil chemical elements like Fe, P, Cd, Cu and Co. Collectively, these results showed similarities with the genetic diversity patterns found in the Andean blueberry in Ecuador, suggesting that this plant species and its associated microbiome have interacted in order to adapt to the particular environmental conditions of the Andean grasslands.

Keywords: adaptation, bacterial communities, fungal communities, grasslands, plant-microbiome interaction, *mortiño*, wild plants.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	8
TABLA DE CONTENIDO	10
INDICE DE TABLAS	13
TABLA DE FIGURAS	14
ARTÍCULO 1	
Comunidades microbianas de la rizósfera de plantas en páramos andinos	17
Introducción	17
Interacción planta-microbioma	18
Microbioma en la rizósfera	19
Factores abióticos que modulan el microbioma de la rizósfera	21
Tipo de suelo	21
pH del suelo.....	23
Nutrientes en el suelo	24
Factores geográficos (Altitud, latitud y longitud)	26
Radiación UV.....	26
Acceso al microbioma: Estrategias de secuenciamiento de nueva generación (Next-generation sequencing)	28
RNA ribosomal para la identificación de microorganismos	28
Secuenciamiento de nueva generación (NGS).....	29
Limitaciones.....	30
Ecosistema de páramo o alta montaña en América del sur	31
El suelo del páramo.....	33
Estudios del microbioma en páramos andinos y zonas de alta montaña	35
Cultivos comerciales	35
Cultivos Silvestres.....	39
Estudios adicionales.....	41
Estudios de microbioma en el género <i>Vaccinium</i>	43
Estudio del microbioma del mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunt, Ericaceae) en páramos del Ecuador.....	45
Conclusiones.....	46
Referencias	48

ARTÍCULO 2

Exploring the microbiome composition of the rhizosphere associated with the wild Andean blueberry (<i>Vaccinium floribundum</i> , Kunth) in the highlands of Ecuador	62
ABSTRACT	62
INTRODUCTION	63
MATERIALS AND METHODS	64
Sample collection	64
DNA extraction, amplicon library and sequencing	65
Amplicon sequence processing, ASV classification and taxonomic assignment	66
Diversity and abundance analyses.....	67
Soil chemical measurements.....	67
RESULTS	68
Composition of rhizosphere microbial communities of <i>V. floribundum</i>	68
Diversity of rhizosphere microbial communities	68
Bacterial diversity	68
<i>Alpha diversity</i>	68
<i>Beta diversity</i>	68
<i>NMDS plots and Principal Coordinate Analysis (PCoA)</i>	69
<i>Mantel test</i>	69
Fungal diversity	69
<i>Alpha diversity</i>	69
<i>Beta diversity</i>	69
<i>NMDS plots and Principal Coordinate Analysis (PCoA)</i>	69
<i>Mantel test</i>	69
Core microbiome of the wild Andean blueberry.....	69
Bacterial core microbiome	70
Fungal core microbiome	70
Differential abundance taxa of rhizosphere microbial communities	70
Bacterial relative abundance	70
Fungal relative abundance	71
Analysis of soil properties in the rhizosphere microbiome.....	71

Soil chemical measurements and regression model (R ²)	71
DISCUSSION.....	71
Microbial Community Composition	71
Bacterial communities.....	71
Fungal communities.....	72
Core microbiome	73
Bacterial core microbiome	73
Fungal core microbiome	73
Diversity and differential abundance analyses of microbial communities	74
Structure of microbial communities.....	75
Impact of soil properties in the rhizosphere microbiome.....	75
Soil variables affecting microbiome diversity	75
Soil variables affecting microbiome structure	76
CONCLUSIONS.....	77
REFERENCES	78

ÍNDICE DE TABLAS**ARTÍCULO 2**

Table 1. Detail of the 43 rhizosphere samples associated with the Andean blueberry <i>Vaccinium floribundum</i> on the Ecuadorian highlands.....	113
Table 2. Alpha diversity metrics of bacterial communities of the Andean blueberry <i>Vaccinium floribundum</i> in the Ecuadorian highlands.....	115
Table 3. Beta diversity metrics of bacterial communities of the Andean blueberry <i>Vaccinium floribundum</i> in the Ecuadorian highlands.....	116
Table 4. Alpha diversity metrics of fungal communities of the Andean blueberry <i>Vaccinium floribundum</i> in the Ecuadorian highlands.....	117
Table 5. Beta diversity metrics of fungal communities of the Andean blueberry <i>Vaccinium floribundum</i> in the Ecuadorian highlands.....	118

TABLA DE FIGURAS

ARTÍCULO 1

Figura1. Esquema de la diversidad de genomas presentes en la rizósfera comparados con el número de genomas de la planta (Mendes *et al.*, 2013).....60

Figura2. Compartimentos del sistema suelo-raíz (Sasse *et al.*, 2018)61

ARTÍCULO 2

Figure 1. Map showing the three geographical regions of the Ecuadorian highlands based on the patterns of genetic structure of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* A: Northern region; B. Central region; C: Southern region; and D: Atypical group. Each circle represents the collection sites of the rhizosphere samples associated with the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* on the Ecuadorian highlands89

Figure 2. Taxa bar plot of the most abundant bacterial phyla in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* on the Ecuadorian highlands.....90

Figure 3. Taxa bar plot of the most abundant fungal phyla in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* on the Ecuadorian highlands91

Figure 4. Comparative analysis of the alpha diversity of rhizobacterial communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* between four groups. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highland regions, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Shannon index, B) Faith's phylogenetic diversity, C) Observed ASVs, and D) Evenness index92

Figure 5. Comparative analysis of the alpha diversity of fungal communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* between four groups. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highlands, except group D: A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Shannon index, B) Faith's phylogenetic diversity, C) Observed ASVs, and D) Evenness index.....93

Figure 6. NMDS plots developed with dissimilarity matrices of the beta diversity of rhizobacterial communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum*. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highland regions, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Canberra index, B) Bray Curtis, C) Unweighted UniFrac, and D) Weighted UniFrac94

Figure 7. NMDS plots developed with dissimilarity matrices of the beta diversity of fungal communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum*. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highland regions, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Canberra index, B) Bray Curtis, C) Unweighted UniFrac, and D) Weighted UniFrac95

- Figure 8.** Structure of the microbial communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* between four groups. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highlands, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Principal Coordinate Analysis (PCoA) of bacterial 16S rRNA (PERMANOVA, $P < 0.001$) Bray Curtis relative abundance; B) Principal Coordinate Analysis (PCoA) of fungal ITS (PERMANOVA, $P < 0.001$) Bray Curtis relative abundance96
- Figure 9.** Correlation analyses (Mantel Test) between the bacterial (A) and fungal (B) Bray Curtis distance matrices and the genetic diversity distance matrix of *Vaccinium floribundum* individuals (Vega, 2019).....97
- Figure 10.** Bacterial core microbiome phyla of the rhizosphere of wild Andean blueberry *Vaccinium floribundum*98
- Figure 11.** Fungal core microbiome phyla of the rhizosphere of wild Andean blueberry *Vaccinium floribundum*99
- Figure 12.** Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and D groups, which represent samples that come from Center region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively.....100
- Figure 13.** Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between A and D groups, which represent samples that come from Northern region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively101
- Figure 14.** Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and A groups, which represent samples that come from Center and Northern regions, respectively102
- Figure 15.** Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and D groups, which represent samples that come from the Southern region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively103
- Figure 16.** Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and C groups, which represent samples that come from the Center and Southern regions, respectively104
- Figure 17.** Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and A groups, which represent samples that come from the Southern and Northern regions, respectively.....105

- Figure 18.** Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and D groups, which represent samples that come from Center region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively106
- Figure 19.** Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and D groups, which represent samples that come from the Southern region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively107
- Figure 20.** Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and A groups, which represent samples that come from the Southern and Northern regions, respectively108
- Figure 21.** Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between D and A groups, which represent samples that come from the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study and the Northern region, respectively109
- Figure 22.** Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and A groups, which represent samples that come from Center and Northern regions, respectively110
- Figure 23.** Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and B groups, which represent samples that come from the Southern and Center regions, respectively111
- Figure 24.** Regression model between soil chemical parameters and microbial communities of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. A) Variation in bacterial community explained by soil chemical parameters (63%); B) Variation in fungal community explained by soil chemical parameters (57%)112

ARTÍCULO 1

Comunidades microbianas de la rizósfera de plantas en páramos andinos

Autor: Andrea Pinos¹

¹ Universidad San Francisco de Quito USFQ. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. EC170157, Quito, Ecuador

Introducción

El término “microbioma” es usado para describir un conjunto de microorganismos que viven asociados a un determinado hospedador o que comparten un mismo ambiente (Andreote *et al.*, 2017). En este sentido, se estima que alrededor de 20,000 especies de plantas requieren simbiontes microbianos del suelo para poder persistir en sus hábitats (Bills *et al.*, 2004; Gams, 2007; Prober *et al.*, 2015; Torsvik, *et al.*, 2002). Esto se debe a que los microorganismos son de vital importancia para el ciclo de nutrientes y carbono en ecosistemas naturales (Bender *et al.*, 2016). Los microorganismos presentes en el suelo fragmentan y descomponen la materia orgánica, permitiendo que los nutrientes estén disponibles para su posterior procesamiento en el suelo y en la planta (Bardgett *et al.*, 1999). A su vez, dichos nutrientes son los que generan y modulan la actividad de los microorganismos presentes en el microbioma (Bonfante *et al.*, 2009; Minz *et al.*, 2013; Philippot *et al.*, 2013).

Los estudios reportados en la última década recalcan el creciente interés por estudiar los microorganismos del suelo (Bron *et al.*, 2012; Mitter *et al.*, 2016; Philippot *et al.*, 2013). Sin embargo, el conocimiento sobre microorganismos asociados a especies de plantas silvestres es limitado. Muchos de los estudios reportados se basan en especies vegetales de importancia agronómica, u organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* (Philippot *et al.*, 2013). Es por esta razón, que se necesitan más estudios que nos permitan mejorar

el conocimiento sobre la ecología microbiana del suelo que incluyan interacciones con especies de plantas en ecosistemas silvestres (Bever *et al.*, 2012).

En esta revisión se discute sobre las interacciones planta-microbioma. Se describen los ambientes heterogéneos que forman parte de la estructura del suelo para dar paso a una descripción general del microbioma de la rizósfera. Después, nos enfocamos en los factores abióticos que influyen en el ensamblaje del microbioma y en cómo el avance en el procesamiento de datos metagenómicos ha permitido la caracterización del microbioma. Adicionalmente, se resume la información actual sobre microbiomas de suelo de páramos y ecosistemas similares, se discuten los factores involucrados en la variación presente en estos estudios y la composición del microbioma de la rizósfera en ambientes andinos. Finalmente, se discute sobre el estado actual del microbioma del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt, Ericaceae) en páramos del Ecuador.

Interacción planta-microbioma

Varios años de investigación han demostrado la importancia de los microorganismos para la salud de las plantas. En este sentido, se ha observado experimentalmente la dificultad de cultivar diferentes especies de plantas en ausencia de microorganismos (hongos y bacterias) (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015). Por lo tanto, el *fitness* de una planta estaría determinado por el hologenoma, el cual está conformado por el genoma de la planta hospedera y el genoma de todos los microorganismos asociados a ella (Guerrero *et al.*, 2013; Mitter *et al.*, 2016). El complejo planta-microorganismo es considerado como un holobionte, compuesto por la planta y sus microorganismos asociados (Minz *et al.*, 2013). Este holobionte actúa como un consorcio y es la unidad de la selección evolutiva descrita por Jefferson (1994). Inicialmente, Rosenberg y Zilber- Rosenberg (2011) propusieron 4 criterios para la teoría holobionte, más tarde, Minz *et al.* (2013) adaptaron estos criterios

específicamente para las interacciones planta-microorganismo. Los postulados que señalan Minz *et al* (2013) son los siguientes: 1) las plantas albergan una gran diversidad de microorganismos asociados los cuales adquieren un ambiente rico en nutrientes de la planta, 2) los microorganismos afectan el *fitness* de la planta de varias maneras, 3) cualquier variación en el hologenoma puede generar cambios en el genoma de la planta o en el genoma de las comunidades microbianas y 4) este criterio sugiere la habilidad de transmitir la variación genética de una generación a otra.

Para comprender las interacciones planta-microbioma es necesario diferenciar los compartimentos físicos que forman el sistema suelo-raíz. En Sasse *et al.* (2018) se menciona una clasificación de estos compartimentos la cual es ampliamente utilizada en la bibliografía sobre microbiomas de suelo (Bulgarelli *et al.*, 2013; Lundberg *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013; Sasse *et al.*, 2018). Desde la zona más lejana a la zona más cercana a las raíces de la planta se utilizan los siguientes términos: (i) el suelo *bulk* es la zona de suelo que rodea todos los compartimentos más internos, esta zona no está directamente influenciada por la raíz de la planta (Lareen *et al.*, 2016), (ii) la rizósfera es la zona de entre 1-3 mm que rodea las raíces de la planta y está colonizada por un subconjunto de los microorganismos que se encuentran en el suelo *bulk*, (iii) el rizoplano es la superficie de las raíces de la planta y finalmente (iv) la endósfera que corresponde al interior de las raíces. Tanto el rizoplano como la endósfera son colonizadas por un subconjunto de los microorganismos que provienen de la rizósfera (Gupta, y Aggarwal, 2018) (Figura 2). A pesar de que estos ambientes están separados por micrómetros o milímetros entre ellos, difieren en la composición de su microbioma, características abióticas, abundancia de microorganismos e incluso presentan diferentes tasas de actividad microbiana (Fierer, 2017; Santoyo *et al.*, 2017).

Microbioma en la rizósfera

El microbioma de la rizósfera (rizobioma) es un término relativamente nuevo en donde las comunidades de microorganismos presentes están directamente asociadas a las raíces de las plantas (Berendsen *et al.*, 2012; Gupta, y Aggarwal, 2018; Sasse *et al.*, 2018). En este hábitat, sistemas sofisticados de comunicación planta-rizobioma le permiten a la planta influir en el comportamiento de los microorganismos para su beneficio (Lareen *et al.*, 2016). La rizósfera, es uno de los ecosistemas más complejos en la tierra que alberga una comunidad microbiana dinámica (Mendes *et al.*, 2013). Esto se debe a los compuestos que forman parte de los exudados de las raíces de las plantas (rizodepósitos), los cuales generan el ambiente de la rizósfera y modifican la química del suelo lo que diferencia a la rizósfera del suelo *bulk* (Bever *et al.*, 2012; Broeckling *et al.*, 2008). Los rizodepósitos atraen principalmente bacterias y hongos los cuales se alimentan de estos nutrientes, exudados y mucílagos liberados por las raíces de la planta (Philippot *et al.*, 2013). Es importante considerar que los compuestos secretados por las raíces pueden variar dependiendo de la especie o del genotipo de la planta (Yang y Crowley, 2000). Por otro lado, los microorganismos presentes en la microbiota deben tolerar los exudados de la planta que también sirven como un mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos de plantas (Bever *et al.*, 2012). Es por esta razón que se genera competencia en la rizósfera y como consecuencia, ciertas comunidades microbianas, especies o cepas se asocian con especies o genotipos de plantas específicas (Bais *et al.*, 2006).

Cuando nos referimos al microbioma es importante tomar en cuenta que no existe un microbioma típico (Philippot *et al.*, 2013). Sin embargo, si podemos hablar de grupos de microorganismos compartidos, aunque con diferentes abundancias relativas. Por ejemplo, se ha reportado que microorganismos del grupo de las proteobacterias son miembros dominantes en el microbioma de la rizósfera (Mendes *et al.*, 2011; Peiffer *et al.*, 2013).

Esto se debe principalmente a que las proteobacterias son estrategas R, es decir, crecen rápidamente y tienen la habilidad de utilizar un amplio rango de sustratos de carbono derivados de las raíces (Philippot *et al.*, 2013). Adicionalmente, también se ha observado la presencia de especies pertenecientes a los filos Firmicutes, Actinobacteria (Mendes *et al.*, 2011). Por otro lado, las bacterias como tal, no monopolizan el nicho rico en nutrientes de la rizósfera ya que los hongos, como los del filo Ascomiceto y Glomeromiceto también responden rápidamente a los rizodepósitos (Hannula *et al.*, 2012; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2007).

Factores abióticos que modulan el microbioma de la rizósfera

Las comunidades microbianas que se encuentran en el suelo interactúan constantemente con su entorno (Santoyo *et al.*, 2017). Sin embargo, determinar el efecto de estos factores ambientales en la composición y estructura del microbioma ha sido un reto para los investigadores (Fierer y Jackson, 2006). Esto se debe, principalmente a la complejidad de las comunidades de microorganismos que son albergadas en el suelo lo que, a su vez, genera múltiples interacciones ecológicas poco descritas hasta el momento (Philippot *et al.*, 2013). En esta sección se analizan los principales factores abióticos que se han reportado por tener un efecto en el ensamblaje del microbioma del suelo.

Tipo de suelo

El suelo puede variar en pH, estructura, textura, contenido de materia orgánica y humedad (Santoyo *et al.*, 2017). Estas propiedades físico-químicas del suelo son importantes ya que influyen en la composición de las comunidades microbianas del suelo (Philippot *et al.*, 2013). La influencia puede ser directa, creando hábitats específicos que benefician a ciertos tipos de microorganismos o indirecta afectando los patrones de exudación de las raíces de las plantas (Lareen *et al.*, 2016). En este sentido, el tipo de suelo determina la

composición del microbioma del suelo *bulk*. Mientras que, los exudados de las raíces de las plantas crean un ambiente en la rizósfera que gradualmente va a alterar el microbioma del suelo *bulk* para favorecer el establecimiento del rizobioma (Lareen *et al.*, 2016). Adicionalmente, Gelsomino *et al.* (1999) mostraron que la estructura de las comunidades de microorganismos es más similar en suelos del mismo tipo que en suelos con la misma ubicación geográfica. Jorquera *et al.* (2016), en su estudio con muestras de ecosistemas en ambientes extremos (Atacama, los Andes y la Antártica) observaron que el tipo de suelo mostró una fuerte correlación con la estructura de la comunidad microbiana comparado con otras variables en estos ecosistemas. Sus resultados también les permitieron concluir que las comunidades microbianas varían en función del origen o tipo de suelo de donde provengan las muestras analizadas (Lareen *et al.*, 2016).

Por otro lado, el suelo también está formado por una mezcla de minerales, principalmente, arena, limo y arcilla (Santoyo *et al.*, 2017). El contenido de estos minerales influye en su porosidad y humedad (Bronick y Lal, 2005). Por ejemplo, un suelo fértil requiere 50% de porosidad en el cual la mitad del suelo es ocupado por gas y la otra mitad por líquidos (Santoyo *et al.*, 2017). Estas interfaces son importantes ya que permiten que se formen gradientes de nutrientes, pH y humedad que influyen en la formación de hábitats específicos en el suelo (Bronick y Lal, 2005). En particular, para suelos en ambientes extremos, como los suelos de tundra, se ha documentado que el contenido de humedad tiene un fuerte impacto en la estructura de la comunidad microbiana (Chu *et al.*, 2011). Esto se debe a que el contenido de humedad en el suelo determina la velocidad con la que los microorganismos pueden desplazarse para colonizar los espacios de la rizósfera cerca a los exudados de la planta (Bashan *et al.*, 1996). Es por esta razón, que el impacto de las características del suelo genera un efecto dominante que influye en la estructuración de las comunidades microbianas de la rizósfera.

Ph del suelo

El pH determina la alcalinidad o acidez de un ambiente, razón por la cual se lo considera es un factor clave en estudios sobre la ciencia del suelo (Santoyo *et al.*, 2017). De la misma manera, el pH es un elemento clave para estructurar las comunidades microbianas del suelo (Fierer, 2017; Lauber *et al.*, 2009). Esto se debe a que los microorganismos tienen un amplio rango de tolerancia al pH por lo que los estudios se han enfocado en investigar su efecto a diferentes escalas. Fierer y Jackson (2006), en su estudio con muestras de suelo de América del Norte y del Sur, mostraron que la diversidad de microorganismos no está relacionada con la temperatura, latitud del sitio de estudio o distancia geográfica. Se encontró que el mejor predictor de la variabilidad en la diversidad y riqueza de las comunidades de microorganismos presentes en el suelo es el pH. Adicionalmente, reportaron que la menor diversidad y riqueza fue observada en suelos con pH ácido. En este estudio, los autores determinaron que los tipos de ecosistemas se diferencian entre sí principalmente en su valor de pH del suelo, debido que sus comparaciones fueron realizadas en sitios de muestreo con vegetación y clima similar, pero con diferente pH. Consistente con estos resultados, Geyer *et al.* (2014) reconocen al pH como el mejor predictor de la diversidad microbiana. En su estudio las correlaciones entre las propiedades del suelo mostraron que el pH puede explicar potencialmente la riqueza a nivel de filo. Adicionalmente, el pH del suelo tiene una relación directa con la disponibilidad de nutrientes, esto se debe a que el pH controla los compuestos químicos del suelo (Santoyo *et al.*, 2017). Lo que sugiere que el pH podría ser un factor indirecto que influye en la composición de las comunidades microbianas del suelo. Se ha observado que en suelos con pH neutro la diversidad microbiana es mayor comparada con suelos en donde el pH es ácido (Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2009). Por otro lado, también existen reportes en donde no se encontró asociación entre el pH y la diversidad de

microorganismos en un ecosistema. Por ejemplo, Donnarumma *et al.*, 2014, en su estudio biogeográfico a través de varias regiones, analizaron los factores abióticos, incluido el pH, que podrían ser responsables de la diversidad de sus aislados de rizósfera. Sus resultados mostraron que únicamente el tipo de suelo y factores geográficos tuvieron influencia en el estructuramiento del microbioma. Debido a la evidencia reportada hasta la fecha, el pH parece tener una importante influencia en la diversidad microbiana del suelo, sin embargo, es importante tomar en cuenta que esto no es una generalidad para todos los estudios sobre microbiomas (Santoyo *et al.*, 2017).

Nutrientes en el suelo

Los nutrientes que se generan en el suelo para las plantas, son el resultado de interacciones entre factores bióticos y abióticos. En este sentido, los microorganismos cumplen una función clave descomponiendo la materia orgánica para que exista disponibilidad de nutrientes (Santoyo *et al.*, 2017). Por su parte, las plantas, mediante sus raíces, van en búsqueda de los nutrientes disponibles permitiendo a los microorganismos adherirse y generar el microbioma de la rizósfera. De esta manera, la disponibilidad de los nutrientes en el suelo influye en la diversidad y abundancia del microbioma de la rizósfera (Berendsen *et al.*, 2012). Por lo tanto, un desbalance en los nutrientes del suelo genera un efecto en las comunidades microbianas que ahí habitan (Santoyo *et al.*, 2017).

Un suelo fértil está determinado en gran medida por 3 nutrientes principales: nitrógeno (N), fósforo (P) y carbono (C) (Ryan y Sommer, 2012). El nitrógeno tiene un efecto sustancial, principalmente en la composición de comunidades bacterianas. El enriquecimiento del suelo con N resulta en un aumento en la productividad de la planta, pero como consecuencia la riqueza y diversidad de especies de bacterias disminuye (Suding *et al.*, 2005). Por otro lado, el P, también es un factor importante que modula el microbioma de la rizósfera. Se ha observado experimentalmente que altas

concentraciones de P modifican la estructura de las comunidades de hongos y bacterias. Sin embargo, no se observó influencia en la riqueza de especies (Beauregard *et al.*, 2010). La liberación de compuestos de C, a través de las raíces de las plantas al suelo que las rodea es un fenómeno que estimula la proliferación de microorganismos. El C liberado permite que la rizósfera sea diferente del suelo *bulk* en cuanto a composición química, física y biológica. Adicionalmente, cuando existe una disminución de C en el suelo, la diversidad en las comunidades microbianas también disminuye (Degens *et al.*, 2000). Existen ciertas actividades antropogénicas, como la quema de pastizales que producen un aumento en la disponibilidad de nutrientes como N y P. Se ha observado que el incremento de N y P altera significativamente la estructura, diversidad de comunidades bacterianas y abundancia de taxones individuales (Santoyo *et al.*, 2017). Como consecuencia, la disponibilidad de nutrientes en el suelo tiene una fuerte influencia en la composición, abundancia y riqueza del microbioma de la rizósfera.

Otro componente fundamental de la rizósfera es la materia orgánica (MO) que incluye todas las sustancias orgánicas vivas o muertas. La materia orgánica se clasifica en residuos y humus (Rowell, 2014). Los residuos corresponden a partes muertas de animales o plantas mientras que el humus es la materia orgánica considerada como activa. El humus presenta propiedades físicas y químicas bien definidas y su acumulación está directamente relacionada a la actividad de los microorganismos (Hofstede *et al.*, 2002). Cuando la materia orgánica se descompone o se mineraliza aporta a las plantas formas aprovechables de N, azufre (S) magnesio (Mg), calcio (Ca) y P (Jaramillo, 2002). Adicionalmente las diferencias en el pH y concentraciones de aniones y cationes entre la rizósfera y el suelo *bulk* permiten la acumulación de nutrientes en grandes cantidades (Jaramillo, 2002). Esto se debe a que existen compuestos que son absorbidos rápidamente por la raíz, por lo tanto, no se acumulan en el exterior. Mientras que, aquellos compuestos

que son excluidos de la absorción, tienden a acumularse precipitándose alrededor de la raíz como es el caso del Ca y el hierro (Fe) (Bowen, 1993). Finalmente, existen nutrientes poco móviles en el suelo como Zinc (Zn), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo) y Boro (B) que le permiten a la planta resistir a condiciones desfavorables. Por ejemplo, variaciones de temperatura, salinidad, sequías, pH extremo, y presencia de elementos tóxicos como Fe, Aluminio (Al), Manganeseo (Mn) y protegen a las raíces de potenciales patógenos (Jaramillo, 2002).

Factores geográficos (altitud, latitud y longitud)

De manera general, los factores geográficos como altitud, longitud y latitud influyen en la distribución y diversidad de especies (Santoyo *et al.*, 2017). Sin embargo, esta influencia para las comunidades microbianas no ha sido estudiado ampliamente. Van Horn *et al.* (2013) estudió la influencia de factores abióticos en suelos de la Antártida. Sus resultados mostraron que sitios ricos en carbono orgánico, con elevación baja estimulan la presencia de miembros del filo *Actinobacteria* y *Acidobacteria*. Mientras que, en sitios con elevación alta y humedad baja dominan miembros del filo *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Wang *et al.* (2015) analizaron la distribución biogeográfica de comunidades de microorganismos a través de 3 zonas climáticas. Se observó que la riqueza y diversidad bacteriana tiende a disminuir a mayor altitud. Estos estudios sugieren, la importancia del muestreo a escala geográfica para determinar la combinación de factores geográficos junto con otros elementos abióticos responsables de este fenómeno biogeográfico que controla el estructuramiento del microbioma (Santoyo *et al.*, 2017).

Radiación UV

La rizósfera es un hábitat que se encuentra influenciado principalmente por fuentes de carbono y nutrientes liberados por los exudados de las raíces de las plantas (Ryan y

Sommer, 2012). Cuando la radiación UV es alta, las plantas alteran el metabolismo de los exudados de sus raíces en respuesta al estrés abiótico (Santoyo *et al.*, 2017). Como consecuencia de esta alteración la selección de las comunidades de microorganismos puede ser modificada. Los efectos directos de los rayos UV en los suelos se producen, por ejemplo, a través de un cambio en la comunidad fúngica con un aumento en las capacidades competitivas de los hongos de pigmentación oscura (Formánek *et al.*, 2014). Solo algunas de las especies de hongos del suelo son sensibles a los rayos UV-B mientras que la diversidad de otras especies aumenta bajo la radiación UV-B (Duguay y Klironomos, 2000). Avery *et al.* 2003 analizaron la respuesta de las comunidades microbianas de la rizósfera a altos niveles de radiación UV. Los autores encontraron que la radiación no solo afecta el crecimiento de la planta, sino que también modifica la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto, alteraciones en el metabolismo de las raíces puede influir en la composición de las comunidades de microorganismos (Formánek *et al.*, 2014). A pesar de que la luz no penetra fácilmente en las capas más profundas del suelo. La radiación UV si tiene un efecto en las comunidades de microorganismos y biomasa, así como en los pequeños invertebrados del suelo lo que genera cambios en el ciclo de nutrientes (Cadwell *et al.*, 2007). Por lo tanto, la exposición a niveles elevados de radiación UV reduce la biomasa de las raíces lo que, a su vez, disminuye la colonización de microorganismos (Santoyo *et al.*, 2017). Es decir, que la radiación UV tiene un potencial para disturbar las comunidades microbianas de la rizósfera (Sinha *et al.*, 1999).

Finalmente, varios factores adicionales han sido reportados como moduladores indirectos del ensamblaje del microbioma de la rizósfera (Igiehon y Babalola, 2018; Philippot *et al.*, 2013; Santoyo *et al.*, 2017). Entre estos factores se encuentran temperatura (Oliverio *et al.*, 2017), el estatus redox (Pett-Ridge & Firestone, 2005) y cambio climático (Santoyo

et al., 2017). Es importante considerar que la influencia de estos factores es dependiente de los taxones en cuestión, de la elección de los suelos a ser analizados y del método experimental utilizado (Fierer, 2017).

Acceso al microbioma: Estrategias de secuenciación de nueva generación (Next-generation sequences)

La gran diversidad de microorganismos y su capacidad para adaptarse a diferentes tipos de ambientes ha permitido que solo una pequeña fracción de ellos sea cultivada en el laboratorio (Andreote *et al.*, 2017). Cultivar estos microorganismos en ambientes artificiales requiere un profundo conocimiento de sus requerimientos en cuanto a nutrientes y condiciones de crecimiento (Kumar, 2017). Adicionalmente, estas técnicas para cultivar microorganismos que no se pueden cultivar en el laboratorio mediante técnicas microbiológicas estándar requieren tiempo y son laboriosas. Debido a esto, es necesario el uso de técnicas cultivo independientes para tener acceso a esta diversidad biológica (De Mandal *et al.*, 2015).

Los métodos moleculares basados en secuencias de ADN nos permiten superar estos problemas, ya que podemos aislar el material genético directamente de células vivas o muertas provenientes de muestras ambientales (De Mandal *et al.*, 2015). Esto ha generado el desarrollo de un nuevo campo llamado metagenómica (Simmons *et al.*, 2018). Actualmente, el secuenciamiento de nueva generación es una de las herramientas más comúnmente usadas en estudios metagenómicos (Simmons *et al.*, 2018). Estas técnicas moleculares, junto con el desarrollo de herramientas bioinformáticas nos permite analizar conjuntos grandes de datos metagenómicos (De Mandal *et al.*, 2015).

