



9CFE-1852

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



Impacto de la gestión forestal sobre la diversidad y la composición microbiana del suelo en masas de pino laricio

RODRÍGUEZ, A. (1), PÉREZ, R. (2), COLLADO, E. (3), SOLA, A. (2), PIQUÉ, M. (3), ALONSO, C. (2), MERINO, J. (2), MARTÍN, B. (2), BLÁZQUEZ, A. (2), RUBIO, R. (2), DE DIOS, J. (2)

(1) Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León

(2) CESEFOR

(3) Centre Tecnològic Forestal de Catalunya

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de los tratamientos selvícolas en la diversidad y composición de hongos y bacterias del suelo en masas de *Pinus nigra* mediante metataxonomía. Se establecieron parcelas control y gestionadas, con estructuras y edades contrastadas, en cinco sitios de Soria y Cataluña (11 parcelas). De cada parcela se combinaron 8 submuestras para extraer ADN y se secuenciaron las regiones ITS (hongos) y 16S (bacterias) mediante Illumina PE de 250 pb. Las variantes de secuencia (ASV), se procesaron con QIIME2 para asignar taxones (bases Unite y Silva) y calcular los valores de diversidad y de abundancia diferencial (ANCOM-BC).

No se detectaron diferencias significativas en la diversidad alfa y beta entre las parcelas control y tratadas. Sólo se detectó una especie y familia bacteriana favorecidas por el tratamiento selvícola ($q < 0.1$). En los hongos no hubo diferencias significativas a nivel de especie, género, familia u orden y solamente tres ASV presentaron abundancia diferencial.

En conclusión, la gestión forestal no afectó significativamente la diversidad ni la composición de la microbiota del suelo. Este estudio demuestra que los tratamientos selvícolas sobre *Pinus nigra* proporcionan servicios ecosistémicos sin comprometer las comunidades fúngicas y bacterianas.

Palabras clave

biodiversidad forestal, gestión forestal, conservación de la diversidad genética, metataxonomía, microbiota del suelo

1. Introducción

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la gestión forestal en la diversidad y composición de hongos y bacterias del suelo en bosques de *Pinus nigra* mediante técnicas de metataxonomía o *metabarcoding*. Se establecieron parcelas control (no gestionadas) y parcelas gestionadas, representando una variedad de tipos, estructuras y edades, en cinco sitios ubicados en Soria y Cataluña, con un total de 11 parcelas. Cada parcela gestionada se situó cerca de una parcela de control (excepto en un caso, donde había dos parcelas gestionadas).

La microbiota del suelo es crucial para mantener la salud y favorecer el crecimiento de las plantas. Los efectos beneficiosos de los microorganismos, bacterias y hongos, radican en la absorción de nutrientes (mejora del crecimiento de las plantas) y en la protección contra diversas condiciones abióticas y bióticas negativas (MERCADO-BLANCO *et al.*, 2018). Además, la diversidad microbiana es importante porque aporta redundancia funcional, lo que garantiza que se mantengan funciones esenciales incluso cuando algunas especies microbianas se ven afectadas (LLADÓ *et al.*, 2018). Aunque los estudios sobre la ecología del suelo forestal se han centrado predominantemente en los hongos, las bacterias constituyen una parte esencial de la comunidad microbiana en estos suelos



(LLADÓ *et al.*, 2017). No obstante, el conocimiento sobre cómo responden las comunidades microbianas del suelo a las prácticas de gestión forestal sigue siendo muy limitado (ONET *et al.*, 2025).

La metodología de metataxonomía empleada consiste en extraer ADN de las muestras de suelo y, utilizando este ADN como molde, amplificar por PCR regiones específicas de genes ribosómicos. Los productos amplificados se secuencian en la plataforma de ultrasecuenciación Illumina. Las lecturas de secuenciación resultantes se analizan bioinformáticamente para caracterizar la diversidad y la composición microbiana de bacterias y de hongos.

Las regiones de los genes ribosómicos analizadas reúnen dos características clave: combinan segmentos de secuencia conservada o compartida entre organismos filogenéticamente distantes y segmentos variables entre los diversos taxones. Los segmentos conservados permiten el diseño de pares de oligonucleótidos que ceban la polimerización y amplifiquen, en un único ensayo, secuencias génicas de un rango taxonómico amplio (un ensayo para hongos y otro para bacterias). Por otra parte, los segmentos variables posibilitan identificar el género o incluso la especie.

Las regiones de los genes ribosomales que poseen estas características para el análisis de hongos se denominan ITS (*Internal Transcribed Spacer*), mientras que las útiles para el grupo de bacterias corresponden al gen ribosomal 16S.

En las siguientes secciones se describen las acciones realizadas en este estudio, desde la recolección de muestras y el diseño experimental hasta los resultados del análisis.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la gestión forestal en la diversidad y composición de hongos y bacterias del suelo en bosques de *Pinus nigra* mediante técnicas de metataxonomía.

3. Metodología

3.1. Diseño experimental

La especie arbórea principal de las once parcelas utilizadas en este estudio fue *Pinus nigra*. Los tratamientos selvícolas aplicados a cada parcela se detallan en la Tabla 1. Estas parcelas están ubicadas en cinco localizaciones, una en Soria (Castilla y León; CL.01 y CL.02) y cuatro en Cataluña (CA.01 a CA.09). Estas últimas corresponden a rodales de *Pinus nigra* ubicados en cuatro bosques de Cataluña, dentro de las comarcas del Solsonès, Alt Urgell y Pallars Sobirà (Tabla 1, Figura 1). Estos rodales, identificados en el marco del proyecto Life+ PINASSA (LIFE13 NAT/ES/000724; BELTRÁN *et al.*, 2018), representan diferentes tipologías forestales, condiciones topográficas y climáticas, con precipitaciones anuales que oscilan entre 784 y 874 mm y temperaturas medias anuales entre 9,1 y 11,6 °C. La especie principal presente en los rodales es *Pinus nigra*, mientras que las especies arbóreas secundarias son *Acer monspessulanum*, *Ilex aquifolium*, especies de roble (*Quercus faginea* y *Quercus pubescens*), *Pinus sylvestris* y *Prunus avium*.

