



Universidad
Rey Juan Carlos

GRADO EN BIOLOGÍA
Curso Académico 2023/24
Trabajo de Fin de Grado

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD FUNCIONAL DEL SUELO DE
ENCINAS AFECTADAS POR EL FITOPATÓGENO
Phytophthora cinnamomi EN LA DEHESA BOYAL DE
COLMENAREJO**

Autor: Pablo Checa Verdugo

Directores: Natalia González Benítez y Luis Merino Martín

Índice

1. Resumen
2. Introducción
3. Materiales y métodos
 - 3.1. Área de estudio
 - 3.2. Estudio experimental
 - 3.2.1. Parámetros fisicoquímicos
 - 3.2.2. Parámetros biológicos
 - 3.2.2.1. Respiración inducida por múltiples sustratos (MSIR)
 - 3.2.2.2. Sensibilidad térmica (Q10)
 - 3.3. Análisis estadísticos
4. Resultados
 - 4.1. Respiración basal
 - 4.2. Diversidad funcional
 - 4.3. Actividad catabólica
 - 4.4. Análisis multivariante (NMDS)
 - 4.5. Sensibilidad térmica (Q10)
5. Discusión
6. Conclusión
7. Bibliografía

Resumen

Este estudio analiza la diversidad funcional del suelo en encinas afectadas por el patógeno *Phytophthora cinnamomi* en un sistema agroforestal mediterráneo con alta biodiversidad en la Dehesa Boyal de Colmenarejo, Madrid. Se aplicaron diferentes tratamientos contra el hongo patógeno *P. cinnamomi* para estudiar cómo influyen en las comunidades microbianas del suelo. Los tratamientos fueron endoterapia con fosetil de aluminio, enmienda caliza, una combinación de ambos y un control sin ningún tratamiento. Se analizaron parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo, incluyendo la respiración microbiana inducida por múltiples sustratos (MSIR) y la sensibilidad térmica de la comunidad (Q10). Los resultados mostraron que los diferentes tratamientos no afectaron significativamente a la respiración basal y potencial, así como la diversidad funcional y la sensibilidad térmica de las comunidades microbianas. Se observaron diferencias significativas en el metabolismo de los aminoácidos y en la época de muestreo siendo abril la época de mayor productividad. Estos hallazgos proporcionan información crucial para la gestión sostenible de las dehesas, ya que permiten comprender mejor cómo mantener la salud del suelo y la biodiversidad microbiana, esenciales para la resiliencia del ecosistema. Además, la mejora de la función del suelo contribuye a la captura de carbono, ayudando a mitigar los efectos del cambio climático y asegurando la preservación de los servicios ecosistémicos que estas áreas proporcionan.

Introducción

Las dehesas son sistemas agroforestales artificiales emblemáticos por los altos niveles de biodiversidad que presentan, específicos del suroeste de la península ibérica. Se caracterizan por resultar de la interacción de actividades agrícolas, ganaderas, siendo importantes paisajes mediterráneos con gran interés para la conservación de la biodiversidad. Recientemente, en el contexto de cambio climático, se han identificado recientemente que estos sistemas agroforestales de explotaciones extensivas actúan, a diferencia de otros sistemas agroforestales, como sumideros de CO₂ (Escribano et al., 2022). De modo que, más allá de su valor económico, las dehesas albergan una riqueza biológica crucial para la conservación del suelo, la captura de carbono y la preservación de los recursos hídricos, aportando un importante valor en términos de servicios ecosistémicos (Bugalho et al., 2016). Según la Directiva 43/92 CEE, estas dehesas son consideradas Hábitats de Interés Comunitario Europeo (Habitat 6310). Por ello, la comprensión de los factores que impulsan la

biodiversidad en estos paisajes es esencial para su gestión sostenible y la salvaguarda de su valor natural y cultural (Moreno et al. 2018; Plieninger et al., 2014).

La presencia de árboles como encinas (*Quercus ilex* L.) y alcornoques (*Quercus suber* L.) en las dehesas ibéricas crea heterogeneidad de hábitats y microclimas que beneficia a numerosas especies y favorecen la diversidad. Además, son una importante fuente de alimentos estacionales para aves, mamíferos e insectos, así como juegan un papel clave en la conservación de especies en peligro de extinción como el lince ibérico (*Lynx pardinus*) o el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) (Plieninger et al. 2014; López-Carrasco et al. 2022). raíces de estos árboles sustentan un microbioma diverso en el suelo, compuesto por bacterias, hongos y otros microorganismos (Oggioni et al., 2020). La diversidad microbiana no solo es esencial para mantener la salud del suelo y la productividad vegetal, sino que también influye en una variedad de procesos ecológicos clave, como la descomposición de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno y la resistencia a las perturbaciones ambientales (Delgado-Baquerizo et al., 2016; Fierer, 2017).

En los últimos años, se ha observado un declive global de cobertura vegetal que afecta a múltiples ecosistemas y en particular a la región mediterránea (Oggin et al., 2020; Lloret F. 2012). En España, este fenómeno ha sido especialmente notable desde los años 80 en el sur de la Península Ibérica, impactando gravemente a las encinas (*Quercus ilex* L.) y los alcornoques (*Quercus suber* L.). El cambio climático y el fitopatógeno oportunista *Phytophthora cinnamomi* considerado de los más agresivos, exóticos e invasores (Serrano et al., 2022), están causando un importante declive en las quercíneas, provocando la muerte de los árboles debido a múltiples factores bióticos y abióticos no siempre claramente identificados.

El deterioro de estos árboles se asocia frecuentemente con anomalías climáticas adversas vinculadas al cambio climático, lo que incrementa la vulnerabilidad de las encinas y facilita la proliferación de patógenos oportunistas. *P.cinnamomi* y *Pythium spiculum* son actualmente considerados los principales causantes de la Seca y la podredumbre radical (Sánchez et al. 2002). Estos patógenos dañan las raíces secundarias, limitando la absorción de agua y nutrientes por parte del árbol, lo que provoca síntomas como marchitamiento, clorosis, defoliación y, eventualmente, la muerte progresiva o súbita del árbol (Carrasco et al. 2009).

P.cinnamomi, uno de los hongos patógenos más destructivos del mundo, puede infectar alrededor de 5000 especies de plantas, incluidas especies agrícolas, hortícolas y forestales, y está considerado entre las 100 peores especies invasoras (Lower et al. 2000). Este hongo puede sobrevivir hasta seis años en suelos húmedos, siendo la humedad un factor

crucial para su propagación y persistencia (Zentmyer 1980). Su introducción en el medio natural tiene consecuencias devastadoras para el medio ambiente y la biodiversidad, con impactos significativos reportados en bosques de castaños y encinas en Europa, así como en la vegetación natural de Australia (Hardham & Blackman, 2018).



Figura 1. Aspecto de un ejemplar de encina sano (izquierda) y uno muerto por *Phytophthora cinnamomi* (derecha).