RNA ribosomal para la identificación de microorganismos

La extracción directa de ADN y la caracterización de las comunidades microbianas a través de PCR y metagenómica ha revolucionado el estudio de la microbiología ambiental (Nesme *et al.*, 2016). Como consecuencia del avance en la tecnología ha sido posible generar análisis más exactos sobre la diversidad de las comunidades microbianas del suelo. Estos métodos moleculares basados en secuenciamiento de última generación incluyen dos enfoques principales (Andreote *et al.*, 2017). El primero, se basa en el análisis de varios genes o *shotgun sequencing* (metagenómica) el cual nos permite acceder al genoma completo de los organismos dentro del microbioma (Goodwin *et al.*, 2016). El segundo enfoque se basa en el análisis de un solo gen o *amplicon sequencing* el cual utiliza secuencias conservadas dentro del RNA ribosomal (Andreote *et al.*, 2017). El RNA ribosomal es ampliamente utilizado debido a que presenta varias ventajas. El gen *16s rRNA* se encuentra en todos los organismos vivos, excepto en los virus, y representa más del 80% del RNA total bacteriano (De Mandal *et al.*, 2015). Por otro lado, para la identificación de ADN eucariota se utiliza el gen *18s rRNA* (Stackebrandt y Goebel, 1994). Estos genes han sido utilizados como marcadores filogenéticos por ser estable y por la presencia de dominios que han evolucionado independientemente. Ambos genes contienen 9 regiones hipervariables (V1-V9) altamente conservadas que exhiben cierto grado de variabilidad en su secuencia (Lagesen *et al.*, 2007). Por esta razón, los genes *16s rRNA* y *18s rRNA* son adecuados para la amplificación por PCR y secuenciamiento (De Mandal *et al.*, 2015).

Secuenciamiento de nueva generación (NGS)

NGS nos permite secuenciar masivamente y generar miles de millones de secuencias para un estudio a un bajo costo comparado con el método de secuenciamiento Sanger (Kimura, 2006). Existen diferentes plataformas de NGS (Illumina, Pacific Biosciences, Ion torrent, SOLiD) con diferentes principios y características como tiempos de corrida, rendimientos

y longitud de los *reads* (De Mandal *et al.*, 2015). Independientemente del tipo de NGS que se utilice, existen algunos pasos en común como la colección de muestras, extracción de ADN, construcción de librerías, secuenciamiento y procesamiento de los *reads* seguido del análisis cuantitativo y funcional (De Mandal *et al.*, 2015). Debido a que en los estudios sobre ecología microbiana no existe información acerca de la cantidad de muestra requerida que contenga toda la población microbiana en un entorno. Es necesario realizar una curva de rarefacción, representada por una gráfica de la cantidad de especies versus la cantidad de individuos muestreados (De Mandal *et al.*, 2015). Este análisis generalmente define la riqueza y la uniformidad de la población que son medidas usadas para estimar la fracción de especies secuenciadas (Andreote *et al.*, 2009).

El método de *amplicon sequencing* es usado para generar un perfil de la comunidad utilizando genes marcadores (De Mandal *et al.*, 2015). El procedimiento específico implica los siguientes pasos: (i) realizar un *denoising*, es decir, quitar el ruido a los datos sin procesar, (ii) eliminación de quimeras, son recombinantes que se forman cuando los fragmentos terminados prematuramente se vuelven a unir a otro molde de ADN durante la PCR, (iii) agrupamiento por OTUs, se realiza un alineamiento de nuestras secuencias con secuencias de referencia disponibles en las bases de datos, (iv) clasificación taxonómico, se realiza un asignamiento taxonómico a cada OTU, y (v) análisis bioinformático, en este paso se calculan los índices de alpha y beta diversidad (Atlas, 1984). En este sentido, se utiliza el índice de diversidad alpha, el cual se refiere a la riqueza de taxones en una localidad o comunidad y, el índice de diversidad beta que nos indica la diferenciación taxonómica entre estos sitios o comunidades (Sepkoski, 1988). Otros análisis incluyen escalamiento multidimensional, análisis de similitudes y prueba de hipótesis (De Mandal *et al.*, 2015).

Limitaciones

De manera general, la estimación de la diversidad puede variar dependiendo de factores como la profundidad del secuenciamiento, el tamaño de la muestra y los métodos para aislar el ADN (Fierer, 2017). Algunas limitantes en el estudio del microbioma mediante estas técnicas, derivan de la presencia de ADN de células muertas en el suelo que sobreestiman la diversidad hasta en un 40% (Carini *et al.*, 2017). Otra forma en la que se puede sobreestimar la diversidad presente en la muestra de rizósfera es por los errores de secuenciamiento y restricciones que tienen los algoritmos que se utilizan para realizar la asignación taxonómica aumentando la diversidad a nivel de especie (Edgar, 2013).

Por otro lado, también existen limitaciones en el análisis del microbioma subestiman la diversidad. Por ejemplo, cuando trabajamos con genes marcadores basados en PCR existe el sesgo hacia ciertos grupos de microorganismos, enmascarando de esta forma la diversidad presente (Tremblay *et al.*, 2015). Adicionalmente, se encuentran los problemas con las bases de datos que en algunos casos tienen genomas de referencia incompletos (Choi *et al.*, 2017). Sin embargo, cualquier estudio enfocado en analizar la riqueza y diversidad del microbioma está sujeto a sobre o sub estimaciones y por lo tanto los resultados de estos estudios deben manejarse con precaución (Shade, 2017). Es importante tomar en cuenta que no existe un método perfecto que nos permita acceder a la información completa de las comunidades microbianas en el suelo. Pese a esto, con estas herramientas es posible direccionar de mejor manera las preguntas que se generan al estudiar el microbioma del suelo.

Ecosistema de páramo o alta montaña en América del sur

El ecosistema de alta montaña fue identificado por primera vez cuando los españoles llegaron a América tropical, y llamaron páramos a las tierras de los Andes del norte por su similitud con las zonas altas y frías de la península Ibérica (Llambi, 2012). El término páramo se utiliza para conceptualizar los biomas ecuatoriales de alta montaña. Hofstede *et*

al. (2003), lo define como un ecosistema de alta montaña del trópico húmedo, en donde domina la vegetación abierta (herbácea y arbustiva) y se encuentra ubicado entre el límite del bosque cerrado y las nieves perpetuas. Los Andes tropicales atraviesan siete países desde el Suroeste de Venezuela hasta el norte de Chile y Argentina, incluidas las regiones montañosas de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Yarzabal y Chica, 2017). Estos sitios aparentemente estériles albergan diversas comunidades microbianas ofreciéndonos una oportunidad única para investigar cómo la vida se establece y desarrolla en uno de los ambientes terrestres más extremos en la tierra (Schmidt *et al.*, 2008). Otros ecosistemas neotropicales muy similares al páramo pero que no caen directamente en esta definición, se encuentran en las zonas de mayor altitud y áridas de la Cordillera de los Andes Centrales de Bolivia, las punas de Perú y los ecosistemas que se encuentran al norte de Argentina y Chile (Hofstede *et al.*, 2014). A pesar de que estos paisajes también se encuentran por encima de los límites del bosque y su vegetación está dominada por pajonales, exhiben diferencias marcadas con los páramos (Llambi, 2012). Las punas, al encontrarse en una zona sub-tropical, se caracteriza por ser una zona más árida con estacionalidad marcada. Es decir, presenta variaciones de temperatura promedio mensual entre los meses más fríos (julio-agosto) y los meses más cálidos (diciembre-febrero) (Tonneijck, 2008). Por otro lado, los páramos, al estar ubicados en el trópico, son ecosistemas más húmedos y tienen variaciones de temperatura menos marcadas durante todo el año (Yarzabal y Chica, 2017).

La heterogeneidad en estos ecosistemas se debe a procesos bióticos (biogeografía), abióticos (clima, suelo, altitud, geología) y antrópicos (impacto humano) (Hofstede *et al.*, 2014). La singularidad de cada tipo de páramo está dada por las vertientes húmedas y secas, las cuales se generan por corrientes de aire o la nubosidad (Rodríguez y Rivera, 2018). La edad de levantamiento, el tipo de roca y la presencia de volcanismo son factores

geológicos que también influyen en el desarrollo del tipo de páramo (Hofstede *et al.*, 2014). La diversidad de páramos a nivel local, está influenciado por aspectos geográficos como la glaciación y drenaje del suelo. Otro aspecto clave que se toma en cuenta para clasificar los diferentes tipos de páramos son aspectos biogeográficos como origen, distribución y radiación. Finalmente, el impacto humano es un factor adicional que dirige esta heterogeneidad observada en los páramos (Jorgensen y Ulloa, 1994).

El suelo del páramo

Una de las características más relevantes sobre los páramos se encuentra precisamente en el suelo, el cual es muy sensible a la labranza, ganadería, incendios y deforestación (Hofstede *et al.*, 2014). El suelo del páramo es conocido por su rol en captar, proveer y distribuir el agua a las zonas más bajas y también por almacenar el carbono atmosférico (Llambi, 2012). Este tipo de suelos presentan bajas temperaturas, alto grado de humedad, y pH bajo (Vásconez y Hofstede, 2001). Las bajas temperaturas influyen en los procesos de formación y descomposición química de las rocas que, al ser lentos, hacen que los suelos de páramo sean relativamente jóvenes y poco desarrollados (Llambi, 2012).

El clima frío también aletarga la actividad de los microorganismos presentes, por lo tanto, el proceso de descomposición de la materia orgánica es más lento, y ésta tiende a acumularse (Hofstede *et al.*, 2014). La materia orgánica, uno de los principales componentes del suelo, se descompone aún más lento en suelos de páramo con origen volcánico (Winckell *et al.*, 1991). Esto se debe a la presencia de Al que proviene de las cenizas volcánicas, ya que al combinarse forma partículas altamente resistentes a la descomposición (Hofstede *et al.*, 2003). Es por esta razón, que la materia orgánica, de la cual la mitad es C, se acumula en altas concentraciones (100g/kg) (Castañeda y Montes, 2017, Mena *et al.*, 2001). Gracias a esto los suelos de páramos son considerados como almacenes de C en sitios con mayor humedad la concentración de C orgánico puede llegar

al 40% (Buytaert *et al.*, 2006). Mientras que, en suelos de páramo con depósitos de cenizas el contenido de C orgánico varía entre 4-10% (Zehetner *et al.*, 2003).

Por otro lado, los valores promedio de pH están entre 4-6.5, es decir, los suelos de páramo son ácidos. En muchos suelos de páramo la principal causa de acidez es el contenido de H y Al. El pH en el suelo es importante debido a que a pH inferiores a 5.5 el crecimiento de plantas es restringido debido a la deficiencia de ciertos nutrientes (Hofstede *et al.*, 2003). Así como los microorganismos del suelo, los nutrientes también tienen un rango de pH en el que su disponibilidad es adecuado para las plantas. Es por esta razón, que si la disponibilidad óptima se encuentra por debajo de este rango se generan deficiencias o toxicidad. Los principales problemas debido a la acidez es la toxicidad por el Al y deficiencias por Ca, Mg y Mn (Andinos, 2012).

En Ecuador, el suelo de páramo es principalmente de origen volcánico porque se ha desarrollado junto con los depósitos piroplásticos resultado de erupciones volcánicas (Podwojewski, 1999). De manera general, la concentración de materia orgánica en los suelos de páramo es mayor a 5% y además es muy variable (Tonneijck, 2008). Esta variabilidad en la acumulación de materia orgánica se debe a la naturaleza del suelo y del tipo de páramo en sí (Hofstede *et al.*, 2003). Por ejemplo, en un páramo con suelo de origen volcánico, húmedo y de baja altitud (páramos en la frontera entre Colombia y Ecuador) se ha reportado hasta 40% de contenido de materia orgánica. Mientras que en un páramo que no tiene origen volcánico, seco y de mayor altitud (páramo del Chimborazo) el contenido de materia orgánica es menor (Mena *et al.*, 2001). Los páramos ecuatorianos forman parte de una gran diversidad a nivel de los ecosistemas que se presentan en Ecuador debido a: (i) presencia de la cordillera de los Andes, (ii) ubicación geográfica, y (iii) corrientes marinas (Vásconez *et al.*, 2001). La mayoría de estudios realizados en páramos se han enfocado en analizar la vegetación y describir la

composición química del suelo (Vasco *et al.*, 2009). Sin embargo, muy poco se sabe acerca del papel que juegan los microorganismos presentes en los suelos de este ecosistema y sus interacciones con las plantas a las que se encuentran asociados (Beltrán *et al.*, 2009; Hofstede *et al.*, 2014).

Estudios del microbioma en páramos andinos y zonas de alta montaña

Estudios sobre las comunidades de microorganismos de la rizósfera en entornos silvestres son escasos (Jorquera *et al.*, 2016; Yurgel *et al.*, 2017, 2018), especialmente en ambientes extremos como los Andes (Ferrero *et al.*, 2010; Lugo *et al.*, 2008; Menoyo *et al.*, 2017). Las zonas montañosas se caracterizan por sus condiciones adversas para el desarrollo de microorganismos y plantas (Menoyo *et al.*, 2017). Estos suelos son pobres en nutrientes, razón por la cual, las interacciones con los microorganismos de la rizósfera pueden ser la clave para permitir disponibilidad suficiente de las reservas de nutrientes en el suelo (Ferrero *et al.*, 2010).

Cultivos comerciales

A pesar de que los Andes tropicales son considerados como un *hot spot* de biodiversidad pocos estudios se han enfocado en la diversidad de las comunidades de microorganismos que colonizan la rizósfera de cultivos andinos. Con el fin de explorar formas sostenibles para intensificar la producción de cultivos andinos, los grupos de investigación se han centrado en investigar el microbioma de la rizósfera (Yarzabal y Chica, 2017). Entre estos estudios se destacan los realizados en el cultivo de la papa, el cual tiene su origen en las montañas de los Andes centrales. Pfeiffer *et al.* (2016) analizaron si las plantas de papa, en el altiplano andino de Perú (3245 y 4070 msnm.), comparten un microbioma central y si la composición del microbioma sigue patrones específicos influenciados por parámetros ambientales. Sus hallazgos mostraron que la diversidad α de bacterias está influenciada por el sitio de muestreo, el cual está representado por las propiedades del

suelo, altitud y variables climáticas. Mientras que, la diversidad β de bacterias tuvo un efecto más pronunciado relacionado al estado de vegetación más que al tipo de suelo o altitud. Por otro lado, Senés-Guerrero *et al.* 2014, utilizando las mismas muestras de papa observaron que la riqueza de hongos estaba influenciada principalmente por el estado de desarrollo de la planta que por otras variables. Adicionalmente, identificaron un microbioma central de 40 OTUs encontrados en todos los sitios de muestreo (*Bradyrhizobium*, *Microvirga zambiensis*, *Sphingobium* y *Blastococcus*) a pesar de la variabilidad en las propiedades del suelo, historia de cultivo, clima y altitud. Ghyselinck *et al.* (2013), aislaron 585 cepas de rizobacterias asociadas a cultivos de papa en ecosistemas andinos (Perú y Bolivia) para identificar posibles microorganismos como agentes para biocontrol de hongos patógenos de la papa y microorganismos promotores de crecimiento de plantas. De estos aislados, 58 cepas inhibían el crecimiento de los patógenos de la papa *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* pertenecientes a los subgrupos *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas corrugata* y al género *Bacillus*. Mientras que 12 cepas promovían el crecimiento de plantas *in vitro*. Posteriormente, 5 de estas cepas mostraron una mejora en el rendimiento y tamaño de la papa durante estudios realizados en Perú, Bolivia y Ecuador (Velivelli *et al.*, 2014).

Por otro lado, hongos aislados de la rizósfera han mostrado su potencial como biofertilizante o biocontroladores en la producción de la papa (Yarzabal y Chica, 2017). Por ejemplo, cepas de hongos nativas de la rizósfera de la papa como *Acaulospora* spp., *Glomus* spp., *Scutellospora* spp., *Gigaspora* spp., y *Sclerocystis* spp. mostraron ser promotoras de crecimiento y rendimiento en este cultivo en Perú (Davies *et al.*, 2005). Este efecto positivo se atribuyó principalmente a la mejora en la toma de nutrientes específicamente P, Fe y Mg por parte de estos microorganismos.

Chica *et al.* (2019), caracterizaron las comunidades bacterianas de la rizósfera de 3 especies de tubérculos nativos de los Andes en la provincia de Cañar (~3700 msnm). Se observó que la riqueza de especies fue similar, sin embargo, pocos OTUs fueron compartidos entre las 3 especies. Esto se atribuye a que los exudados de las raíces pueden estructurar la microbiota según la especie de planta. Los grupos más abundantes pertenecen a los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes, sugiriendo que estos grupos de microorganismos son reclutados específicamente en este ambiente andino. Las razones que explican las diferencias en abundancia de estos 3 grupos puede estar relacionada a la habilidad que tienen las Proteobacterias para colonizar de manera efectiva la rizósfera. Adicionalmente, las Proteobacterias y Actinobacterias juegan un papel importante como promotores de crecimiento de las plantas y también se ha observado que las Actinobacterias son altamente resistentes a ambientes extremos. En el caso de Bacteroidetes, su abundancia puede estar relacionada con su modo de vida copiotrófo, es decir, que pueden vivir en ambientes con poca cantidad de nutrientes.

La quinua es otro cultivo nativo de los Andes Centrales que se ha adaptado a condiciones ambientales extremas. En el altiplano boliviano la mayoría de los cultivos de quinua son orgánicos cultivados con técnicas ancestrales. Sin embargo, para mantener esta tradición, se han juntado esfuerzos para una agricultura sostenible utilizando microorganismos (Yarzabal y Chica, 2017). Las cepas de interés aisladas de la rizósfera de la quinua han sido la bacteria *Bacillus* sp. y el hongo *Trichoderma* sp. para ser utilizados como bioinoculantes mejorando considerablemente el rendimiento de este cultivo (Ortuño *et al.*, 2014). En los Andes tropicales también se produce una gran variedad de cultivos vegetales (Yarzabal y Chica, 2017). Los microorganismos comúnmente aislados de la rizósfera de estos cultivos incluyen *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Pseudomonas* spp. En cuanto a hongos los más comunes son especies de *Trichoderma*

que han sido foco de estudio por sus propiedades como antagonistas de patógenos de cultivos vegetales (Zambrano-Moreno *et al.*, 2016).

En cuanto a la domesticación de plantas, se ha observado que conlleva a reducción en la diversidad genética de las especies que se cultivan. Sin embargo, poco se sabe sobre cómo esta reducción en la diversidad genética afecta las interacciones planta-microorganismos. En este sentido, Pérez-Jaramillo *et al.* (2017), investigaron la composición de la comunidad de microorganismos de la rizósfera del fréjol tanto en zonas de cultivo como en su hábitat silvestre en la región de páramo en Colombia. Se observó una variación gradual de ciertos grupos de microorganismos en la rizósfera del fréjol domesticado. La abundancia relativa de Bacteroidetes disminuyó, principalmente de Chitinofagaceae y Cytotagaceae, mientras que, la abundancia relativa de Actinobacteria y Proteobacteria aumentó, en particular Nocardioideae y Rhizobiaceae, respectivamente. Las correlaciones mostraron que la divergencia observada en la composición de las comunidades de la rizósfera del fréjol domesticado versus la rizósfera asociada al fréjol silvestre se debe principalmente a las diferencias en la longitud de las raíces del fréjol. Correa-Galeote *et al.* (2016), analizaron la rizósfera asociada a cultivos de maíz en chacras andinas de Perú. En este estudio, se enfocaron específicamente en determinar si existen diferencias en la composición de microorganismos en presencia y ausencia de una especie de leguminosa (*Medicago polymorpha*) que crece comúnmente entre los cultivos de maíz. Se observó que los géneros más abundantes en los cultivos de maíz con la leguminosa fueron *Flavobacterium*, *Dechloromonas* y *Ohtaekwangia*. Mientras que, miembros de filo Verrucomicrobia, y del género *Rhodiferax* fueron más abundantes en los cultivos de maíz sin la leguminosa. Estos resultados sugieren que, las interacciones entre las especies de plantas, en este caso, la leguminosa, generan cambios en la diversidad de microorganismos en la rizósfera asociada al maíz.

Cultivos Silvestres

Por otro lado, también existen estudios realizados con especies silvestres en los Andes. Por ejemplo, Jorquera *et al.* (2016), analizaron las comunidades microbianas de la rizósfera asociadas a vegetación silvestre en ecosistemas con ambientes extremos en Chile, el desierto de Atacama, los Andes y la Antártica. Se observó la presencia de *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, y *Actinobacteria* como los filos más dominantes en la rizósfera de plantas nativas. Adicionalmente, el desierto de Atacama mostró el menor número de OTUs comparado con los otros sitios de estudio. Los hallazgos mostraron que el estructuramiento de las comunidades bacterianas se encuentra relacionado al tipo de suelo. Entre las propiedades del suelo que mostraron estar correlacionadas con las diferencias en diversidad están el pH, contenido de materia orgánica y concentración de P. También se observaron diferencias en las comunidades microbianas en la rizósfera entre especies de plantas incluso en las que crecen en el mismo ambiente extremo particularmente para los Andes y Antártica. Sugiriendo al genotipo de la planta como un factor que dirige el estructuramiento del microbioma.

Menoyo *et al.* (2017), analizaron si el estructuramiento de las comunidades de microorganismos de la rizósfera están influenciadas por las propiedades del suelo o por la dominancia de especies de pastizales en Puna, Argentina (3400 – 4500 msnm.) y si esto puede predecir la densidad y ocurrencia de microorganismos en esta alta montaña. Se observó que los grupos de microorganismos dominantes en la rizósfera pertenecen al grupo de las Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes. Adicionalmente, la densidad de microorganismos en la rizósfera fue baja y mostró una fuerte relación con el grado de dominancia de los pastizales sin ninguna influencia significativa de otras variables como las propiedades del suelo. Los autores atribuyen sus hallazgos a que las plantas con el mismo grado de dominancia usualmente ocupan el mismo nicho ecológico mostrando

comportamientos similares incluso a nivel de las interacciones planta-microorganismo. Por lo tanto, se sugiere que las comunidades de pastizales de Puna podrían ser un buen predictor de la densidad de microorganismos, tal como se ha reportado para diferentes familias de plantas en ecosistemas de alta montaña. En este mismo ambiente Ferrero *et al.* (2010), analizaron la composición de las comunidades de microorganismos de la rizósfera asociada a pastizales a lo largo de un gradiente altitudinal (2000–4400 msnm.). Sus resultados mostraron que la comunidad microbiana en la rizósfera está principalmente dominada por Actinobacteria, Firmicutes y Gammaproteobacteria. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en la riqueza de estos grupos a lo largo del gradiente altitudinal.

Fernández-Gómez *et al.* (2019), en su estudio en la montaña de Atacama (3800 msnm.) compararon muestras de suelo *bulk* con muestras de rizósfera asociadas a pastizales nativos con el fin de identificar grupos potenciales de bacterias seleccionados y enriquecidos por la rizósfera. Sus hallazgos mostraron que algunas plantas ejercen una presión selectiva sobre las comunidades bacterianas que promueven la colonización de Proteobacterias principalmente Alphaproteobacteria en la rizósfera, una clase conocida por incluir rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR). Por otro lado, se observó que el suelo *bulk* estaba dominado por Actinobacteria principalmente la clase Blastocatellia. Estos resultados refuerzan la idea de que además de los factores abióticos las plantas pueden contribuir en el estructuramiento el microbioma de la rizósfera. Las raíces gradualmente cambian las comunidades bacterianas originales encontradas en el suelo *bulk* para generar el microbioma de la rizósfera. Adicionalmente, los autores sugieren que las plantas nativas reclutan bacterias promotoras de crecimiento que les permitan sobrevivir en estos ambientes extremos de alta montaña.

Las asociaciones de plantas nativas con hongos en montañas de América del Sur también han sido estudiadas en los Andes. Por ejemplo, Lugo *et al.* (2008), tomaron muestras de rizósfera asociados a pastizales nativos en Puna a lo largo de un gradiente altitudinal (2000-4400 msnm.) para analizar la composición de hongos y bacterias en esta zona de alta montaña. Los grupos de bacterias identificados como dominantes en este estudio fueron los del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter*. Todos estos grupos de bacterias están asociados a la solubilización del fósforo y en particular, las especies de *Arthrobacter* se cree que juegan un papel importante en la transformación de la materia orgánica en ambientes naturales. Mientras que, los taxones de hongos encontrados fueron *Acaulospora* sp., *Acaulospora laevis*, *Acaulospora spinosa*, *Gigaspora* sp., *Gigaspora ramisporophora*, *Glomus* sp., *Glomus aggregatum*, *Glomus ambisporum*, *Glomus sinuosum*, *Scutellospora biornata*. La riqueza y abundancia de hongos se correlaciona negativamente con la altura. Esto se explica porque a mayor altitud la temperatura y energía lumínica disminuye lo que sugiere un mayor efecto de estos factores que de la especie de planta. En este sentido, el género *Glomus* ha sido reportado como dominante en ambientes extremos los que concuerda con los resultados de este estudio ya que *Glomus* fue encontrado en la zona de mayor altitud del gradiente.

Estudios adicionales

El cambio climático global ha acelerado tanto la velocidad como la extensión del deshielo glacial en entornos de gran altitud. Este patrón es particularmente importante en sitios de gran elevación como los Andes en donde las condiciones extremas impiden la colonización rápida de plantas. Schmidt *et al.* (2008), mediante una cronosecuencia analizaron el desarrollo conjunto de las comunidades microbianas y los procesos bioquímicos microbianos en suelos recientemente deglaciados en los Andes peruanos. Se observó que los suelos recientemente glaciados son colonizados por una diversa

comunidad de cianobacterias durante los primeros 5 años seguido del retiro del glaciar. Este incremento en la diversidad de cianobacterias concuerda con el incremento en la estabilidad del suelo para generar biomasa microbiana, actividad enzimática en el suelo y la presencia de pigmentos fotosintéticos. Adicionalmente, las tasas de fijación de nitrógeno en el suelo también incrementaron durante los 5 primeros años de sucesión, muchos años antes del establecimiento de la vegetación en la zona. Por otro lado, los análisis de materia orgánica indican que el carbono en el suelo a lo largo de la cronosecuencia permitió el establecimiento de los microorganismos en el suelo. Estos resultados sugieren que durante el desarrollo temprano de un ecosistema el enriquecimiento de nutrientes y materia orgánica están dominados principalmente por microorganismos fijadores de carbono y nitrógeno. Nemergut *et al.* (2007), investigaron los cambios en la comunidad bacteriana a lo largo de una cronosecuencia de tres suelos sucesivos no vegetados (gradiente de edad de 20 años) de un glaciar en retroceso en los Andes Peruanos (5000 msnm.). Se observó que los microorganismos más comunes en suelos antiguos incluyen miembros de Acidobacteria, Bacteroidetes y Verrucomicrobia, Por otro lado, en suelos jóvenes los grupos dominantes pertenecen al clado Comamonadaceae de las Betaproteobacterias los cuales no se encontraron presentes en suelos de mayor edad. Estos resultados sugieren que, las comunidades microbianas del suelo se estructuran por la edad del sustrato y que sufren cambios predecibles a través del tiempo. Es decir, que las comunidades microbianas reemplazan sus poblaciones de manera consistente a través del tiempo.

Lynch *et al.* (2012), investigaron cómo se da el estructuramiento de las comunidades microbianas en suelos provenientes de una zona volcánica central andina con elevaciones significativamente altas (>6000 msnm.) en la región de Atacama. Se observó que en esta zona de gran elevación y condiciones extremas los niveles de carbono y agua son los más

bajos de cualquier ecosistema terrestre. Adicionalmente, las comunidades microbianas mostraron nuevos filotipos de bacterias y hongos. No se encontraron organismos fotosintéticos, pero si varios filotipos de bacterias relacionados a organismos involucrados en la oxidación de monóxido de carbono en otros volcanes como *Pseudonocardia* y *Ktedonobacter* spp. Por otro lado, la diversidad de microorganismos eucariotas fue extremadamente baja, lo cual está asociado a la restricción de carbono orgánico en este ambiente. En general, estos resultados sugieren que una comunidad microbiana única, sostenida por gases atmosféricos y volcánicos difusos, apenas funciona en estos volcanes, que representan los ecosistemas terrestres más altos hasta ahora estudiados. Finalmente, en ambientes similares con bajas temperaturas como los del Himalaya (Stres *et al.*, 2013), la tundra (Kim *et al.*, 2014) y desiertos polares (Steven *et al.*, 2013) el filo mayormente observado es Planctomycetes. Este filo incluye miembros que tiene la habilidad de degradar exopolisacáridos producidos por otras bacterias del suelo. Esta característica les permite crecer eficientemente en ambientes como la rizósfera de plantas.

Estudios de microbioma en el género *Vaccinium*

Yurgel *et al.* (2017), analizaron diferencias en las comunidades bacterianas y eucariotas del suelo asociadas al blueberry silvestre, *Vaccinium angustifolium*, en Canadá. Se observó que los filos de hongos relativamente más abundantes fueron Ascomycota, Mucoromycota y Basidiomycota. Mientras que los taxones bacterianos más abundantes fueron de las clases Acidobacteria, Actinobacteria, Alpha, Beta, Delta, y Gammaproteobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes y Verrucomicrobia. Adicionalmente, sus resultados mostraron que las comunidades bacterianas y eucariotas se diferencian entre sí en cómo se correlacionan con las propiedades químicas del suelo analizadas. Es decir, los microbiomas bacterianos y eucariotas responden de manera diferente a los

factores bióticos y abióticos. Por un lado, las comunidades de eucariotas se correlacionaron fuertemente con las propiedades químicas del suelo, mientras que las comunidades bacterianas se correlacionaron positivamente con el tipo de planta al que estén asociadas. Utilizando estos resultados, Yurgel *et al.* (2018), evaluaron la asociación de microorganismos no fúngicos eucariotas asociados al blueberry silvestre, *V. angustifolium*. Los resultados mostraron que la influencia de la planta es más fuerte en eucariotas que en bacterias. Adicionalmente, identificaron varios taxones de hongos y protistas correlacionados con una disminución en la producción de frutos en el blueberry silvestre en ecosistemas agronómicos. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la abundancia relativa de hongos adaptados al estilo de vida asociado a las plantas, mientras que la abundancia relativa de eucariotas no fúngicos se redujo en la endosfera de la raíz, probablemente debido a la baja adaptación de estos microorganismos a las respuestas de defensa de la planta hospedera. En Yurgel *et al.* (2019), tomando como base los estudios anteriores Yurgel *et al.* (2017, 2018), se analizó las características funcionales del microbioma del suelo *bulk* y rizósfera asociado al blueberry silvestre. Los autores encontraron que de manera general muchas funciones metabólicas del microbioma son compartidas entre el suelo *bulk* y la rizósfera. Sin embargo, también identificaron funciones metabólicas únicas que promueven la supervivencia de los microorganismos presentes en la rizósfera. Adicionalmente, se encontró a través de estos estudios una alta abundancia relativa de microorganismos con potencial para fijar N y C. Esto sugiere, una adaptación del microbioma a suelos con baja fertilidad típicos del hábitat del blueberry silvestre. En contraste con lo que sucede en la rizósfera, el suelo *bulk* exhibió estabilidad funcional, es decir no se observó variación en la composición microbiana asociado al hábitat silvestre versus el sistema agronómico.