Tabla 1. Detalles de los tratamientos selvícolas e identificadores de las parcelas experimentales de *Pinus nigra*. Las parcelas control y las

gestionadas (tratadas) están situadas cerca unas de otras y organizadas en pares, con la excepción de un trío (CA.07-CA.09).

ID parcela	Tratamiento selvícola	Último año de intervención	Intensidad de la corta (% de reducción de área basimétrica)	Desbroces
CL01	Ninguno	-	-	No
CL02	Corta por lo bajo	2004	35-40	No
CA01	Corta por lo bajo	2016	21,5	Sí, selectivos
CA02	Ninguno	-	-	No
CA03	Corta preparatoria	2016	32,5	Sí, selectivos
CA04	Ninguno	-	-	No
CA05	Corta preparatoria	2016	29,4	No
CA06	Ninguno	-	-	No
CA07	Entresaca por bosque	2016	16,7	No
CA08	Entresaca por bosque	2016	23,2	No
CA09	Ninguno	-	-	No

Las 9 parcelas (5 gestionadas y 4 control, no gestionadas) de Life+ PINASSA están distribuidas en masas regulares, con diferentes edades, y en masas irregulares (Tabla 1, Figura 1). El tamaño de las parcelas dependía de la densidad del rodal, variando entre 200 y 710 m². Cada una de estas parcelas se ubicó en rodales puros (área basimétrica [AB] de *P. nigra* ≥ 80%) con una cobertura mínima del dosel del 60%. Se consideró parcela no gestionada aquella sin tratamientos silvícolas en, al menos, los últimos 30 años desde el año de inventario (2016). Los tratamientos aplicados a las parcelas gestionadas se implementaron en 2016, e incluyen claras por lo bajo (en masas más jóvenes), cortas de regeneración-preparatorias (en la masa adulta y madura) y entresacas por bosquetes (en masas irregulares) (Tabla 1). Para más información sobre los tratamientos silvícolas realizados en las distintas tipologías, así como los resultados dasométricos, consultar el manual de buenas prácticas del Life+ PINASSA (BELTRÁN *et al.*, 2018).

3.2. Muestreo de suelo

Las parcelas son circulares y de radio variable, entre 8 m y 16 m. Se muestreó la misma área en todos los casos: un círculo interno de 8 m de radio. Los puntos de muestreo se determinaron previamente y de manera aleatoria en oficina (Figura 1). En el campo, se tomaron 8 núcleos de suelo (21 cm de largo y 5 cm de diámetro) por parcela utilizando una barrena y se introdujeron en bolsas de plástico.

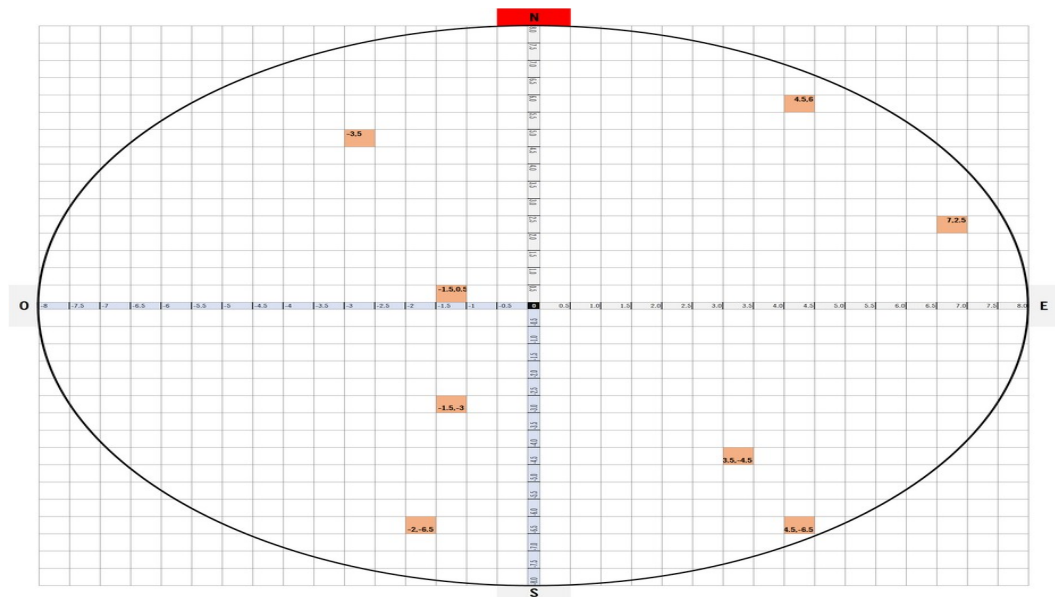


Figura 1. Ejemplo de una cuadrícula para guiar el muestreo del suelo. Se delimitó un plano cartesiano desde el centro de la parcela con ejes este-oeste (abscisas) y norte-sur (ordenadas). Las coordenadas, con una precisión de 0,5 m, definieron las celdas de la cuadrícula, y aquellas cuyo centro se encontraba dentro del círculo de la parcela también fueron consideradas. Las coordenadas de las celdas se definieron aleatoriamente, asegurando que se recogieran dos submuestras por cuadrante (8 submuestras en total por parcela).