Actualmente en España se están aplicando varios tratamientos contra la Seca como mejora genética de individuos, fungicidas y enmiendas calizas u orgánicas. (Isabel et al., 2024). Aunque se ha demostrado que estos tratamientos funcionan se desconoce el efecto que tienen sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo asociado a los árboles tratados ya que los tratamientos modifican las condiciones del árbol y alrededores lo que puede interferir en los ciclos del C y N de los que estas comunidades son responsables (Wang et al. 2024). Para ello se evalúa la diversidad funcional de los suelos y también la sensibilidad térmica de la respiración (Q10) de cara a evaluar la respuesta de las comunidades microbianas al escenario de cambio climático presente.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar cómo los diferentes tratamientos para la recuperación de árboles infectados por el fitopatógeno *P. cinnamomi* afectan a la funcionalidad de la comunidad microbiana, contribuyendo directamente al Objetivo 15: Vida de ecosistemas terrestres de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). El objetivo secundario es evaluar la sensibilidad de las comunidades microbianas estudiadas al cambio de temperatura, lo cual también puede ser relevante para abordar el Objetivo 13: Acción por el clima. La hipótesis de partida para el objetivo principal es que las comunidades microbianas se ven afectadas negativamente por los tratamientos aplicados contra el fitopatógeno *P. cinnamomi*, afectando así la biodiversidad y la funcionalidad de los ecosistemas agroforestales. La hipótesis para el objetivo secundario es que las comunidades microbianas estudiadas pueden demostrar una capacidad notable para adaptarse y tolerar cambios térmicos, lo que también puede ser crucial para la resiliencia de estos ecosistemas frente a futuros cambios climáticos (ODS 13).

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio ha sido realizado en la Dehesa Boyal de Colmenarejo, ubicada entre las poblaciones de Manzaneres el Real y Soto del Real al noroeste de la Comunidad de Madrid, formando parte del espacio natural protegido Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares.

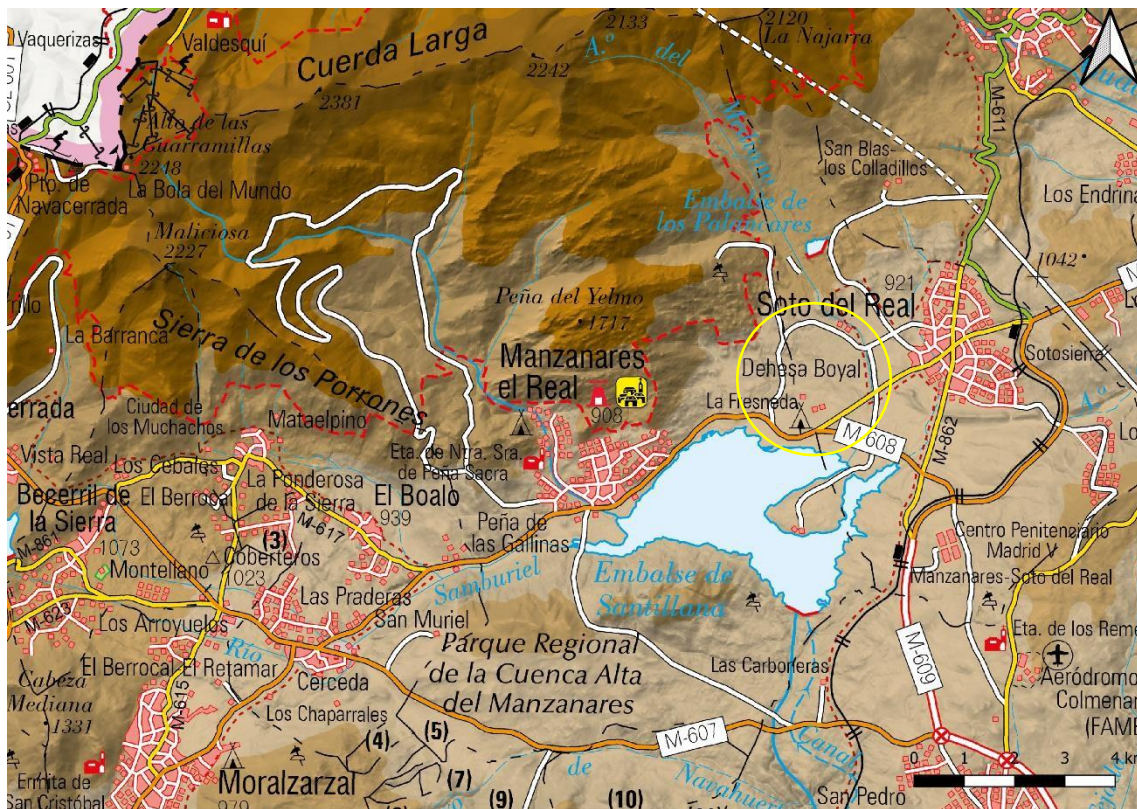


Figura 2. Localización de la Dehesa Boyal (círculo amarillo)

Según la clasificación de Rivas Martínez (1987), la finca se encuentra en el piso bioclimático mesomediterráneo, caracterizado por un clima mediterráneo típico con veranos secos y calurosos e inviernos lluviosos y suaves, una temperatura media anual de 12.0 °C y precipitaciones promedio de 585 mm en Manzaneres el Real (Climate data 2019).

La región presenta predominantemente granito y suelos clasificados como cambisoles, tanto húmicos como dísticos, mientras que en zonas más empinadas y rocosas prevalecen los leptosoles, que pueden ser dísticos, úmbricos o líticos.

Biogeográficamente, la finca pertenece a la región mediterránea, provincia Carpetano - ibérico-leonesa, sector Guadarrámico y distrito Guadarramense. La vegetación potencial

incluye encinares carpetanos con enebro de la miera (*Junipero oxycedri-Querceto rotundifoliae* S.), con encinas (*Quercus ilex subsp. ballota*) como especie principal, junto a fresnos (*Fraxinus angustifolia*), quejigos (*Quercus faginea*) y enebros (*Juniperus oxycedrus*). El sotobosque alberga especies como labiérnago (*Phillyrea angustifolia*), torvisco (*Daphne gnidium*), jara pringosa (*Cistus ladanifer*), retama (*Retama sphaerocarpa*), cantueso (*Lavandula stoechas*) y romero (*Rosmarinus officinalis*). El pasto típico es el majadal, compuesto por gramíneas (*Poa bulbosa*), trébol (*Trifolium subterraneum*) y cedacillo (*Briza media*), junto a esparragueras (*Asparagus acutifolius*) en áreas sombreadas.

Estudio experimental

El experimento consistió en la aplicación de 4 tratamientos para el fitopatógeno *P.*: endoterapia con fosetil aluminio al 4%, enmienda con caliza, 50% de dolomita (carbonato cálcico y magnesio [CaMg (CO₃)₂]) y 50% de sulfato cálcico [CaSO₄], una mezcla de ambos tratamientos y un control sin ningún tratamiento. Para evaluar el impacto de estos tratamientos en el microbioma del suelo se realizaron dos campañas de recolección. La primera el día 3 de octubre del 2022 justo al inicio de la aplicación de los tratamientos y la segunda, seis meses después, el 27 de abril de 2023, recogiendo las muestras de los mismos árboles siempre con afectación del patógeno atendiendo al grado de defoliación observado (Sánchez et al. 2002; Romero et al. 2007).