Dussault (2019), analizaron si el cambio en el uso de la tierra desde su hábitat silvestre a un sistema agronómico afecta la comunidad microbiana del blueberry silvestre, *V. angustifolium*. Los filos bacterianos con mayor abundancia relativa tanto para el hábitat silvestre como el sistema agronómico (suelo *bulk*, la rizósfera y sistema radicular) fueron Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Chloroflexi y Bacterioidetes. Por su parte, el orden eucariota más abundante fue Ascomycota. Adicionalmente, los resultados mostraron que la transición desde el hábitat silvestre a un sistema agronómico altera las comunidades eucariotas mientras que, los microorganismos unicelulares son menos susceptibles a estos cambios.

Estudio del microbioma del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt, Ericaceae) en páramos del Ecuador

Como se presenta en esta revisión estudios relevantes sobre el análisis del microbioma asociado a especies silvestres en páramos ecuatorianos, son escasos (Hidalgo, 2016; Zúñiga, 2017). Los páramos son considerados ecosistemas sensibles a los cambios en el uso de la tierra, razón por la cual, su potencial como recurso para la agronomía es limitado (Vásconez *et al.*, 2001). A pesar de esta problemática, los pobladores de estas zonas han aprovechado y explotado los recursos de este paisaje de manera continua (Hofstede *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto es el cultivo del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt, Ericaceae), también conocido como blueberry andino (Vasco *et al.*, 2009). El mortiño es un arbusto endémico del norte de América del Sur que crece desde 1600 hasta 4600 msnm (Luteyn, 2012). Este produce bayas comestibles las cuales se utilizan en Ecuador para la preparación de la colada morada en el día de los difuntos, así como mermeladas, vino y helados (Coba *et al.*, 2012). Las bayas poseen un alto contenido de antocianinas y compuestos polifenólicos, por lo que se ha reportado su uso como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno y como un agente para contrarrestar la diabetes

(Guijarro *et al.*, 2018; Vasco *et al.*, 2009). Adicionalmente, la especie se usa para la regeneración de zonas quemadas y reforestación de su ecosistema (Cobo *et al.*, 2016; Ramsay y Oxley, 1996). A pesar de su uso potencial, *V. floribundum* es considerada una especie en peligro debido a la fragmentación de su hábitat (Coba *et al.*, 2012). Hasta el momento no existen cultivos comerciales de mortiño, razón por la cual, se explotan las pequeñas parcelas que crecen de forma natural en los páramos del Ecuador (Hidalgo, 2016). En Ecuador, se han realizado dos estudios en los que se analizó el microbioma de la rizósfera asociada al mortiño. El primero fue de Hidalgo (2016), que realizó una caracterización de las propiedades químicas del suelo y morfológica de los microorganismos presentes en uno de los hábitats del mortiño, el páramo del volcán Rumiñahui (3600 msnm.). Los resultados de este estudio mostraron que la abundancia del mortiño es directamente proporcional a la concentración de F, Cu, Fe, e inversamente proporcional a la concentración de Zn, materia orgánica, conductividad, Mn y Ca. Entre los microorganismos aislados se encontró *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp.. El segundo estudio es el de Zúñiga (2017), también realizó una caracterización morfológica de los microorganismos presentes en la rizósfera del mortiño en la reserva ecológica Cotachi-Cayapas. Sus resultados mostraron la presencia de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* y no se identificó la presencia de bacterias en las muestras analizadas. Estos estudios se han limitado a la caracterización de los microorganismos mediante técnicas microbiológicas tradicionales, es decir mediante el cultivo directo en el laboratorio de muestras de suelo (Hidalgo, 2016; Zúñiga, 2017). Debido a que la domesticación del mortiño no ha sido posible, es necesario juntar esfuerzos para realizar más estudios que nos ayuden a mejorar el conocimiento sobre las interacciones planta-microorganismo que ocurren en su hábitat natural.

Conclusiones

Los ecosistemas de alta montaña presentan una biodiversidad, clima, posición geográfica, origen geológico y biogeografía única. Por esta razón, son considerados como un *hot spot* de diversidad (Yarzabal y Chica, 2017). Sin embargo, solo unos pocos estudios se han enfocado en la diversidad de las comunidades microbianas del suelo en los diferentes ecosistemas de esta región (Chica *et al.* (2019); Ferrero *et al.*, 2010; Lugo *et al.*, 2008; Menoyo *et al.*, 2017; Pfeiffer *et al.* 2016; Senés-Guerrero *et al.* 2014). A pesar del avance para entender la complejidad de la rizósfera nuestra comprensión aun es escasa y la mayoría de nuestros conocimientos se derivan de plantas modelo y del estudio de unos pocos cultivos comerciales (Correa-Galeote *et al.*, 2016; Pfeiffer *et al.*, 2016; Pérez-Jaramillo *et al.*, 2017). Particularmente, las plantas nativas reclutan y conservan ciertos grupos de microorganismos asociados a su rizósfera que les permitan crecer, sobrevivir y adaptarse a factores abióticos y bióticos en ambientes extremos como los páramos. Estas interacciones entre plantas y microorganismos han evolucionado bajo condiciones ambientales difíciles para el desarrollo de la vida como lo son los páramos (Ferrero *et al.*, 2010; Lugo *et al.*, 2008; Menoyo *et al.*, 2017). Es por esta razón, que los páramos andinos a pesar de ser sitios aparentemente estériles albergan diversas comunidades microbianas ofreciéndonos una oportunidad única para investigar cómo la vida se establece y desarrolla en uno de los ambientes terrestres más extremos en la tierra.

Referencias

- Andinos, P. (2012). Ecología, hidrología y suelos de páramos.
- Andreote, F. D., Azevedo, J. L., & Araújo, W. L. (2009). Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3), 417-432.
- Andreote, F. D., e Silva, M. D. C. P., Melo, V. M., & Roesch, L. (2017). The Brazilian Soil Microbiome. In *The Brazilian Microbiome* (pp. 21-39). Springer, Cham.
- Atlas, R. M. (1984). Diversity of microbial communities. In *Advances in microbial ecology* (pp. 1-47). Springer, Boston, MA.
- Avery, L. M., Smith, R. L., & West, H. M. (2003). Response of rhizosphere microbial communities associated with Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica*) to UV radiation. *Polar Biology*, 26(8), 525-529.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Bardgett, R. D., & Chan, K. F. (1999). Experimental evidence that soil fauna enhances nutrient mineralization and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(7), 1007-1014.
- Bashan, Y., Holguin, G., & Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*, 14(2), 159-192.
- Beauregard, M. S., Hamel, C., & St-Arnaud, M. (2010). Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. *Microbial Ecology*, 59(2), 379-389.
- Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León-Yáñez, S., Romoleroux, K., Ortiz, E., ... & Velástegui, A. (2009). Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización florística de los páramos en el Ecuador. *EcoCiencia, Proyecto Páramo Andino y Herbario QCA*. Quito.
- Bender, S. F., Wagg, C., & van der Heijden, M. G. (2016). An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in ecology & evolution*, 31(6), 440-452.

- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
- Bever, J. D., Platt, T. G., & Morton, E. R. (2012). Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual review of microbiology*, 66, 265-283.
- Bills, G. F., Mueller, G. M., & Foster, M. S. (2004). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Academic Press.
- Bonfante, P., & Anca, I. A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual review of microbiology*, 63, 363-383.
- Bowen, G. 1993. The rhizosphere. Appendix B. In: *Tropical soil Biology and Fertility: A handbook of methods*. 2^a Ed. Anderson J. M. and J. S. I. Ingram editors. CAB International. U. K. 221 p.
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(3), 738-744.
- Bron, P. A., Van Baarlen, P., & Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 66.
- Bronick, C. J., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124(1-2), 3-22.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838.
- Buytaert, W., Célleri, R., De Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews*, 79(1-2), 53-72.
- Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballaré, C. L., Flint, S. D., & Kulandaivelu, G. (2007). Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(3), 252-266.

- Castañeda-Martín, A. E., & Montes-Pulido, C. R. (2017). Carbono almacenado en páramo andino. *Entramado*, 13(1), 210-221.
- Carini, P., Marsden, P. J., Leff, J. W., Morgan, E. E., Strickland, M. S., & Fierer, N. (2017). Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature microbiology*, 2(3), 16242.
- Chica, E., Buena, L., Valdez, A., Villena, P., Peña, D., & Yarzabal, L. A. (2019). Metagenomic survey of the bacterial communities in the rhizosphere of three Andean tuber crops. *Symbiosis*, 1-10.
- Choi, J., Yang, F., Stepanauskas, R., Cardenas, E., Garoutte, A., Williams, R., ... & Howe, A. (2017). Strategies to improve reference databases for soil microbiomes. *The ISME journal*, 11(4), 829.
- Chu, H., Neufeld, J. D., Walker, V. K., & Grogan, P. (2011). The influence of vegetation type on the dominant soil bacteria, archaea, and fungi in a low Arctic tundra landscape. *Soil Science Society of America Journal*, 75(5), 1756-1765.
- Coba Santamaría, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 16(2).
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., Torres, A. F., & de Lourdes Torres, M. (2016). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical systematics and ecology*, 64, 14-21.
- Correa-Galeote, D., Bedmar, E. J., Fernández-González, A. J., Fernández-López, M., & Arone, G. J. (2016). Bacterial communities in the rhizosphere of amilaceous maize (*Zea mays* L.) as assessed by pyrosequencing. *Frontiers in plant science*, 7, 1016.
- Davies, F. T., Calderón, C. M., & Huaman, Z. (2005). Influence of Arbuscular Mycorrhizae Indigenous to Peru and a Flavonoid on Growth, Yield, and Leaf Elemental Concentration of Yungay Potatoes. *HortScience*, 40(2), 381-385.
- De Mandal, S., Panda, A. K., Bisht, S. S., & Kumar, N. S. (2015). Microbial Ecology in the Era of Next Generation Sequencing. *Next Generat Sequenc & Applic S*, 1, 2.

- Degens, B. P., Schipper, L. A., Sparling, G. P., & Vojvodic-Vukovic, M. (2000). Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(2), 189-196.
- Donnarumma, F., Bazzicalupo, M., Blažinkov, M., Mengoni, A., Sikora, S., & Babić, K. H. (2014). Biogeography of *Sinorhizobium meliloti* nodulating alfalfa in different Croatian regions. *Research in microbiology*, 165(7), 508-516.
- Duguay, K. J., & Klironomos, J. N. (2000). Direct and indirect effects of enhanced UV-B radiation on the decomposing and competitive abilities of saprobic fungi. *Applied soil ecology*, 14(2), 157-164.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10(10), 996.
- Fernández-Gómez, B., Maldonado, J., Mandakovic, D., Gaete, A., Gutiérrez, R. A., Maass, A., ... & González, M. (2019). Bacterial communities associated to Chilean altiplanic native plants from the Andean grasslands soils. *Scientific reports*, 9(1), 1042.
- Ferrero, M. A., Menoyo, E., Lugo, M. A., Negritto, M. A., Farías, M. E., Anton, A. M., & Siñeriz, F. (2010). Molecular characterization and in situ detection of bacterial communities associated with rhizosphere soil of high altitude native Poaceae from the Andean Puna region. *Journal of arid environments*, 74(10), 1177-1185.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579.
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.
- Formánek, P., Rejšek, K., & Vranová, V. (2014). Effect of elevated CO₂, O₃, and UV radiation on soils. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Gams, W. (2007) Biodiversity of soil-inhabiting fungi. *Biodivers. Conserv.* 16, 69–72.
- Garbeva, P. V., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (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.

- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., & van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1-2), 1-15.
- Geyer, K. M., Altrichter, A. E., Takacs-Vesbach, C. D., Van Horn, D. J., Gooseff, M. N., & Barrett, J. E. (2014). Bacterial community composition of divergent soil habitats in a polar desert. *FEMS microbiology ecology*, 89(2), 490-494.
- Ghyselinck, J., Velivelli, S. L., Heylen, K., O'Herlihy, E., Franco, J., Rojas, M., ... & Prestwich, B. D. (2013). Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. *Systematic and applied microbiology*, 36(2), 116-127.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333.
- Guerrero, R., Margulis, L., & Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int Microbiol*, 16(3), 133-143.
- Guijarro-Fuertes, M., Andrade-Cuvi, M. J., Bravo-Vásquez, J., Ramos-Guerrero, L., & Vernaza, M. G. (2018). Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*) bread: physicochemical properties and bioaccessibility of antioxidants. *Food Science and Technology*, (AHEAD).
- Gupta, M. M., & Aggarwal, A. (2018). From mycorrhizosphere to rhizosphere microbiome: The paradigm shift. In *Root Biology* (pp. 487-500). Springer, Cham.
- Hannula, S. E., Boschker, H. T. S., de Boer, W., & Van Veen, J. A. (2012). ¹³C pulse-labeling assessment of the community structure of active fungi in the rhizosphere of a genetically starch-modified potato (*Solanum tuberosum*) cultivar and its parental isolate. *New Phytologist*, 194(3), 784-799.
- Hidalgo Verdezoto, M. R. (2016). Caracterización morfológica de microorganismos, físico-química del suelo y arvenses presentes en el hábitat de crecimiento del mortiño (*vaccinium floribundum* Kunth) en el páramo del volcán Rumiñahui, Pichincha (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2016.).
- Hofstede, R. G., Groenendijk, J. P., Coppus, R., Fehse, J. C., & Sevink, J. (2002). Impact of pine plantations on soils and vegetation in the Ecuadorian high Andes. *Mountain Research and Development*, 22(2), 159-168.

- Hofstede, R., Segarra, P., & Vásconez, P. M. (2003). Los páramos del mundo: Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. UICN; Global Peatland Initiative; Ecociencia.
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., & Cerra, M. (2014). Los páramos andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. UICN, Quito, Ecuador, 156.
- Igiehon, N., & Babalola, O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International journal of environmental research and public health*, 15(4), 574.
- Jaramillo, D. F. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Universidad Nacional de Colombia.
- Jefferson, R. (1994). *The hologenome. Agriculture, Environment and the Developing World: A Future of PCR*.
- Jorgensen, P. M., & Ulloa, U. (1994). Seed plants of the high Andes of Ecuador: A checklist (No. 34).
- Jorquera, M. A., Maruyama, F., Ogram, A. V., Navarrete, O. U., Lagos, L. M., Inostroza, N. G., ... & Mora, M. D. L. L. (2016). Rhizobacterial community structures associated with native plants grown in Chilean extreme environments. *Microbial ecology*, 72(3), 633-646.
- Kim, H. M., Jung, J. Y., Yergeau, E., Hwang, C. Y., Hinzman, L., Nam, S., ... & Lee, Y. K. (2014). Bacterial community structure and soil properties of a subarctic tundra soil in Council, Alaska. *FEMS microbiology ecology*, 89(2), 465-475.
- Kumar, V., Singh, A., Tyagi, M. B., & Kumar, A. (2017). Microbial Community Composition and Functions Through Metagenomics. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 633-657). Springer, Singapore.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H. H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic acids research*, 35(9), 3100-3108.
- Lareen, A., Burton, F., & Schäfer, P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant molecular biology*, 90(6), 575-587.

- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Llambí, L. D. (2012). Ecología, hidrología y suelos de páramos: Proyecto Páramo Andino. Proyecto Páramo Andino.
- Lugo, M. A., Ferrero, M., Menoyo, E., Estévez, M. C., Siñeriz, F., & Antón, A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizospheric bacteria diversity along an altitudinal gradient in South American Puna grassland. *Microbial ecology*, 55(4), 705.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., ... & Edgar, R. C. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86.
- Luteyn, J. L. (2002). Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: biogeographical patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review*, 68(1), 55-87.
- Lynch, R. C., King, A. J., Farías, M. E., Sowell, P., Vitry, C., & Schmidt, S. K. (2012). The potential for microbial life in the highest- elevation (> 6000 masl) mineral soils of the Atacama region. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 117(G2)
- Mena Vásconez, P., Medina, G., & Hofstede, R. G. M. (2001). Los páramos del Ecuador: particularidades, problemas y perspectivas.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., ... & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Menoyo, E., Lugo, M. A., Teste, F. P., & Ferrero, M. A. (2017). Grass dominance drives rhizospheric bacterial communities in a desertic shrub and grassy steppe highland. *Pedobiologia*, 62, 36-40.
- Minz, D., Ofek, M., & Hadar, Y. (2013). Plant rhizosphere microbial communities. The prokaryotes: prokaryotic communities and ecophysiology, 56-84.

- Mitter, B., Pfaffenbichler, N., & Sessitsch, A. (2016). Plant–microbe partnerships in 2020. *Microbial biotechnology*, 9(5), 635-640.
- Nemergut, D. R., Anderson, S. P., Cleveland, C. C., Martin, A. P., Miller, A. E., Seimon, A., & Schmidt, S. K. (2007). Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microbial ecology*, 53(1), 110-122.
- Nesme, J., Achouak, W., Agathos, S. N., Bailey, M., Baldrian, P., Brunel, D., ... & Kruus, K. L. (2016). Back to the future of soil metagenomics. *Frontiers in microbiology*, 7, 73.
- Oliverio, A. M., Bradford, M. A., & Fierer, N. (2017). Identifying the microbial taxa that consistently respond to soil warming across time and space. *Global change biology*, 23(5), 2117-2129.
- Ortuño, N., Claros, M., Gutiérrez, C., Angulo, M., & Castillo, J. (2014). Bacteria associated with the cultivation of quinoa in the Bolivian Altiplano and their biotechnological potential. *Rev Agric*, 53, 53-61.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., ... & Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6548-6553.
- Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., Bosse, M., Ferrão, L. F., de Hollander, M., Garcia, A. A., ... & Raaijmakers, J. M. (2017). Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *The ISME journal*, 11(10), 2244.
- Pett-Ridge, J., & Firestone, M. K. (2005). Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11), 6998-7007.
- Pfeiffer, S., Mitter, B., Oswald, A., Schloter-Hai, B., Schloter, M., Declerck, S., & Sessitsch, A. (2016). Rhizosphere microbiomes of potato cultivated in the High Andes show stable and dynamic core microbiomes with different responses to plant development. *FEMS microbiology ecology*, 93(2), fiw242.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789.

- Podwojewski, P. (1999). Los suelos de las altas tierras andinas: los páramos del Ecuador. *Bol Soc Ecuator Cie Suelo*, 18(9), 14.
- Prober, S. M., Leff, J. W., Bates, S. T., Borer, E. T., Firn, J., Harpole, W. S., ... & Cleland, E. E. (2015). Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology letters*, 18(1), 85-95.
- Ramsay, P. M., & Oxley, E. R. B. (1996). Fire temperatures and postfire plant community dynamics in Ecuadorian grass páramo. *Vegetatio*, 124(2), 129-144.
- Rodríguez Murcia, C. E., & Rivera Ospina, D. (2018). Guía divulgativa de criterios para la delimitación de páramos de Colombia.
- Rosenberg, E., & Zilber- Rosenberg, I. (2011). Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(1), 56-66.
- Rowell, D. L. (2014). *Soil science: Methods & applications*. Routledge.
- Ryan, J., & Sommer, R. (2012). Soil fertility and crop nutrition research at an international center in the Mediterranean region: achievements and future perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 58(sup1), S41-S54.
- Santoyo, G., Pacheco, C. H., Salmerón, J. H., & León, R. H. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. *Spanish journal of agricultural research*, 15(1), 13.
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome?. *Trends in plant science*, 23(1), 25-41.
- Schmid, M. W., Hahl, T., van Moorsel, S. J., Wagg, C., De Deyn, G. B., & Schmid, B. (2018). Rhizosphere bacterial community composition depends on plant diversity legacy in soil and plant species identity. *bioRxiv*, 287235.
- Schmidt, S. K., Reed, S. C., Nemergut, D. R., Stuart Grandy, A., Cleveland, C. C., Weintraub, M. N., ... & Martin, A. M. (2008). The earliest stages of ecosystem succession in high-elevation (5000 metres above sea level), recently deglaciated soils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1653), 2793-2802.

- Senés-Guerrero, C., Torres-Cortés, G., Pfeiffer, S., Rojas, M., & Schüßler, A. (2014). Potato-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities in the Peruvian Andes. *Mycorrhiza*, 24(6), 405-417.
- Sepkoski, J. J. (1988). Alpha, beta, or gamma: where does all the diversity go?. *Paleobiology*, 14(3), 221-234.
- Shade, A. (2017). Diversity is the question, not the answer. *The ISME journal*, 11(1), 1.
- Simmons, T., Caddell, D. F., Deng, S., & Coleman-Derr, D. (2018). Exploring the Root Microbiome: Extracting Bacterial Community Data from the Soil, Rhizosphere, and Root Endosphere. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (135), e57561.
- Sinha, R. P., Klisch, M., & Häder, D. P. (1999). Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. by UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 52(1-3), 59-64.
- Stackebrandt, E., & GOEBEL, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 44(4), 846-849.
- Steven, B., Lionard, M., Kuske, C. R., & Vincent, W. F. (2013). High bacterial diversity of biological soil crusts in water tracks over permafrost in the high arctic polar desert. *PLoS One*, 8(8), e71489.
- Stres, B., Sul, W. J., Murovec, B., & Tiedje, J. M. (2013). Recently deglaciated high-altitude soils of the Himalaya: diverse environments, heterogenous bacterial communities and long-range dust inputs from the upper troposphere. *PloS one*, 8(9), e76440.
- Suding, K. N., Collins, S. L., Gough, L., Clark, C., Cleland, E. E., Gross, K. L., ... & Pennings, S. (2005). Functional-and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), 4387-4392.
- Tonneijck, F. H. (2008). Volcanic ash soils in Andean ecosystems: unravelling organic matter distribution and. *Geoderma*, 144, 231-247.
- Torsvik, V., Øvreås, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570), 1064-1066.

- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E. S., He, S., Woyke, T., ... & Tringe, S. G. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontiers in microbiology*, 6, 771.
- Van Horn, D. J., Van Horn, M. L., Barrett, J. E., Gooseff, M. N., Altrichter, A. E., Geyer, K. M., ... & Takacs-Vesbach, C. D. (2013). Factors controlling soil microbial biomass and bacterial diversity and community composition in a cold desert ecosystem: role of geographic scale. *PLoS One*, 8(6), e66103.
- Vandenkoornhuyse, P., Mahé, S., Ineson, P., Staddon, P., Ostle, N., Cliquet, J. B., ... & Young, J. P. W. (2007). Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 16970-16975.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274-8281.
- Vásconez, P., Medina, G., & Hofstede, R. (2001). Los Páramos del Ecuador. *Botánica económica de los Andes Centrales*, 2006, 91-109.
- Velivelli, S. L., Sessitsch, A., & Prestwich, B. D. (2014). The role of microbial inoculants in integrated crop management systems. *Potato Research*, 57(3-4), 291-309.
- Wang, J. T., Cao, P., Hu, H. W., Li, J., Han, L. L., Zhang, L. M., ... & He, J. Z. (2015). Altitudinal distribution patterns of soil bacterial and archaeal communities along Mt. Shigyla on the Tibetan Plateau. *Microbial ecology*, 69(1), 135-145.
- Winckell, A., Zebrowski, C., & Delaune, M. (1991). Evolution du modèle quaternaire et des formations superficielles dans les Andes de l'Equateur: 1. Le volcanisme pyroclastique récent. *Géodynamique*, 6(2), 97-117.
- Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1), 345-351.

- Yarzabal, L. A., & Chica, E. J. (2017). Potential for developing low-input sustainable agriculture in the tropical Andes by making use of native microbial resources. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 29-54). Springer, Singapore.
- Yurgel, S. N., Douglas, G. M., Comeau, A. M., Mammoliti, M., Dusault, A., Percival, D., & Langille, M. G. (2017). Variation in bacterial and eukaryotic communities associated with natural and managed wild blueberry habitats. *Phytobiomes*, 1(2), 102-113.
- Yurgel, S. N., Douglas, G. M., Dusault, A., Percival, D., & Langille, M. G. (2018). Dissecting community structure in wild blueberry root and soil microbiome. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Yurgel, S. N., Douglas, G. M., & Langille, M. G. (2019). Metagenomic functional shifts to plant induced environmental changes. *Frontiers in microbiología*, 10, 1682.
- Zambrano-Moreno, D. C., Avellaneda-Franco, L., Zambrano, G., & Bonilla-Buitrago, R. R. (2016). Scientometric analysis of Colombian research on bio-inoculants for agricultural production. *Universitas Scientiarum*, 21(1), 63-81.
- Zehetner, F., Miller, W. P., & West, L. T. (2003). Pedogenesis of volcanic ash soils in Andean Ecuador. *Soil Science Society of America Journal*, 67(6), 1797-1809.
- Zúñiga Freire, M. A. (2017). Caracterización del hábitat de crecimiento del mortiño (*Vaccinium floribundum* kunth) en el páramo de Cotacachi, Ecuador (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2017.).

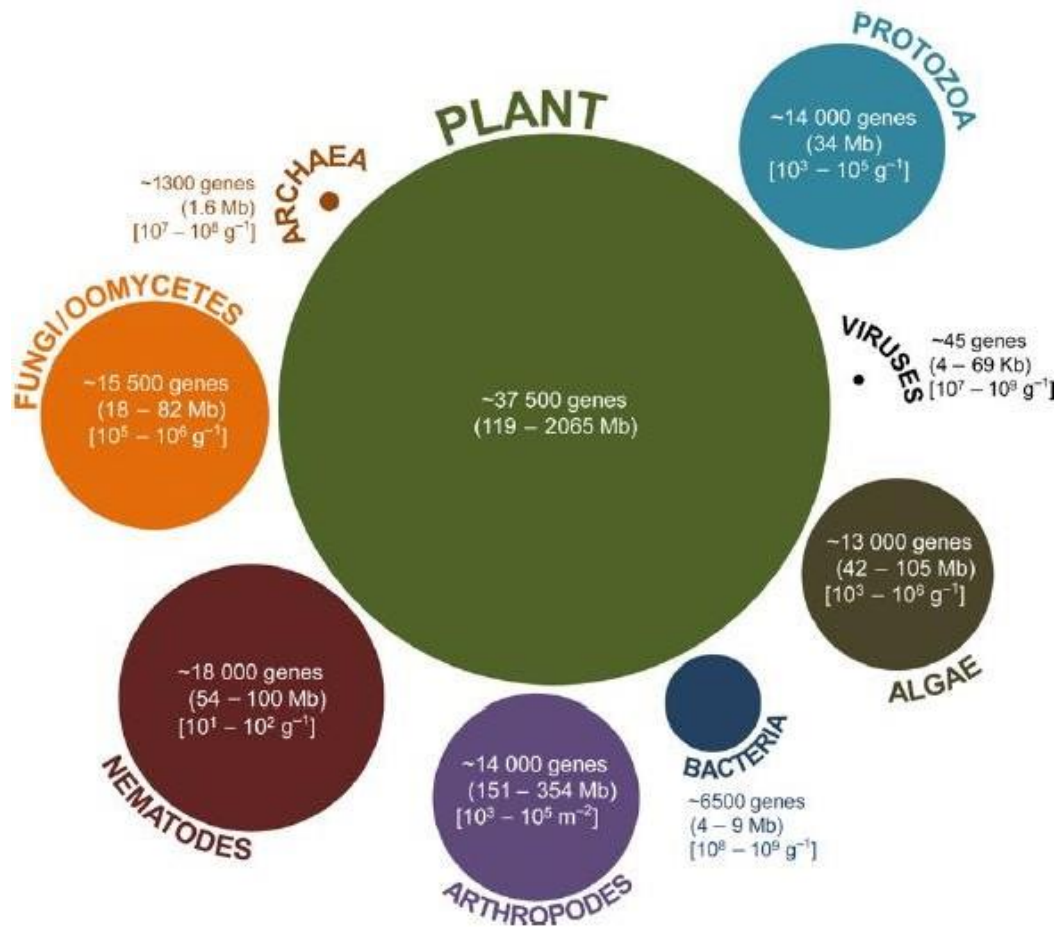
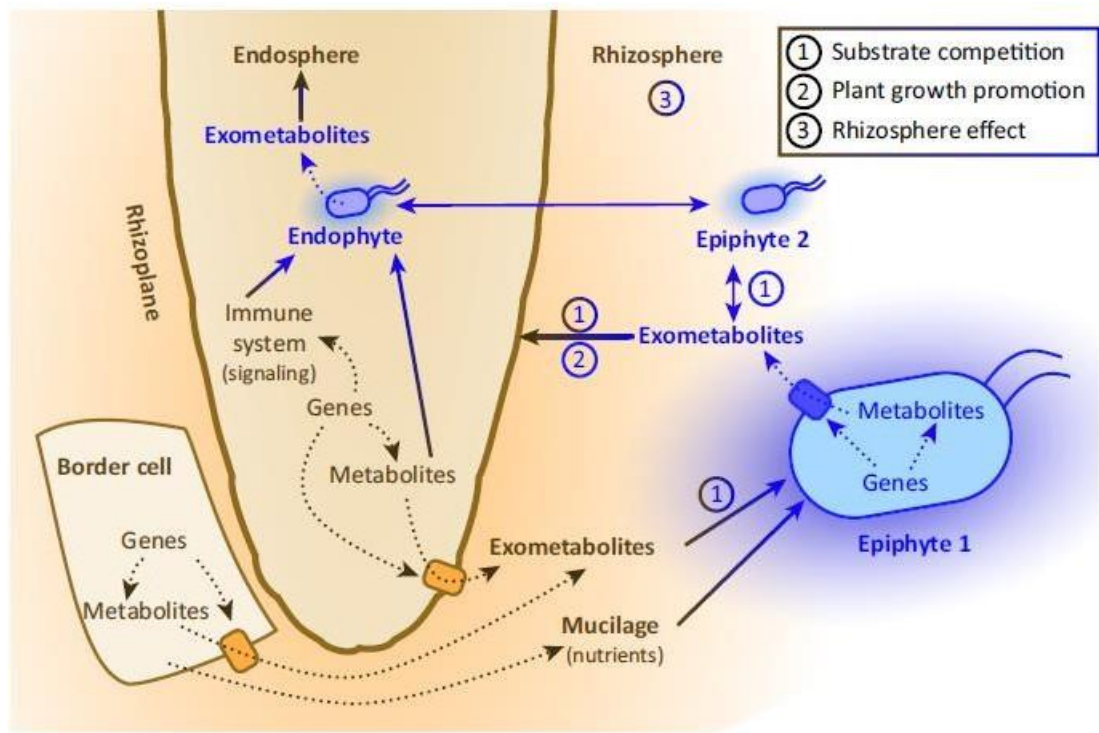


Figura1. Esquema de la diversidad de genomas presentes en la rizósfera comparados con el número de genomas de la planta (Mendes *et al.*, 2013).