3.2.1. Transporte y procesamiento de las muestras de suelo

Para evitar el crecimiento microbiano y mantener la representatividad, las muestras de suelo se mantuvieron refrigeradas desde la recolección hasta su transporte al centro de procesamiento (instalaciones de Cese-for-Inbiotec, León, España). El tiempo transcurrido desde la recolección hasta el procesamiento (siguiente etapa) fue inferior a 24 horas.

Las muestras de suelo de cada parcela se procesaron de la siguiente manera para garantizar uniformidad y limpieza: primero, los núcleos de suelo se desmenuzaron cuidadosamente para dispersar pequeños terrones. Luego, se transfirieron a un recipiente plástico circular, elegido por su facilidad de limpieza y mezcla. Para evitar cualquier contaminación potencial, los investigadores usaron guantes de nitrilo, que se cambiaban entre parcelas. En caso de que las muestras estuvieran particularmente húmedas, se extendieron sobre papel de filtro y se dejaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 30 minutos a 1,5 horas. Según protocolos establecidos en investigaciones de microbiología del suelo, el suelo se pasó por un tamiz de 2,5 mm y se transfirió a otro recipiente, tal y como se muestra en las fotografías siguientes (Figura 2). En este recipiente se mezcló manualmente durante al menos cinco minutos para obtener una muestra compuesta homogénea.



Figura 2. Tamizado (izquierda) y mezcla (centro) de muestras de suelo para obtener el suelo tamizado, que luego fue dividido en alícuotas (derecha).

Se recogieron los siguientes tipos de muestras de cada muestra compuesta tamizada:

- 1) Aproximadamente 0,5 mL (equivalente a 0,2-0,4 g) de suelo tamizado destinado a la extracción de ADN, transferido a cinco microtubos de 2,2 mL y almacenado a -80 °C hasta su extracción.
- 2) Aproximadamente 35 mL (22-28 g de peso húmedo) de suelo tamizado se recogieron en un tubo de 50 mL prepesado y se incubaron destapados en un horno a 45°C durante al menos 14 días. Luego, se pesaron para calcular el contenido de humedad del suelo en el momento en que se recogieron las alícuotas para extracción de ADN. Estos valores se utilizaron posteriormente para correlacionar el ADN obtenido por gramo de peso seco del suelo.
- 3) 35-40 mL de suelo tamizado se recogieron en un tubo de centrifuga de 50 mL y se almacenaron a -80 °C como reserva.

3.3. Análisis químico

Tras separar las alícuotas descritas, los suelos se dejaron secar en una bandeja durante unos días a temperatura ambiente (no más de 5 días) y luego se transfirieron para medir el pH, el contenido total de carbono y nitrógeno, y el fósforo asimilable (servicio de laboratorio de la Universidad de León). Los suelos se tamizaron nuevamente a través de un tamiz de 2 mm y se trituraron. Se preparó una suspensión suelo:agua (1:2,5) para medir el pH directamente. El carbono y nitrógeno totales se determinaron con un analizador EuroVector EA3000. La espectroscopía UV/Vis se utilizó para determinar el fósforo asimilable tras extraer el suelo con NaHCO₃ 0,5M pH 8,5. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis químico de las muestras de suelo de cada parcela. Los valores reflejan las características similares entre las parcelas de control y tratadas gestionadas que forman un conjunto experimental.

Parcela	pH	N Total (%)	C Total (%)	P (mg/kg)
CL01	5,60	0,08	3,44	1,42
CL02	5,73	0,12	3,35	1,28
CA01	8,01	0,25	8,27	8,57
CA02	8,09	0,26	8,80	7,87
CA03	8,13	0,23	8,15	6,33
CA04	8,19	0,18	7,19	7,31
CA05	8,34	0,25	10,41	7,31
CA06	8,26	0,27	10,03	5,06
CA07	7,35	0,19	5,76	3,94
CA08	5,94	0,31	10,88	6,47
CA09	7,28	0,25	8,95	3,80

3.4. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

La extracción de ADN del suelo se ve dificultada por la presencia de ácidos húmicos que inhiben la reacción de polimerización subsiguiente (PCR). Para este proceso se utilizó el kit comercial DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen), uno de los procedimientos más utilizados en los trabajos recientes de microbiología del suelo.

El proceso de extracción de ADN se aplicó a las alícuotas de suelo tamizado descritas anteriormente y conservadas a -80 °C. Primero, se pesó cada tubo vacío de lisis (proporcionado en el kit); luego, las alícuotas de suelo se transfirieron a los tubos de lisis correspondientes, y los tubos se pesaron nuevamente. La cantidad exacta de suelo seco procesado por extracción se determinó posteriormente calculando el coeficiente obtenido tras secar al horno una alícuota de masa mayor.

Se siguieron las instrucciones del fabricante, con la particularidad de que la agitación mecánica se realizó en un agitador Mikro-Dismembrator (Sartorius) a 1500 rpm durante 5 minutos; posteriormente, se invirtieron los adaptadores de los tubos y se repitió el proceso de agitación. El ADN se eluyó de las columnas del kit con 60 µL de la solución tampón. Se realizaron tres extracciones de ADN por cada muestra de suelo (11 muestras de suelo × 3 extracciones = 33 muestras de ADN). La calidad de las preparaciones se comprobó mediante espectroscopía UV (NanoDrop) y electroforesis (Figura 3).