Parámetros fisicoquímicos

Se recogieron 300 g del suelo próximo a las raíces secundarias de los árboles y se mantuvieron refrigeradas hasta llegar al laboratorio. Una vez en el laboratorio se dejó secar, se tamizaron a 2 mm y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su procesamiento. Se recogieron también muestras de suelo para el análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo que fueron enviadas al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) para su análisis, proporcionando los datos de pH, fósforo, potasio, magnesio, sodio, CIC, conductividad, nitrógeno, materia orgánica oxidada, carbonatos, arenas, limos, arcillas, capacidad de campo y punto de marchitamiento

Parámetros biológicos

Respiración inducida por múltiples sustratos (MSIR)

Las medidas de diversidad funcional se calcularon mediante la técnica del MicroResp™ siguiendo el protocolo de Campbell et al. (2003), con adaptaciones de Fanin et al.

al. (2014). Esta técnica es un método para caracterizar y evaluar la diversidad funcional del microbiota del suelo. La técnica consiste en una trampa de CO₂ en unas placas de 96 multipocillos con indicador de pH. El CO₂ que se produce en cada una de las muestras de suelo inoculado en cada uno de los pocillos en función de la fuente de carbono añadido es atrapado por NaOH que se encuentra en el agar y que según el pH del ambiente vira el color, de rojo a amarillo. Este proceso ocurre por la acidificación del medio debido a la respiración de la muestra es capaz de cuantificar la diversidad funcional.

Para la preparación del gel indicador se mezcla, en una proporción 1:2, gel de Agar 3% con la solución indicadora, compuesta de NaHCO₃, KCL y rojo cresol, a 60°C (es importante no superar esta temperatura ya que el rojo cresol dejaría de actuar) y se añaden 150 µl por pocillo en placas de 96 pocillos. En este paso es importante calentar tanto las placas como las puntas para evitar que se formen burbujas. Pasadas 2 o 3 horas se deben almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad dentro de un desecador y agua de 2 a 3 días para que se equilibren y transcurrido este tiempo se cubre cada placa con Parafilm y pueden ser almacenadas a 4°C. Por otro lado, se preparan las soluciones de sustratos para proporcionar 1,5 mg de C por g de suelo y para alcanzar entre un 80-120% de la capacidad de campo para cada muestra.

Para calcular la capacidad de campo se cogieron 20 g de los tamizados anteriormente, se humedecieron usando papel de filtro y se taparon con Parafilm agujereado. Pasadas 24 h se pesaron (peso húmedo) y se dejaron en la estufa a 105 °C durante 24 h para volver a pesarlos (peso seco). Los filtros se pesaron antes y después de humedecerlos para corregir la fórmula de los pesos. Finalmente, para obtener los parámetros requeridos se siguieron las ecuaciones [1], según Walker et al., (2004) y [2], según Gardner et al. (2000):

$$\text{humedad} = \text{peso seco inicial} - \text{peso seco final} \quad [1]$$

$$CC (\%) = (\text{peso suelo húmedo} - \text{peso seco final} / \text{peso seco final}) * 100 \quad [2]$$

Se ha de calcular la cantidad de suelo, cantidad de sustrato (ver tabla X) y la cantidad de agua en función de la capacidad de campo. Las disoluciones de cada sustrato se preparan, mezclando la cantidad de sustrato obtenida con agua miliQ en tubos Falcon de 50 ml manteniendo las condiciones de esterilidad utilizando filtros de jeringa de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm (FILTER-LAB®).

Tabla 1. Fuentes de carbono

Azucres		Aminoácidos		Acido orgánicos	
GLU	D-glucosa	ASP	L (+)-Asparagina monohidratada	OX	ac oxálico
FRU	D (-)-fructosa	SER	L-Serina	MAL	ac málico
GAL	D (+)-galactosa	GLY	Glicina	CIT	ac cítrico monohidratado
ARA	L (+)-Arabinosa	GLUT	L-Glutamina	KET	ac 2-cetoglutarico
NAC	N-acetil glucosamina	CIS	L-Cisteína	BEN	ac 3-4 Dihidroxi benzoico

Para el primer paso en la realización de la prueba de MicroResp™ se atemperan tanto las soluciones de sustratos como las placas de medición que se vayan a usar, evitando la luz en estas últimas. Cada placa Deepwell preparada equivale a 2 muestras de nuestro suelo. Cada muestra tiene 3 réplicas de 15 fuentes de carbono más el agua. Primero se prepara una muestra y después la otra tapando en todo momento la parte que no se está preparando (Figura 3). Las placas se pesan antes y después de la adición de la primera muestra y después de la adición de la segunda muestra para obtener el peso añadido de cada suelo de cara a los análisis estadísticos. Una vez cargadas las muestras de suelo se añaden los sustratos a cada pocillo correspondiente y con un 80%-120% de capacidad de campo manteniendo las condiciones de esterilidad. Transcurridas las 2 horas, se mide la placa en el espectrofotómetro a 570 nm. Pasadas 6 horas desde la adición de los sustratos al suelo, 4 horas desde que ponemos la placa de medición, se repite la lectura en el espectrofotómetro y se guardan los valores de absorbancia para el análisis posterior.

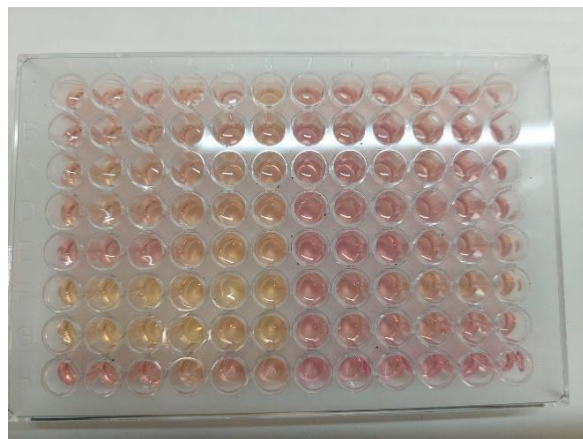


Figura 3. Método de llenado del dispositivo MicroResp™ (izquierda) y placa en la última medición (derecha)

En primer lugar, se realizan se normalizan los valores de absorbancia con la ecuación [1], y utilizando la recta de calibración se transforman en valores de CO₂ [2]

$$DO_{\text{normalizada}} = \frac{DO_{t4}}{DO_{t10}} \times DO_{t0\text{Avg}} \quad [1]$$

$$\%CO_2 = -0,1546 - \frac{4,14171}{1 - (5,2191 \times DO_{\text{normalizada}})} \quad [2]$$

Para obtener los valores SIR (Substrate Induced Respiration) con los que vamos a trabajar se transforman los porcentajes de CO₂ teniendo en cuenta las horas de incubación (4h), los gramos de suelo por pocillo en cada placa, el volumen de aire disponible para la acumulación de CO₂ en el pocillo (945μl), la masa molar del C (12g/mol) y la transformación de volumen a moles de un gas (22,4mol/l), según la ecuación [3].

$$SIR = \%CO_2 \times 12 \times 9,45 / 22,4 / g_{\text{suelo seco por pocillo}} / 4h \quad [3]$$

Posteriormente se restaron los valores de respiración basal (SIR del H₂O) para generar una tabla de datos con los valores de metabolización para cada sustrato.