Trends in Plant Science

Figura2. Compartimentos del sistema suelo-raíz (Sasse *et al.*, 2018)

ARTÍCULO 2

Exploring the microbiome composition of the rhizosphere associated with the wild Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*, Kunth) in the highlands of Ecuador

Autor: Andrea Pinos¹

¹ Universidad San Francisco de Quito USFQ. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. EC170157, Quito, Ecuador

ABSTRACT

The rhizosphere is a complex and dynamic environment where plant roots interact with microorganisms, affecting plant growth and tolerance to biotic and abiotic stress. Deciphering its composition is key to understand how plant adaptations occur in wild habitats. In spite of it, the knowledge about microorganisms associated with wild plant species is limited, particularly in the Andean region. In this study, we analyzed the rhizosphere microbiome associated with the wild Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*), also known as “*mortiño*”, in the Ecuadorian highlands. Forty-three samples, across ten provinces, were analyzed using Next-generation sequencing (NGS) to explore bacterial and fungal composition. Our data revealed that *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* phyla were the dominant bacterial taxa, whereas *Ascomycota* and *Basidiomycota* were the dominant fungal taxa. Our study identified a core microbiome that includes taxa with important roles in soil and plant-microbe interaction, suggesting that it could play a key role in the adaptation of the wild Andean blueberry to harsh environmental conditions. We separated our samples into four groups (A, B, C, and D); the Group A, composed by individuals from the northern provinces (Carchi, Imbabura, Pichincha, and the north part of Cotopaxi); Group B, composed by individuals from the provinces of the central region (The south part of Cotopaxi, Tungurahua, Bolivar and Chimborazo); Group C, composed by individuals from the provinces of the southern region (Cañar, Azuay, and Loja); and Group D, an atypical group, composed by individuals growing at the highest altitude range (the south part of Cotopaxi and Azuay provinces) . Phylogenetic diversity metrics showed rhizobacterial diversity was similar within groups, whereas group C showed the highest diversity of fungi rhizospheres, which represent samples coming from the Center region, respectively. The differences found in the microbiome diversity and composition could be explained by the changes in pH and concentration of soil chemical elements like Fe, P, Cd, Cu and Co. Collectively, these results showed similarities with the genetic diversity patterns found in the Andean blueberry in Ecuador, suggesting that this plant species and its associated microbiome have interacted in order to adapt to the particular environmental conditions of the Andean grasslands.

Keywords: adaptation, bacterial communities, fungal communities, grasslands, plant-microbiome interaction, *mortiño*, wild plants.

INTRODUCTION

The microbiome is a set of microorganisms that live associated with a host and its importance for the plant's function is widely recognized (Andreote *et al.*, 2017; Lareen *et al.*, 2016). In this sense, it is estimated that around 20,000 species of plants require soil microbial symbionts to persist in their habitats (Bills *et al.*, 2004; Gams, 2007; Prober *et al.*, 2015; Torsvik, *et al.*, 2002). Microorganisms present in the soil are able to fragment and decompose organic matter, allowing nutrients to be available for plants and microbes (Bardgett *et al.*, 1999), highlighting its key role in nutrient cycle and carbon in natural ecosystems (Bender *et al.*, 2016; Lareen *et al.*, 2016). The rhizosphere microbiome refers to communities of microorganisms directly associated with plant roots (Berendsen *et al.*, 2012; Gupta and Aggarwal, 2018; Sasse *et al.*, 2018). The rhizosphere is one of the most complex environments on Earth, harboring a complex and highly diverse microbial community (Mendes *et al.*, 2013). Bacteria and fungi can live in the rhizosphere by feeding on root nutrients and exudates released by plants (Philippot *et al.*, 2013). These exudates, also known as rhizodeposits, modify the chemistry of the rhizosphere soil, differentiating it from the bulk soil (Bever *et al.*, 2012; Broeckling *et al.*, 2008). On the other hand, microorganisms present in the microbiota must tolerate plant exudates that also serve as a defense mechanism against plant pathogenic microorganisms (Bever *et al.*, 2012). Consequently, plants directly influence the specific composition of the microbiome in their rhizosphere for its benefit (Bais *et al.*, 2006; Lareen *et al.*, 2016; Philippot *et al.*, 2013) using a plant-rhizosphere communication system (Lareen *et al.*, 2016).

The rhizosphere microbiome plays a key role in the development and resilience of plants in nature (Berendsen *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013). For instance, microbial communities display beneficial effects on adaptation and survival of endemic plants to local harsh environmental conditions (Jorquera *et al.*, 2016; Pfeiffer *et al.*, 2016). Nevertheless, little is known about the role of the rhizosphere microbiome in wild environments (Jorquera *et al.*, 2016; Yurgel *et al.*, 2017, 2018), especially in extreme environments such as the Andean grasslands or *páramos* (Ferrero *et al.*, 2010; Lugo *et al.*, 2008; Pfeiffer *et al.*, 2016). Much of our knowledge comes from studies on cultivated plant species or model organisms such as *Arabidopsis thaliana* (Philippot *et al.*, 2013). Therefore, more studies are needed to improve the knowledge about microbial soil ecology, which include interactions with plant species in wild ecosystems (Bever *et al.*, 2012).

Highlands display adverse conditions for the development of plants and microorganisms (Hofstede *et al.*, 2014); however, they are still able to grow. For instance, wild blueberries are

well adapted to the infertile and acidic soils present in the Andean grasslands (Vásconez *et al.*, 2001; Yurgel *et al.*, 2017). Part of this adaptation could be related with the development of an extensive root and rhizome system, but also with the interaction with bacteria and fungi in the rhizosphere soil (Goulart *et al.*, 1993). The Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunt, Ericaceae), also known as “*mortiño*”, is an endemic shrub of northern South America that grows from 1600 to 4600 masl. (Luteyn, 2012). This plant produces edible berries, which are harvested from natural populations (Hidalgo, 2016) and in Ecuador, are used for the preparation of a traditional beverage, as well as jam, wine, and ice cream (Coba *et al.*, 2012). These berries have a high content of anthocyanins and polyphenolic compounds, consequently their use has been reported as antioxidant, anti-inflammatory, and cancer and diabetes (Guijarro *et al.*, 2018; Vasco *et al.*, 2009). Additionally, the species is used for regeneration of burned areas and reforestation of grasslands (Cobo *et al.*, 2016; Ramsay and Oxley, 1996). Despite its extensive use, *V. floribundum* has not been cultivated and remains as a wild species, being vulnerable to extinction because of the fragmentation of its natural habitat (Coba *et al.*, 2012).

A previous study about the genetic diversity of *V. floribundum* in the Andean highlands of Ecuador, (Vega 2019), reported four genetic clusters: Group A, composed by individuals from the northern provinces (Carchi, Imbabura, Pichincha, and the north part of Cotopaxi); Group B, composed by individuals from the central provinces of region (the south part of Cotopaxi, Tungurahua, Bolivar and Chimborazo); Group C, composed by individuals from the southern provinces of the region (Cañar, Azuay, and Loja); and Group D, an atypical group, composed by individuals growing at the highest altitude range (3900 to 4200 masl.) in the study, but separated geographically (the south part of Cotopaxi and Azuay provinces) (Figure1). Considering these results, we were interested in analyzing whether the genetic diversity and population structure found in the Andean blueberry was related with the diversity and population structure of the rhizosphere microbiome. For this purpose, we analyzed 43 rhizosphere samples collected in ten provinces of Ecuador (Figure 1). We sequenced the *16S rRNA* gene and the ITS region using NGS approaches in order to characterize the composition of bacterial and fungal communities, and to analyze their relation with the soil chemical composition. This work aims to shed light on the microbial communities associated with the Andean blueberry across the Ecuadorian highlands, and to generate information that contributes to the conservation of this valuable biological resource.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

The rhizosphere sample collection was carried out together with the sampling of the study of genetic diversity of *V. floribundum* (Vega, 2019). All rhizosphere samples collected were

associated to the same plant used in the study of genetic diversity developed by Vega (2019). The samples come from ten provinces where the Andean blueberry has been reported previously in the Ecuadorian highlands ranging from 2874 to 4160 masl (Tropicós, 2019) during 2017 and 2018 (Figure 1). The identification of the plants was done based on morphological characteristics of the plant (Luteyn, 1996). All samples were obtained from plants separated by at least 100 m to avoid sampling repeated individuals due to their extensive root system. To obtain a sample, we dug the soil at the base of an Andean blueberry plant to expose its roots using a small shovel. We collected the soil barely adhered to the roots with vigorous shaking and using gloves. The soil samples were stored in sterile bags and transported on ice to the *Laboratory of Plant Biotechnology* at *Universidad San Francisco de Quito*, where they were stored at -80 °C until DNA extraction.

A total of 252 rhizosphere samples were collected in each of the following provinces: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Bolívar, Cañar, Azuay, and Loja, whereas in the provinces of Tungurahua and Chimborazo we sampled two and one localities, respectively. We did not use all 252 samples for analyses, we just include the most representative samples $N = 43$, grouped as follows: The group A ($n = 10$) that includes samples from Carchi, Imbabura, Pichincha, and the north part of Cotopaxi; the Group B ($n = 13$) with samples from the south part of Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar and Chimborazo; the Group C ($n = 10$) which includes samples that comes from Cañar, Azuay, and Loja; and the Group D ($n = 10$), composed by individuals growing at the highest altitude range (3900 to 4200 masl.) in the study, but separated geographically (the south part of Cotopaxi and Azuay provinces).

DNA extraction, amplicon library and sequencing

DNA isolation was carried out from 0.25 g of rhizosphere soil using the PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, United States) according to the manufacturer's protocol. DNA quality and concentration were measured using Multiskan Sky microplate reader (Thermo Scientific, USA). At least 50 μ l of DNA solution from each sample were sent to the Laboratory of Genomic Sciences at North Carolina State University for the amplicon library preparation and sequencing following Comeau *et al.* (2017). Briefly, we used a dual indexing in a one-step PCR instead of a two-step PCR because using one only primer combination per sample during the whole process reduces chances for error and chimeric PCR product formation. We used fusion primers that include adaptors, indices and specific regions targeting either 16S rRNA gene V3-V4 region (forward: TCACTCCTACGGGGAGGCAGCA; reverse: CTAGGACTACHVGGGTWTCTAAT) or ITS (forward: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA; reverse: GCTGCGTTCTTCATCGATGC). 16S rRNA and ITS fragments were amplified from the extracted DNA by duplicate, using separate template dilutions, with a high-fidelity

polymerase. Additionally, negative and positive controls were included on every run (1 per 96-well plate). The duplicate PCR products were combined in one plate and then verified visually by running a high-throughput Invitrogen 96-well E-gel. Any samples with failed PCRs were reamplified by optimizing PCR conditions to produce correct bands. Amplicons were then cleaned up and normalized in one step using the high-throughput Invitrogen SequelPrep 96-well plate kit. The samples were pooled to make one library which was quantified using the Invitrogen Qubit double-stranded DNA high-sensitivity (dsDNA HS) fluorescence-based method before sequencing. Samples were sequenced using an Illumina MiSeq with 300 x 2 paired-end v3 chemistry, and later multiplexed using a dual-indexing approach (Comeau *et al.* 2017). Sequences are available in European Nucleotide Archive (ENA) under the accession number PRHEB35843 experiment ERP118961.

Amplicon sequence processing, ASV classification and taxonomic assignment

We performed the quality control and denoise of the DNA sequences using the DADA2 pipeline (Callahan *et al.*, 2017). Sequences obtained from the 16S rRNA and the ITS rhizosphere libraries were processed separately. We removed the primers and adaptors from the 16S rRNA and the ITS sequences using the software Cutadapt (Martin, 2011). After quality inspection of 16S rRNA reads, we removed the low-quality bases using a truncation length of 240bp (R1) and 230bp (R2), and a maximum expected error of 2 for both reads. For the ITS reads, truncation length was not used, since ITS presents natural length variation (Anslan *et al.*, 2018). We merged the forward and reverse reads together to obtain the full-denoised sequences, by aligning the denoised forward reads with the reverse-complement of the corresponding denoised reverse reads, and then constructing the merged “contig” sequences with zero mismatches. Following these filtering steps, we constructed an amplicon sequence variant table (ASV), which is a higher-resolution version of the OTU table produced by traditional methods (Callahan *et al.*, 2017). The DADA2 pipeline also removed non-useful sequences such as chimeras (single DNA sequence originating from multiple sequences), singletons (sequences present once) and duplicates. Taxonomy assignment to the sequence variants was performed using the software Mothur (Schloss *et al.*, 2009). We used the function ‘classify_seqs’ uses, which uses a training set of reference sequences with known taxonomy, to classify our sequences in taxonomic assignments with a bootstrap confidence of at least minBoot. We performed the taxonomy assignment using SILVA v.132 (Quast *et al.*, 2012), UNITE v.7 (Kõljalg *et al.*, 2013) and the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990). In order to remove sequence heterogeneity, we rarefied the samples to 16S (120.000 ASVs) and ITS (10.000 ASVs) before calculating diversity indexes. For the core microbiome analyses, we used rarefied ASVs tables, for both bacterial and fungal communities. The QIIME 2 core features command was applied in order to obtain a list of ASVs observed in 80% of the wild Andean blueberry rhizosphere samples.

Diversity and abundance analyses

We used the software QIIME2 - Quantitative Insights into Microbial Ecology (Carporaso *et al.*, 2010; Reeder y Knight, 2010) for downstream analyses. We imported the obtained ASV tables to QIIME2, as well as the taxonomy tables, and a rooted phylogenetic tree for diversity analyses. We calculated alpha diversity metrics such as Shannon's diversity index (a quantitative measure of community diversity) (Shannon, 1948), observed amplicon sequence variant ASVs (a qualitative measure of community richness), Pielou's evenness (a measure of community evenness) (Pielou, 1966; Magurran, 1988), and Faith's phylogenetic diversity (a qualitative measure of community richness that incorporates phylogenetic relationships between the features). Beta diversity metrics were calculated using the distances Unweighted Unifrac (a presence/absence measure of community dissimilarity that incorporates phylogenetic relationships between the features), Weighted Unifrac (a presence/absence/abundance measure of community dissimilarity that incorporates phylogenetic relationships between the features) (Lozupone *et al.*, 2011), Jaccard (a qualitative measure of community dissimilarity), and Bray-Curtis (a quantitative measure of community dissimilarity). We performed Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) plots using the previous resulting dissimilarity matrices of beta diversity in order to obtain the stress value that indicates how reliable the observed clusters are. In order to perform the Principal Coordinate Analysis (PCoA) we used the rhizosphere distance Bray Curtis matrix, these analyses were performed in R v 3.6.1 (RStudio, 2015). We also performed a Mantel test (Smouse *et al.*, 1986) using the package *vegan* (Oksanen *et al.*, 2017) in order to determine whether the microbiome community dissimilarities (Bray-Curtis distance matrix) is correlated with the genetic diversity distances of *V. floribundum*, previously reported by Vega (2019). Differential abundance analysis was performed using balances with Gneiss in QIIME 2. Filtered ASVs tables with the samples separated in four groups corresponding to four genetic clusters found in *V. floribundum* (A, B, C, and D) were used for pairwise comparisons.

Soil chemical measurements

We determined soil chemical parameters of 43 soil samples at the *Laboratory of Environmental Engineering at Universidad San Francisco de Quito*. For each soil sample, we characterized pH, total nitrogen (N, %), organic matter (OM, %), organic carbon (OC, %) conductivity ($\mu\text{s}/\text{cm}$), Al (mg/kg), As (mg/kg), Ba (mg/kg), Bi (mg/kg), Ca (mg/kg), Cd (mg/kg), Co (mg/kg), Cu (mg/kg), Cr (mg/kg), Fe (mg/kg), K (mg/kg), Mg (mg/kg), Mn (mg/kg), Mo (mg/kg), Na (mg/kg), Ni (mg/kg), P (mg/kg), Pb (mg/kg), Se (mg/kg), Sr (mg/kg), and V (mg/kg), according to standard procedures (Astm, 2000; EPA, 1996; Janitzky, 1986). With this information, we generated a metadata file in order to determine whether soil chemical parameters could explain the diversity metrics (Alpha and Beta) and the structure of the rhizosphere microbiome. For the metadata file

construction, we divided the measurements values of each soil variable in classes to cover as much information as possible. Then we used these measurements to perform regression models in QUIIME 2 (Carporaso *et al.*, 2010). A resulting R2 value show us a percentage that represents how much of the variance in the microbial community is explained by our soil variables and also the percentage of the individual contribution of each variable. In this way, we could determine the influence of each of the soil variables, and suggest which of them could exert the most influence on the diversity and structure of the rhizosphere microbiome.

RESULTS

Composition of rhizosphere microbial communities of *V. floribundum*

Bacterial communities. A total of 45.686.727 raw 16S sequences were obtained from 43 rhizosphere samples. After quality control and denoising, 120.653 sequences remained which means that between 217 and 980 sequences were obtained per sample. These sequences were grouped into 112.143 reads. Altogether, the most relatively abundant bacterial phyla were *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* (Figure2).

Fungal communities. A total of 15.647.602 raw ITS sequences were obtained from 43 rhizosphere samples. After denoising, singleton exclusion, chimera checking and removal of ASVs present in only one sample, a total of 27.422 sequences remained. Between 17 and 466 sequences were obtained per sample. This sequences were distributed among 10.761 ASVs. The most relatively abundant fungal phyla were *Ascomycota*, *Basidiomycota*, and *Mortierellomycota* (Figure3).

Diversity of rhizosphere microbial communities

- Bacterial diversity.

Alpha diversity: The diversity within groups showed that the richness represented by Shannon and Evenness indexes was highest in the group B, but did not show statistical significance (Figure 4A, 4D), suggesting that there are not differences in terms of diversity within each group. The highest Faith's phylogenetic diversity and number of observed ASVs were found in the group A ($P < 0.05^*$), followed by the group B (Figure 4B, 4C); however, these measures are less reliable than Shannon and Evenness metrics.

Beta diversity: The diversity between groups represented by Unweighted Unifrac distances showed significant differences between the four groups (A, B, C, and D) ($P < 0.001^{***}$), as well as Bray-Curtis ($P = 0.001^{***}$) and Jaccard ($P = 0.001^{***}$) metrics (Table 3). These differences with highly statistical significance suggest that the bacterial composition is different between the four groups, highlighting the presence of unique characteristics in each group.

NMDS plots and Principal Coordinate Analysis (PCoA): NMDS plots developed with dissimilarity matrices of beta diversity metrics revealed the presence of four possible groups (A, B, C, and D) (Figure 6). The stress value of NMDS plots (< 0.2) supported our observations, suggesting that the separation in these four groups was adequate. On the other hand, our PCoA performed with Bray Curtis rhizosphere distance matrix supported our previous observations with Beta diversity metrics in which the bacterial communities were separated in four groups (A, B, C, and D) (PERMANOVA, $P < 0.001^{***}$), even though there is a slight spatial overlap between groups A, C and D (Figure 8A).

Mantel test: This test showed that the dissimilarity of the bacterial communities (Bray-Curtis) is significantly correlated ($P < 0.01^{**}$) with the genetic distances between Andean blueberry individuals (Figure 9A).

- Fungal diversity.

Alpha diversity: The group C showed the highest alpha diversity values supported by the Shannon index, number of observed ASVs, and Faith's phylogenetic diversity ($P < 0.05^*$ for all), whereas the group B showed the lowest diversity (Figure 5A, 5B, 5C) suggesting that the most of the fungal diversity was found in the group C. Evenness index was significantly higher ($P < 0.05^*$) in group D (Figure 5D) compared with the other groups, suggesting that samples in group D are distributed more equitably.

Beta diversity: All metrics (Unweighted Unifrac, weighted Unifrac, Bray-Curtis, and Jaccard) showed significant differences in diversity between the four groups (A, B, C, and D) ($P < 0.01^{**}$) (Table 5). Our results suggest the presence of unique characteristics in each group that drive the diversity of fungal communities.

NMDS plots and Principal Coordinate Analysis (PCoA): NMDS plots showed a separation between groups D and C, whereas groups B and A are slightly overlapped (Figure 7). These results suggest that groups D and C are more different between them than groups B and A. The stress value of NMDS plots (< 0.2) supported our observations, suggesting that the separation in these groups was appropriate. PCoA revealed a clear separation between the groups D and C, whereas groups B and A were spatially overlapped; however, the clustering of the fungal communities in the four groups (A, B, C, and D) was statistically significant (PERMANOVA, $P < 0.001^{***}$) (Figure 8B).

Mantel test: The test showed that the dissimilarity of the fungal communities is positively correlated ($P < 0.01^{**}$) with the genetic distances found in the Andean blueberry individuals (Figure 9B).

Core microbiome of the wild Andean blueberry

- Bacterial core microbiome

From the total 112.146 bacterial clustered ASVs, we found 50 ASVs present consistently in the rhizosphere of all the 43 samples. These ASVs could be shaping the core microbiome of the wild Andean blueberry samples analyzed in this study. Twenty-four of the 50 ASVs were classified up to genus level. The core rhizosphere microbiome found in the present study consists of 28 *Proteobacteria* ASVs that represents 56% of the core microbiome. The genera identified in *Proteobacteria* were *Bradyrhizobium*, *Roseiarcus*, *Reyranella*, *Sphingomonas*, *Rhodoplanes*, *Phenylobacterium*, *Devosia*, *Variovorax*, *Acidicaldus* and *Candidatus*. Other phyla with less representation in the core rhizosphere microbiome were *Actinobacteria* (ten ASVs, 20%), *Acidobacteria* (nine ASVs, 18%), *Bacteroidetes* (two ASVs, 4%) and *Verrucomicrobia* (one ASV, 2%) (Figure 10).

- Fungal core microbiome

Regarding fungal communities, our analysis identified four ASVs present across all the 43 samples from a total of 10.761 ASVs. These four ASVs belong to the phyla *Ascomycota* (two ASVs, 50%), *Mortierellomycota* (one ASV, 25%), and *Basidiomycota* (one ASV, 25%) (Figure 11), which corresponds to the genera *Cladosporium*, *Llinoctria*, *Mortierella*, and *Solicoccozyma*, respectively. The presence of these taxa in all our samples suggest a key rol of them in the *V. floribundum* microbiome interactions.

Differential abundance taxa of rhizosphere microbial communities

- Bacterial relative abundance.

Differential abundance analyses identified differentially abundant taxa in pairwise comparisons. The genera *Roseiarcus* and *Granulicella* belonging to *Proteobacteria* and *Acidobacteria* phyla, respectively, were present in the group D, B (Figure 12) and A (Figure 13), but the group D showed an increase of these taxa. While, the taxon *JG30a-KF-32* (*Ktedonobacteriaceae*) present in the group A, D (Figure 13) and B (Figure 14) was abundant in the group A. A member of the phylum *Chloroflexi* (*KD4-96*) showed an increase in its relative abundance in the group B compared with the group A (Figure 14). There is not available information about these clones, but the phylum *Chloroflexi* includes non-phototrophic bacteria (Hanada, 2014). Pairwise comparisons between groups C and D showed that the genus *Roseiarcus* is abundant in the group C (Figure 15). Our analyses did not show significant differences in relative abundance of any taxon between groups B and C, and between the groups A and C. Nevertheless, the genus *Bradyrhizobium*, member of the phylum *Proteobacteria*, was equally abundant between groups B and C and between groups A and C (Figure 16, 17). Suggesting an important rol of *Bradyrhizobium* in the rhizosphere.

- **Fungal relative abundance.**

The analysis showed that the genus *Mortierella*, belonging to the phylum *Mortierellomycota*, was abundant in group D when compared with groups B (Figure 18) and C (Figure 19). The genus *Archaeorhizomyces* showed an increase in its abundance in the group A compared with the groups C (Figure 20) and D (Figure 21). The relative abundance of the order *Helotiales*, that belongs to phylum *Ascomycota*, was higher in the group B when compared with group A (Figure 22). The genera *Penicillium* and *Mortierella* were abundant in group B than in group C (Figure 23). Differences in relative abundance found in these pairwise comparisons suggest, that some microorganisms are better adapted to specific biotic and abiotic factors within each group.

Analysis of soil properties in the rhizosphere microbiome

Alpha diversity metrics were positively correlated with soil parameters. The soil elements that showed an influence in the alpha diversity in the bacterial communities were Cd, Co, Fe, and P (Table 1) and Cd, Cu, and Fe for alpha diversity of fungal communities (Table 3). Additionally, our analyses revealed that beta diversity of bacterial and fungal communities is positively correlated with almost all soil parameters analyzed here, except for N and conductivity where no statistical significance was found (Table 5).

Soil chemical measurements and regression model (R²)

Our regression analysis showed that soil chemical parameters explain 63% of the 100% of the bacterial community variation. Additionally, with this analysis, we could explore which individual nutrient the variation in bacterial communities. The regression revealed that Fe was the largest explanatory factor, explaining 4.54% of the variation in bacterial communities (Figure 24A). Regarding fungal communities, our regression model determined that 57% of the community variation could be explained by the soil variables analyzed in our study. We could not observe a single nutrient explaining the observed variation in fungal communities, suggesting that a combination of all soil variables is the best predictor of the variation in fungal populations. Nevertheless, Ca was the nutrient that influence the composition of fungal communities the most (2.82%) (Figure 24B).

DISCUSSION

Microbial Community Composition

- **Bacterial communities**

The phyla *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, and *Actinobacteria* are the most abundant bacterial taxa in the rhizosphere of plants (Bulgarelli *et al.*, 2013; Fierer and Jackson, 2006; Fierer *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2017; Perez-Jaramillo *et al.*, 2019; Yurgel, *et al.*, 2017, 2018), including the wild

Andean blueberry in Ecuador as reported here. Some members of these phyla are adapted to harsh environmental conditions such as extreme cold, broad temperature fluctuations, aridity, and steep chemical gradients (Niederberger *et al.*, 2008). Therefore, these phyla are expected to occur in the Andean “*páramos*”, which are tundra-like ecosystems where the Andean blueberry grows. *Proteobacteria* is the most diverse phylum in bacteria, and harbors most of the recognized taxa in agriculture (Dussault, 2019). *Acidobacteria* members are oligotrophs and have been associated with low soil pH (Fierer *et al.*, 2007; Kielak *et al.*, 2009; Perez-Jaramillo *et al.*, 2019), which are conditions preferred by *Vaccinium* species in the Andean highlands (Hidalgo, 2016; Hofstede *et al.*, 2003; Yurgel *et al.*, 2017; Vásconez & Hofstede, 2001) as revealed by our pH soil chemical analyses. These analyses revealed that the most acidic soils are those from the province of Loja, whereas the less acidic are from the province of Cotopaxi. Members of *Actinobacteria* probably play an important role in the establishment of the Andean blueberry because they are able to recycle organic matter and promote the formation of humus and the enrichment of the soil (Polti *et al.*, 2014). Additionally, *Actinobacteria* produce antifungal metabolites used in controlling plant diseases (Genilloud *et al.*, 2011; Schrey and Tarkka, 2008), and remove substances such as pesticides, and heavy metals from the environment (Polti *et al.*, 2014). We found the genus *Acidicapsa* (*Acidobacteria*), which is found exclusively in native habitat of wild crops (Perez-Jaramillo *et al.*, 2019) and include strictly aerobic chemo-organotrophs that are adapted to acidic conditions (Kulichevskaya *et al.*, 2012). The genera *Dokdonella* and *Conexibacter* were recently reported for the first time in wild blueberry rhizospheres by Yurgel *et al.* (2017). *Dokdonella* is part of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation communities (Bacosa and Inoue, 2015) suggesting its role in bioremediation.

- **Fungal communities**

Ascomycota and *Basidiomycota* are the most abundant fungal phyla found in the rhizosphere of the Andean blueberry and other blueberry species (Dussault, 2019; Kumar *et al.*, 2017; Yurgel, *et al.*, 2017, 2018), and possibly play a key role in their development. *Ascomycota* is the largest and most diverse phylum of fungi (Schoch *et al.*, 2009), and is particularly important because some of its members cause diseases in species of *Vaccinium* (Batra, 1983). For instance, the genus *Botrytis*, identified in our study, causes a soft decay of wild blueberry plant tissues accompanied by a growth of fuzzy grey-brown mold (Hildebrand *et al.*, 2001). The phylum *Basidiomycota* comprises organisms that decay plant residues and ectomycorrhizal fungi (Lim *et al.*, 2010). Decay fungi decompose hard woody organic matter in order to convert it into carbon dioxide, organic acids, and fungal biomass that could be used by plants (Lim *et al.*, 2010). Ectomycorrhizal fungi colonize plant roots and help plants to obtain nutrients from soil, such as P (Li *et al.*, 2006). The fungal classes: *Agaricomycetes* and *Leotiomycetes* have been reported previously in the rhizosphere of wild blueberry species (Yurgel *et al.*, 2017; Dussault, 2019). Our

analyses also detected the *Archaeorhizomycetes* class, which has been reported as slow-growing fungi (Menkis *et al.*, 2014; Urbina *et al.*, 2018).