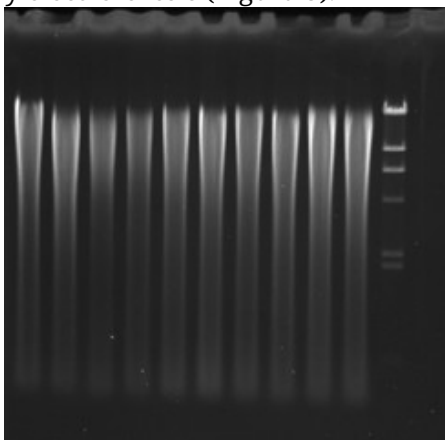


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (0,7 %) de una serie de 10 preparaciones representativas de ADN junto con un marcador de tamaño (M). Se observa un patrón de degradación o fragmentación, que, según nuestra experiencia, no interfiere con el resultado de la secuenciación posterior.

Además de las tres extracciones de ADN por muestra de suelo, incluimos en el análisis 2 controles positivos y 2 controles negativos. Para el control positivo, se añadió a la muestra de suelo CA.03 una suspensión fresca de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Se añadieron un total de $1,2 \times 10^5$ células de levadura por gramo de suelo seco a dos alícuotas de suelo CA.03 al inicio del procedimiento de extracción (antes del paso de disrupción mecánica). Para el control negativo, no se utilizó ninguna muestra de suelo; en su lugar, se siguió el protocolo utilizando únicamente las soluciones del kit.

3.5 Secuenciación en la plataforma Illumina

Las muestras de ADN se enviaron a las instalaciones de Novogene en Oxford (Reino Unido) para la amplificación por PCR y la secuenciación. Para la amplificación de la región V3-V4 del 16S bacteriano, se utilizaron los cebadores 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) y 806R (GGACTACNNGGTATCTAAT). Para el análisis de hongos, se usó la pareja de cebadores diseñada por Tedersoo y Lindahl (2016): gITS7ngs (GTGARTCATCRARTYTTTG) e ITS4ngsUni (CCTSCSCTTANTDATATATGC). Estos cebadores amplifican la región ITS2 y, según Nilsson et al. (2019), muestran una mayor cobertura taxonómica dentro del reino fúngico. La secuenciación de los productos amplificados se realizó en una plataforma Illumina en modo 2×250 pb. Se obtuvieron 33 librerías de secuenciación, es decir, 3 réplicas técnicas por parcela, para el análisis de bacterias y otras 33 para el análisis fúngico.

3.6 Procedimientos bioinformáticos

Control de calidad de las lecturas de ultrasecuenciación

Las lecturas de secuenciación se procesaron utilizando el siguiente *software* y parámetros. Las secuencias de los cebadores de PCR se recortaron de las lecturas con BBDuk versión 39.06 (Bushnell B.; <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) en dos pasos: primero, para eliminar las secuencias técnicas a la izquierda, y una segunda ejecución para recortar a la derecha. Los parámetros utilizados para las lecturas 16S fueron, respectivamente: "literal=CCTAYGGGRBGCASCAG,GGACTACNNGGTATCTAAT copyundefined=t ktrim=l k=13 rcomp=f mink=11 hdist=1 minlen=20 maq=10", y "literal=CTGSTGCVYCCRTAGG,ATTAGATACCCNNGTAGTCC copyundefined=t ktrim=r k=19 ecco=t rcomp=f mink=11 hdist=1 minlen=20 maq=10". Los parámetros utilizados para las lecturas ITS fueron, respectivamente: "literal=GTGARTCATCRARTYTTTG,CCTSCSCTTANTDATATGC copyundefined=t ktrim=l k=15 rcomp=f mink=11 hdist=1 minlen=20 maq=10", y "literal=CAAARAYTYGATGAYTCAC,GCATATHANTAAGSGSAGG copyundefined=t ktrim=r k=19 ecco=t rcomp=f mink=11 hdist=1 minlen=20 maq=10". Los anteriores parámetros incluyen la eliminación de las lecturas muy cortas (menores de 20 bases) y con valores de calidad bajos (un umbral de 10 del nivel promedio de calidad Phred). Un segundo paso de control de calidad fue realizado durante el expurgado de secuencias de baja calidad con la función filterAndTrim del paquete dada2 (véase siguiente sección). Se usaron los parámetros "QTrim = 10, maxEE = 4", que son los parámetros recomendados en el reciente trabajo de NAYMAN *et al.*, (2023). En este paso también se eliminan las lecturas con bases indeterminadas ('N') y las secuencias del fago PhiX.

Inferencia de las variantes de secuencia de amplicones (ASV).

Se utilizó el paquete de R/Bioconductor denominado dada2 (CALLAHAN et al.,



2016) en su reciente versión 1.30 para la inferencia de variantes de secuencia de amplicones (ASV, de *amplicon sequence variant*).. Tras el control de calidad con la función `filterAndTrim` (sección anterior), las lecturas se desreplicaron (función `derepFastq`), se eliminó el ruido mediante la función `'dada'` y las lecturas emparejadas se fusionaron mediante `mergePairs` [AR1] con la configuración predeterminada, excepto `"maxMismatch = 2"`. Los pares de lecturas no fusionados se concatenaron mediante la misma función `mergePairs` con el parámetro `justConcatenate` y se combinaron con el conjunto fusionado previamente, ya que esta complementación mejora las clasificaciones taxonómicas (DACEY et al., 2021). La eliminación de quimeras se realizó utilizando la función `removeBimeraDenovo` con el método `consensus`. Las funciones del paquete `dada2` producen tanto la tabla de secuencias de las ASV como el recuento de lecturas asociadas a cada muestra, indicando cuántas lecturas corresponden a cada secuencia ASV (tabla de frecuencias o recuentos).

