



**2025** | **16-20**  
**GIJÓN** | **JUNIO**

**9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL**

**9CFE-1553**

Actas del Noveno Congreso Forestal Español  
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**  
ISBN: **978-84-941695-7-1**

Organiza





## La transferencia de carbono a través de las raíces como impulsor de la estabilización de la materia orgánica en el suelo

PIÑEIRO, J. (1), FERNÁNDEZ ALONSO, MJ. (2) y RUBIO, A. (1)

(1) Departamento de Sistemas y Recursos Naturales. ETSI Montes, Forestal y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.

(2) Departamento de Geología y Geoquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

### Resumen

Las interacciones entre la vegetación y los microorganismos del suelo son fundamentales para entender el papel de los bosques como sumidero de carbono (C). La vegetación se adapta a las condiciones ambientales ajustando la proporción de C que destina a las funciones de captación de nutrientes del suelo, lo que conlleva cambios en la biomasa y morfología radicular. La mineralización microbiana de estos insumos vegetales produce la liberación de dióxido de carbono a la atmósfera pero, a su vez, favorece la incorporación del C orgánico transformado en necromasa microbiana a la matriz mineral del suelo, donde permanece estabilizado a largo plazo. En este estudio, usamos el anillado (*tree girdling*) de 18 individuos maduros de *Pinus pinaster* en seis parcelas de 50x50 m para interrumpir el transporte de C hacia las raíces y así investigar el papel de la transferencia de C radicular sobre la morfología radicular y la actividad microbiana del suelo, evaluada a través de la actividad enzimática del suelo y la rizosfera. Este conocimiento es esencial para diseñar una gestión forestal eficaz que promueva la acumulación de C estabilizado en suelos de repoblación.

### Palabras clave

Relación planta-suelo, Biomasa microbiana, Rasgos funcionales de la raíz, Actividad enzimática, Anillamiento, Repoblación.

### 1. Introducción

Los ecosistemas terrestres desempeñan un papel fundamental en el ciclo global del carbono (C), al almacenar aproximadamente 450 Gt de C en su vegetación y 1,700 Gt de C en sus suelos, siendo los bosques los principales contribuyentes (Friedlingstein et al., 2023). Con el cambio climático, la preservación y gestión de los bosques como estrategia de mitigación ha despertado un interés creciente entre la comunidad científica y grupos de interés (Zhang et al., 2024). Sin embargo, persisten importantes incertidumbres sobre cómo distintas prácticas de gestión forestal influyen sobre las reservas de C y sus dinámicas en los distintos compartimentos del suelo (Ruiz-Peinado et al., 2017). Además, gran parte de los trabajos científicos que analizan estos impactos se basan en modelos de simulación forestal y ecohidrológicos, los cuales suelen centrarse en los efectos sobre la biomasa aérea (Mäkipää et al., 2023). Por tanto, son esenciales más estudios empíricos que evalúen las dinámicas de la biomasa subterránea (p. ej. raíces finas) y su influencia en las reservas de C del suelo, específicamente en la región



Mediterránea, donde la marcada variabilidad climática intra- e interanual afecta significativamente la funcionalidad del suelo (Ruiz-Peinado et al., 2017). Este conocimiento permitirá adoptar medidas de gestión forestal eficaz que promueva la acumulación de C estabilizado en suelos de repoblación.

La producción de raíces finas representa una proporción importante de la producción primaria anual en los ecosistemas forestales –hasta un 65%– (Jackson et al., 1997) y, por tanto, es un factor principal que determina la acumulación del C en el suelo y el balance de gases de efecto invernadero. Además, el crecimiento y la actividad metabólica radicular impacta en las propiedades fisicoquímicas del suelo, en la comunidad y actividad de los microorganismos y en la fauna edáfica, o en sus múltiples interrelaciones y dependencias (Mäkipää et al., 2023; Zhang et al., 2024). Un aspecto candente en la ecología del suelo es desentrañar cómo la variación en la asignación del C a los tejidos subterráneos de la planta puede afectar a los procesos implicados en el ciclo del C del suelo (Wu et al., 2011). Hay trabajos que muestran una disminución de la biomasa y actividad de los microorganismos del suelo en respuesta a la reducción o eliminación de la biomasa de raíces finas (Craig et al., 2022). Sin embargo, las respuestas pueden cambiar entre especies, climas y condiciones edáficas (Keller et al., 2021). Así, otros estudios indican un incremento de la actividad microbiana impulsada por mortalidad de las raíces finas (Subke et al., 2011). Por tanto, existe una necesidad crítica de comprobar empíricamente hasta qué punto una reducción del aporte de C subterráneo afecta a la biomasa, composición y fisiología microbiana, responsable de la respiración heterotrófica del suelo. Esto cobra más importancia si los productos derivados de la metabolización microbiana de los insumos radiculares de mayor calidad (p. ej. exudados de bajo peso molecular) constituyen la principal fuente del C de suelo de ciclado lento, al estabilizarse asociado a fracciones reactivas del suelo como el limo y la arcilla (Craig et al., 2022).

La actividad de enzimas extracelulares en el suelo es un indicador común para evaluar el funcionamiento de los microorganismos (Piñeiro et al., 2023). Estas enzimas, sintetizadas por bacterias, hongos y arqueas del suelo, desempeñan un papel clave en la descomposición y estabilización de la materia orgánica al regular la disponibilidad y el reciclaje de nutrientes y las dinámicas de C orgánico del suelo (Drake et al., 2011). A través de la producción de estas enzimas, los microorganismos del suelo degradan compuestos orgánicos complejos en moléculas solubles más pequeñas, liberando nutrientes que pueden ser asimilados por plantas y otros microorganismos (Carrillo et al., 2014). La transferencia de C a través de raíces finas, en forma de exudados radiculares o de C estructural, proporciona una fuente energética que estimula la actividad microbiana y la producción de enzimas extracelulares en la rizosfera. Esto puede intensificar la descomposición de la materia orgánica mediante el fenómeno conocido como *priming effect* (Kuzyakov, 2010), lo que pone de manifiesto el papel fundamental de las raíces finas como mediadoras entre la productividad vegetal, la composición microbiana y la persistencia del C en el suelo.