Core microbiome

- Bacterial Core Microbiome

Once we determine the composition of the microbiome we go a step further to find common microbiota across the 43 samples analyzed. As previously established (Chica *et al.*, 2019; Fierer, 2017; Kielak *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013), the phyla *Proteobacteria*, *Acidobacteriia* and, *Actinobacteria* are known to be abundant in soil and have been shown to be ecologically important due to their members are predicted to be involved in soil nutrient cycling (Chica *et al.*, 2019; Kielak *et al.*, 2009). Due to this, it is expected that they are part of the core microbiome in our study. The low relative abundance of the *Deltaproteobacteria* class in the rhizosphere of wild blueberry plants has been reported previously (Yurgel *et al.*, 2017), suggesting that it may has not a key role in the rhizosphere of plants as other classes such as *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*. At genus level, *Bradyrhizobium* has been already reported to be part of the core microbiome of wild blueberry species (Yurgel *et al.*, 2017; 2018), and appears as an ecologically important genus. *Bradyrhizobium* species plays a critical role in soil fertility (Yurgel *et al.*, 2018) by promoting plant growth and nitrogen fixation in plant tissues (Piromyou *et al.*, 2017). Because of that, *Bradyrhizobium* is used as a model organism to study the impact of abiotic factors on soil microbiota (Shah and Subramaniam, 2018). The genera *Roseiarcus*, *Reyranella*, *Sphingomonas*, *Rhodoplanes* *Phenylobacterium*, *Devosia*, *Variovorax*, and *Acidicaldus*, also found as part of the core microbiome, encompass an enormous morphological, physiological, and metabolic diversity, and are of great importance to carbon, nitrogen, and sulfur cycling (Kersters *et al.*, 2006; Perez-Jaramillo *et al.*, 2019). *Acidotherrmus* is a thermophilic and acidophilic genus of bacteria isolated from extreme environments with high amounts of cellulosic and lignin materials (Mohagheghi *et al.*, 1986). Cellulose is the most abundant form of carbon contributing to soil organic matter formation, suggesting a role of *Acidotherrmus* on cellulose degradation (Berry *et al.*, 2014). The genus *Granulicella* include members strictly aerobic, acidophilic and chemoorganotrophs, capable of hydrolyzing several polysaccharides but not cellulose (Pankratov *et al.*, 2010). *Bryobacter* and *Candidatus* are mildly acidophilic, psychrotolerant bacteria (Dedysh, 2015). Information about the role of these bacterial genera in rhizosphere microbiomes is limited and more studies are needed to clarify their contribution in the relation with wild blueberry species.

- Fungal Core Microbiome

Only four fungal ASVs are shared by all analyzed samples. *Ascomycota* and *Basidiomycota* form the core microbiome, and are the most abundant groups found in the

rhizosphere of the Andean blueberry. These results could suggest that, abundant and easily detectable organisms might have a high impact on microbial structure, function, and nutrient cycling (Lupatini *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). It is not surprising that these phyla form the core microbiome because previous studies have reported that some of these taxa have shown affinity with rhizodeposits secreted by plants (Philippot *et al.*, 2013). Additionally, we found some genera with important functions in the microbiome. For instance, *Mortierella* can transform P from an insoluble to a soluble form that can be directly used by plants, playing a possible role in wild habitats (Osorio *et al.*, 2013). *Cladosporium* is another bacterial genus frequently isolated from soil that is widespread in nature and can be found in the superficial soil layer (Bensch *et al.* 2012); however, it can use organic matter found deeper in the soil (Parbery, 1969). *Ilyonectria* is a genus commonly associated with plant root diseases by infecting root vascular tissues restricting the movement of water and nutrients (Cabrera *et al.*, 2012; Halleen *et al.*, 2006). Therefore, our findings emphasize the complexity of soil ecology and the need for more research aimed to understand the key role of these taxa in rhizosphere and plant-associated communities.

Diversity and differential abundance analyses of microbial communities

As mentioned before, the rhizosphere samples were divided into four groups (A, B, C, and D) based in a previous study of genetic diversity of the Andean blueberry in Ecuador (Vega 2019). With this information we elaborated our metadata file to perform the diversity analyses comparing these four groups. Alpha diversity levels in bacteria were similar for the four groups (A, B, C, and D), whereas it was significantly higher in the group C for fungi. Regarding Beta diversity, bacterial and fungal communities revealed low similarity between the four groups, suggesting differences in the specific composition of the microbial communities present in each group.

The observed differences in Beta diversity between the four groups found in this study, led us to explore more in depth the differences in the taxonomic identity and differential relative abundance of the microbial communities. When the composition and abundance of the rhizobacterial ASVs were compared pairwise, we found that the group D was the most dissimilar compared to the others. Interestingly, the high degree of differentiation of the group D was also observed in the genetic differentiation analyzes in the study of genetic diversity of the Andean blueberry (Vega 2019). The atypical clustering of the group D could be explain considering that the samples of this group were collected at the highest altitude in our sampling (Cotopaxi and Azuay provinces) (Table 1). The highest zone of the “*páramo*” is known as “*superpáramo*”, which is characterized by less diversity of vegetation and recently formed soils (Hofstede *et al.*, 2014). In general, microorganisms that live at high altitude are able to survive and grow at low temperatures, facing up the limited availability of nutrients and water (D'Amico *et al.*, 2016). Therefore, only microbes with structural and functional adaptations can survive these high altitudes (Praeg *et al.*, 2019). On

the other hand, pairwise comparisons of fungal ASVs revealed that groups B (central region) and C (southern region) were the most dissimilar. The geological origin of the soils of the Ecuadorian “páramos” could be a possible explanation of this differentiation between groups B and C. The soils of the “páramos” are volcanic ash soils and differ mainly in the parental material from which they originate (Prat, 2018). Soils from the central region (group B), known as andosols, are recently formed and are rich in organic matter, with a high water retention rate and great permeability, which enhance root development (Hofstede *et al.*, 2003). Soils in the southern region (group C) are known as inceptisols and are formed from weathered metamorphic rock. These soils are older than the soils in the central region, and are more superficial and less fertile (Podwojewski and Poulénard 2000). Differences in soil types in these regions could influence the differential abundance of fungal taxa between groups B and C.

Structure of microbial communities

We found that the bacterial and fungal communities identified in our samples are clustered in four groups (A, B and C) and an atypical group (D). These results remind the grouping patterns observed in the samples of the genetic diversity study of the Andean blueberry (Vega, 2019). A possible explanation for the clustering observed could be the glacial and interglacial climatic cycles occurred during the Pleistocene in the Andean region (Simpson, 1975). As a consequence of these temperature fluctuations, the extension of the Andean “páramos” increased and decreased repeatedly. Near “páramos” got connected during glacial periods, and isolated again during interglacial periods (Flantua *et al.*, 2019), influencing the distribution of species and the patterns of gene flow between populations (Pennington *et al.*, 2010). In this sense, the Pleistocene climatic fluctuations could have shaped the microbial communities studied here. These climatic fluctuations may have left their footprint in the genetic patterns of highland plants (Muellner *et al.*, 2019), and probably in the genetic structure of *mortino* (Vega 2017). Further studies are needed to clarify the influence of Pleistocene climatic fluctuations in the structure and composition of the microbiome associated with Andean plants.

Impact of soil properties in the rhizosphere microbiome

- Soil variables affecting microbiome diversity

Based on our correlation analyses, we suggest that the soil elements Fe, P, Cd, and Co could explain the bacteria alpha diversity levels reported here. Fe plays a fundamental role in biochemical processes, such as the reduction of atmospheric nitrogen, the synthesis of deoxyribonucleotides, cellular respiration, and the synthesis of numerous small molecules such as amino acids, lipids and sterols (Philpott, 2006). P is a macronutrient used for the synthesis of nucleic acids and phospholipids. Fungi can utilize this source of P but bacteria need to transform it into an inorganic form in order to use it (Madigan *et al.*, 1997; Marchant, 1989). Fe and P are

both macronutrients essential for key processes in the metabolism of microorganisms, and for this reason, its positive correlation with diversity has been documented before (Santoyo *et al.*, 2017). Although, Cd and Co are non-essential elements and less abundant in soil compared with other elements at low concentrations it can be toxic to all living organisms (Waisberg *et al.*, 2003). Some microorganisms are able to resist the presence of heavy metals such Cd and uses it as a source of C. The order *Heliotiales* and the genus *Bradyrhizobium*, include species that can tolerate heavy metals, suggesting that these microorganisms could help plants to tolerate the stress caused by these elements (Ayubb *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2010). For fungal communities, we observe that Cd, Fe, and Cu could explain the alpha diversity patterns reported here. Cu is an essential micronutrient for fungi that works as a cofactor in enzymes involved in processes such as cellular respiration, free radical detoxification, pigmentation, and iron acquisition (Antsoyegi *et al.*, 2019). Cu, as well as, Cd are toxic to all organisms at high concentrations (Cervantes y Gutierrez, 1994); nevertheless, some fungi taxa have developed a variety of Cu resistance mechanisms to survive in the presence of toxic concentrations of Cu (Giller *et al.*, 1998). It is possible that Cu has influence the alpha diversity in our study by filtering fungi taxa that is not resistance to higher concentrations of this heavy metal, but further investigation is needed to understand the role of Cu in the diversity of fungal communities.

The correlations between soil properties and microbial Beta diversity observed here suggest that a combination of soil nutrients are influencing the diversity observed. For this reason, it is difficult to determine the specific effect of the variables individually. Additionally, the influence of soil pH in the diversity of rhizosphere microbiomes has also been documented previously (Kuramae *et al.*, 2012; Lauber *et al.*, 2009; Yurgel *et al.*, 2017). Variation in pH promote changes of other soil variables as nutrient availability, soil moisture, organic C, and these factors may drive the observed changes in microbial community diversity (Brady *et al.*, 2008). Additionally, significant deviations in environmental (extracellular) pH impose stress on unicellular organisms, being unable to survive if soil pH falls outside a certain range (Lauber *et al.*, 2009). As a consequence, deviations in pH have a significant effect on the overall diversity of microbial communities in a range of terrestrial environments (Fierer and Jackson, 2006).

- **Soil variables affecting microbiome structure**

Additionally to the soil nutrients that influence the diversity mentioned before we observed that Ca have a strong effect on the composition and structure of the bacterial communities in the rhizosphere of the Andean blueberry. Ca is not an essential nutrient for the growth of most microorganisms, but it helps to stabilize the bacterial cell wall and plays an important role in heat resistance of endospores, asexual spore production, and fruiting body formation in fungi (Madigan *et al.*, 1997; Pitt and Ugalde, 1984). Also, Ca is intimately involved in uptake of other

cations like H, Na and K and can protect against injurious effects of these elements (Hughes and Poole, 1989), suggesting, that Ca could help plants to tolerate the stress caused by these elements (White and Broadley, 2003).

CONCLUSIONS

- *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* were the dominant bacterial taxa in rhizosphere soil samples, while *Ascomycota* and *Basidiomycota* were the dominant fungal taxa. These phyla were reported as part of the core microbiome.
- The rhizosphere microbiome samples were clustering in four groups (A, B, C, and D) similar to the genetic structure patterns of the Andean blueberry in Ecuador, suggesting that this plant species and the members of its rhizosphere microbiome developed interactions in order to adapt to the conditions of the Andean "páramos".
- The diversity and composition of the microbiome observed in our study could be explained in part by the influence of the soil chemical parameters (pH, Fe, P, Co, Cu, Cd and Ca).

References

- Andreote, F. D., e Silva, M. D. C. P., Melo, V. M., and Roesch, L. (2017). The Brazilian Soil Microbiome. In *The Brazilian Microbiome* (pp. 21-39). Springer, Cham.
- Antsoetegi-Uskola, M., Markina-Iñarrairaegui, A., & Ugalde, U. (2019). New insights into copper homeostasis in filamentous fungi. *International Microbiology*, 1-9.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, M 745 yers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215: 403-410.
- Application Note 124/2013, Nitrogen Determination in Reference Substances – Operational Quality Check Procedure DIN ISO 11261:1995 Soil quality – Determination of total nitrogen – Modified Kjeldahl Method.
- Arwidsson, Z., Elgh-Dalgren, K., von Kronhelm, T., Sjöberg, R., Allard, B., & van Hees, P. (2010). Remediation of heavy metal contaminated soil washing residues with amino polycarboxylic acids. *Journal of Hazardous Materials*, 173(1-3), 697-704.
- EN 13342:2000 Characterization of sludges – Determination of Kjeldahl nitrogen
- Astm, D. (2000). 2974 standard test methods for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils. American Society of Testing and Materials. doi, 10(1520), D2974.
- Ayubb, N., Cerra, A., Chamorro, L., & Pérez, A. (2017). Resistencia a cadmio (Cd) de bacterias endófitas y bacterias rizosféricas aisladas a partir de *Oriza sativa* en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 281-293.
- Bacosa, H. P., & Inoue, C. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *Journal of hazardous materials*, 283, 689-697.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Bardgett, R. D., and Chan, K. F. (1999). Experimental evidence that soil fauna enhances nutrient mineralization and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(7), 1007-1014.
- Batra, L. R. (1983). *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Sclerotiniaceae): Its biology on blueberry and comparison with related species. *Mycologia*, 75(1), 131-152.
- Brady, N. C., Weil, R. R., & Weil, R. R. (2008). *The nature and properties of soils* (Vol. 13). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

- Bender, S. F., Wagg, C., and van der Heijden, M. G. (2016). An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in ecology & evolution*, 31(6), 440-452.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus *cladosporium*. *Studies in mycology*, 72, 1-401.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., and Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
- Berry, A. M., Barabote, R. D., & Normand, P. (2014). The Family Acidothermaceae. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 13-19.
- Bever, J. D., Platt, T. G., and Morton, E. R. (2012). Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual review of microbiology*, 66, 265-283.
- Bills, G. F., Mueller, G. M., and Foster, M. S. (2004). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Academic Press.
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(3), 738-744.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7.5 (2010): 335.
- Cervantes, C., & Gutierrez-Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS microbiology reviews*, 14(2), 121-137.
- Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics* 1984; 11: 265–270.
- Chica, E., Buena, L., Valdez, A., Villena, P., Peña, D., & Yarzabal, L. A. (2019). Metagenomic survey of the bacterial communities in the rhizosphere of three Andean tuber crops. *Symbiosis*, 1-10.

- Coba Santamaria, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., and Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 16(2).
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., Torres, A. F., and de Lourdes Torres, M. (2016). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical systematics and ecology*, 64, 14-21.
- Comeau, A. M., Douglas, G. M., & Langille, M. G. (2017). Microbiome helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research. *MSystems*, 2(1), e00127-16.
- Cabrera, A., Rego, C., Crous, P. W., & Oliveira, H. (2012). Virulence and cross-infection potential of *Ilyonectria* spp. to grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 340-354.
- Dassen, S., Cortois, R., Martens, H., de Hollander, M., Kowalchuk, G. A., van der Putten, W. H., & De Deyn, G. B. (2017). Differential responses of soil bacteria, fungi, archaea and protists to plant species richness and plant functional group identity. *Molecular ecology*, 26(15), 4085-4098.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, 7(4), 385-389.
- Dedysh, S. N. (2015). *B ryobacteraceae*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-4.
- De Deyn, G. B., Quirk, H., & Bardgett, R. D. (2010). Plant species richness, identity and productivity differentially influence key groups of microbes in grassland soils of contrasting fertility. *Biology letters*, 7(1), 75-78.
- De Deyn, G. B., & Van der Putten, W. H. (2005). Linking aboveground and belowground diversity. *Trends in ecology & evolution*, 20(11), 625-633.
- Dussault, A. (2019). Evaluation of bacterial and eukaryotic diversity in wild blueberries (*Vaccinium angustifolium* ait. And *Vaccinium mytilloides* michx.).
- Eisenhauer, N., Milcu, A., Sabais, A. C., Bessler, H., Brenner, J., Engels, C., ... & Schonert, F. (2011). Plant diversity surpasses plant functional groups and plant productivity as driver of soil biota in the long term. *PloS one*, 6(1), e16055.
- EPA, E. P. A. (1996). Method 6010B. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry.
- Ferrero, M. A., Menoyo, E., Lugo, M. A., Negritto, M. A., Farías, M. E., Anton, A. M., and Siñeriz, F. (2010). Molecular characterization and in situ detection of bacterial communities associated with rhizosphere soil of high altitude native Poaceae from the Andean Puna region. *Journal of arid environments*, 74(10), 1177-1185.

- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579.
- Flantua, S. G., O'dea, A., Onstein, R. E., Giraldo, C., & Hooghiemstra, H. (2019). The flickering connectivity system of the north Andean páramos. *Journal of Biogeography*.
- Foulon, J., Zappelini, C., Durand, A., Valot, B., Blaudez, D., & Chalot, M. (2016). Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site. *FEMS microbiology ecology*, 92(10).
- Gams, W. (2007). Biodiversity of soil-inhabiting fungi. *Biodivers. Conserv.* 16, 69–72.
- Gomez-Alvarez, V., King, G. M., & Nüsslein, K. (2007). Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS microbiology ecology*, 60(1), 60-73.
- Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J. R., & Vicente, F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(3), 375-389.
- Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil biology and biochemistry*, 30(10-11), 1389-1414.
- Goulart, B. L., Schroeder, M. L., Demchak, K., Lynch, J. P., Clark, J. R., Darnell, R. L., and Wilcox, W. F. (1993). Blueberry mycorrhizae: current knowledge and future directions. In *V International Symposium on Vaccinium Culture* 346 (pp. 230-239).
- Guijarro-Fuertes, M., Andrade-Cuvi, M. J., Bravo-Vásquez, J., Ramos-Guerrero, L., and Vernaza, M. G. (2018). Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*) bread: physicochemical properties and bioaccessibility of antioxidants. *Food Science and Technology*, (AHEAD).
- Gupta, M. M., and Aggarwal, A. (2018). From mycorrhizosphere to rhizosphere microbiome: The paradigm shift. In *Root Biology* (pp. 487-500). Springer, Cham.
- Halleen, F., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, S55-S67.

- Hanada, S. (2014). The phylum *Chloroflexi*, the family Chloroflexaceae, and the related phototrophic families Oscillochloridaceae and Roseiflexaceae. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, 515-532.
- Hidalgo Verdezoto, M. R. (2016). Caracterización morfológica de microorganismos, físico-química del suelo y arvenses presentes en el hábitat de crecimiento del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en el páramo del volcán Rumiñahui, Pichincha (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2016.).
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y., & Shimizu, S. (2002). Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(5), 252-262.
- Hildebrand, P. D., McRae, K. B., & Lu, X. (2001). Factors affecting flower infection and disease severity of lowbush blueberry by *Botrytis cinerea*. *Canadian journal of plant pathology*, 23(4), 364-370.
- Hofstede, R., Segarra, P., & Vásconez, P. M. (2003). Los páramos del mundo: Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. UICN; Global Peatland Initiative; Ecociencia.
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., and Cerra, M. (2014). Los páramos andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. UICN, Quito, Ecuador, 156.
- Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1989). *Metals and Micro-organisms*. Chapman and Hall.
- Janitzky, P. (1986). Organic Carbon (Walkley-Black. Field and laboratory procedures used in a soil chronosequence study, (1648), 34.
- Jorquera, M. A., Maruyama, F., Ogram, A. V., Navarrete, O. U., Lagos, L. M., Inostroza, N. G., ... and Mora, M. D. L. L. (2016). Rhizobacterial community structures associated with native plants grown in Chilean extreme environments. *Microbial ecology*, 72(3), 633-646.
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. *The prokaryotes: volume 5: Proteobacteria: alpha and beta subclasses*, 3-37.
- Kielak, A., Pijl, A. S., Van Veen, J. A., & Kowalchuk, G. A. (2009). Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *The ISME journal*, 3(3), 378.
- Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Mol Ecol*. 22:5271-5277.
- Kumar, V., Singh, A., Tyagi, M. B., & Kumar, A. (2017). Microbial Community Composition and Functions Through Metagenomics. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 633-657). Springer, Singapore.

- Kulichevskaya, I., Kostina L., Valášková, V., Rijpstra, W., Damsté, J. de Boer, W., Dedysh, S. (2012). *Acidicapsa borealis* gen. nov., sp. nov. and *Acidicapsa ligni* sp. nov., subdivision 1 Acidobacteria from Sphagnum peat and decaying wood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Kulichevskaya, I. S., Danilova, O. V., Tereshina, V. M., Kevbrin, V. V., & Dedysh, S. N. (2014). Descriptions of *Roseiarcus fermentans* gen. nov., sp. nov., a bacteriochlorophyll a-containing fermentative bacterium related phylogenetically to alphaproteobacterial methanotrophs, and of the family Roseiarcaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(8), 2558-2565.
- Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., van Veen, J. A., & Kowalchuk, G. A. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 12-24.
- Lareen, A., Burton, F., and Schäfer, P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant molecular biology*, 90(6), 575-587.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009). Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Li, H., Smith, S. E., Holloway, R. E., Zhu, Y., & Smith, F. A. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*, 172(3), 536-543.
- Lim, Y. W., Kim, B. K., Kim, C., Jung, H. S., Kim, B. S., Lee, J. H., & Chun, J. (2010). Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *The Journal of Microbiology*, 48(3), 284-289.
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal* 5.2 (2011): 169-172.
- Lugo, M. A., Ferrero, M., Menoyo, E., Estévez, M. C., Siñeriz, F., & Antón, A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizospheric bacteria diversity along an altitudinal gradient in South American Puna grassland. *Microbial ecology*, 55(4), 705.
- Lupatini, M., Suleiman, A. K., Jacques, R. J., Antonioli, Z. I., de Siqueira Ferreira, A., Kuramae, E. E., & Roesch, L. F. (2014). Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 10.
- Luteyn, J. (1996). *Flora of Ecuador*. No. 54. 147 Ericaceae. Goetborg.
- Luteyn, J. L. (2002). Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: biogeographical patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review*, 68(1), 55-87.

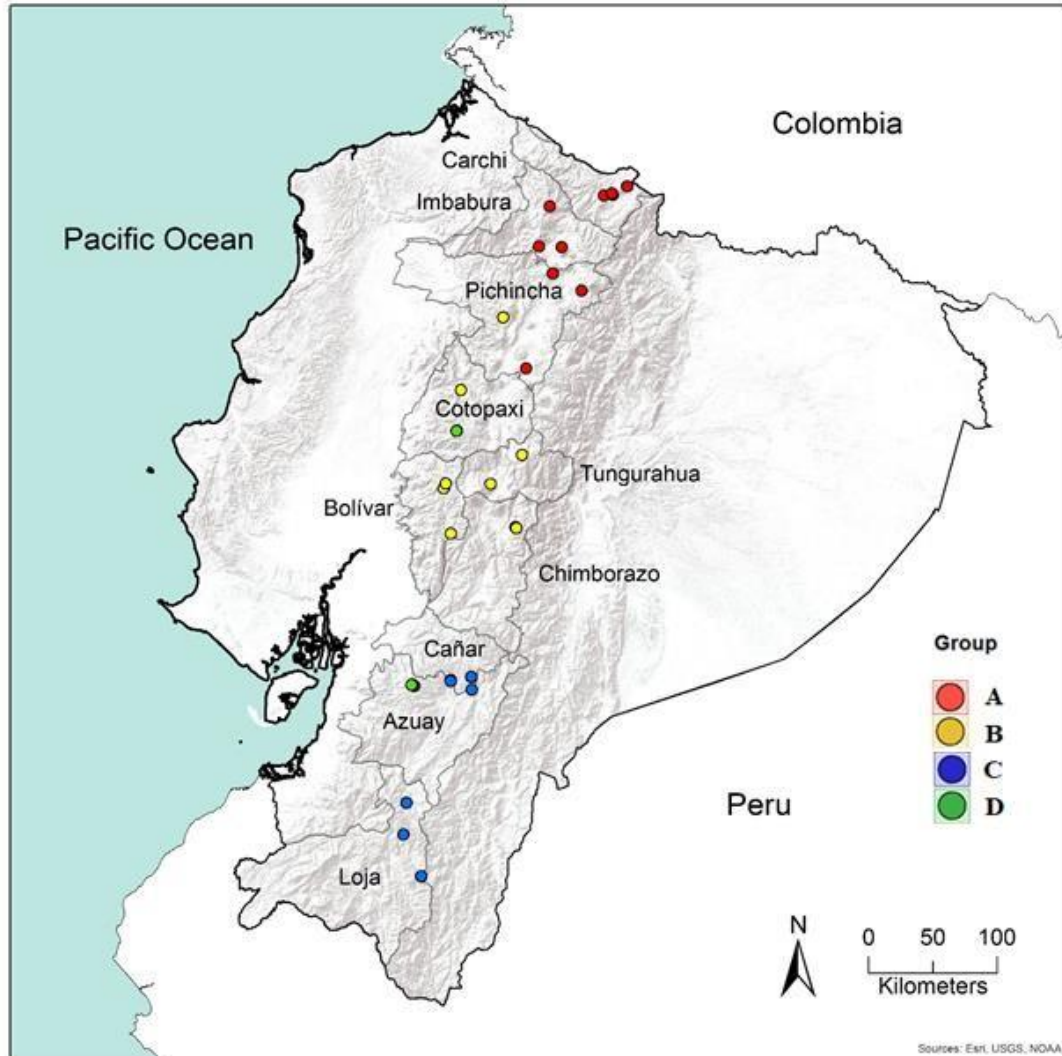
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). Brock biology of microorganisms (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Magurran AE. Ecological Diversity and its Measurement. Princeton, NJ: Princeton University Press 1988.
- Marchant, R. (1989). Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilisation by Fungi: Symposium of the British Mycological Society Held at The University of Birmingham, April 1988. Cambridge University Press.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet. journal, 17(1), 10-12.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ISME J. 2012;6: 610–618.
- Mendes, R., Garbeva, P., and Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS microbiology reviews, 37(5), 634-663.
- Menkis, A., Urbina, H., James, T., Rosling, A. 2014. *Archaeorhizomyces borealis* sp. nov. and a sequence-based classification of related soil fungal species. Fungal Biol. 118 (12), 943-955.
- Milcu, A., Patsch, S., Langel, R., & Scheu, S. (2006). The response of decomposers (earthworms, springtails and microorganisms) to variations in species and functional group diversity of plants. Oikos, 112(3), 513-524.
- Mitchell, R. J., Hester, A. J., Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Hewison, R. L., & Potts, J. M. (2010). Is vegetation composition or soil chemistry the best predictor of the soil microbial community?. Plant and soil, 333(1-2), 417-430.
- Mohagheghi, A., Grohmann, K. M. M. H., Himmel, M., Leighton, L., & Updegraff, D. M. (1986). Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 36(3), 435-443.
- Muellner- Riehl, A. N., Schnitzler, J., Kissling, W. D., Mosbrugger, V., Rijdsdijk, K. F., Seijmonsbergen, A. C., ... & Favre, A. (2019). Origins of global mountain plant biodiversity: Testing the ‘mountain- geobiodiversity hypothesis’. Journal of Biogeography.
- Niederberger, T. D., McDonald, I. R., Hacker, A. L., Soo, R. M., Barrett, J. E., Wall, D. H., & Cary, S. C. (2008). Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica. Environmental Microbiology, 10(7), 1713-1724.

- Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B. vegan: Community Ecology Package. In: R package version 2.4-4; 2017. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Osorio, N. W. and Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany*, 91(4), 274-281.
- Pankratov, T. A., & Dedysh, S. N. (2010). *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading Acidobacteria from Sphagnum peat bogs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(12), 2951-2959.
- Parbery, D. G. (1969). The natural occurrence of *Cladosporium resinae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 53(1), 15-23.
- Pennington, R. T., Lavin, M., Särkinen, T., Lewis, G. P., Klitgaard, B. B., & Hughes, C. E. (2010). Contrasting plant diversification histories within the Andean biodiversity hotspot. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13783-13787.
- Pérez-Jaramillo, J. E., de Hollander, M., Ramírez, C. A., Mendes, R., Raaijmakers, J. M., & Carrión, V. J. (2019). Deciphering rhizosphere microbiome assembly of wild and modern common bean (*Phaseolus vulgaris*) in native and agricultural soils from Colombia. *Microbiome*, 7(1), 1-16.
- Pfeiffer, S., Mitter, B., Oswald, A., Schloter-Hai, B., Schloter, M., Declerck, S., and Sessitsch, A. (2016). Rhizosphere microbiomes of potato cultivated in the High Andes show stable and dynamic core microbiomes with different responses to plant development. *FEMS microbiology ecology*, 93(2), fiw242.
- Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta (bba)-molecular cell research*, 1763(7), 636-645.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., and Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789.
- Pielou, E. C., 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131-44.
- Pitt, D., & Ugalde, U. O. (1984). Calcium in fungi. *Plant, Cell & Environment*, 7(6), 467-475.
- Piromyou, P., Greetatorn, T., Teamtisong, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., & Teaumroong, N. (2017). Potential of rice stubble as a reservoir of Bradyrhizobial inoculum in rice-legume crop rotation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(22), e01488-17.

- Podwojewski, P., & Poulénard, J. (2000). La degradación de los suelos de los páramos. Los suelos del páramo. Serie Páramo, 5, 27-36.
- Polti, M. A., Aparicio, J. D., Benimeli, C. S., & Amoroso, M. J. (2014). Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 48-55.
- Praeg, N., Pauli, H., & Illmer, P. (2019). Microbial diversity in bulk and rhizosphere soil of *Ranunculus glacialis* along a high-alpine altitudinal gradient. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1429.
- Prat, C. (2018). *The Soils of Ecuador*. J. Espinosa, J. Moreno, & G. Bernal (Eds.). Springer.
- Prober, S. M., Leff, J. W., Bates, S. T., Borer, E. T., Firn, J., Harpole, W. S., ... & Cleland, E. E. (2015). Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology letters*, 18(1), 85-95.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Ramsay, P. M., and Oxley, E. R. B. (1996). Fire temperatures and postfire plant community dynamics in Ecuadorian grass páramo. *Vegetatio*, 124(2), 129-144.
- Reeder, Jens, Rob Knight. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nature methods* 7.9 (2010): 668.
- Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*, 156(3), 989-996.
- Rosling, A., Cox, F., Cruz-Martinez, K., Ihrmark, K., Grelet, G. A., Lindahl, B. D., ... & James, T. Y. (2011). Archaeorhizomycetes: unearthing an ancient class of ubiquitous soil fungi. *Science*, 333(6044), 876-879.
- RStudio, R. T. (2015). *Integrated Development for R*. RStudio. Inc., Boston, MA: RStudio.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(23), 7537-7541.
- Santoyo, G., Pacheco, C. H., Salmerón, J. H., and León, R. H. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. *Spanish journal of agricultural research*, 15(1), 13.
- Sasse, J., Martinoia, E., and Northen, T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in plant science*, 23(1), 25-41.

- Sauheitl, L., Glaser, B., Dippold, M., Leiber, K., & Weigelt, A. (2010). Amino acid fingerprint of a grassland soil reflects changes in plant species richness. *Plant and soil*, 334(1-2), 353-363.
- Schmid, M. W., Hahl, T., van Moorsel, S. J., Wagg, C., De Deyn, G. B., & Schmid, B. (2018). Rhizosphere bacterial community composition depends on plant diversity legacy in soil and plant species identity. *BioRxiv*, 287235.
- Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. (2008). Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 11-19.
- Schoch, C. L., Sung, G. H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., ... & Gueidan, C. (2009). The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic biology*, 58(2), 224-239.
- Shah, V., & Subramaniam, S. (2018). *Bradyrhizobium japonicum* USDA110: a representative model organism for studying the impact of pollutants on soil microbiota. *Science of the total environment*, 624, 963-967.
- Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 1948; 27: 379–423 and 623–656.
- Simpson, B. B. (1975). Pleistocene changes in the flora of the high tropical Andes. *Paleobiology*, 1(3), 273-294.
- Smouse, P. E., Long, J. C., & Sokal, R. R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic zoology*, 35(4), 627-632.
- Sun, L. N., Zhang, Y. F., He, L. Y., Chen, Z. J., Wang, Q. Y., Qian, M., and Sheng, X. F. (2010). Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 101(2), 501-509.
- Torsvik, V., Øvreås, L., and Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570), 1064-1066.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 09 Nov 2019 <http://www.tropicos.org/Name/12300488>
- Urbina, H., Breed, M. F., Zhao, W., Gurralla, K. L., Andersson, S. G., Ågren, J., ... & Rosling, A. (2018). Specificity in *Arabidopsis thaliana* recruitment of root fungal communities from soil and rhizosphere. *Fungal biology*, 122(4), 231-240.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., and Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274-8281.