Se genero una tabla de datos con la que empezar los análisis incluyendo los siguientes parámetros: a) los índices de diversidad de Simpson (D) como indicador de la diversidad de los microorganismos del suelo;

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

b) la suma de todos los sustratos como indicador de la actividad catabólica global y c) la suma de los sustratos separándolos por su naturaleza (azúcares, aminoácidos y ácidos)

Sensibilidad térmica (Q₁₀)

La sensibilidad térmica (Q₁₀) nos permite conocer la tasa de cambio de la respiración microbiana cuando la temperatura aumenta en 10°C.

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

Para la estimación de la Q10 se ha utilizado el BacTrac 4300®. Este equipo se basa en el mismo principio que la MicroResp™ nos permite detectar la producción de CO₂ (actividad microbiana) mediante la evolución de la impedancia en un campo de corriente alterna, generada por un cambio en la conductividad del medio (2 ml de KOH al 2%), que actúa como trampa de CO₂ (Zhu et al., 2012; Yoo et al., 2013; Bancalari et al., 2019; Singh et al., 2019). Para ello se cargan unos viales de plástico con 8 g de muestra de suelo y los mililitros necesarios para igualar la capacidad de campo que empleamos en el MicroResp™. Estos viales de plástico se introducen abiertos en los viales tipo SY-LAB con electrodos con los 2 ml de KOH al 2% y se cierran herméticamente para que el CO₂ producido quede atrapado en la KOH modifique la impedancia y sea registrado por el equipo. Como controles se añaden además dos viales SY-LAB, uno abierto y otro cerrado, ambos con 2 ml de KOH al 2% para asegurarnos de que la potasa está activa y el CO₂ medido en los viales con muestras de suelo procede de la respiración microbiana. El factor de sensibilidad térmica (Q10) se calcula a partir de la respiración basal a distintas temperaturas: 5°C, 15°C, 20°C y 35°C para cada tratamiento y tiempo. (Meyer et al. 2018).



Figura 4. Foto de preparación del vial Sy-Lab con el vial de plástico abierto en su interior (izquierda) y foto del bactrac 4300 (derecha).

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de MicroResp™ y de BacTrac 4300® fueron analizados con el programa R versión 4.3.2. (<http://r-project.org/>) y RStudio versión 2023.12.2 (<https://posit.co/download/rstudiodesktop/>).

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los parámetros calculados se realizaron test ANOVA, seguidos de test post-hoc de Tukey en caso de resultar significativos. Se comprobó que se cumplían los supuestos de normalidad y homeocasticidad mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene. Se tuvieron en cuenta la distinta estacionalidad en la recogida de las muestras añadiendo el factor tiempo a los análisis. Estas diferencias se graficaron con diagramas de cajas. Además, se realizó un test multivariante mediante NMDS utilizando las distancias de Bray-Curtis para visualizar los resultados obtenidos.

Se utilizaron los paquetes “vegan” para calcular el índice de diversidad de Simpson, “car” para realizar los test de homeocasticidad de los modelos y los paquetes “cowplot”, “ggpubr” y “ggplot2” para obtener las gráficas presentadas en el trabajo (Cayuela Delgado & De la Cruz Rot, 2022).

Resultados

Respiración basal

Los tratamientos no afectan de manera significativa a la respiración basal del suelo, sin embargo, la fecha de recogida sí que afecta de forma significativa (Figura 5, Tabla 2). La respiración basal aumento pasados 6 meses ($F=4,9105$; $p<0,03$); Tabla 2). Los tratamientos no afectaron a la respiración basal ($F=0,0671$; $p=>0,97$; Tabla 2).

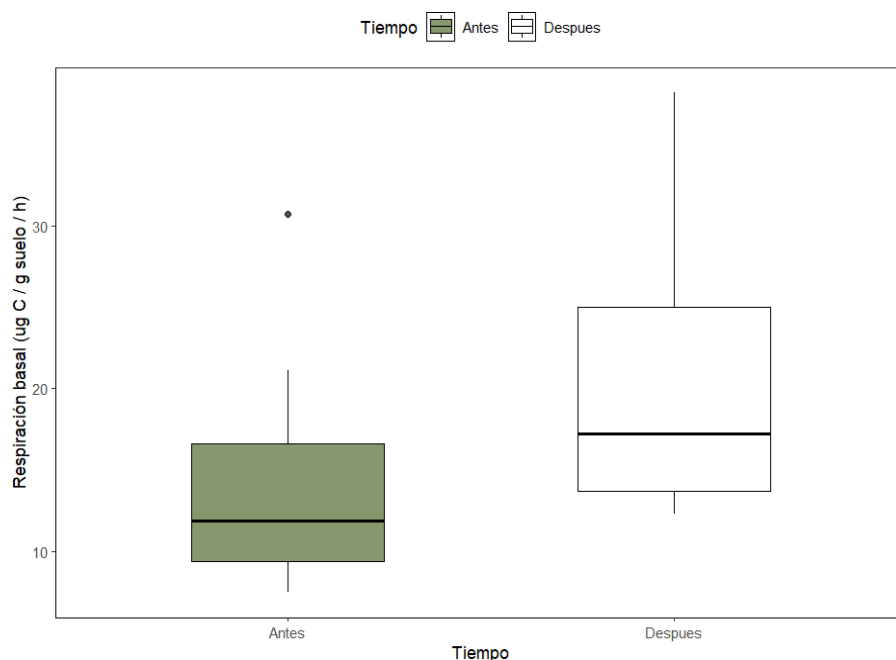


Figura 5. Respiración basal del suelo para los distintos tiempos. La respiración basal es únicamente la medida del agua. Las diferencias significativas al 5% calculadas con ANOVA multifactorial, cumpliendo los supuestos de normalidad y homeocasticidad.

Tabla 2. Análisis de varianza de dos factores para la respiración basal. Las diferencias son significativas para el tiempo, pero no para los tratamientos ni la interacción

	Df	Sum	Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	11,19	3,731	0,0671	0,97683
Tiempo	1	272,86	272,859	4,9105	0,03643 *
Tratamiento:Tiempo	3	74,22	24,74	0,4452	0,72288
Residuos	24	1333,58	55,566		

Diversidad funcional

Los diferentes tratamientos contra la *P.cinnamoni* no afectaron significativamente a la diversidad funcional representada por el índice de Simpson ($F=0,29$; $p=>0,83$; Tabla 3) tampoco por el tiempo en que se recogieron las muestras ($F=1,09$; $p=>0,054$; Tabla 3) ni la interacción de ambos ($F=1,18$; $p=>0,33$; Tabla 3)

Tabla 3. Análisis de varianza de dos factores para la diversidad funcional de los microorganismos del suelo.