En este trabajo utilizamos el anillado de árboles (*tree girdling* en inglés) para reducir la transferencia de C hacia el suelo en pies de *Pinus pinaster* procedentes de repoblación en Arbancón (Guadalajara, España). Se trata de una técnica que elimina la corteza y el cambium en un anillo alrededor del tronco, provocando la muerte del árbol sin talarlo (Zeller et al., 2008). Al retirar el floema, los fotosintatos recién asimilados ya no pueden ser transportados a las raíces y, una vez consumidos los carbohidratos de reserva, los árboles mueren (Högberg et al.,



2011). Este tratamiento experimental permite evaluar el efecto a corto plazo (~2 y 12 meses) sobre la biomasa de raíces finas y su funcionalidad, la biomasa microbiana y la mineralización de la materia orgánica del suelo a través de enzimas extracelulares. Este trabajo supone un ensayo preliminar en un contexto más amplio. Futuros análisis de las muestras recogidas pretenden evaluar el efecto del anillamiento sobre las comunidades de bacterias, hongos y micorrizas, además de su papel en la dinámica del C del suelo asociado tanto a fracciones de materia orgánica particulada, como asociada a minerales (POM-C y MAOM-C).

## 2. Objetivos

Los objetivos de nuestro trabajo fueron: 1) evaluar el efecto del anillado en el sistema radicular (biomasa de raíces finas y sus rasgos funcionales); 2) estudiar si la biomasa microbiana responde al anillado y si la respuesta es positiva o negativa; 3) evaluar la actividad de enzimas extracelulares implicadas en los ciclos de carbono, nitrógeno y fósforo.

## 3. Metodología

Este estudio se realizó en los montes de Utilidad Pública nº 261, “Jócar”, del término municipal de Arbancón (Guadalajara), situado en Sierra Gorda, al sur de la sierra de Ayllón (Centro de España). La zona de estudio corresponde a una repoblación forestal de *Pinus pinaster* ejecutada en 1969 mediante plantación sobre terrazas con subsolado. La orientación general de la ladera es noroeste, la cota media es de 1070 msnm y las pendientes medias se sitúan en el entorno del 30%. El suelo es un alisol háplico, con un horizonte de acumulación de arcillas y baja saturación de bases en profundidad (Mantel et al., 2023). A principios de junio de 2023 se anillaron 18 árboles en seis parcelas de 50x50 m (3 individuos por parcela). El anillado consistió en la eliminación completa de la corteza y el floema en el tronco principal hasta la profundidad del xilema, a una altura de 1,5 m y en secciones de 0,3 m de longitud. Esta práctica se emplea para reducir el flujo de azúcares y otros nutrientes elaborados por las hojas hacia las raíces. En cada una de las parcelas se utilizaron como control tres árboles no anillados.

A principios de julio de 2023 y en julio de 2024 se recogieron cinco muestras de suelo de los 20 cm superficiales alrededor de cada uno de los árboles objeto de estudio y a 30 cm de distancia desde el tronco, utilizando un extractor cilíndrico de 5 cm de diámetro. En total, en cada campaña de muestreo se recogieron 90 muestras de suelo, que se utilizaron para medir biomasa de raíces finas (<2 mm de diámetro) y sus rasgos morfológicos, las características físico-químicas del suelo (pH, carbono orgánico), la actividad enzimática y la biomasa de los microorganismos. Tras la recogida, todas las muestras se transportaron al laboratorio y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta que se procesaron completamente en los 7 días siguientes a la recogida en el campo.

Para separar las raíces finas, las muestras se tamizaron a través de una malla de 1 mm y luego se clasificaron a mano, recogiendo cualquier material visible de raíces vivas (Piñeiro et al., 2023). Las raíces se clasificaron en dos clases de tamaño: (a) raíces finas, definidas como raíces con un diámetro <2 mm y sin crecimiento leñoso secundario y (b) raíces gruesas, con un diámetro >2 mm y/o crecimiento



secundario evidente. Se eligió esta clasificación de raíces finas en lugar de una clasificación basada en el orden (McCormack et al., 2015) porque el método de extracción no ha permitido recoger raíces intactas de múltiples órdenes de raíces de forma fiable. Por lo tanto, aunque nuestra clasificación del tamaño de las raíces finas puede incluir tanto raíces de absorción como de transporte, se centra en el conjunto más activo y efímero, permitiendo la comparación con estudios anteriores. Además, centramos nuestro estudio en los 20 cm superiores del suelo, donde tiene lugar la mayor parte del crecimiento de las raíces finas (Macinnis-Ng et al., 2010). Todas las raíces finas se lavaron cuidadosamente para eliminar las partículas del suelo. Se midieron los rasgos morfológicos de las raíces finas en submuestras representativas recogidas de cada muestra. Para ello, se escanearon las raíces finas (800 dpi, escáner Epson Perfection 12000) en los 2 días siguientes a su separación del suelo. Las imágenes se analizaron utilizando el software Winrhizo™ (Regent Instrument Inc., 2013) para determinar la longitud total de la raíz, el diámetro medio y la longitud de la raíz dentro de clases de diámetro de 0,1 mm. A partir del subconjunto de raíces escaneadas, calculamos la longitud específica de la raíz (SRL) como la relación entre la longitud de la raíz de las raíces vivas y la masa seca de la raíz (cm/g), el área específica (SRA) como la relación entre el área de la raíz y la masa seca de la raíz (cm<sup>2</sup>/g), la densidad del tejido de la raíz (RTD) como la relación entre la masa seca de la raíz y el volumen de la raíz (g/cm<sup>3</sup>) y el número de puntas y de uniones entre raíces, que es indicativo de la arquitectura del sistema radicular. Tras el escaneado, todas las raíces finas se secaron al horno (70 °C durante 2 días) y se pesaron.