Asignación taxonómica, filogenia y análisis de diversidad.

La clasificación taxonómica, el análisis de diversidad alfa y beta, y las pruebas de abundancia diferencial se realizaron utilizando la plataforma QIIME2 (BOLYEN et al., 2019) y con el paquete de R *microbiome* (<http://microbiome.github.io/microbiome>).

Dado que el análisis de diversidad aplicado se basa en la filogenia, las secuencias de ASV fueron alineadas, y se construyó un árbol filogenético utilizando el módulo `phylogeny` de QIIME2 mediante la función `align-to-tree-mafft-fasttree`. Las métricas fundamentales de diversidad se obtuvieron con la función `core-metrics-phylogenetic` del módulo `diversity`. Además, para realizar comparaciones, se emplearon las funciones `alpha-group-significance` y `beta-group-significance` del mismo módulo.

Para la clasificación taxonómica de las ASV bacteriana, se utilizó la base de datos SILVA SSU rRNA (versión 138.1), procesada con RESCRIPT (ROBESON et al., 2021). Este proceso incluyó la descarga de la versión curada NR99, el filtrado de secuencias con parámetros predeterminados (aquellas con 5 o más bases ambiguas y homopolímeros >7 bases de longitud) y la eliminación de secuencias más cortas de 900 pb para arqueas, 1200 pb para bacterias y 1400 pb para eucariotas. Se eliminaron secuencias duplicadas aplicando el modo `uniq`. También por medio del procesamiento con RESCRIPTse pudo generar un clasificador específico para amplicones. Para ello se extrajeron las regiones amplificadas con la pareja de cebadores usada y se y desduplicó nuevamente la base de datos resultante. Finalmente, se ensamblaron pesos taxonómicos a la base de datos con la herramienta *q2-clawback*, dado que mejoran la clasificación taxonómica (KAEHLER et al., 2019) en una muestra tan compleja como es la del suelo. Se aplicó "Suelo (no salino)" con el contexto `Deblur_2021.09-Illumina-16S-V4-150nt-ac8c0b`.

Para la clasificación de las ASV fúngicas, se utilizó la base de datos UNITE versión 9.0 (todos los eucariotas con *singletons* y agrupamiento dinámico). También se usó el complemento RESCRIPT para descargar y procesar la base de datos. Se eliminaron las secuencias con taxonomía poco útil (por ejemplo, 'Fungi_sp') siguiendo las recomendaciones de los autores de la herramienta.

Tras la asignación taxonómica con el módulo `feature-classifier` de QIIME2, las ASV ITS que no se clasificaron en el reino *Fungi* fueron descartadas, mientras que para las ASV 16S se descartaron aquellas no clasificadas en el dominio *Bacteria*.



Réplicas técnicas y análisis de abundancia diferencial.

Dado que se obtuvieron tres réplicas técnicas por cada parcela, las tablas de frecuencias correspondientes se combinaron sumando los recuentos de cada ASV. Para el análisis de abundancia diferencial, siguiendo la recomendación de DACEY et al., (2021), se aplicó un umbral de abundancia del 0,01 % para las ASV. Este umbral se determinó de la siguiente manera: se calcularon los valores que representan el 0,01% del total de recuentos para cada tabla de frecuencias, y luego se utilizaron los promedios de estos valores (18,4 para tablas ITS y 10,8 para tablas 16S) como umbrales para filtrar las ASV con recuentos totales más bajos en todas las muestras experimentales (excluyendo los controles). El análisis de abundancia diferencial se realizó con el módulo ANCOM-BC (LIN & PEDDADA, 2020) incluido en QIIME2.

4. Resultados

4.1. Análisis de diversidad alfa y beta

Para el análisis de 16S, se obtuvieron un total de 2 081 522 lecturas de la plataforma de secuenciación Illumina después del recorte con BBDuk, lo que resultó en 1 189 765 lecturas ensambladas y 30 011 ASVs distintas tras el procesamiento con dada2. El análisis de ITS produjo 2 210 856 lecturas recortadas con BBDuk, 2 024 597 lecturas ensambladas y 14 322 ASVs. Descartando las ASV no bacterianas y no fúngicas, respectivamente, así como las muestras de control, se obtuvieron 29 423 ASV (1 182 897 lecturas) para el análisis de 16S, y 8 862 ASV (1 847 470 lecturas) para el análisis de ITS. Como se muestra en la Figura 4, las curvas de rarefacción tienden a la asíntota al considerar todas las secuencias de cada parcela (suma de las réplicas técnicas); por lo tanto, se consideró que las muestras recolectadas eran suficientemente representativas de los suelos estudiados.