	Df	Sum	Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	5,50E-04	1,80E-04	0,2913	0,83126
Tiempo	1	2,60E-03	2,60E-03	1,088	0,05447
Tratamiento:Tiempo	3	2,20E-03	7,40E-04	1,1834	0,33695
Residuos	24	1,50E-02	6,30E-04		

Actividad catabólica

Los tratamientos no afectan de forma significativa a la actividad catabólica, pero el factor tiempo sí que afecta de forma significativa (Figura 6, Tabla 4). La actividad catabólica no vario con la aplicación de los distintos tratamientos ($F=2,1696$; $p=>0,11$; Tabla 4). El tiempo de recogida de las muestras aumento la actividad catabólica ($F=15,44$; $p=<6,29e-04$; Tabla 4).

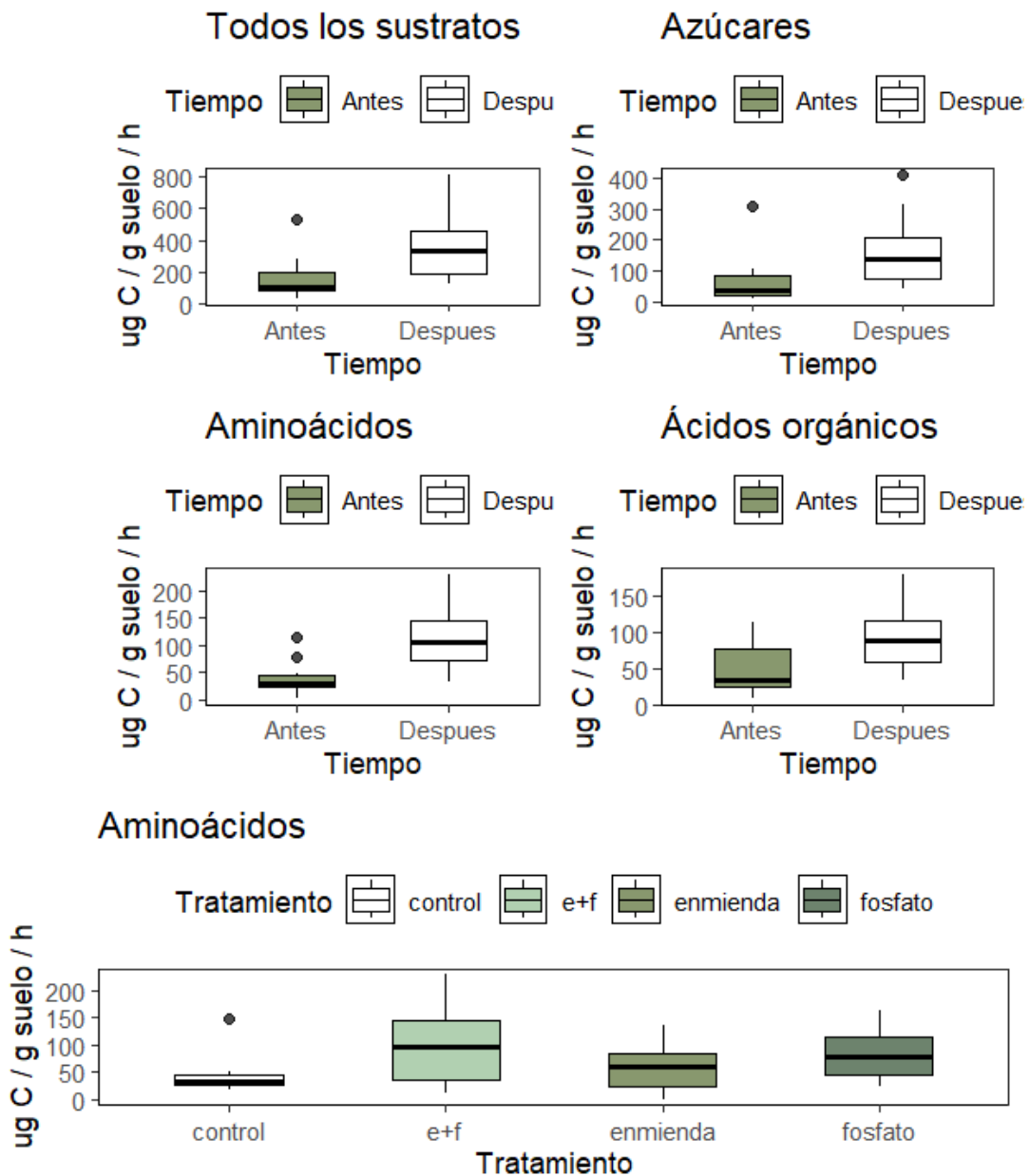


Figura 6. Diferencias en valores de SIR (Substrate Induced Respiration) tras restar el valor del H₂O para los distintos tratamientos y tiempo. Arriba a la izquierda para todos los sustratos, arriba a la derecha para azúcares (D-glucosa, N-acetil glucosamina, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa y L(+)-arabinosa), abajo a la izquierda para aminoácidos (L(+)-asparagina monohidratada, L-serina, glicina, L-glutamina y L-cisteína), abajo a la derecha para ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido málico, ácido cítrico monohidratado, ácido 2-cetoglutarico y ácido 3-4-dihidroxibenzoico) y abajo para los aminoácidos con respecto a los tratamientos. Las diferencias significativas al 5% calculadas con ANOVA multifactorial, cumpliendo los supuestos de normalidad y homeocasticidad

Después de la separación de los sustratos según su naturaleza en azúcares (D-glucosa, N-acetil glucosamina, D(-)-fructosa, D(+)-galactosa y L(+)-arabinosa), aminoácidos (L(+)-asparagina monohidratada, L-serina, glicina, L-glutamina y L-cisteína) y ácidos (ácido oxálico, ácido málico, ácido cítrico monohidratado, ácido 2-cetoglutarico y ácido 3-4-dihidroxibenzoico), observamos que el tiempo de recogida de las muestras sigue siendo significativo para cada grupo, aunque hay diferencias en el grado de afección (azúcares (F=9,5; p=<5,09e-03), aminoácidos (F=29,9; p=<1,28e-05, ácidos (F=11,9; p=<2,04e-03)) (Figura 6, Tabla 4). Además, se observa que para los aminoácidos los tratamientos afectan de forma significativa, aunque en muy poca medida (F=3,2; p=<0,03; Figura 6, Tabla 4)

Tabla 4. Análisis de la varianza multifactorial para la suma de los sustratos metabolizados