La actividad potencial de seis enzimas extracelulares relacionadas con los ciclos del C, N y P se evaluó fluorométricamente siguiendo los métodos descritos en Bell et al. (2013). Brevemente, ensayamos:  $\alpha$ -1,4-glucosidasa (AG; degradación del almidón),  $\beta$ -1,4-glucosidasa (BG; degradación del almidón),  $\beta$ -xilosidasa (XYL; degradación de la hemicelulosa) y  $\beta$ -D-cellobiohidrolasa (CB; degradación de la celulosa) para el ciclo del C;  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminidasa (NAG; degradación de la quitina) para el ciclo del Nitrógeno; fosfatasa (PHOS; mineralización del fósforo) para el ciclo del fósforo. Los ensayos se realizaron homogeneizando 3 g de suelo en 99 ml de tampón acetato sódico 50 mM (pH 5,7) durante 1 minuto. A continuación, las soluciones homogeneizadas junto con los sustratos fluorométricos se añadieron a una microplaca de 96 pocillos (2 ml) y se incubaron durante 1,5 h a 35 °C. Se prepararon curvas estándar para cada muestra añadiendo 800  $\mu$ l de suelo a 200  $\mu$ l de soluciones estándar (4-metilumbelfferona (MUB) a una serie de concentraciones diferentes. Tras la incubación, la solución sobrenadante se transfirió a una placa negra de fondo plano de 96 pocillos y, a continuación, se escanearon en un fluorómetro de microplacas (FLUOstar Omega Microplate reader BMG Labtech, 2010, Alemania) utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm (Bell et al. 2013).

Para medir el C contenido en biomasa microbiana, utilizamos fumigaciones con cloroformo (Witt et al., 2000) seguidas de digestión con persulfato potásico. Brevemente, se extrajeron 10 g de suelo en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M con y sin cloroformo durante 4 h, se decantaron y se filtraron a través de un filtro Whatman de grado 42. A continuación, las soluciones filtradas se sometieron a digestiones con K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en las que el C disuelto se oxidó completamente a CO<sub>2</sub>, que se midió en un LI-Cor



850 (LICor Biosciences Inc. Lincoln, NB, EE.UU.). El C de la biomasa microbiana se calculó como la diferencia de C disuelto entre las muestras fumigadas con cloroformo y las no fumigadas, escalada por 2,64 para corregir la eficiencia de extracción (Vance et al., 1987).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con R 3.3.2 (R Core Team, 2017). Se utilizaron valores medios para cada individuo (obtenidos a partir de 5 muestras de suelo por árbol), lo que dio como resultado un único valor medio para los análisis, con  $n = 18$  para cada nivel de anillamiento. Esto evita la pseudoreplicación que surgiría de considerar las cinco muestras a nivel de árbol como réplicas independientes. Para evaluar el efecto del anillamiento sobre la biomasa de raíces finas, sus rasgos funcionales, la actividad enzimática y la biomasa utilizamos modelos de efectos lineales mixtos con el paquete 'nlme' (Pinheiro et al., 2019). En estos análisis, se incluyeron el tratamiento de anillamiento, la fecha de muestreo y la interacción entre ambos como términos fijos, mientras que la parcela se incluyó como factor aleatorio para tener en cuenta la falta de independencia entre muestras de la misma parcela (Zuur et al., 2009). Los p-valores se aproximaron mediante ANOVA de tipo II, donde los grados de libertad fueron aproximados según Kenward-Roger (Kenward & Roger, 1997). Todos los análisis se verificaron en cuanto a la normalidad de los residuos y la homocedasticidad de la varianza y se aplicaron transformaciones logarítmicas cuando fue necesario para cumplir con los supuestos paramétricos. Para examinar visualmente las diferencias entre los tratamientos de anillamiento y fecha de muestreo en el conjunto de rasgos morfológicos de las raíces finas y el conjunto de enzimas utilizamos análisis de componentes principales (PCA), incluyendo sólo las fechas de muestreo para su visualización debido a la falta de diferencias entre los tratamientos de anillamiento. Para la realización de los análisis de componentes principales, se utilizó la función 'prcomp' del paquete 'stats' (R Core Team, 2017).

#### 4. Resultados

La determinación de la biomasa radicular hasta una profundidad de 20 cm mostró diferencias significativas entre los tratamientos en ambas campañas de muestreo, realizadas después de uno y doce meses después del anillado de los árboles (Figura 1a, b). En consecuencia, los pinos anillados presentaron una menor biomasa de raíces finas que los pinos no anillados. Los resultados del análisis de los rasgos funcionales radiculares mediante PCA para ambas campañas de muestreo no reveló cambios asociados al anillamiento. No obstante, se observó un ajuste en los rasgos funcionales de las raíces finas hacia rasgos menos adquisitivos (mayor diámetro medio y densidad de tejido) en el verano 2024 con respecto al 2023, tanto en árboles anillados como en los árboles control (Figura 2).

Los análisis estadísticos revelaron una interacción significativa entre la campaña de muestreo y el tratamiento de anillamiento sobre la biomasa microbiana del suelo (Figura 3a, b). Así, se constató que la biomasa microbiana del suelo se redujo en el primer muestreo, tras la aplicación del anillamiento, pero no lo hizo de forma significativa al año siguiente.