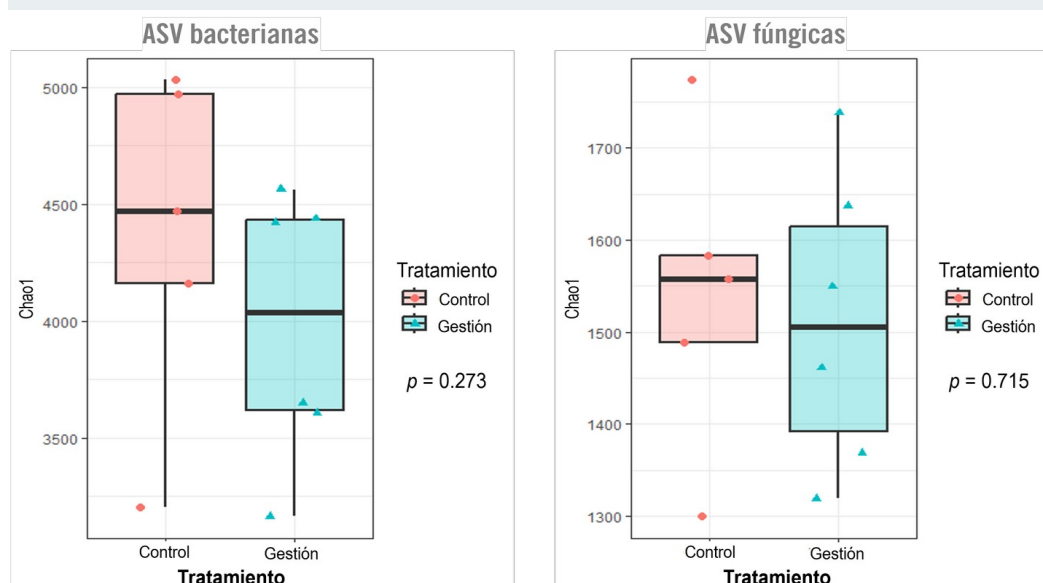


Figura 5. Gráficos que muestran los valores de diversidad Chao1 entre los dos grupos de tratamiento como diagramas de caja y bigotes, junto con los valores p de las pruebas de Kruskal-Wallis.

Se realizaron pruebas PERMANOVA basadas en las distancias de Bray-Curtis, Jaccard, UniFrac ponderada y no ponderada, que a su vez se calcularon a partir de los árboles filogenéticos previamente generados utilizando los complementos de QIIME2. No se encontraron diferencias significativas en la diversidad beta entre los tratamientos en ninguna de las métricas de distancia para los análisis bacteriano y fúngico (Figura 6). En conclusión, el aclareo de las parcelas de *Pinus nigra* no afectó la diversidad alfa ni beta.

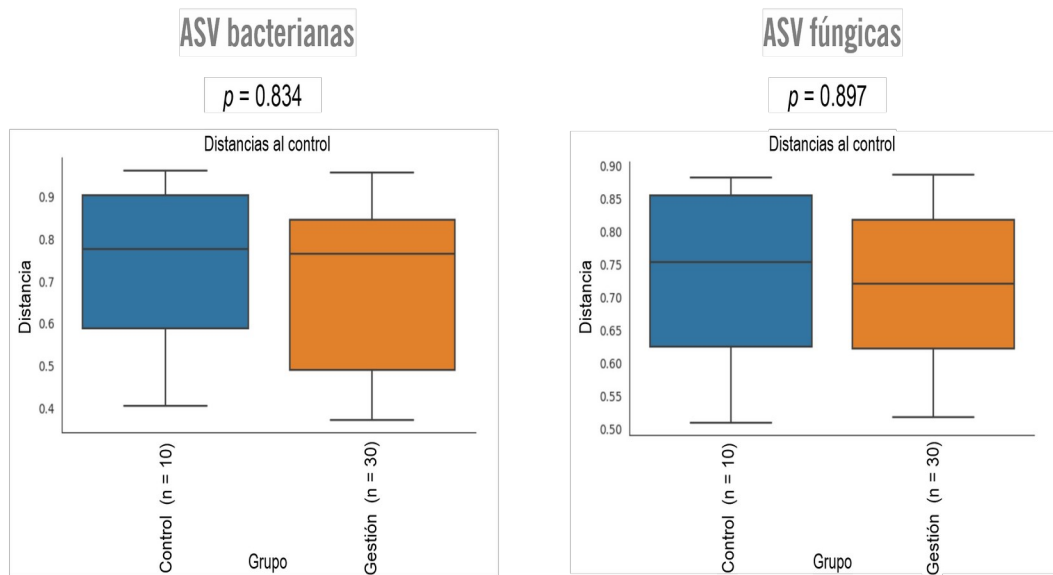


Figura 6. Pruebas PERMANOVA pareadas entre tratamientos utilizando distancias de Bray-Curtis.

4.2 Composición y análisis de abundancia diferencial

La gestión no afectó significativamente la composición de la microbiota del suelo en las parcelas de *Pinus nigra*. La Figura 7 ilustra las abundancias relativas de diferentes filos bacterianos y fúngicos después de agrupar las abundancias a nivel de género, mostrando la similitud entre los grupos experimentales.

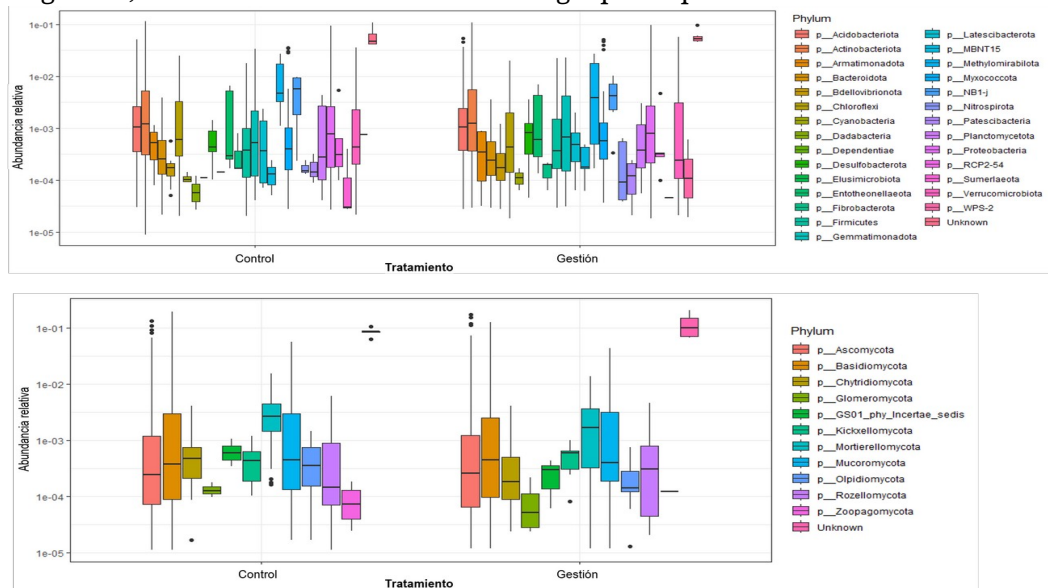
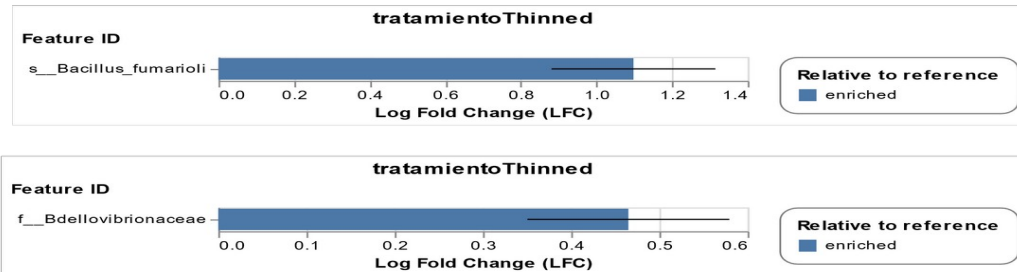