<i>Total</i>	Df	Sum	Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	149862	49954	2,1696	0,117869
Tiempo	1	355597	355597	15,4445	6,288e-04 **
Tratamiento:Tiempo	3	84306	28102	1,2205	0,3237883
Residuos	24	552581	23024		
<i>Azúcares</i>	Df	Sum	Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	41626	13875	1,5718	0,222138
Tiempo	1	83880	83880	9,5018	5,097e-03 **
Tratamiento:Tiempo	3	22063	7354	0,8331	0,488849
Residuos	24	211867	8828		
<i>Aminoácidos</i>	Df	Sum	Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	13374	4458	3,2395	0,0398 *
Tiempo	1	41122	41122	29,8832	1,282e-05***
Tratamiento:Tiempo	3	8204	2735	1,9874	0,1428
Residuos	24	33026	1376		
<i>Ácidos orgánicos</i>	Df	Sum	Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	6076,8	2025,6	1,6119	0,212802
Tiempo	1	15029,6	15029,6	11,9601	2,042e-03 **
Tratamiento:Tiempo	3	3961,7	1320,6	1,0509	0,388232
Residuos	24	30159,5	1256,6		

Análisis multivariante

Las diferencias entre la respiración de las muestras de suelo fueron significativas para el factor tiempo ($F=15,44$; $p<6,3e-04$; Tabla 4) pero no lo fueron para los tratamientos ($F=2,17$; $p>0,11$; Tabla 4). Esto se ve representado en el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) (Figura 7). Se observa la distribución de los datos con respecto a dos grupos alejados entre sí, mientras que para los tratamientos los 4 grupos permanecen juntos.

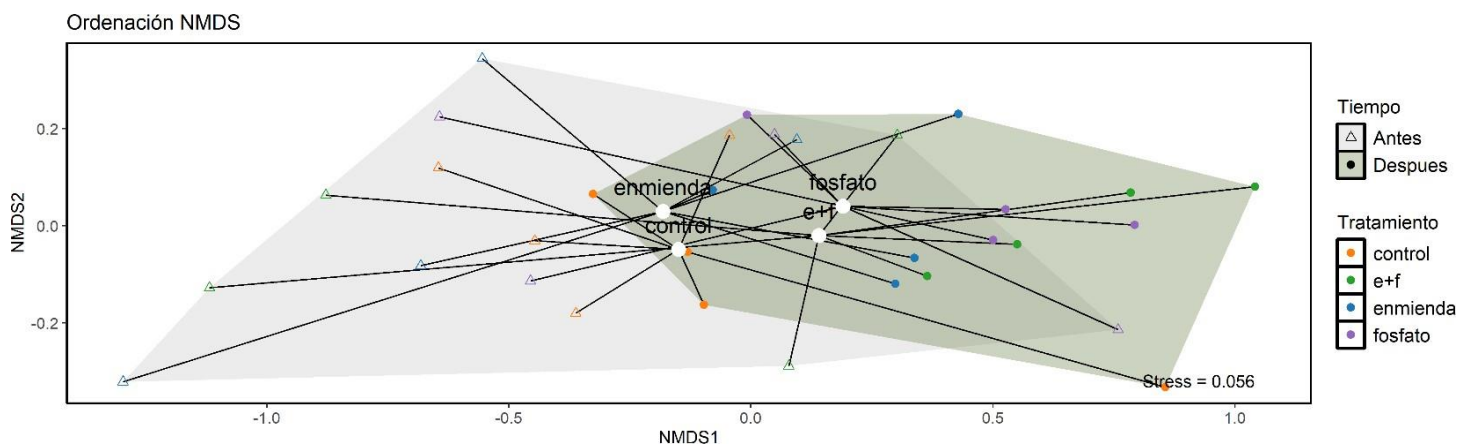


Figura 7. NMDS para los perfiles catabólicos de cada muestra de suelo

Sensibilidad térmica (Q10)

La sensibilidad térmica de la respiración (Q10) no se ve afectada por ninguno de los parámetros estudiados ni por su interacción (tratamiento ($F=2,25$; $p>0,1$), tiempo ($F=0,64$; $p>0,42$), tratamiento*tiempo ($F=2,18$; $p>0,11$)) (Tabla 5), siendo el valor promedio obtenido de entre todos los puntos de temperatura de 1,6.

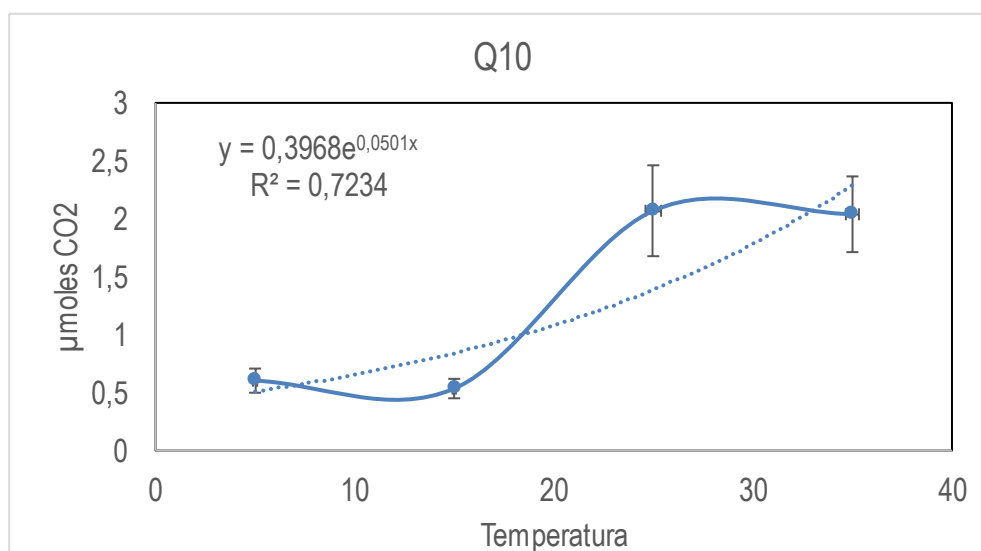


Figura 8. Grafica promedio de respiración de 5, 15, 25 y 35°C

Tabla 5. Análisis de la varianza multifactorial para la sensibilidad térmica de la respiración

	Df	Sum	Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	3	0,22539	0,075132	2,2525	0,1081
Tiempo	1	0,02158	0,021583	0,6471	0,4291
Tratamiento:Tiempo	3	0,21819	0,072729	2,1805	0,1165
Residuos	24	0,80051	0,033354		

Discusión

Nuestro estudio ha demostrado que la aplicación de los tratamientos no afectó de forma significativa a la respiración basal ni a las tasas catabólicas de los azúcares y los ácidos orgánicos, aunque sí lo hizo para los aminoácidos. Estas diferencias pueden explicarse por el aporte extra de nitrógeno que los aminoácidos proporcionan al suelo, que en combinación con el aporte de fósforo del fosetil de aluminio al 4% (Joshi et al., 2024; Wang et al., 2024) y la mejora en la disponibilidad de estos nutrientes gracias a la enmienda caliza (Li et al., 2020) incrementan la tasa metabólica de las comunidades microbianas del suelo (Aslam et al., 2024). En consonancia con investigaciones previas, los tratamientos pueden alterar la composición de las comunidades microbianas, pero la diversidad de funciones metabólicas dentro de estas poblaciones juega un papel crucial en mantener la estabilidad funcional de los suelos frente a cambios ambientales (DC Pierantoni, 2024).