- Vásconez, P., Medina, G., and Hofstede, R. (2001). Los Páramos del Ecuador. Botánica económica de los Andes Centrales, 2006, 91-109.
- Vega, P. 2019. Estudio de la diversidad genética y estructura poblacional del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) en la sierra ecuatoriana. (Bachelor's thesis, Quito: Universidad San Francisco de Quito, 2017).
- Vrålstad, T., Myhre, E., & Schumacher, T. (2002). Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytologist*, 155(1), 131-148.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3), 95-117.
- Wagner, L., Stielow, B., Hoffmann, K., Petkovits, T., Papp, T., Vágvölgyi, C., ... & Voigt, K. (2013). A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 30, 77.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73: 5261–5267.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of botany*, 92(4), 487-511.
- Wolinsky, E., & Rynearson, T. K. (1968). Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. *American Review of Respiratory Disease*, 97(6P1), 1032-1037.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., & Yokota, A. (2010). A life cycle of branched aerial mycelium- and multiple budding spore-forming bacterium *Thermosporothrix hazakensis* belonging to the phylum Chloroflexi. *The Journal of general and applied microbiology*, 56(2), 137-141.
- Yabe, S., Sakai, Y., Abe, K., & Yokota, A. (2017). Diversity of Ktedonobacteria with actinomycetes-like morphology in terrestrial environments. *Microbes and environments*, ME16144.
- Yurgel, S. N., Douglas, G. M., Comeau, A. M., Mammoliti, M., Dusault, A., Percival, D., & Langille, M. G. (2017). Variation in bacterial and eukaryotic communities associated with natural and managed wild blueberry habitats. *Phytobiomes*, 1(2), 102-113.
- Yurgel, S. N., Douglas, G. M., Dusault, A., Percival, D., & Langille, M. G. (2018). Dissecting community structure in wild blueberry root and soil microbiome. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Zhang, X., Liu, W., Schloter, M., Zhang, G., Chen, Q., Huang, J., ... & Han, X. (2013). Response of the abundance of key soil microbial nitrogen-cycling genes to multi-factorial global changes. *PLoS One*, 8(10), e76500.



B

Figure 1. Map showing the three geographical regions of the Ecuadorian highlands based on the patterns of genetic structure of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* A: Northern region; B. Central region; C: Southern region; and D: Atypical group. Each circle represents the collection sites of the rhizosphere samples associated with the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* on the Ecuadorian highlands.

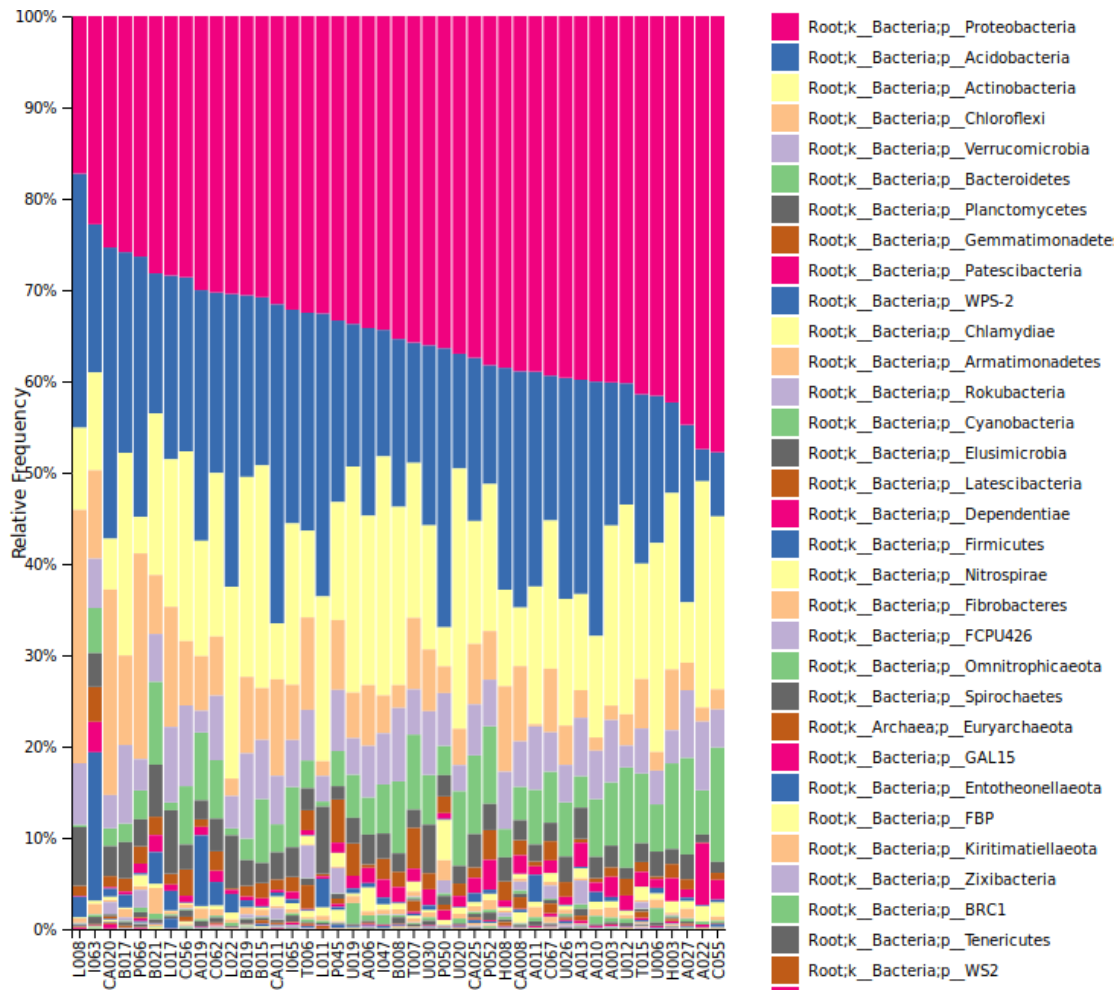


Figure 2. Taxa bar plot of the most abundant bacterial phyla in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* on the Ecuadorian highlands.

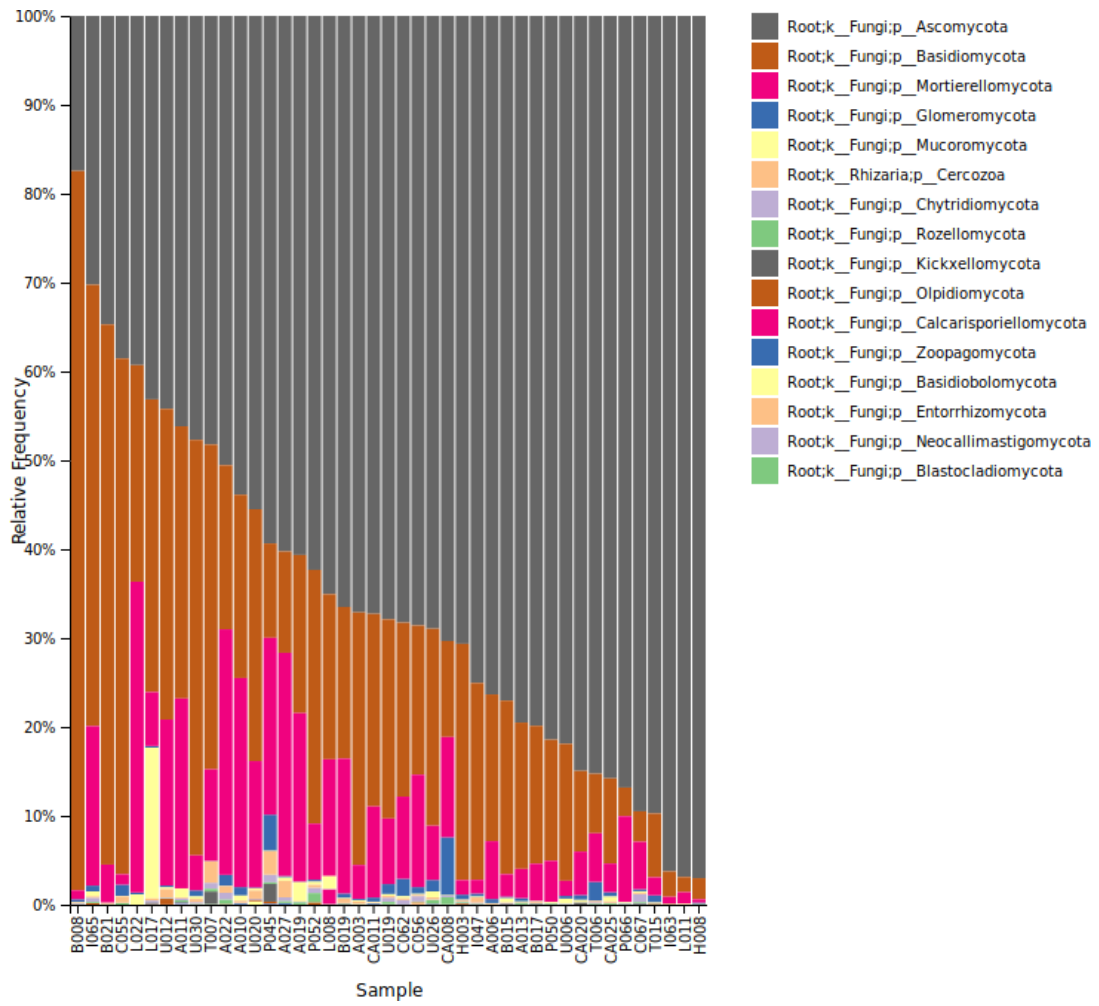


Figure 3. Taxa bar plot of the most abundant fungal phyla in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* on the Ecuadorian highlands.

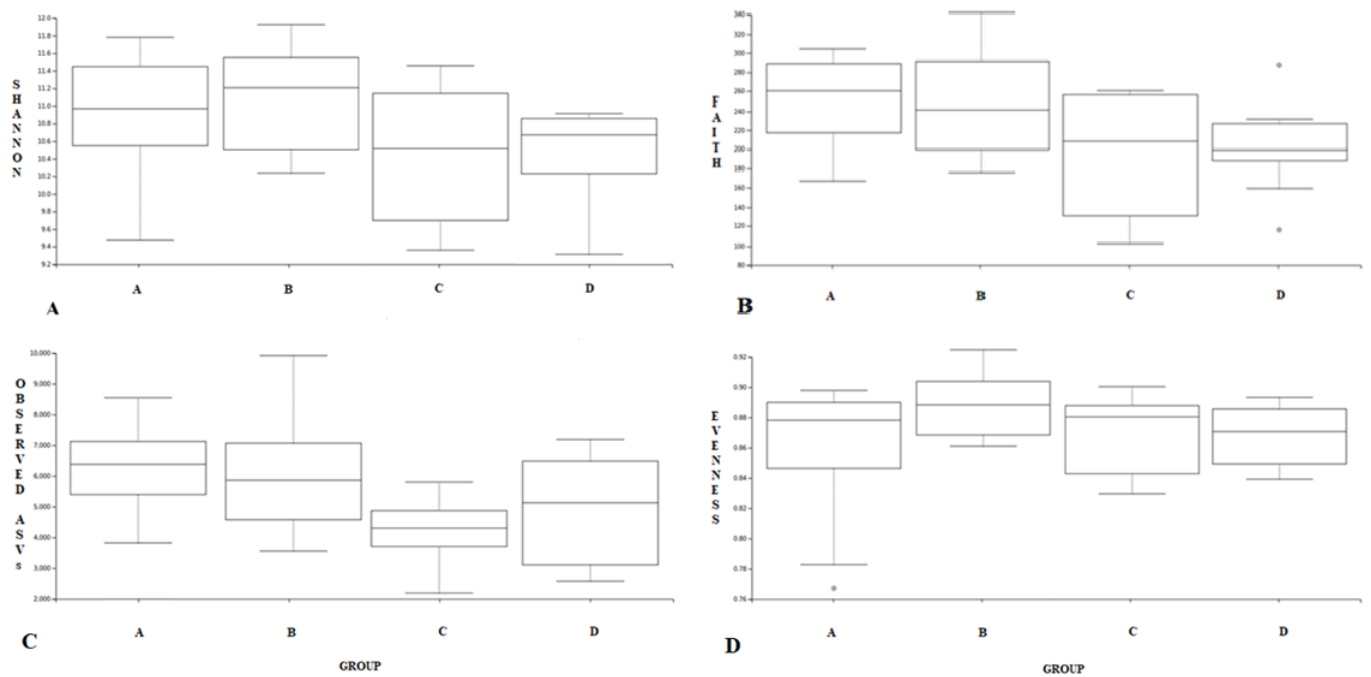


Figure 4. Comparative analysis of the alpha diversity of rhizobacterial communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* between four groups. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highland regions, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Shannon index, B) Faith's phylogenetic diversity, C) Observed ASVs, and D) Evenness index.

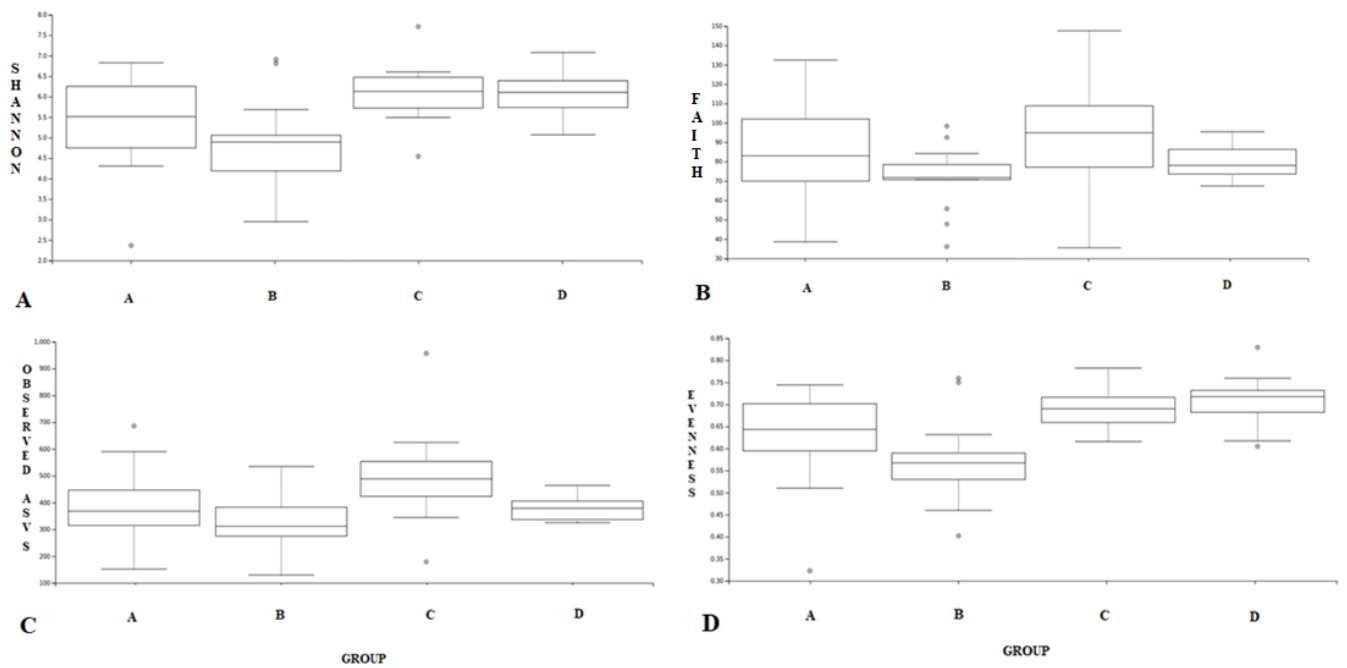


Figure 5. Comparative analysis of the alpha diversity of fungal communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* between four groups. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highlands, except group D: A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Shannon index, B) Faith's phylogenetic diversity, C) Observed ASVs, and D) Evenness index.

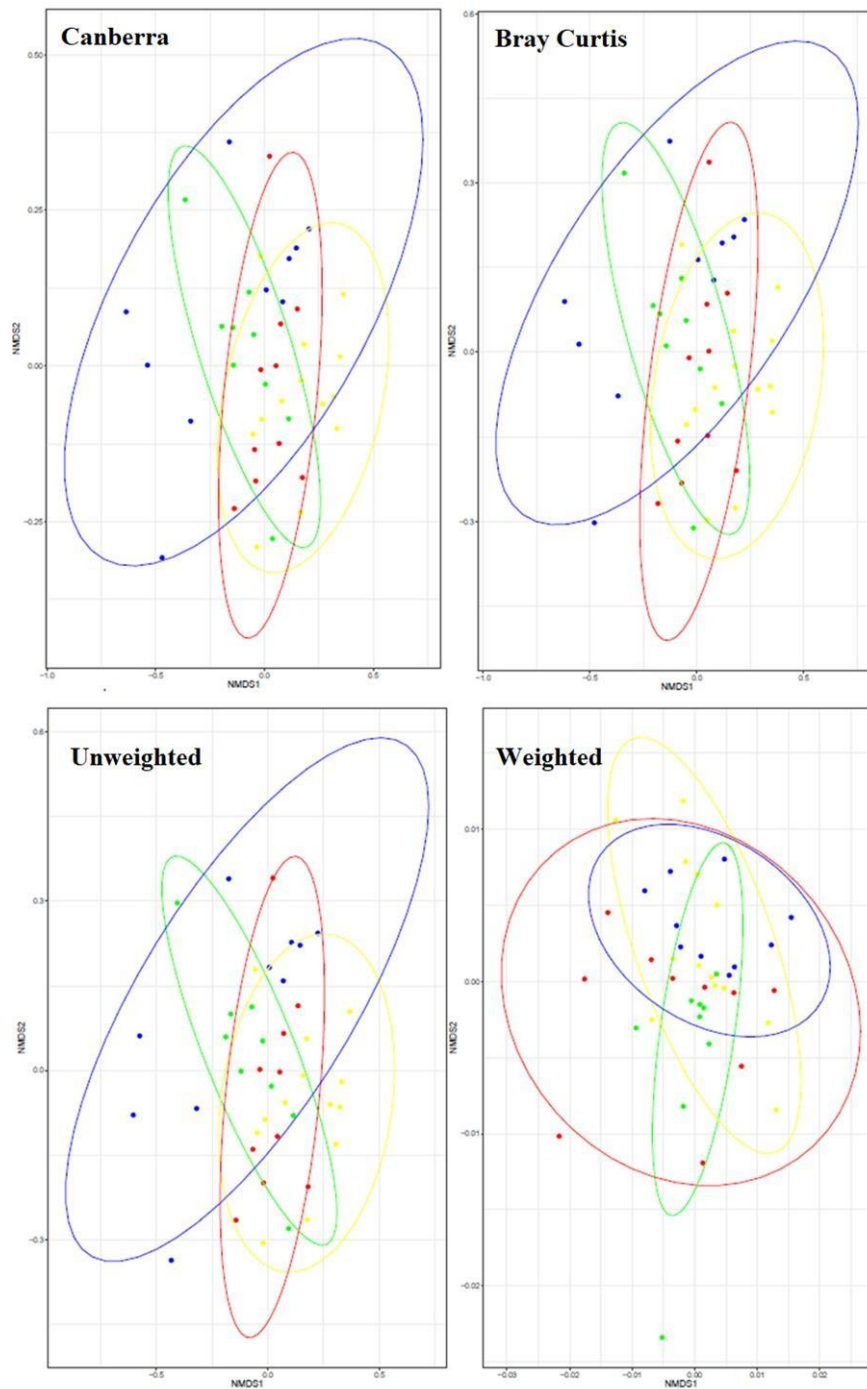


Figure 6. NMDS plots developed with dissimilarity matrices of the beta diversity of rhizobacterial communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum*. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highland regions, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Canberra index, B) Bray Curtis, C) Unweighted UniFrac, and D) Weighted UniFrac.

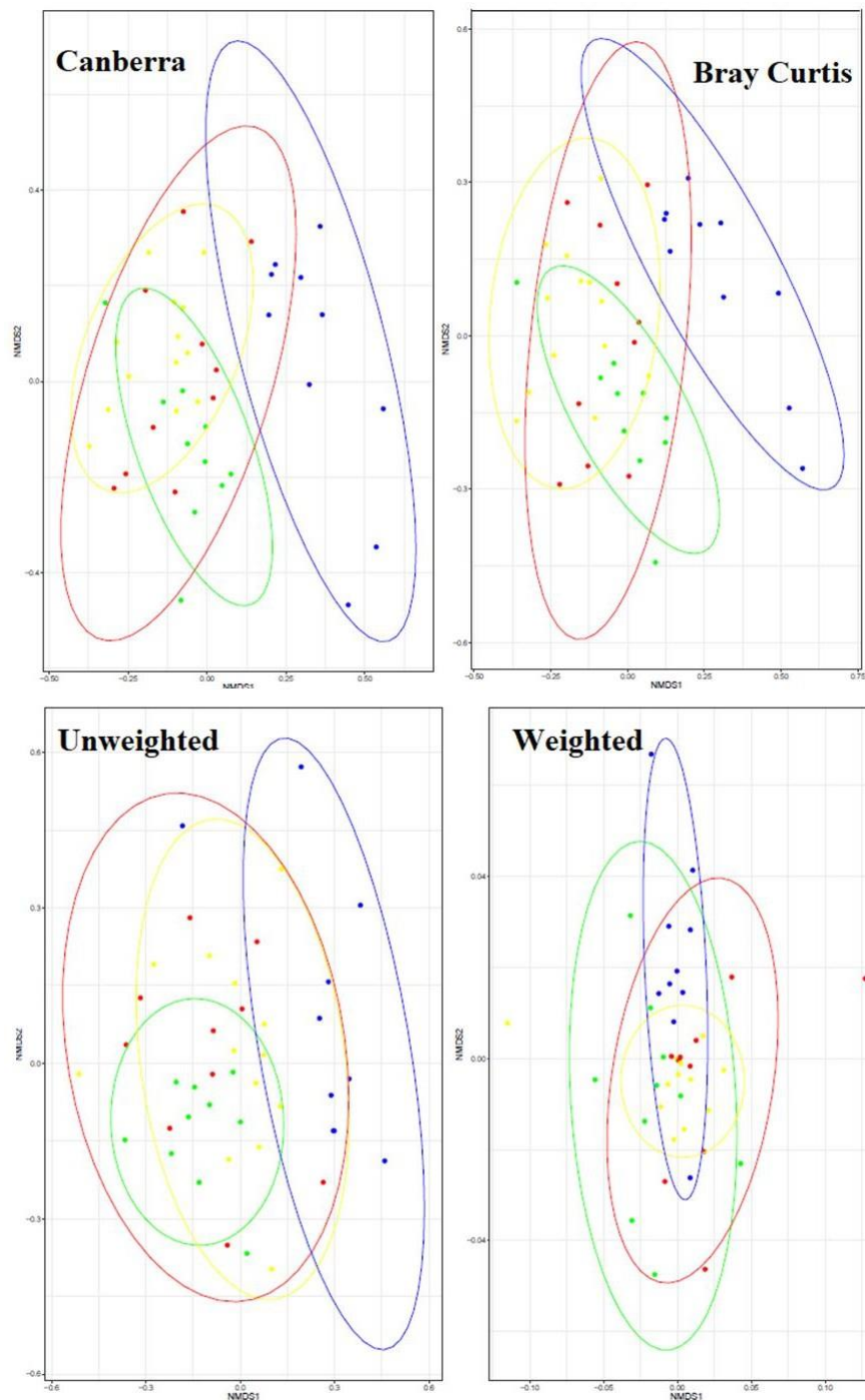


Figure 7. NMDS plots developed with dissimilarity matrices of the beta diversity of fungal communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum*. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highland regions, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Canberra index, B) Bray Curtis, C) Unweighted UniFrac, and D) Weighted UniFrac.

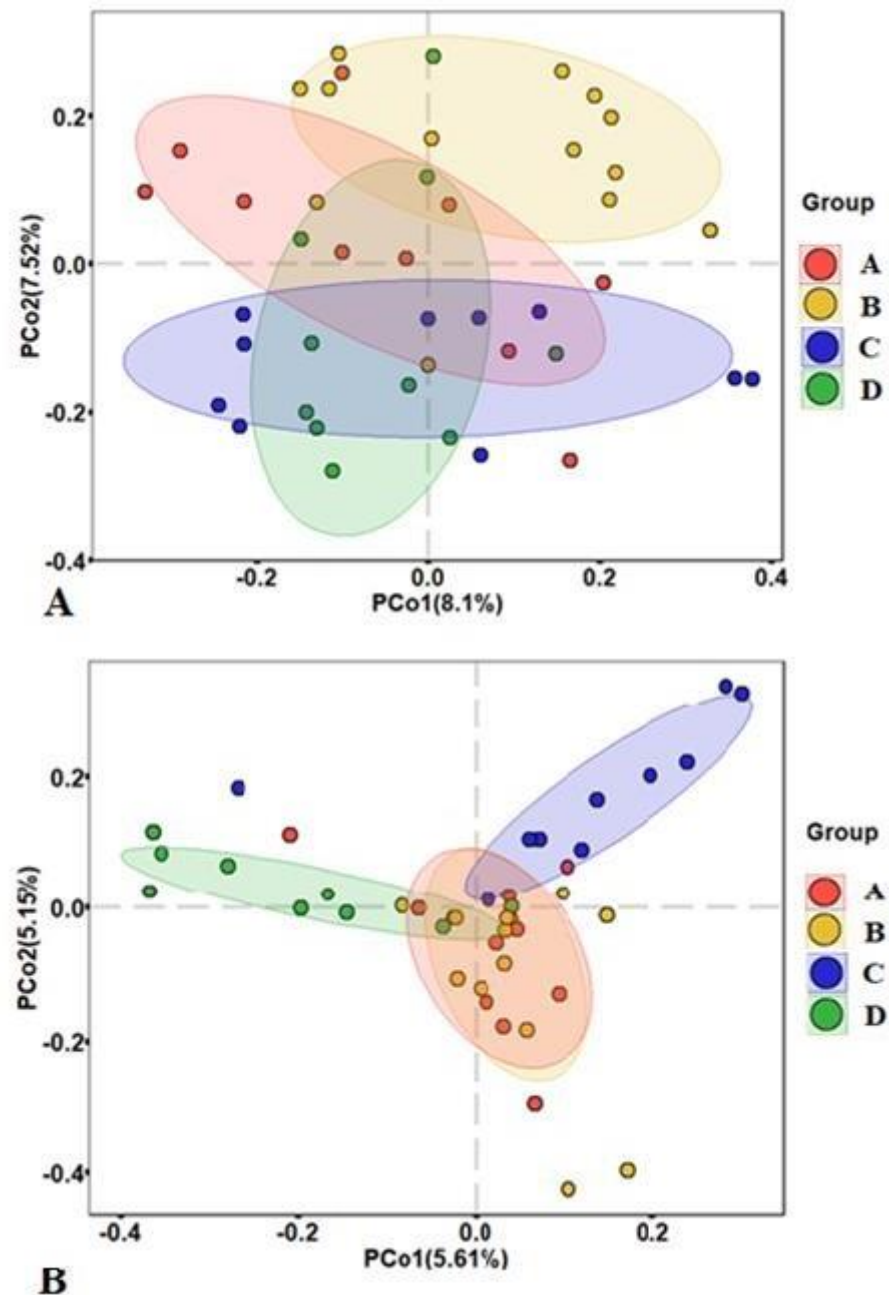


Figure 8. Structure of the microbial communities associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* between four groups. Each group represents a geographic region of the Ecuadorian highlands, except group D. A: northern region, B: central region, C: southern region, D: formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study. A) Principal Coordinate Analysis (PCoA) of bacterial 16S rRNA (PERMANOVA, $P < 0.001$) Bray Curtis relative abundance; B) Principal Coordinate Analysis (PCoA) of fungal ITS (PERMANOVA, $P < 0.001$) Bray Curtis relative abundance.

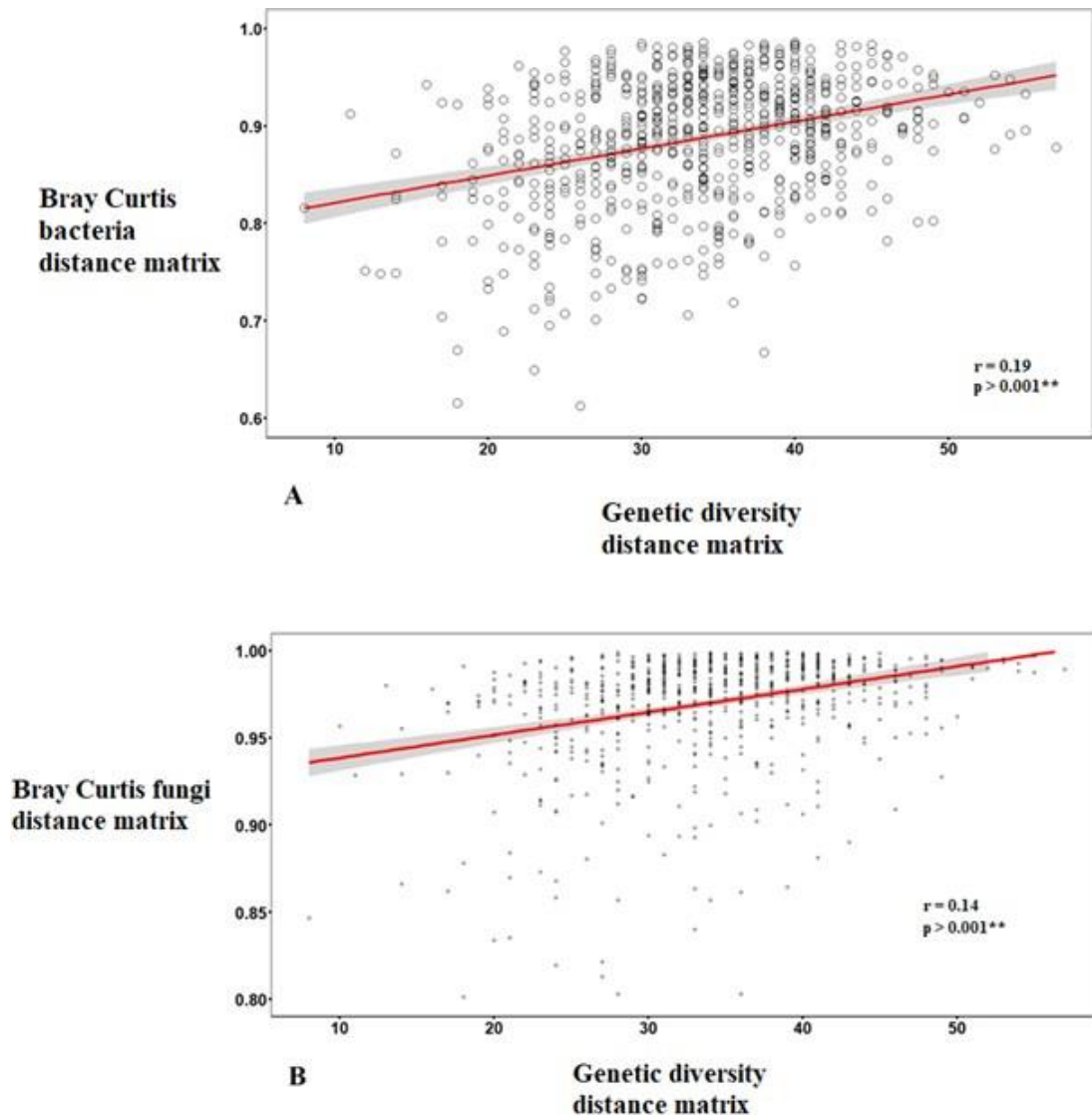


Figure 9. Correlation analyses (Mantel Test) between the bacterial (A) and fungal (B) Bray Curtis distance matrices and the genetic diversity distance matrix of *Vaccinium floribundum* individuals (Vega, 2019).