Figura 7. Abundancias a nivel de género de filos bacterianos y fúngicos en las parcelas control y en las gestionadas.

Además, se aplicó ANCOM-BC para evaluar diferencias en la composición microbiana a diferentes niveles taxonómicos. A un nivel de significancia de 0.1 (corrección de Holm para pruebas múltiples), la composición bacteriana entre los suelos de control y aclarados solo mostró diferencias en una especie y una familia, que presentaron un ligero enriquecimiento debido al aclareo. Para la microbiota fúngica, no se encontraron diferencias significativas en abundancia a nivel de

especie, género, familia u orden. Solo tres ASVs fúngicos, de un total de 2788, mostraron diferencias en abundancia entre los grupos experimentales (Figura 8).

Composición bacteriana



Composición fúngica

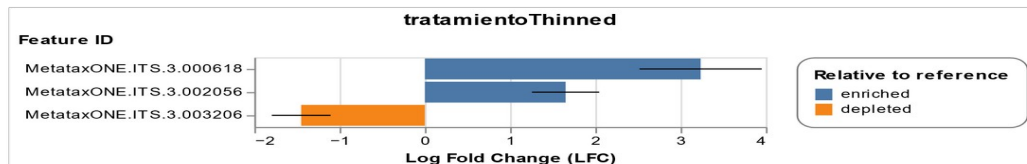


Figura 8. Prueba de abundancia diferencial con ANCOM-BC.

5. Discusión

Los resultados de este estudio destacan la resiliencia de las comunidades microbianas del suelo frente a los tratamientos selvícolas aplicados en masas de *Pinus nigra*. A pesar de las diferencias estructurales y de manejo entre las parcelas estudiadas, no se observaron cambios significativos en la diversidad alfa ni beta de hongos y bacterias. Este hallazgo sugiere que las prácticas de gestión forestal consideradas son compatibles con la conservación de la microbiota del suelo, un componente clave para el mantenimiento de los servicios ecosistémicos en ecosistemas forestales.

Este patrón de estabilidad microbiana se ha documentado previamente en diferentes estudios. Por ejemplo, CASTAÑO et al. (2018) analizaron la comunidad fúngica del suelo durante cuatro años mediante secuenciación PacBio del marcador ITS2 en doce parcelas con y sin claras. Sus resultados no mostraron efectos significativos de los tratamientos de aclareo sobre la composición fúngica (no analizaron la microbiota bacteriana), reforzando la idea de que las comunidades del suelo pueden mostrar una elevada resiliencia frente a ciertos tipos de intervención forestal.

De forma complementaria, MACCHERINI et al. (2021) evaluaron los efectos a corto plazo de tres tratamientos selvícolas (sin intervención, aclareo desde abajo y aclareo selectivo) sobre la riqueza taxonómica y la composición de comunidades bacterianas y de esporocarpos en dos plantaciones de *Pinus nigra*. Mediante un diseño experimental BACI (*Before-After, Control-Impact*) con seguimiento durante tres años, concluyeron que ninguno de los tratamientos produjo efectos significativos sobre la riqueza ni la composición de ambas comunidades, lo que coincide con los resultados del presente estudio.



En esa línea, PONCE et al. (2025) emplearon un enfoque BACI en bosques de *Pinus uncinata* para analizar los efectos de distintas intensidades de aclareo sobre la diversidad y composición de esporocarpos fúngicos durante un periodo de ocho años. Sus resultados mostraron que las intensidades más bajas (<25 % de remoción del área basal) no generaron impactos relevantes. No obstante, el incremento de la intensidad del aclareo se asoció con una disminución progresiva de la riqueza de esporocarpos, con un efecto claramente negativo cuando se superó el 70 % de intensidad. Cabe señalar que COLLADO et al. (2020), utilizando la cuantificación de ergosterol para estimar la biomasa fúngica, observaron que el aclareo redujo la biomasa micelial total y ectomicorrícica en el suelo.

La ausencia de cambios significativos en la diversidad fúngica y bacteriana a nivel de especie, género o familia subraya la estabilidad funcional de estas comunidades, incluso en bosques con intervención humana. Esta estabilidad podría estar vinculada a la capacidad de los suelos forestales para actuar como reservorios de biodiversidad microbiana, compensando posibles impactos locales mediante procesos de recolonización o tolerancia a los cambios físicos y químicos inducidos por las actividades de gestión.