Las actividades enzimáticas en las muestras de suelo analizado mostraron



respuestas variables respecto al tratamiento de anillado de árboles (Figura 4). Los análisis estadísticos revelaron una interacción significativa entre el tratamiento y la campaña de muestreo para la actividad de la enzima BG, implicada en la liberación de glucosa (Figuras 4a y 4b). Se observó que el anillamiento incrementó la actividad hidrolítica de BG únicamente en el verano de 2023. Por otro lado, el anillamiento tuvo una tendencia a reducir la actividad de las enzimas N-acetilglucosidasa y fosfatasa independientemente de la campaña de muestreo. La primera de estas dos enzimas está involucrada en la liberación del grupo amino presente en la pared celular de los hongos (i.e. quitina) y la pared bacteriana (i.e. peptidoglucano), y la segunda enzima actúa en la liberación de grupos fosfato (Figuras 4c, d y e-f). No se observaron efectos significativos ni del tratamiento ni de la campaña de muestreo en la actividad de celobiohidrolasa, alfa-glucosidasa y xilanasas en el suelo. Finalmente, el análisis PCA del conjunto de enzimas extracelulares analizadas indicó un mayor efecto del anillamiento en el muestreo de 2023 con respecto de 2024 (Figura 5).

## 5. Discusión

El presente estudio investigó el papel de la transferencia de C hacia las raíces como modulador de la actividad microbiana y la biomasa del suelo, utilizando el anillado como herramienta para agotar gradualmente los carbohidratos disponibles en las raíces. Los resultados demostraron que el anillado fue eficaz para interrumpir la transferencia de C hacia el sistema radicular, ya que se observó una disminución significativa en la biomasa de raíces finas en los árboles anillados (Figura 1), un efecto que se ha documentado en diversas especies arbóreas (Oberhuber et al., 2017). Esta reducción en la biomasa de raíces finas se manifestó apenas un mes después del tratamiento y perduró durante el año siguiente. En estudios previos realizados en diferentes ecosistemas forestales, también se ha visto una rápida disminución de los carbohidratos en las raíces finas tras el anillado (Chen et al., 2010; Dannenmann et al., 2009), lo que puede inducir un aumento en la mortalidad radicular. Sin embargo, de manera sorprendente, la biomasa de raíces finas se mantuvo estable durante el segundo año posterior al anillado, lo que sugiere que la biomasa radicular podría ser sostenida por otros mecanismos alternativos. Los resultados sugieren que el flujo de C recientemente asimilado es un factor clave en el mantenimiento de la biomasa radicular; no obstante, la movilización de compuestos de C no estructurales podría desempeñar un papel crucial en la conservación de la biomasa radicular a largo plazo, especialmente cuando el C derivado de la fotosíntesis es limitado (Drake et al., 2011).

Por otro lado, a pesar del impacto negativo del anillado sobre la biomasa de raíces finas, no se observaron diferencias significativas en los rasgos funcionales de las mismas en ninguno de los dos muestreos realizados. Sin embargo, se detectaron ajustes morfológicos en las raíces finas a lo largo del tiempo, ya que en el muestreo de 2024 las raíces presentaron un mayor diámetro medio y mayor densidad de tejido (RTD). Este cambio morfológico podría explicarse por las variaciones en las condiciones ambientales entre los dos muestreos, particularmente por una menor humedad del suelo en 2024 (Tabla 1), lo cual podría haber inducido un mayor desarrollo de raíces finas adaptadas para tolerar períodos de estrés hídrico (Macinnis-Ng et al., 2010). Estos resultados sugieren que



las variaciones en la disponibilidad de agua podrían ser factores más determinantes que el propio tratamiento de anillado en las características morfológicas de las raíces finas (Piñeiro et al., 2023).

Respecto a la biomasa microbiana, se registró un incremento significativo en los árboles anillados durante el mes posterior al tratamiento. Este aumento podría explicarse por la mayor disponibilidad de carbono lábil en el suelo, ya que los microorganismos del suelo dependen ampliamente de este recurso para su actividad metabólica (Craig et al., 2022). En este caso, el anillado, al inducir la mortalidad de las raíces, generó una liberación de C derivada de la descomposición del material radicular (Subke et al., 2011). Este aporte temporal de C parece haber actuado como una nueva fuente de energía para los microorganismos del suelo, favoreciendo su crecimiento y contribuyendo al aumento observado en la biomasa microbiana durante este periodo inicial (Oberhuber et al., 2017). No obstante, al analizar los datos de biomasa microbiana en 2024, se observó una disminución en los árboles anillados en comparación con 2023, mientras que en los árboles control se produjo un aumento en el mismo periodo. Esta reducción en la biomasa microbiana de los árboles anillados podría estar asociada con el agotamiento progresivo del C lábil en el suelo (Carrillo et al., 2014). Una vez que se consumieron los insumos derivados de la descomposición del material radicular y debido a la falta de exudados radiculares, el suelo habría perdido una fuente clave de C necesario para sostener las comunidades microbianas. En contraste, los árboles control, al mantener un aporte constante de C a través de los exudados radiculares y otros procesos, facilitaron un entorno más favorable para el desarrollo microbiano. Estos resultados resaltan la importancia del flujo continuo de C entre las raíces y los microorganismos del suelo para mantener la biomasa microbiana a lo largo del tiempo. El anillado, al interrumpir esta interacción clave, genera un cambio en la dinámica de C que, aunque inicialmente fomenta un aumento transitorio en la biomasa microbiana, eventualmente conduce a una disminución debido a la falta de insumos sostenidos (Dannenmann et al., 2009).