Relative abundance (%)

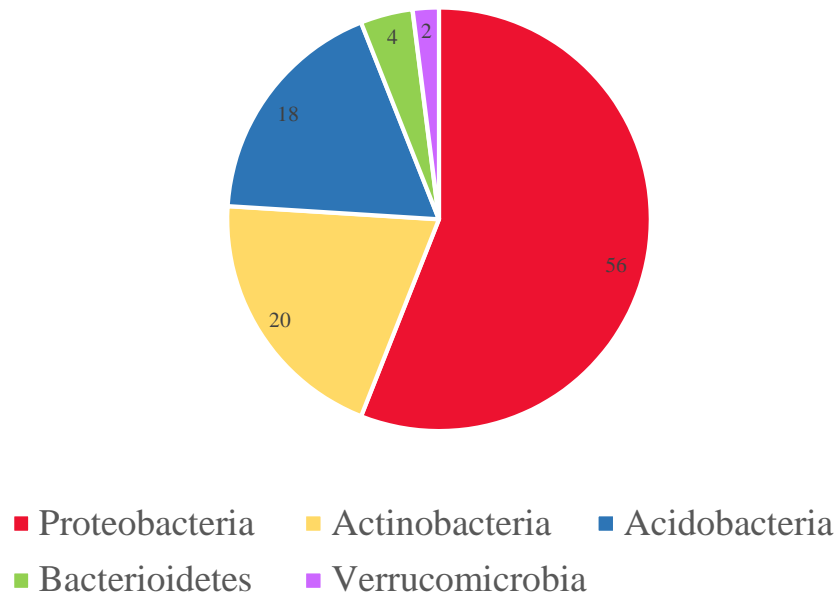


Figure 10. Bacterial core microbiome phyla of the rhizosphere of wild Andean blueberry *Vaccinium floribundum*.

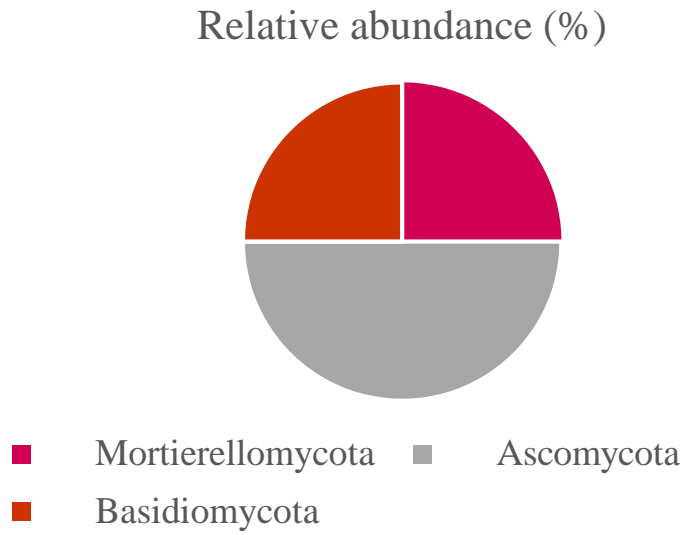


Figure 11. Fungal core microbiome phyla of the rhizosphere of wild Andean blueberry *Vaccinium floribundum*.

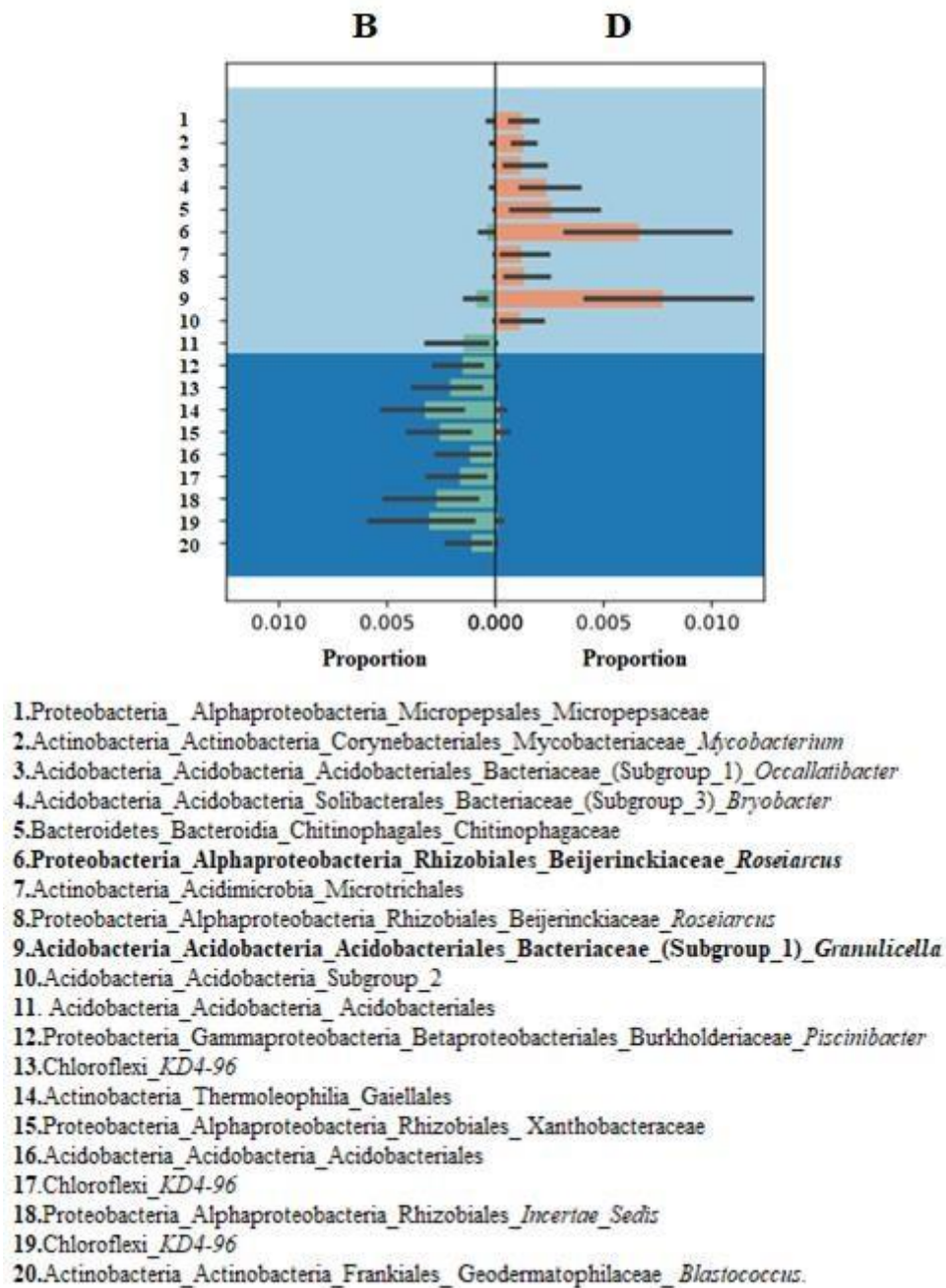
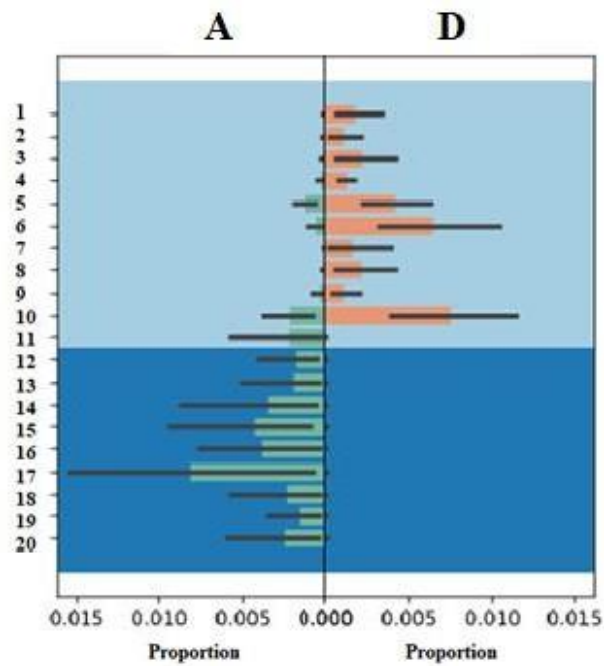
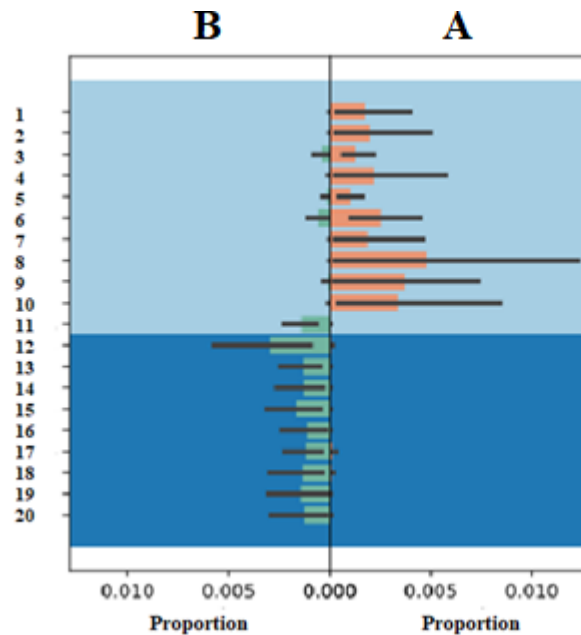


Figure 12. Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and D groups, which represent samples that come from Center region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively.



1. Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Betaproteobacteriales_A21b
2. Actinobacteria_Acidimicrobiia_Microtrichales
3. Actinobacteria_Actinobacteria_Frankiales_Acidothermaceae_Acidothermus
4. Actinobacteria_Actinobacteria_Corynebacteriales_Micobacteriaceae_Mycobacterium
5. Verrucomicrobia_Verrucomicrobia_Chthoniobacterales_Xiphinematobacteraceae_Idatus_Xiphinematobacter
6. Proteobacteria_Alphaproteobacteria_Rhizobiales_Beijerinckiaceae_Roseiarcus
7. Acidobacteria_Acidobacteria_Subgroup_2
8. Proteobacteria_Gammaproteobacteria_WD260
9. Acidobacteria_Acidobacteria_Acidobacteriales_Bacteriaceae_(Subgroup_1)_Occallatibacter
10. Acidobacteria_Acidobacteria_Acidobacteriales_Bacteriaceae_(Subgroup_1)_Granulicella
11. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacteriales_Ktedonobacteriaceae_JG30a-KF-32
12. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacteriales_Ktedonobacteriaceae_JG30a-KF-32
13. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacteriales_Ktedonobacteriaceae_JG30a-KF-32
14. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacteriales_Ktedonobacteriaceae_JG30a-KF-32
15. Chloroflexi_AD3
16. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacteriales_Ktedonobacteriaceae_JG30a-KF-32
17. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacteriales_Ktedonobacteriaceae_JG30a-KF-32
18. WPS-2
19. Chloroflexi_TK10
20. Chloroflexi_AD3

Figure 13. Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between A and D groups, which represent samples that come from Northern region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively.



1. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacterales_Ktedonobacteraceae_JG30a-KF-32
2. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacterales_Ktedonobacteraceae_JG30a-KF32
3. Actinobacteria_Actinobacteria_Frankiales_Acidotherrmaceae_Acidotherrmus
4. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacterales_Ktedonobacteraceae_JG30a-KF-32
5. Acidobacteria_Acidobacteriia_Solibacterales_Bacteraceae_(Subgroup_3)_Candidatus_solibacter
6. Acidobacteria_Acidimicrobiia
7. Acidobacteria_Acidobacteriia_Subgroup_2
7. Acidobacteria_Acidobacteriia_Subgroup_2
8. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacterales_Ktedonobacteraceae_JG30a-KF-32
9. Chloroflexi_Ktedonobacteria_Ktedonobacterales_Ktedonobacteraceae_JG30a-KF-32
10. Gemmatimonadetes_Gemmatimonadetes_Gemmatimonadales_Gemmatimonadaceae
12. Chloroflexi_KD4-96
13. Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Betaproteobacterales_Nitrosomonadaceae_MND1
14. Proteobacteria_Alphaproteobacteria_Rhizobiales
15. Chloroflexi_KD496
16. Actinobacteria_Actinobacteria_Frankiales_Geodermatophiliaceae_Blastococcus
17. Verrucomicrobia_Verrucomicrobiae_Pedosphaerales_Pedosphaeraceae_Pedosphaeraceae
18. Proteobacteria_Alphaproteobacteria_Rhizobiales_Hyphomicrobiaceae_Hyphomicrobium
19. Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Betaproteobacterales_Nitrosomonadaceae
20. Acidobacteria_Blastocatellia_(Subgroup_4)_Pyrinomonadales_Pyrinomonadaceae_RB4.1.

Figure 14. Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and A groups, which represent samples that come from Center and Northern regions, respectively.

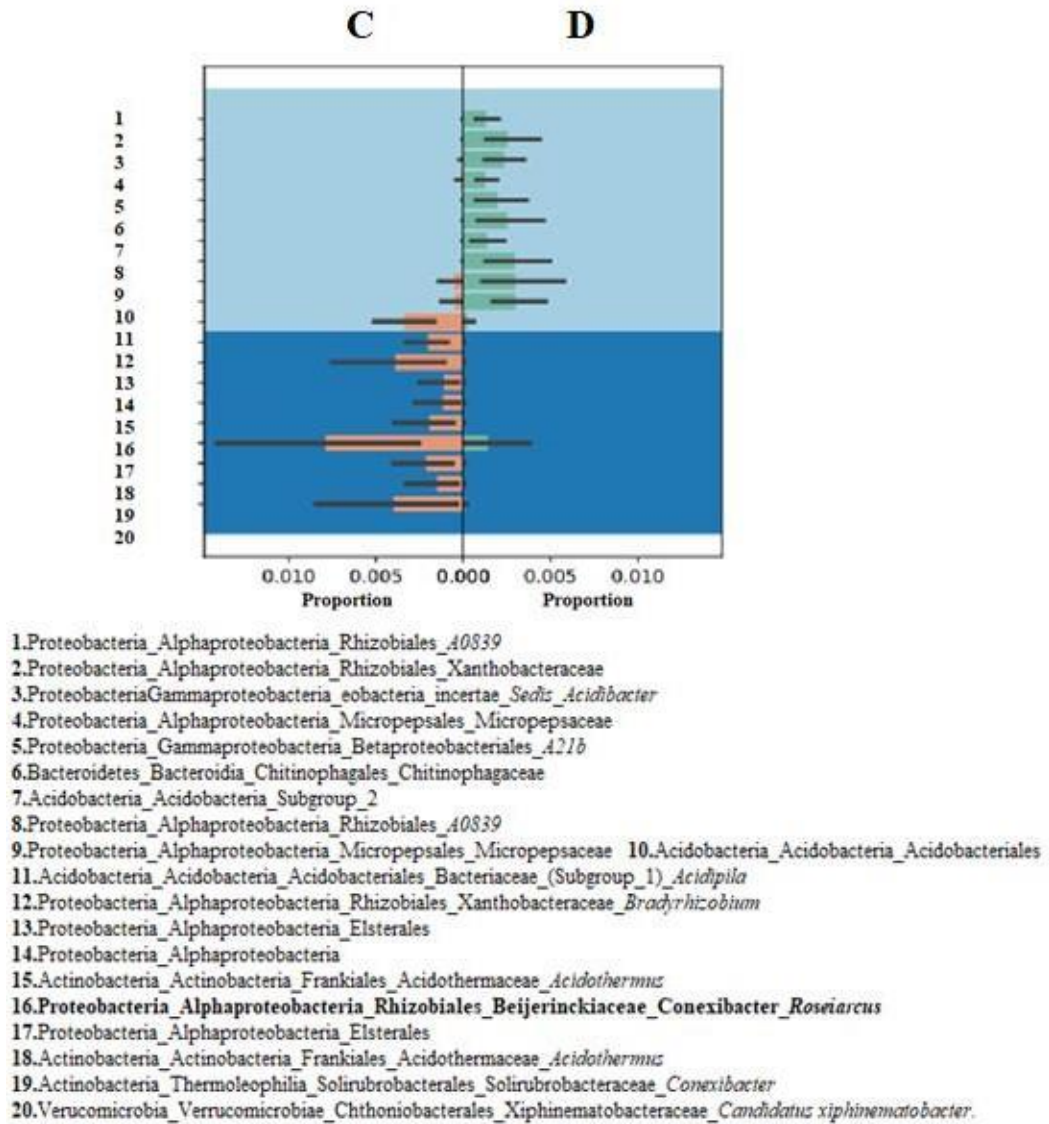


Figure 15. Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and D groups, which represent samples that come from the Southern region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively.

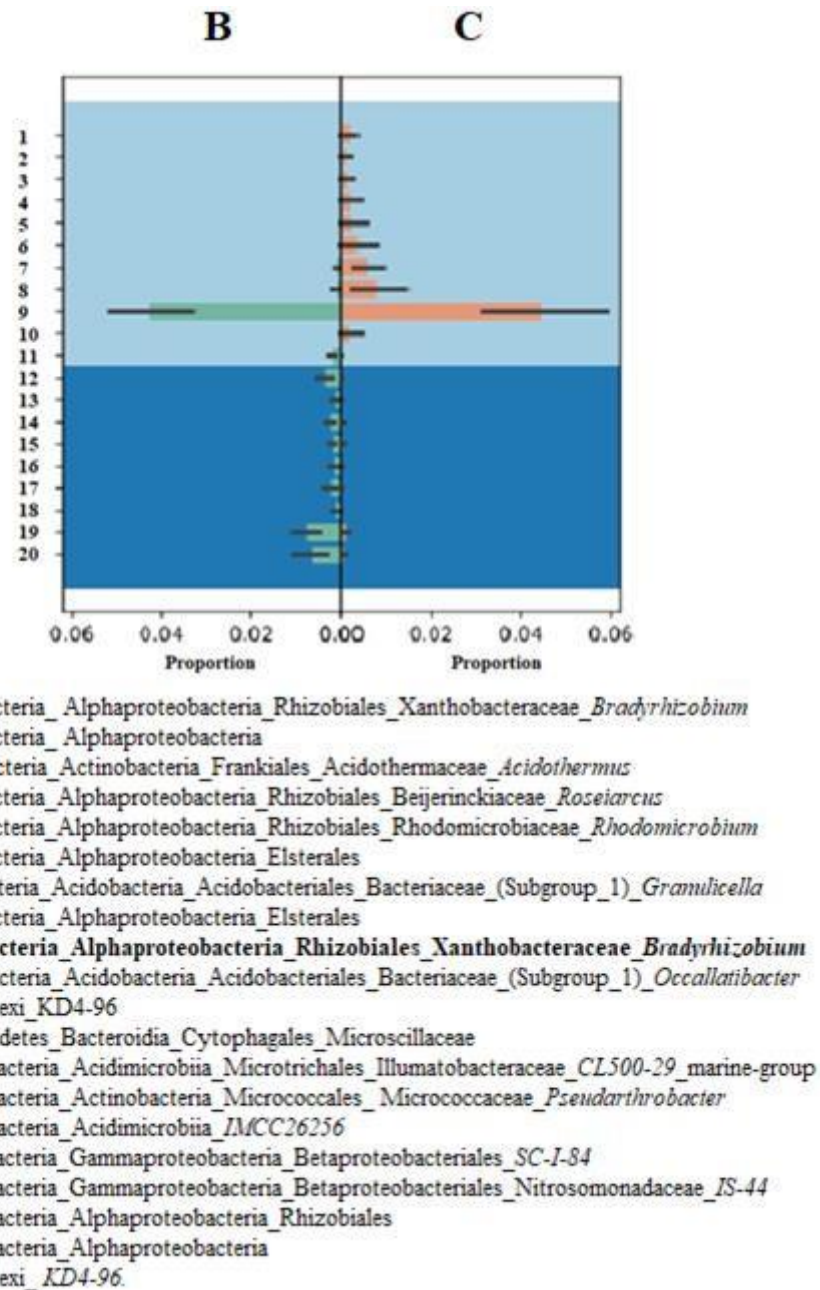


Figure 16. Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and C groups, which represent samples that come from the Center and Southern regions, respectively.

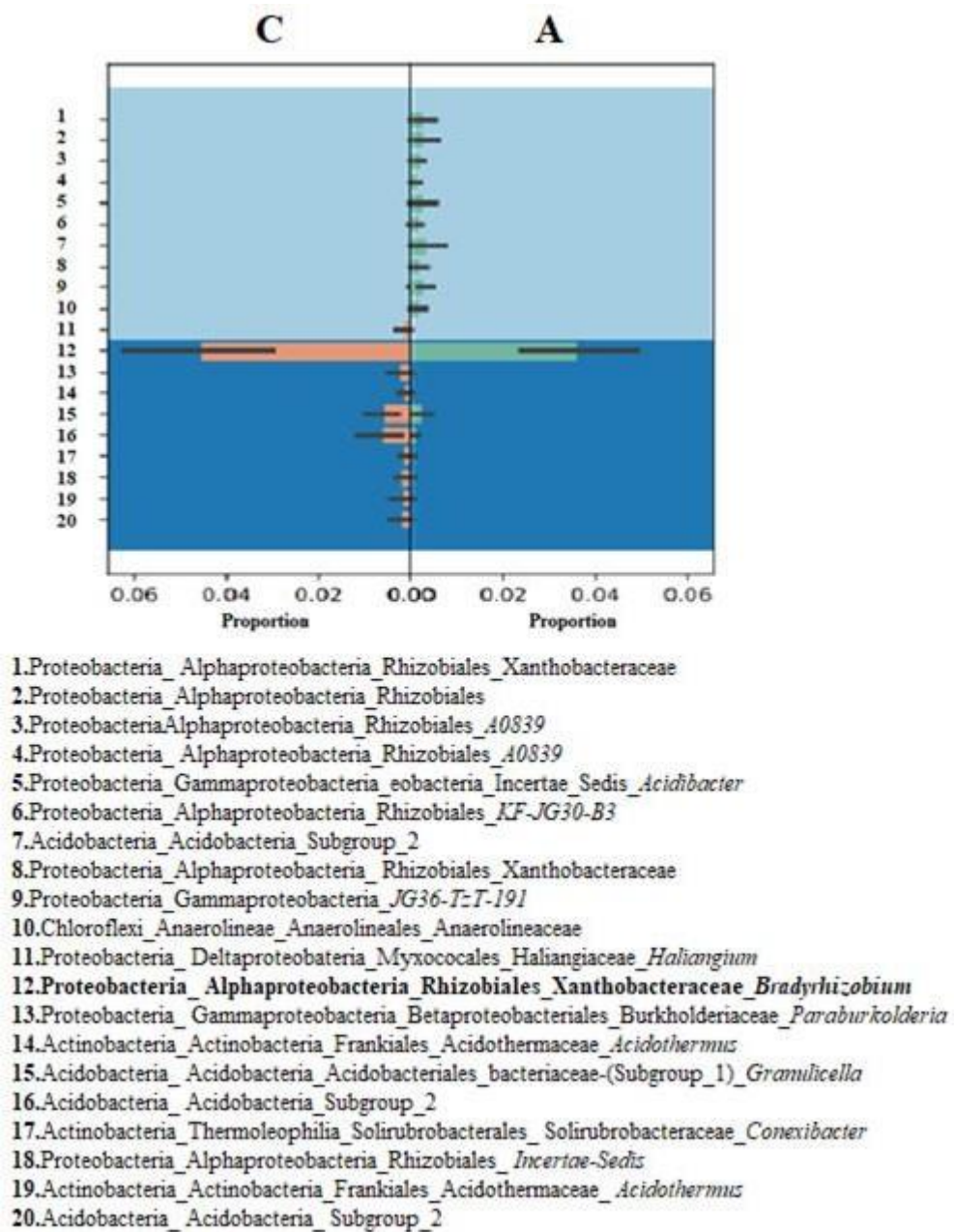


Figure 17. Differential abundance of bacterial ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and A groups, which represent samples that come from the Southern and Northern regions, respectively.

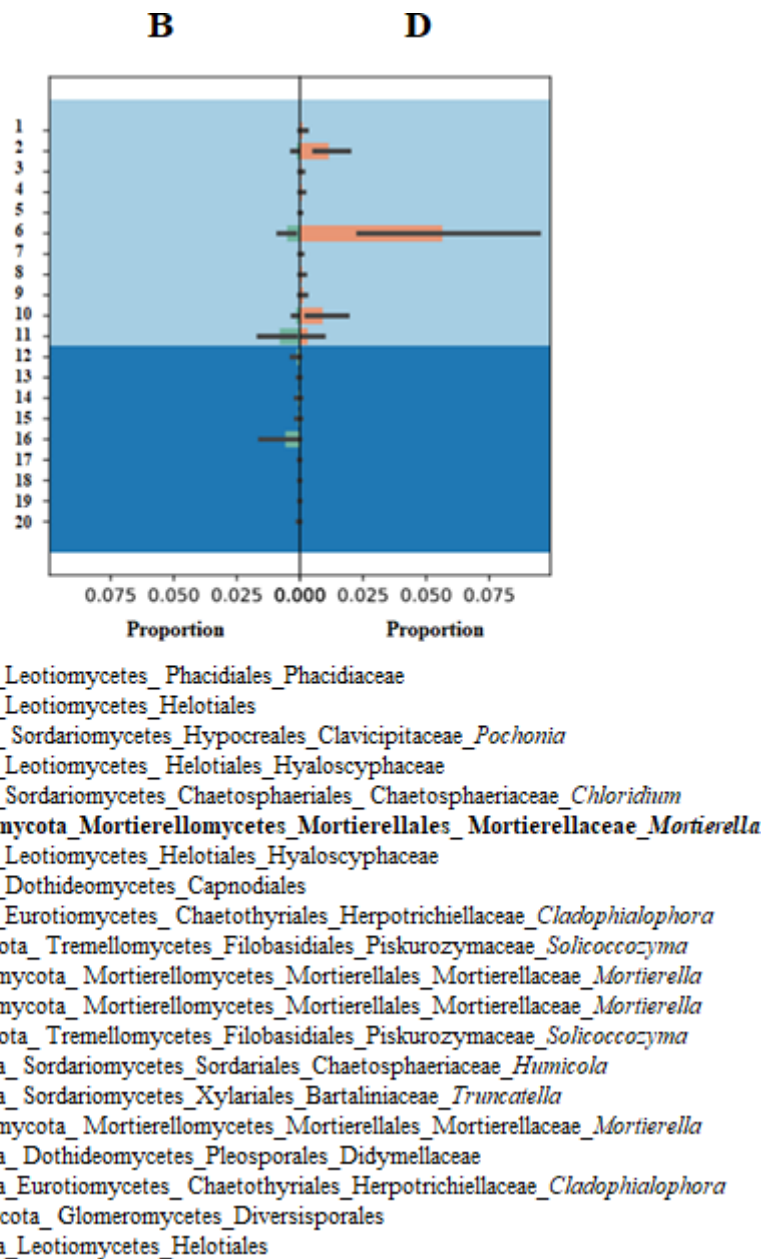


Figure 18. Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and D groups, which represent samples that come from Center region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively.