La estacionalidad en este caso sí presentó diferencias significativas para la respiración basal y todas las tasas catabólicas y nuestros resultados se relacionan con la bibliografía disponible (Wan et al., 2024). Las tasas de descomposición del carbono están mediadas por la actividad enzimática, tanto intracelulares como extracelulares, y las condiciones de nitrificación, viéndose ambos factores alterados positivamente por la temperatura, alcanzando su óptimo en primavera, que fue la segunda fecha de muestreo (Costa et al., 2013; Machmuller et al., 2016; Solanki et al., 2024). Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar factores estacionales al evaluar la dinámica del carbono en los suelos y subrayan la complejidad de las interacciones entre la biota del suelo y las variables ambientales (Martínez et al., 2023).

La aplicación de tratamientos en las muestras analizadas no tuvo un impacto significativo en el índice de diversidad de Simpson. Este resultado está en línea con estudios

previos que han investigado el efecto de diversos tratamientos en la diversidad de especies infectadas por *P. cinnamomi*, tales como los realizados por Bossolani et al. (2021), Zhang et al. (2021) y Farooq et al. (2022), los cuales también arrojaron resultados similares. La razón detrás de estos hallazgos puede ser atribuida a la notable capacidad de resiliencia que poseen las comunidades microbianas. Esta resiliencia se debe, en gran medida, a la redundancia funcional presente en estas comunidades, la cual juega un papel crucial en la mitigación de los cambios que experimentan los ecosistemas ante diversas perturbaciones (Jones et al., 2023).

Por último, los resultados para la sensibilidad térmica (Q10) no presentan diferencias significativas entre tratamientos y tiempo. Además, los valores obtenidos concuerdan con la mayoría de los modelos utilizados (Meyer y Welp et al., 2018), dando un valor de entre 1,5 y 2 para el aumento de la respiración del suelo por cada aumento de 10°C en la temperatura (Q10). Este hallazgo cobra especial relevancia en el contexto del cambio climático global, ya que la sensibilidad térmica de las comunidades microbianas es un factor crucial en la retroalimentación del ciclo del carbono (Gromova et al. 2020). A medida que las temperaturas globales continúan aumentando, entender cómo responden los ecosistemas terrestres, en particular los microorganismos, es fundamental para predecir y mitigar los impactos del cambio climático (Bradford Lab, n.d.). La estabilidad de la sensibilidad térmica observada en este estudio sugiere que, al menos en el corto plazo, los modelos actuales pueden seguir siendo fiables para proyectar los futuros flujos de carbono del suelo. Sin embargo, es imprescindible continuar investigando para evaluar cómo estas respuestas pueden variar a largo plazo y bajo diferentes escenarios climáticos, asegurando así que las estrategias de mitigación y adaptación sean eficaces y basadas en datos precisos.

Conclusión

Los tratamientos no modifican ni la diversidad ni la estructura funcional de las comunidades microbianas presentes en los suelos estudiados, viéndose cambios únicamente en los aminoácidos, ya que actúan como un aporte externo de nitrógeno que incrementa el metabolismo de los microorganismos. Esto resalta la capacidad de las comunidades microbianas para mantener su funcionalidad pese a intervenciones externas (ODS 15).

La estacionalidad sí modifica la estructura funcional de las comunidades microbianas a través de la actividad enzimática, tanto intracelular como extracelular, así como el aumento de la disponibilidad de nitrógeno, favorecidos estos dos factores por el incremento de las

temperaturas. Durante la primavera, cuando las temperaturas son óptimas, se observa una mayor actividad microbiana debido a las mejores condiciones para la nitrificación y descomposición de materia orgánica (ODS 13).

La sensibilidad térmica (Q10) no se ve afectada por la aplicación de los tratamientos y entra dentro de los rangos previstos en la mayoría de estudios al respecto. Este parámetro es fundamental para comprender las respuestas de la respiración del suelo a cambios de temperatura, y su estabilidad sugiere que los tratamientos no alteran significativamente los procesos metabólicos subyacentes (ODS 13).

Para líneas futuras de investigación, sería interesante evaluar la acción de los tratamientos a lo largo de varios años durante la misma estación, preferiblemente en primavera, ya que los microorganismos presentan mayor actividad en esta época. Además, se sugiere realizar trabajos de mapeo de las condiciones de la dehesa durante todo el año para obtener una visión más completa de cómo los factores estacionales y los tratamientos afectan a las comunidades microbianas a largo plazo. Estas investigaciones podrían proporcionar información valiosa sobre la dinámica temporal de las respuestas microbianas y ayudar a desarrollar estrategias de manejo más sostenibles para los suelos (ODS 15).

Bibliografía

Aslam, S., Arslan, M., & Nowak, K. M. (2024). Microbial activity, community composition and degraders in the glyphosate-spiked soil are driven by glycine formation. *Science of the Total Environment*, 907, 168206.

Bancalari, E., D'Incecco, P., Sardaro, M. L. S., Neviani, E., Pellegrino, L., & Gatti, M. (2019). Impedance microbiology to speed up the screening of lactic acid bacteria exopolysaccharide production. *International journal of food microbiology*, 306, 108268

Bradford Lab. (n.d.). Carbon Cycle-Climate Feedbacks. Yale University. Retrieved from <https://bradfordlab.yale.edu/carbon-cycle-climate-feedbacks>

Beatriz IR, Blanca CR, Angela CS, Luis GNJ, Antonio R, et al. (2024) Different Approaches to establish soil health and to combat *Phytophthora cinnamomi*. *Open J Plant Sci* 9(1): 006-015. DOI: 10.17352/ojps.000059

Bossolani, J. W., Crusciol, C. A., Leite, M. F., Merloti, L. F., Moretti, L. G., Pascoaloto, I. M., & Kuramae, E. E. (2021). Modulation of the soil microbiome by long-term Ca-based soil amendments boosts soil organic carbon and physicochemical quality in a tropical no-till crop rotation system. *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 108188.

Bugalho, M.N.; Dias, F.S.; Briñas, B.; Cerdeira, J.O. Using the High Conservation Value Forest Concept and Pareto Optimization to Identify Areas Maximizing Biodiversity and Ecosystem Services in Cork Oak Landscapes. *Agrofor. Syst.* 2016, 90, 35–44.

Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., Davidson, M. S., y Potts, J. M. (2003). A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3593-3599.

Cayuela Delgado, L., & De la Cruz Rot, M. (2022). Análisis de datos ecológicos en R. Mundiprensa.

Carrasco, A., & cols. (2009). Procesos de Decaimiento Forestal (la Seca), Situación del Conocimiento. Córdoba: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. <https://doi.org/978-84-92807-29-1>

Costa, D., Freitas, H., and Sousa, J. P. (2013). Influence of seasons and land-use practices on soil microbial activity and metabolic diversity in the "Montado ecosystem". *Eur. J. Soil Biol.* 59, 22–30. doi: 10.1016/j.ejsobi.2013.08.003

Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F., Reich, P. et al. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nat Commun* 7, 10541 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>

Escribano, M., Horrillo, A., C Mesias, F. J. (2022). Greenhouse gas emissions and carbon sequestration in organic dehesa livestock farms. Does technical-economic management matters?. *Journal of Cleaner Production*, 372, 133779.