En cuanto a las actividades enzimáticas, aquellas relacionadas con la degradación de almidón (AG), hemicelulosa (XYL), celulosa (CB), quitina (NAG) y la mineralización de fósforo (Phos) no presentaron variaciones significativas tras el tratamiento de anillado. Esto sugiere un menor control directo de la transferencia de C a través de las raíces sobre la actividad de estas enzimas en el corto y medio plazo. Sin embargo, se registró un aumento significativo en la actividad de la  $\beta$ -1,4-glucosidasa (BG), encargada de la liberación de glucosa, apenas un mes después del anillado. Este incremento podría estar relacionado con el efecto positivo del anillado sobre la biomasa microbiana; no obstante, el aumento en BG debería, en teoría, ir acompañado de un incremento en la actividad de otras enzimas estudiadas. Por ello, es plausible que la mayor actividad de BG no sea exclusivamente resultado del aumento en la biomasa microbiana tras el anillado.

Los resultados sugieren que el incremento en BG podría estar vinculado al aumento de insumos de C derivados de la mortalidad de raíces finas ocasionada por el anillado. Este proceso parece haber generado un aumento en la demanda de glucosa en relación con nitrógeno y fósforo, como lo indican los aumentos en BG



junto con ligeras reducciones en NAG y Phos en los árboles anillados. Sin embargo, no es posible discernir si los cambios en BG están asociados a ajustes en la composición de las comunidades microbianas, como un desplazamiento hacia taxones especializados en la degradación de glúcidos. Durante 2024, se observó una reducción en la actividad de BG en comparación con 2023, lo que se alinea con la disminución de la biomasa microbiana en los árboles anillados. En conclusión, los resultados indican que el incremento en la actividad de BG tras el anillado es un fenómeno transitorio potencialmente vinculado al aumento de insumos de C derivados de la mortandad de raíces finas. Este efecto no parece deberse exclusivamente al crecimiento de la comunidad microbiana, sino a una respuesta más compleja asociada al pulso inicial de materia orgánica disponible en el suelo tras el anillado. La posterior disminución de la actividad de BG en 2024, en línea con la reducción de la biomasa microbiana sugiere que estos cambios enzimáticos son sensibles a la disponibilidad de C lábil y reflejan la dinámica temporal de los procesos de descomposición y mineralización en suelos afectados por el anillado.

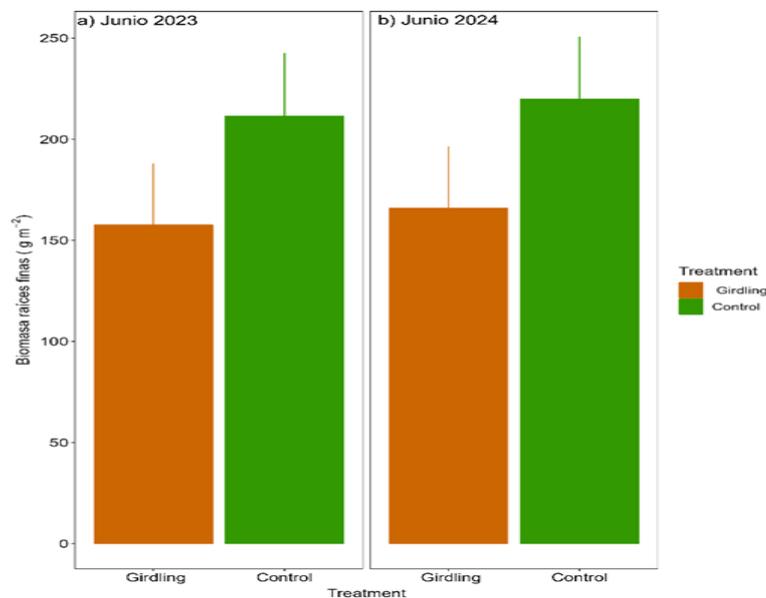


Figura 1. Biomasa de raíces finas en el suelo bajo individuos de *Pinus pinaster* en parcelas control (verde) y con árboles anillado ('Girdling' en naranja) para las campañas de campo de a) Junio 2023 y b) Junio 2024.

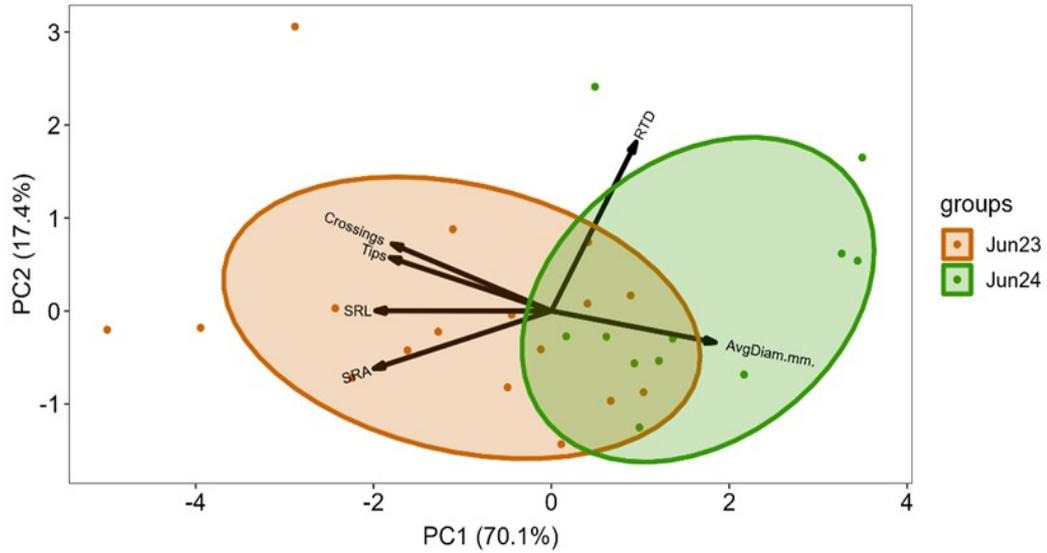


Figura 2. Análisis de componentes principales de los rasgos funcionales de las raíces recogidas en cilindros de suelo bajo individuos de *Pinus pinaster* en las campañas de campo de Junio 2023 y (naranja) y Junio 2024 (verde). RTD, densidad de tejido radicular; AvgDiam.mm., diámetro promedio; SRA, área específica; SRL, longitud específica; Tips, puntas; Crossings, cruces.