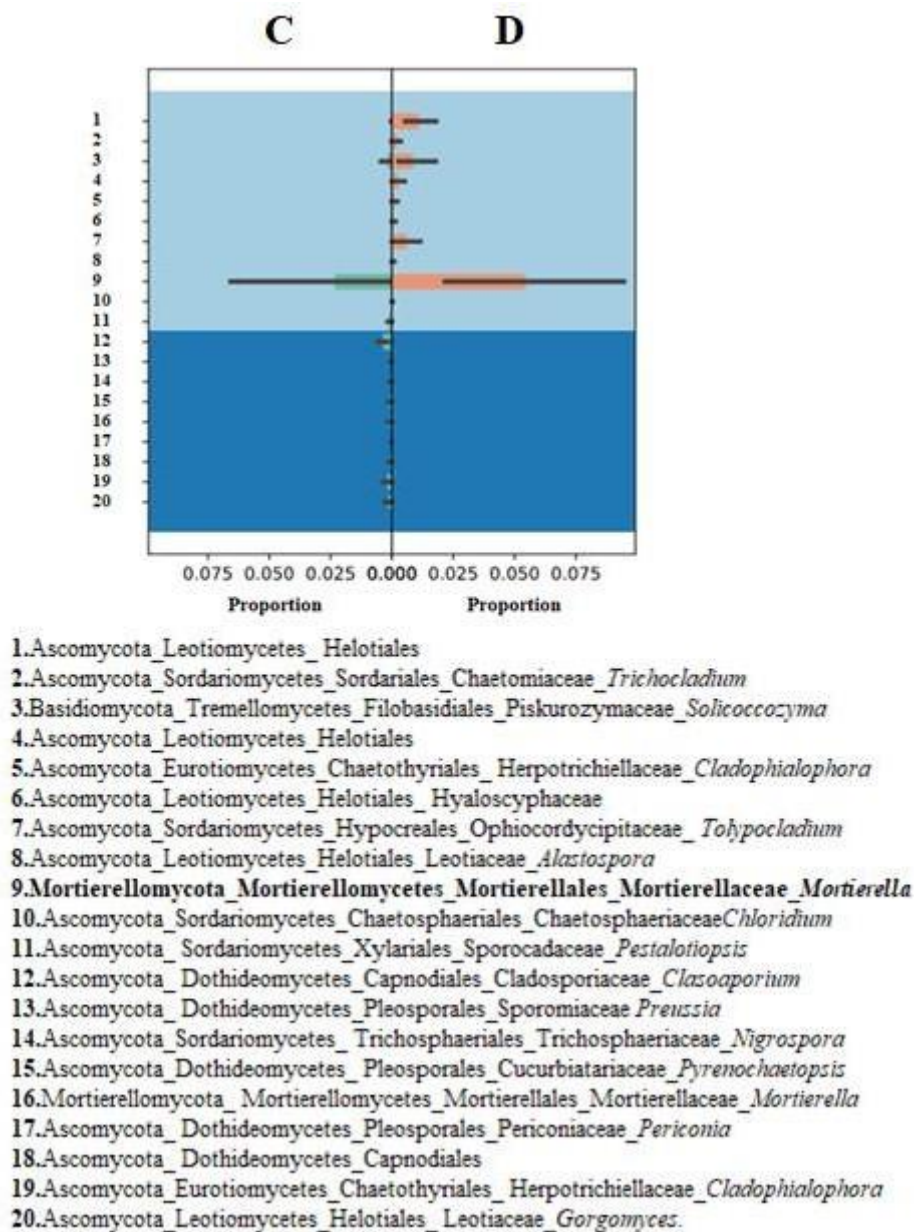


Figure 19. Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and D groups, which represent samples that come from the Southern region and the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study, respectively.

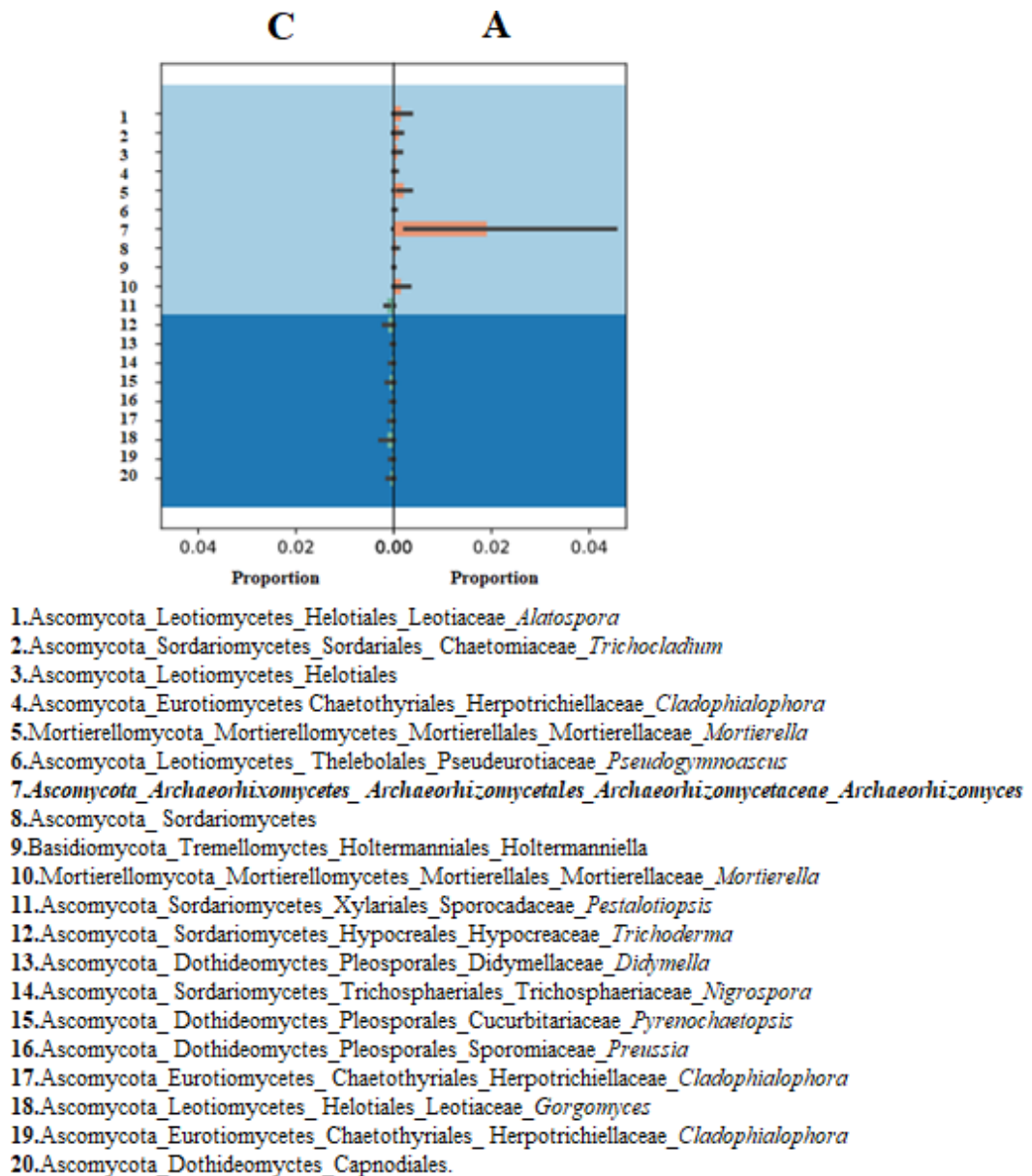


Figure 20. Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and A groups, which represent samples that come from the Southern and Northern regions, respectively.

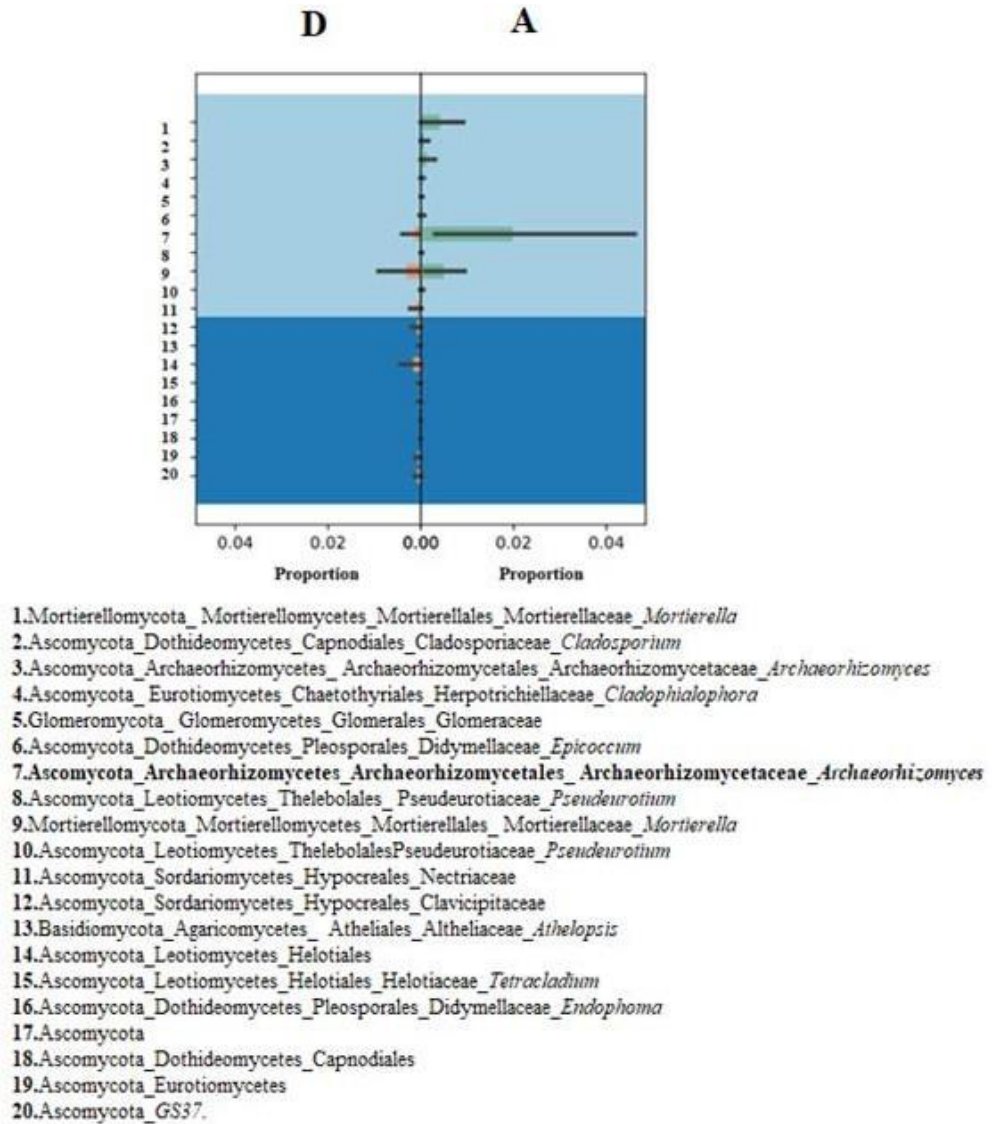


Figure 21. Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between D and A groups, which represent samples that come from the atypical group formed by the two localities sampled at the highest altitude in this study and the Northern region, respectively.

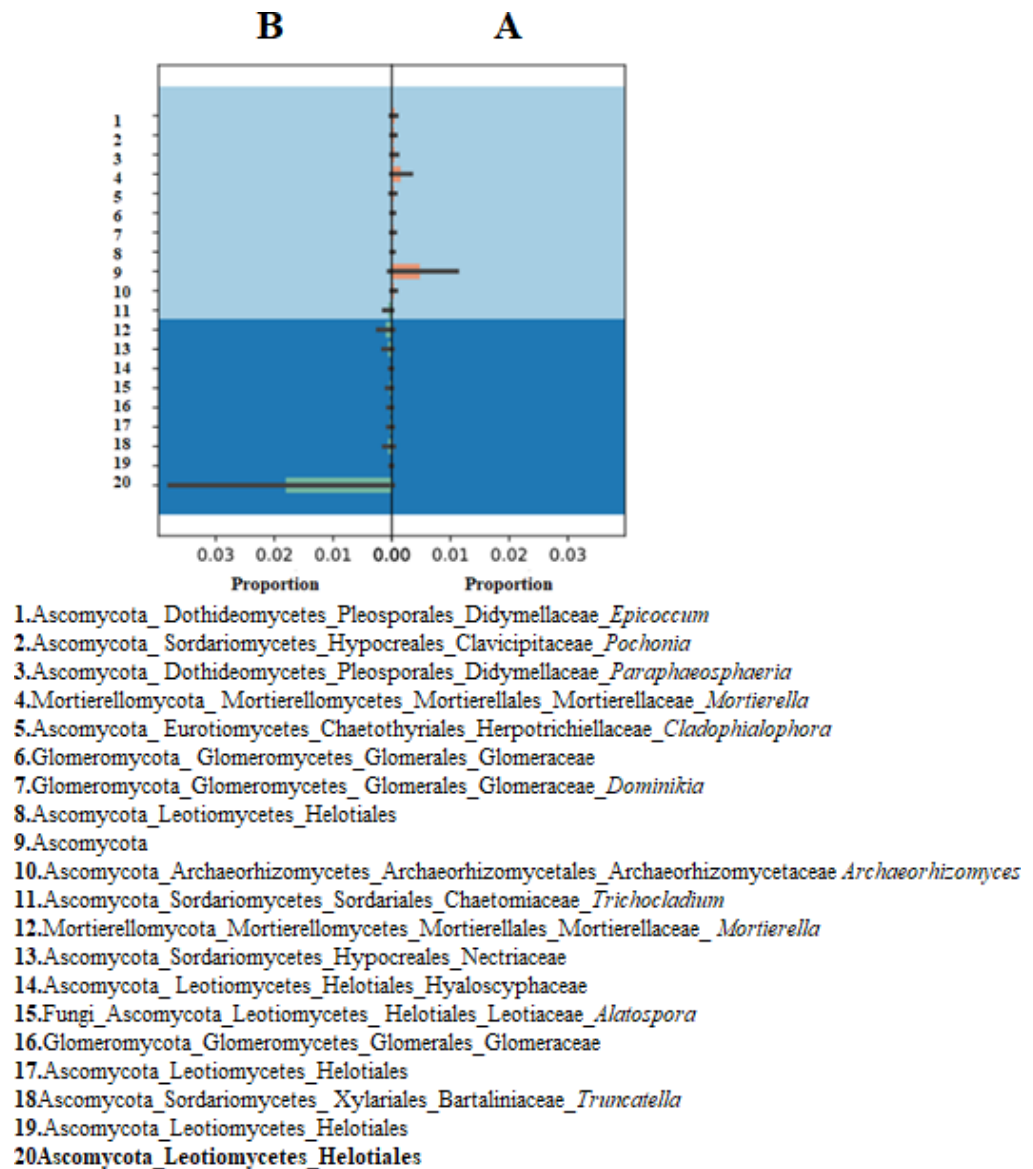


Figure 22. Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between B and A groups, which represent samples that come from Center and Northern regions, respectively.

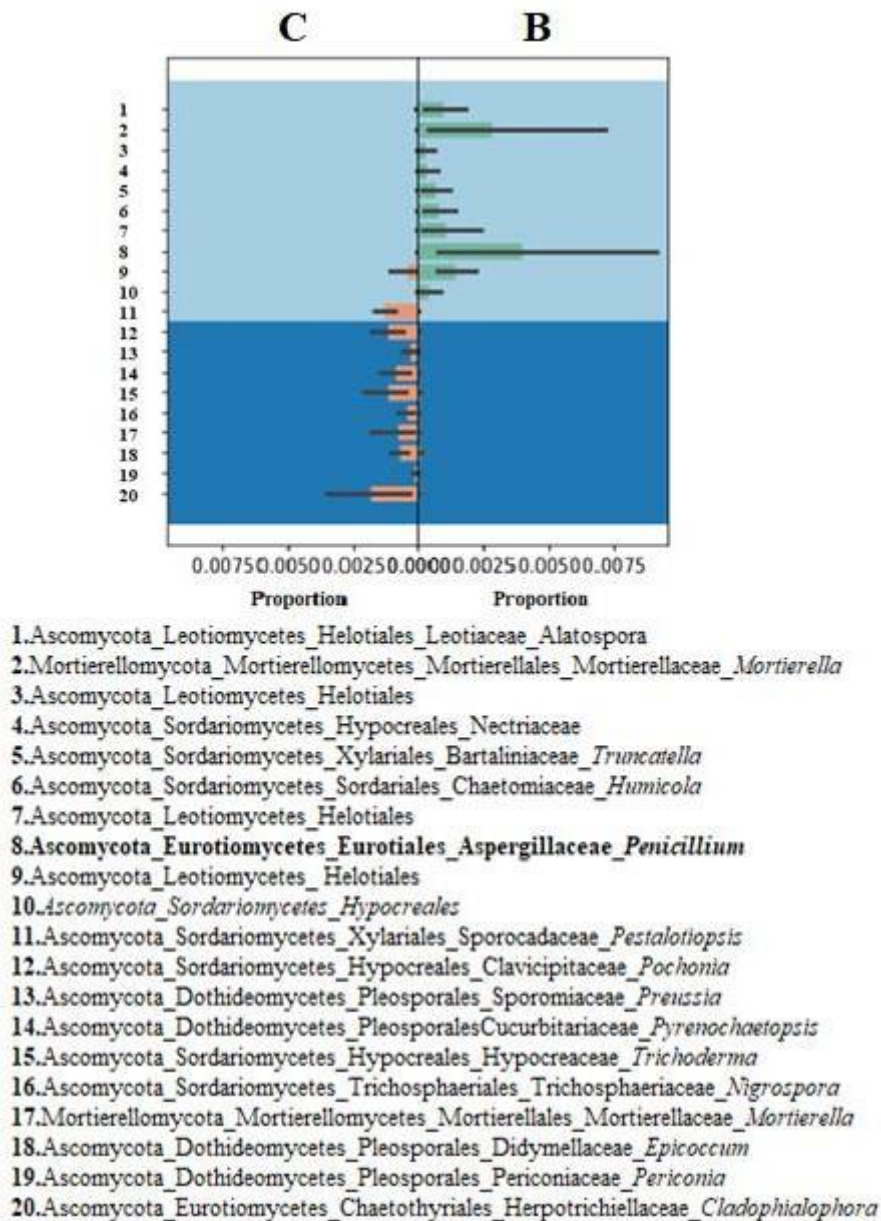


Figure 23. Differential abundance of fungal ASVs in the rhizosphere associated to the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. Pairwise comparisons between C and B groups, which represent samples that come from the Southern and Center regions, respectively.

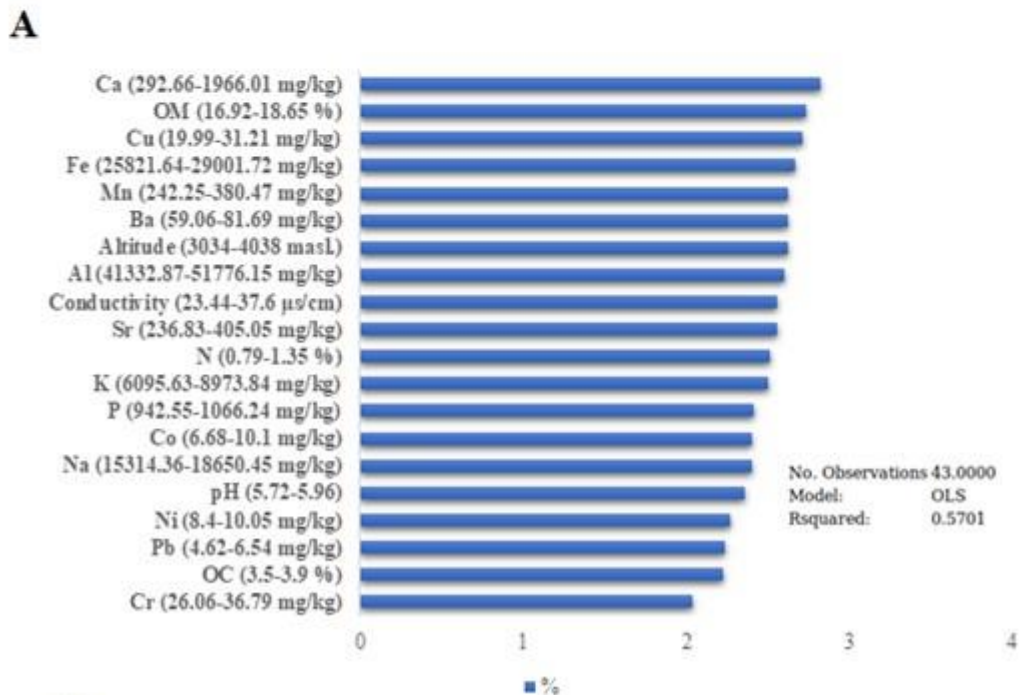
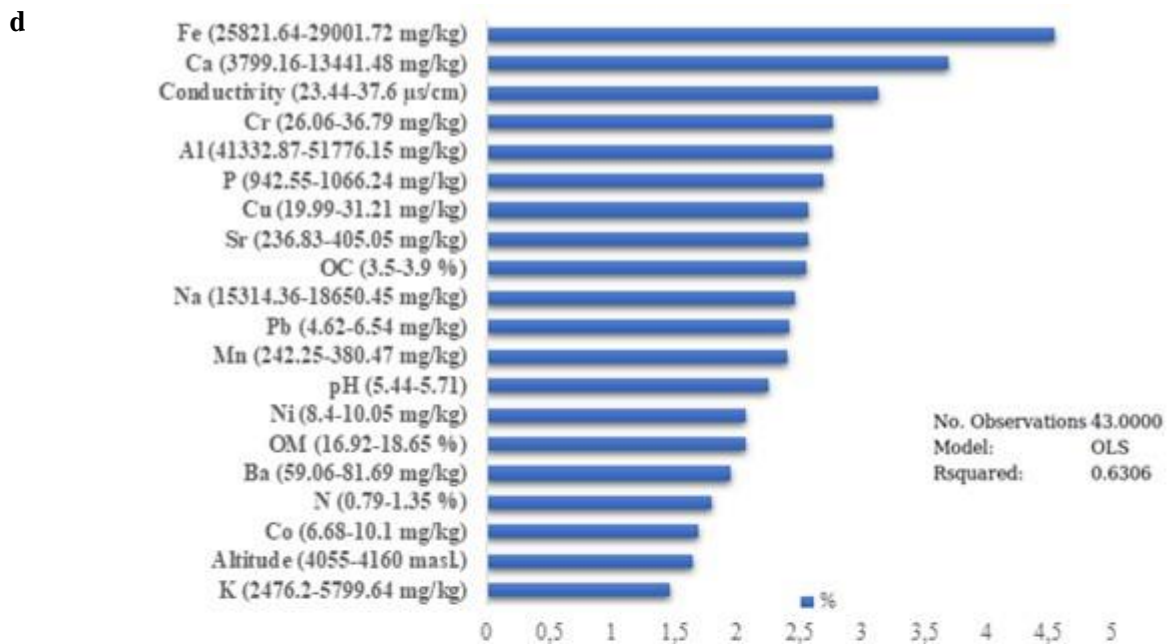


Figure 24. Regression model between soil chemical parameters and microbial communities of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands. A) Variation in bacterial community explained by soil chemical parameters (63%); B) Variation in fungal community explained by soil chemical parameters (57%).

Table 1. Detail of the 43 rhizosphere samples associated with the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* on the Ecuadorian highlands.

ID	PROVINCIA	LOCALIDAD	GROUP	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE
CA008	Carchi	El Ángel	A	0.6464	-77.8987	3376
CA011	Carchi	San Gabriel	A	0.6511	-77.83775	3459
CA020	Carchi	San Gabriel	A	0.65938	-77.84093	3459
CA025	Carchi	La Cofradía	A	0.70915	-77.73498	3251
I047	Imbabura	Cotacachi	A	0.2894	-78.35135	3091
I063	Imbabura	Santa Lucía	A	0.28515	-78.19333	3022
I065	Imbabura	Cahuasquí	A	0.5698	-78.27623	3605
P066	Pichincha	Mojanda	A	0.10018	-78.2547	3765
P045	Pichincha	Lloa	B	-0.20765	-78.60143	3519
P050	Pichincha	Lloa	B	-0.20743	-78.60305	3519
P052	Pichincha	Cayambe	A	-0.0213	-78.05341	3761
C055	Cotopaxi	PNC	A	-0.56439	-78.442	3693
C056	Cotopaxi	Quilotoa	D	-0.99943	-78.92696	4118
C062	Cotopaxi	Quilotoa	D	-1.00103	-78.9277	4118
C067	Cotopaxi	Sigchos	B	-0.71411	-78.89639	3137
T006	Tungurahua	Carihuairazo	B	-1.37236	-78.69058	3724
T007	Tungurahua	Carihuairazo	B	-1.37268	-78.68983	3724
T015	Tungurahua	Tisandeo	B	-1.16904	-78.46993	3559
B008	Bolívar	Cebapamba	B	-1.7187	-78.96944	3265
B015	Bolívar	Salinas de Guaranda	B	-1.40108	-79.01668	3638
B017	Bolívar	Salinas de Guaranda	B	-1.4019	-79.01726	3638
B019	Bolívar	Salinas Norte	B	-1.37025	-79.00305	4054
B021	Bolívar	Salinas Norte	B	-1.37001	-79.00293	4054
H003	Chimborazo	Chambo y Quimiac	B	-1.67358	-78.51653	3689
H008	Chimborazo	Chambo y Quimiac	B	-1.68016	-78.5104	3689
U006	Cañar	S. Miguel de Poroto	C	-2.80866	-78.82261	3076
U012	Cañar	Cerro Abuga	C	-2.7208	-78.82388	3044
U019	Cañar	Cerro Abuga	C	-2.72063	-78.82381	3044

U020	Cañar	Cerro Abuga	C	-2.71971	-78.82371	3044
U026	Cañar	Surimpalti	C	-2.74091	-78.96926	3044
U030	Cañar	Surimpalti	C	-2.7503	-78.96886	3044
A003	Azuay	Cajas-Toreadora	D	-2.78315	-79.22403	3944
A006	Azuay	Cajas-Toreadora	D	-2.78251	-79.22559	3944
A010	Azuay	Cajas-Toreadora	D	-2.78205	-79.22653	3944
A011	Azuay	Cajas	D	-2.77533	-79.23739	4081
A013	Azuay	Cajas	D	-2.77446	-79.23775	4081
A019	Azuay	Cajas	D	-2.77278	-79.23671	4081
A022	Azuay	Cajas-Cruces	D	-2.77678	-79.24123	4155
A027	Azuay	Cajas-Cruces	D	-2.77696	-79.24128	4155
L008	Loja	Saraguro	C	-3.59866	-79.27678	2954
L011	Loja	Podocarpus	C	-4.11211	-79.17345	3053
L017	Loja	Podocarpus	C	-4.11171	-79.17496	3053
L022	Loja	Santiago	C	-3.82048	-79.2984	2892

Table 2. Alpha diversity metrics of bacterial communities of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands.

VARIABLE	CORE METRICS ALPHA DIVERSITY			
	FAITH	OBSERVED ASVs	EVENNESS	SHANNON
Group	0.021*	0.02*	-	-
Altitude	-	-	-	-
pH	-	-	-	-
OC	-	-	0.04*	--
OM	-	-	-	-
Conductivity	-	-	-	-
N	-	-	-	-
Al	-	-	0.010**	-
Ba	0.02*	0.04*	-	0.04*
Ca	-	-	-	-
Cd	0.03*	0.05*	0.029*	0.05*
Co	0.02*	0.015*	0.01*	0.015*
Cu	-	-	-	-
Cr	-	-	-	-
Fe	0.0064**	0.02*	0.014*	0.02*
K	-	-	-	-
Mg	-	-	-	-
Mn	0.051*	-	-	-
Na	-	-	-	-
Ni	-	-	-	-
P	0.01**	0.0009***	0.0007***	0.0009***
Pb	-	-	-	-
Sr	-	-	-	-
V	-	-	0.009**	-
Zn	0.023*	0.006**	-	0.006**

Significance levels are shown at *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001.**

Table 3. Beta diversity metrics of bacterial communities of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands.

VARIABLE	CORE METRICS BETA DIVERSITY			
	UNWEIGHTED	WEIGHTED	BRAY CURTIS	JACCARD
Group	0.001***	-	0.001***	0.001***
Altitude	0.03*	0.026*	-	0.029*
pH	0.005**	0.022*	0.001***	0.001***
OC	0.035*	-	0.009**	0.005**
OM	0.005**	0.046*	0.019*	0.007**
Conductivity	-	-	-	-
N	-	-	-	-
Al	0.001***	0.01**	0.001***	0.001***
Ba	0.001***	0.006**	0.001***	0.001***
Ca	0.001***	0.002**	0.001***	0.001***
Cd	0.001***	0.024*	0.001***	0.001***
Co	0.001***	0.003***	0.001***	0.002**
Cu	0.027*	0.05*	0.024*	0.01**
Cr	0.036*	0.05*	0.047*	-
Fe	0.001***	0.006**	0.001***	0.001***
K	0.006**	0.05*	0.006**	0.002**
Mg	0.001***	0.01**	0.001***	0.001***
Mn	0.003**	0.01**	0.001***	0.002**
Na	0.001***	0.029*	0.001***	0.001***
Ni	0.038*	0.035*	0.017*	0.019*
P	0.001***	0.003**	0.001***	0.001***
Pb	0.003**	-	0.002**	0.001***
Sr	0.001***	0.038*	0.001***	0.001***
V	0.002**	0.01**	0.004**	0.003**
Zn	0.003**	0.01**	0.003**	0.004**

Significance levels are shown at *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001.**

Table 4. Alpha diversity metrics of fungal communities of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands.

CORE METRICS ALPHA DIVERSITY				
	FAITH	EVENNESS	OBSERVED ASVs	SHANNON
Group	0.05*	0.01**	0.05*	0.02*
pH	-	-	-	-
OC	-	-	-	-
OM	-	-	-	-
Conductivity	-	-	-	-
N	0.049*	-	0.026*	-
Al	0.024*	-	0.05*	-
Ba	-	-	-	-
Ca	-	-	-	-
Cd	0.006**	0.021*	0.01**	0.014*
Co	-	-	-	-
Cu	0.02*	0.044*	0.01**	0.01**
Cr	-	-	-	-
Fe	0.007**	0.029*	0.01**	0.02*
K	-	-	-	-
Mg	-	0.05*	-	-
Mn	-	-	-	-
Na	-	-	-	-
Ni	-	-	0.016*	-
P	-	-	-	-
Pb	0.006**	-	0.007**	-
Sr	-	0.033*	-	-
V	0.04*	-	-	-
Zn	-	-	-	-

Significance levels are shown at *P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001.**

Table 5. Beta diversity metrics of fungal communities of the Andean blueberry *Vaccinium floribundum* in the Ecuadorian highlands.

VARIABLE	CORE METRICS BETA DIVERSITY			
	UNWEIGHTED	WEIGHTED	BRAY CURTIS	JACCARD
Group	0.001***	0.003**	0.001***	0.001***
Altitude	0.01**		0.004**	0.003
pH	0.001***	0.029*	0.001***	0.001***
OC	0.01**		0.001***	0.002**
OM	0.005**	0.006**	0.001***	0.001***
Conductivity	-	-	-	-
N	-	-	0.02	-
Al	0.001***	0.01**	0.001***	-
Ba	0.001***	0.004**	0.001***	0.001***
Ca	0.001***	0.002**	0.001***	0.001***
Cd	0.001***	0.001***	0.001***	0.001***
Co	0.001***	0.001***	0.001***	0.001***
Cu	0.001***	0.031*	0.001***	0.003**
Cr	0.013*	0.004**	0.007**	0.013*
Fe	0.001***	0.003**	0.001***	0.001***
K	0.001***	0.024*	0.001***	0.001***
Mg	0.001***	0.003**	0.001***	0.001***
Mn	0.001***	-	0.001***	0.001***
Na	0.001***	0.007**	0.001***	0.001***
Ni	0.007**	-	0.01**	0.005**
P	0.001***	0.006**	0.001***	0.001***
Pb	0.001***	0.04*	0.001***	0.001***
Sr	0.001***	0.006**	0.002**	0.001***
V	0.005**	0.031*	0.001***	0.003**
Zn	0.014*	0.01**	0.001***	0.008**

Significance levels are shown at *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.