Fanin, N., Hättenschwiler, S. y Fromin, N. (2014). Litter fingerprint on microbial biomass, activity, and community structure in the underlying soil. *Plant Soil* 379, 79–91.

Farooq, Q. U. A., Hardy, G. E. S. J., McComb, J. A., Thomson, P. C., & Burgess, T. I. (2022). Changes to the bacterial microbiome in the rhizosphere and root endosphere of *Persea americana* (avocado) treated with organic mulch and a silicate-based mulch or phosphite and infested with *Phytophthora cinnamomi*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 870900

Fierer, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* 15, 579–590 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>

Gardner, C. M., Robinson, D., Blyth, K., & Cooper, J. D. (2000). Soil water content. *Soil analysis: physical methods*, 1-74

Gromova, M. S., Matvienko, A. I., Makarov, M. I., Cheng, C. H., & Menyailo, O. V. (2020). Temperature sensitivity (Q_{10}) of soil basal respiration as a function of available carbon substrate, temperature, and moisture. *Eurasian Soil Science*, 53, 377-382.

Hardham, A., & Blackman, L. (2018). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 19, 260-285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12568>

Joshi, S. R., Tfaily, M. M., Young, R. P., & McNear Jr, D. H. (2024). Root exudates induced coupled carbon and phosphorus cycling in a soil with low phosphorus availability. *Plant and Soil*, 498(1), 371-390.

Li, S., Liu, J., Yao, Q. et al. Short-term lime application impacts microbial community composition and potential function in an acid black soil. *Plant Soil* 470, 35–50 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04913-0>

Lloret, F., Siscart, D., & Dalmases, C. (2004). Canopy recovery after drought dieback in holm-oak Mediterranean forests of Catalonia (NE Spain). *Global Change Biol.*, 10, 2092- 2099. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00870.x>

López-Carrasco, C., Redondo García, M. M., & Sánchez-Mata, D. (2022). Which Factors Favour Biodiversity in Iberian Dehesas? *Sustainability*, 14(4), 2345.

Lower, S., Browne, M., Boudjelas, S., & Poorter, M. D. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN).

Machmuller, M. B., Mohan, J. E., Minucci, J. M., Phillips, C. A., and Wurzbürger, N. (2016). Season, but not experimental warming, affects the activity and temperature sensitivity of extracellular enzymes. *Biogeochemistry* 131, 255–265. doi: 10.1007/s10533-016-0277-6

Meyer, N., Welp, G., & Amelung, W. (2018). The temperature sensitivity (Q_{10}) of soil respiration: Controlling factors and spatial prediction at regional scale based on environmental soil classes. *Global Biogeochemical Cycles*, 32(2), 306-323.

Moreno, G., Aviron, S., Berg, S. et al. Agroforestry systems of high nature and cultural value in Europe: provision of commercial goods and other ecosystem services. *Agroforest Syst* 92, 877–891 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0126-1>.

Oggioni, S.D.; Ochoa-Hueso, R.; Peco, B. Livestock Grazing Abandonment Reduces Soil Microbial Activity and Carbon Storage in a Mediterranean Dehesa. *Appl. Soil Ecol.* 2020, 153, 103588

Pierantoni, D. C., Conti, A., Corte, L., Benincasa, P., Cardinali, G., & Guiducci, M. (2024). Soil microbiota resilience in a two-decade long-term experiment comparing an organic and a conventional cropping system. *Applied Soil Ecology*, 201, 105481.

Plieninger, T.; Van Der Horst, D.; Schleyer, C.; Bieling, C. Sustaining Ecosystem Services in Cultural Landscapes: Analysis and Management Options Sustaining Ecosystem Services in Cultural Landscapes. *Ecol. Soc.* 2014, 19, art59.

Priha, O., & Smolander, A. (1994). Fumigation-extraction and substrate-induced respiration derived microbial biomass C, and respiration rate in limed soil of Scots pine sapling stands. *Biology and Fertility of Soils*, 17, 301-308.

Romero, M. A., Sánchez, J. E., Jiménez, J. J., Belbahri, L., Trapero, A., Lefort, F., & Sánchez, M. E. (2007). New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *Journal of Phytopathology*, 155, 289–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01230.x>

Ruíz-Galea, M., Mostaza-Colado, D., Ávila, A., Valladares, S., Martínez, V., Blasco-Fernández, F., Cardo, L., Hernández, I., & Carreño, F. (2022). Estudio de focos de seca de encinas en la Comunidad de Madrid y detección de árboles sobrevivientes para la obtención de variedades tolerantes. SECOMA.

Sánchez, M., Caetano, P., Ferraz, J., & Trapero, A. (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*, 32, 5-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00261.x>

Serrano, M. S., Romero, M. Á., Homet, P., C Gómez-Aparicio, L. (2022). Climate change impact on the population dynamics of exotic pathogens: The case of the worldwide pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 322, 109002.

Singh, J., Bhunia, H., & Basu, S. (2019). Adsorption of CO₂ on KOH activated carbon adsorbents: Effect of different mass ratios. *Journal of environmental management*, 250, 109457.

Solanki, A. C., Gurjar, N. S., Sharma, S., Wang, Z., Kumar, A., Solanki, M. K., ... & Kashyap, B. K. (2024). Decoding seasonal changes: soil parameters and microbial communities in tropical dry deciduous forests. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1258934.

Walker, J. P., Willgoose, G. R., & Kalma, J. D. (2004). In situ measurement of soil moisture: a comparison of techniques. *Journal of Hydrology*, 293(1-4), 85-99.

Wan, X., Zhou, R., Liu, S., Xing, W., & Yuan, Y. (2024). Seasonal Changes in the Soil Microbial Community Structure in Urban Forests. *Biology*, 13(1), 31.

Wang, A., Zhang, Y., Wang, G. et al. Soil physicochemical properties and microorganisms jointly regulate the variations of soil carbon and nitrogen cycles along vegetation restoration on the Loess Plateau, China. *Plant Soil* 494, 413–436 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06290-2>

Wang, Y., & Tang, D. W. (2024). Soil chemical fumigation alters soil phosphorus cycling: effects and potential mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1289270.

Yoo, M. R., Han, S. J., Shin, J. Y., & Wee, J. H. (2012). A study on carbon dioxide capture performance of KOH aqueous solution via chemical absorption. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 34(1), 55-62.

Zentmyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. American Phytopathological Society. <https://doi.org/9780890540305>

Zhang, W., Zhang, B. W., Deng, J. F., Li, L., Yi, T. Y., & Hong, Y. Y. (2021). The resistance of peanut to soil-borne pathogens improved by rhizosphere probiotics under calcium treatment. *BMC microbiology*, 21, 1-13

Zhu, S., Schnell, S., & Fischer, M. (2012). Rapid detection of *Cronobacter* spp. with a method combining impedance technology and rRNA based lateral flow assay. *International Journal of Food Microbiology*, 159(1), 54-58