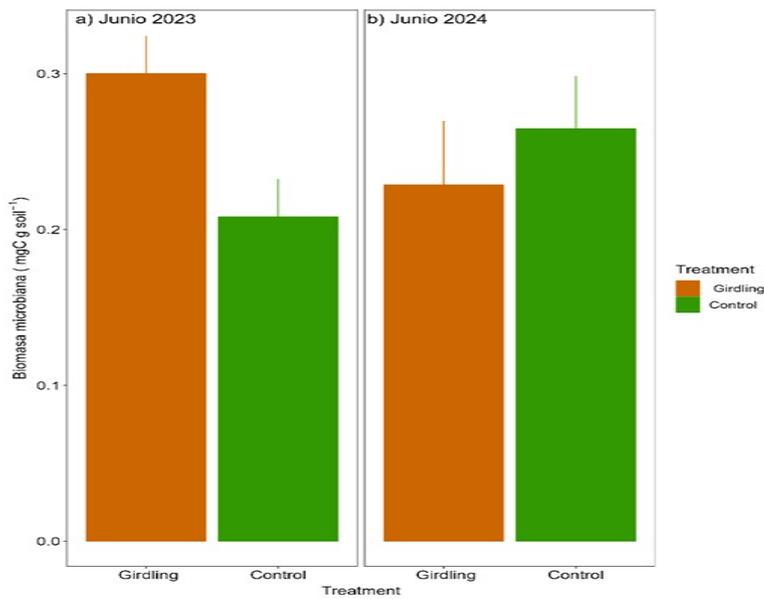


Figura 3. Biomasa microbiana en el suelo bajo individuos de *Pinus pinaster* en parcelas control (verde) y con árboles anillado (Girdling en naranja) para las campañas de campo de a) Junio 2023 y b) Junio 2024.

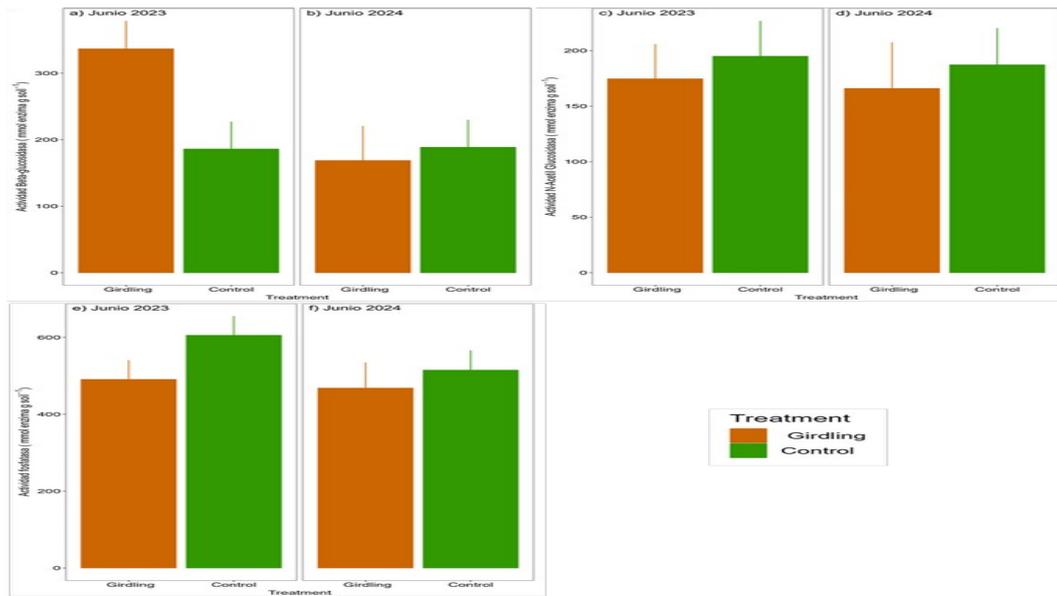


Figura 4. Actividad enzimática de a, b) beta-glucosidasa, c, d) N-acetil glucosidasa y e, f) fosfatasa en suelo bajo individuos de *Pinus pinaster* de parcelas control (verde) y con árboles anillados (“Girdling” en naranja) para las campañas de campo de junio 2023 y junio 2024, respectivamente.