En términos de implicaciones prácticas, los resultados refuerzan el valor de las prácticas selvícolas como herramientas sostenibles para gestionar masas de *Pinus nigra*. Además de mejorar la estructura forestal y proporcionar recursos madereros, estos tratamientos no comprometen la diversidad microbiana del suelo, una pieza fundamental para procesos como el reciclado de nutrientes, la descomposición de materia orgánica y la regulación de las interacciones planta-suelo.

Finalmente, este estudio pone de relieve la utilidad de la metataxonomía como herramienta para evaluar el impacto de las intervenciones forestales sobre los ecosistemas del suelo.

6. Conclusiones

Este trabajo muestra la idoneidad de la metodología metataxonómica para evaluar la diversidad y composición del conjunto de bacterias y hongos presentes en el suelo. Utilizando esta metodología, no se ha observado ningún efecto significativo de la gestión forestal sobre la microbiota del suelo.

7. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Proyecto ForH2O financiado por la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) y el proyecto H2020 ONEforest (101000406). Agradecemos también la colaboración de las personas implicadas en la toma y gestión de datos de campo por parte del CTFC, a Haozhen Su de Novogene por el apoyo brindado para llevar a cabo este estudio, así como a los revisores de esta comunicación.

8. Bibliografía

BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A.; ABNET, C. C.; AL-GHALITH, G. A.; ALEXANDER, H.; ALM, E. J.; ARUMUGAM, M.; ASNICAR, F.; BAI, Y.; BISANZ, J. E.; BITTINGER, K.; BREJNROD, A.; BRISLAWN, C. J.; BROWN, C. T.; CALLAHAN, B. J.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M. ET AL.; 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37(8), 852–857.



- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P.; 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods*. 13(7) 581–583.
- COLLADO, E., CASTAÑO, C., BONET, J.A., HAGENBO, A., MARTÍNEZ DE ARAGÓN, J., DE-MIGUEL, S.; 2020. Divergent above- and below-ground responses of fungal functional groups to forest thinning. *Soil Biol. Biochem.* 150, 108010.
- DACEY, D. P.; CHAIN, F. J. J.; 2021. Concatenation of paired-end reads improves taxonomic classification of amplicons for profiling microbial communities. *BMC Bioinform.* 22(1) 493.
- FRANCIOLI, D.; LENTENDU, G.; LEWIN, S.; KOLB, S.; 2021. DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota-pitfalls and solutions. *Microorganisms*. 9(2) 361.
- KAEHLER, B. D.; BOKULICH, N. A.; MCDONALD, D.; KNIGHT, R.; CAPORASO, J. G.; HUTTLEY, G. A.; 2019. Species abundance information improves sequence taxonomy classification accuracy. *Nat. Commun.* 10(1) 4643.
- LIN, H.; PEDDADA, S. D., 2020. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat. Commun.* 11(1) 3514.
- LLADÓ, S., LÓPEZ-MONDÉJAR, R., BALDRÍAN, P.; 2017. Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81(2), e00063–16.
- LLADÓ, S., LÓPEZ-MONDÉJAR, R., BALDRÍAN, P.; 2018. Drivers of microbial community structure in forest soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(10), 4331–4338.
- MACCHERINI, S., SALERNI, E., MOCALI, S., BIANCHETTO, E., LANDI, S., DE MEO, I., DI SALVATORE, U., MARCHI, M., BACARO, G., TORDONI, E., BARBATO, D., GARDIN, L., PERINI, C., FABIANI, A., CHIELLINI, C., ANGIOLINI, C., D'ERRICO, G., FANFARILLO, E., CANTIANI, P.; 2021. Silvicultural management does not affect biotic communities in conifer plantations in the short-term: A multi-taxon assessment using a BACI approach. *For. Ecol. Manag.* 493, 119257.
- MERCADO-BLANCO, J., ABRANTES, I., BARRA CARACCILO, A., BEVIVINO, A., CIANCIO, A., GRENNI, P., HRYNKIEWICZ, K., KREDICS, L., PROENÇA, D.N.; 2018. Belowground Microbiota and the Health of Tree Crops. *Front. Microbiol.* 9, 1006.
- NAYMAN, E. I.; SCHWARTZ, B. A.; POLANCO, F. C.; FIREK, A. K.; GUMABONG, A. C.; HOFSTEE, N. J.; NARASIMHAN, G.; CICKOVSKI, T.; MATHEE, K.; 2023. Microbiome depiction through user-adapted bioinformatic pipelines and parameters. *J. Med. Microbiol.* 72(10).
- NILSSON, R. H., ANSLAN, S., BAHRAM, M., WURZBACHER, C., BALDRÍAN, P. y TEDERSOO, L.; 2019. Mycobionite diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 17(2), 95-109.
- ONET, A., GRENNI, P., ONET, C., STOIAN, V., CRISAN, V.; 2025. Forest Soil Microbiomes: A Review of Key Research from 2003 to 2023. *Forests*. 16(1), 148.
- PONCE, Á., ERDOZAIN, M., ALDAY, J., BONET, J.A., DE ARAGÓN, J.M., DE-MIGUEL, S.; 2025. Effect of forest thinning on the diversity and composition of macrofungal sporocarps in *Pinus uncinata* stands. *For. Ecol. Manag.* 576, 122385.
- TEDERSOO, L. y LINDAHL, B.; 2016. Fungal identification biases in microbiome projects. *Environ. Microbiol. Rep.* 8(5), 774-779.