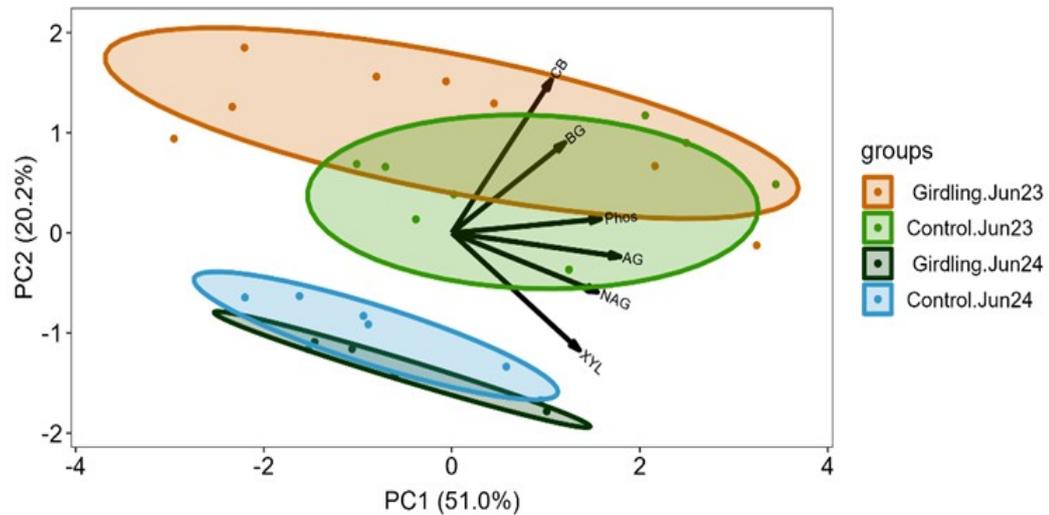


Figura 5. Actividad enzimática de a, b) beta-glucosidasa, c, d) N-acetil glucosidasa y e, f) fosfatasa en suelo bajo individuos de *Pinus pinaster* de parcelas control (verde) y con árboles anillados (“Girdling” en naranja) para las campañas de campo de Junio 2023 y Junio 2024, respectivamente (n=3). CB,  $\beta$ -D-cellobiohidrolasa; BG,  $\beta$ -1,4-glucosidasa; Phos, fosfatasa; AG,  $\alpha$ -1,4-glucosidasa; NAG,  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminidasa; Xyl,  $\beta$ -xilosidasa.

Tabla 1. Resultados de los modelos lineales mixtos que evalúan los efectos de la interacción del tratamiento de anillado con la campaña de muestreo sobre las distintas variables de estudio.

Variable	Anillado (1,20)	Fecha (1,20)	Anillado:Fecha (1,20)
----------	-----------------	--------------	-----------------------

	F	P-valor	F	P-valor	F	P-valor
Biomasa raíces finas	4,61	0,04	0,83	0,37	0,47	0,49
Humedad del suelo	0,04	0,81	20,51	<0,01	0,03	0,84
Carbono orgánico disuelto	0,23	0,63	18,22	<0,01	0,02	0,89
Biomasa microbiana	7,33	0,02	0,32	0,57	4,11	0,05
BG	16,01	<0,01	12,61	<0,01	6,57	0,03
AG	0,51	0,47	1,32	0,25	2,81	0,16
CB	2,11	0,15	2,35	0,12	2,25	0,13
XVL	0,25	0,61	1,67	0,20	4,50	0,03
NAG	0,23	0,65	0,09	0,74	0,005	0,94
Phos	3,54	0,08	0,33	0,56	0,67	0,42

## 6. Conclusiones

El anillado de árboles maduros de *Pinus pinaster* redujo la biomasa de raíces finas a corto plazo con respecto a árboles control (ca. 1 mes), manteniéndose estable esta reducción 1 año después del tratamiento. Estos resultados indican que el tratamiento de anillamiento fue efectivo para reducir la transferencia de C a las raíces. Los árboles anillados no mostraron cambios en los rasgos funcionales de las raíces finas, cuyos cambios morfológicos podrían ser más sensibles a las variaciones climáticas interanuales que al propio tratamiento de anillamiento. La biomasa microbiana del suelo se incrementó bajo los árboles anillados, aunque se recuperó el segundo año de muestreo lo que podría vincularse con el agotamiento progresivo del C lábil del suelo. Únicamente la actividad de la enzima extracelular BG respondió al tratamiento de anillado. Este efecto no parece deberse exclusivamente al crecimiento de la comunidad microbiana, sino a una respuesta más compleja asociada al pulso inicial de materia orgánica disponible en el suelo tras el anillado (mortalidad de raíces finas). El estudio destaca la interdependencia entre la transferencia de C desde las raíces y la dinámica de las comunidades microbianas y enzimáticas del suelo, así como la capacidad limitada de los ecosistemas para sostener estos procesos en ausencia de un flujo continuo de carbono. Este conocimiento es clave para desarrollar estrategias de manejo forestal que favorezcan el almacenamiento de carbono estabilizado en los suelos de áreas reforestadas.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto FORTRESS (PID2021-127241OB-I00) de la convocatoria de Generación de Conocimiento 2021. Juan Piñeiro recibió apoyo adicional del programa Ramón y Cajal del Ministerio de Ciencia español (RYC-2021-033454).

## 8. Bibliografía

BELL CW, FRICKS BE, ROCCA JD, STEINWEG JM, MCMAHON SK, WALLENSTEIN MD (2013). High-throughput fluorometric measurement of potential soil



extracellular enzyme activities. *Journal of Visualization experiments* 81:e50961

CARRILLO, Y., DIJKSTRA, F. A., PENDALL, E., LECAIN, D., & TUCKER, C. (2014). Plant rhizosphere influence on microbial C metabolism: the role of elevated CO<sub>2</sub>, N availability and root stoichiometry. *Biogeochemistry*, 117, 229-240.

CHEN, D., ZHOU, L., WU, J., HSU, J., LIN, Y., & FU, S.; 2012, Tree girdling affects the soil microbial community by modifying resource availability in two subtropical plantations. *Applied Soil Ecology*, 53(1), 108–115.

CRAIG, M. E., GEYER, K. M., BEIDLER, K. V., BRZOSTEK, E. R., FREY, S. D., STUART GRANDY, A., LIANG, C., & PHILLIPS, R. P.; 2022, Fast-decaying plant litter enhances soil carbon in temperate forests but not through microbial physiological traits. *Nature Communications*, 13(1), 1229

DANNENMANN, M., SIMON J., GASCHÉ, R., KÖGEL-KNABNER, I., KNICKER H., ET AL. (2009). Tree girdling provides insight on the role of labile carbon in nitrogen partitioning between soil microorganisms and adult European beech. *Soil Biology and Biochemistry* 41(8), 1622-1631.

DRAKE, J. E., GALLET-BUDYNEK, A., HOFMOCKEL, K. S., BERNHARDT, E. S., BILLINGS, S. A., JACKSON, R. B., & FINZI, A. C. (2011). Increases in the flux of carbon belowground stimulate nitrogen uptake and sustain the long-term enhancement of forest productivity under elevated CO<sub>2</sub>. *Ecology letters*, 14(4), 349-357.

FRIEDLINGSTEIN, P., O'SULLIVAN, M., JONES, M. W., ANDREW, R. M., BAKKER, D. C. E., HAUCK, J., LANDSCHÜTZER, P., LE QUÉRÉ, C., LUIJKX, I. T., PETERS, G. P., PETERS, W., PONGRATZ, J., SCHWINGSHACKL, C., SITCH, S., CANADELL, J. G., CIAIS, P., JACKSON, R. B., ALIN, S. R., ANTHONI, P., ... ZHENG, B.; 2023. Global Carbon Budget 2023. *Earth System Science Data*, 15(12), 5301–5369.

HÖGBERG, P., NORDGREN, A., BUCHMANN, N., TAYLOR, A. F., EKBLAD, A., HÖGBERG, M. N., ... & READ, D. J. (2001). Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*, 411(6839), 789-792.

KELLER, A. B., BRZOSTEK, E. R., CRAIG, M. E., FISHER, J. B., & PHILLIPS, R. P.; 2021. Root-derived inputs are major contributors to soil carbon in temperate forests, but vary by mycorrhizal type. *Ecology Letters*, 24(4), 626–635.

KENWARD, M. G., & ROGER, J. H. (1997). Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, 53(3), 983

KUZYAKOV, Y. (2010). Priming effects: interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1363-1371.

MACINNIS-NG, C. M. O., FUENTES, S., O'GRADY, A. P., PALMER, A. R., TAYLOR, D., WHITLEY, R. J., ... EAMUS, D. (2010). Root biomass distribution and soil properties of an open woodland on a duplex soil. *Plant and Soil*, 327(1–2), 377–388.

MANTEL, S., DONDEYNE S. & DECKERS, S. World reference base for soil resources (WRB). Goss, Margaret Oliver Encyclopedia of Soils in the Environment, 2nd ed.; Michael, J., Ed (2023): 206-217.

MÄKIPÄÄ, R., ABRAMOFF, R., ADAMCZYK, B., BALDY, V., BIRYOL, C., BOSELA, M., CASALS, P., CURIEL YUSTE, J., DONDINI, M., FILIPEK, S., GARCIA-PAUSAS, J., GROS, R., GÖMÖRYOVÁ, E., HASHIMOTO, S., HASEGAWA, M., IMMONEN, P., LAIHO, R., LI, H., LI, Q., ... LEHTONEN, A. ; 2023. How does management affect soil C sequestration and greenhouse gas fluxes in boreal and temperate forests? – A review. *Forest Ecology and Management*, 529, 120637.



MCCORMACK, M. LUKE, IAN A. DICKIE, DAVID M. EISSENSTAT, TIMOTHY J. FAHEY, CHRISTOPHER W. FERNANDEZ, DALI GUO, HELJÄ-SISKO HELMISAARI et al. (2015). Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytologist*, 207, 3: 505-518.

OBERHUBER, WALTER, ANDREAS GRUBER, GINA LETHAUS, ANDREA WINKLER, AND GERHARD WIESER (2017). Stem girdling indicates prioritized carbon allocation to the root system at the expense of radial stem growth in Norway spruce under drought conditions. *Environmental and Experimental Botany* 138: 109-118.

PINHEIRO J, BATES D, DEBROY S, SARKAR D, R CORE TEAM (2018) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1–137.

PIÑEIRO, J., OCHOA-HUESO, R., SERRANO-GRIJALVA, L. AND POWER, S.A. (2023). Phosphorus and water supply independently control productivity and soil enzyme activity responses to elevated CO<sub>2</sub> in an understorey community from a Eucalyptus woodland. *Plant and Soil*, 483(1), 643-657.

R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

RUIZ-PEINADO, R., BRAVO-OVIEDO, A., LÓPEZ-SENEPLEDA, E., BRAVO, F., & DEL RÍO, M.; 2017. Forest management and carbon sequestration in the Mediterranean region: A review. *Forest Systems*, 26(2), eR04S.

SUBKE, J., VOKE, N. R., LERONNI, V., GARNETT, M. H., & INESON, P.; 2011. Dynamics and pathways of autotrophic and heterotrophic soil CO<sub>2</sub> efflux revealed by forest girdling. *Journal of Ecology*, 99(1), 186–193. .

VANCE, E. D., BROOKES, P. C., & JENKINSON, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 703–707.

WITT, C., GAUNT, J. L., GALICIA, C. C., OTTOW, J. C. G., & NEUE, H.-U. (2000). A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5), 510–519.

WU, J., LIU, Z., WANG, X., SUN, Y., ZHOU, L., LIN, Y., & FU, S. 2011. Effects of understory removal and tree girdling on soil microbial community composition and litter decomposition in two Eucalyptus plantations in South China. *Functional Ecology*, 25(4), 921–931.

ZHANG, H., LIU, S., YU, J., LI, J., SHANGGUAN, Z., & DENG, L.; 2024. Thinning increases forest ecosystem carbon stocks. *Forest Ecology and Management*, 555, 121702.

ZUUR, A. F., IENO, E. N., WALKER, N. J., SAVELIEV, A. A., & SMITH, G. M. (2009). Mixed effects modelling for nested data. In M. Gail, K. Krickeberg, J. M. Samet, A. Tsiatis, & W. Wong (Eds.), *Mixed effects models and extensions in ecology with R statistics for biology and health* (pp. 101–142). Springer