2025 | 16·20
GIJÓN | JUNIO

9º CONGRESO **FORESTAL** ESPAÑOL

9CFE-1903

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

Organiza

Sociedad Española de Ciencias Forestales
SECF

Diversidad funcional y taxonómica del suelo de un encinar tratado para el control de Phytophthora cinnamomi Rands.

HERNÁNDEZ, I. (1), GONZÁLEZ-BENÍTEZ, N. (2,3), MERINO MARTÍN, L. (2,3), PAJARES MORENO, S. (2), KREMER, C. (1), FRIERO, E. (1), CONTRERAS, M. (1), VILLARREAL, C. (1), RUÍZ-GALEA, M. (1), USCOLA, M. (2) y ÁVILA, A. (4).

1. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín. Autovía A-2, km. 38,2. 28805 Alcalá de Henares, Madrid.

2. Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica, Universidad Rey Juan Carlos (URJC), Tulipán s/n, 28933 Móstoles, España.

3. Instituto de Investigación en Cambio Global (IICG-URJC), Universidad Rey Juan Carlos, Tulipán s/n, Madrid, Mostoles, 28933, España.

4. QUERCUSCARE SL. C/ San Gerardo, 30. 28035 Madrid.

Resumen

Los encinares acidófilos de la Península Ibérica están siendo afectados por patógenos como la *Phytophthora cinnamomi* Rands. Este estudio analiza los efectos de los tratamientos contra este oomiceto sobre la diversidad funcional y taxonómica de la microbiota del suelo en un encinar afectado por este fitopatógeno, ubicado en la Dehesa Boyal de Colmenarejo (Comunidad de Madrid). Los tratamientos incluyeron enmienda caliza en suelo, inyección de fosetil de aluminio en árbol y su combinación. Se evaluaron parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo, incluyendo la respiración microbiana inducida por múltiples sustratos (MSIR) y la sensibilidad térmica de la comunidad microbiana de los suelos (Q10). Los tratamientos no afectaron los índices de diversidad de Shannon y Simpson, pero sí hubo cambios en la composición y en la estructura de las comunidades microbianas del suelo. Los resultados mostraron variabilidad estacional y una importante resiliencia de la comunidad microbiana ante los diferentes tratamientos aplicados. Estos resultados proporcionan información crucial para la gestión sostenible de las dehesas al permitir una mejor comprensión de cómo mantener la salud del suelo y la biodiversidad microbiana, esenciales para la recuperación de estos ecosistemas.

Palabras clave

Quercus ilex, enmiendas, fosetil-aluminio, sanidad forestal, microbiota.

1. Introducción

El oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands (fitóftora) está considerado como el principal agente causante de la enfermedad denominada Seca, la cual ha ocasionado una elevada mortalidad de encinas (*Quercus ilex* L.) y alcornoques (*Quercus suber* L.) en la Península Ibérica (BRASIER 1996; SÁNCHEZ et al.

2002). Este patógeno provoca podredumbre radical, destruyendo las raicillas absorbentes y, en consecuencia, reduciendo la capacidad de absorción de agua y nutrientes del árbol. Los síntomas foliares incluyen marchitamiento, clorosis, defoliación o puntisecado de ramas. Se han descrito dos tipos de síndrome en los árboles infectados: el síndrome agudo o de muerte súbita, en el que los árboles sufren un colapso rápido, y el síndrome crónico o de muerte lenta, caracterizado por un debilitamiento progresivo que puede prolongarse durante años (CARRASCO et al. 2009; CAMILO-ALVES et al. 2013). La presencia de fitóftora se presenta como el principal factor, pero su interacción con otros factores ambientales dirigidos por el escenario actual de cambio climático, como determinadas características del suelo, podría reducir la capacidad de recuperación de los árboles y aumentar su susceptibilidad a otras causas de estrés (SÁNCHEZ et al. 2003; CAMILO-ALVES et al. 2013). La fitóftora realiza su ciclo de vida en el suelo, siendo la humedad un elemento importante en su desarrollo y propagación. Al ser un patógeno altamente agresivo, su control es complicado debido a su amplio rango de hospedadores y su elevada resistencia y capacidad de propagación. Así, el control de esta enfermedad se basa en medidas preventivas, basadas en prácticas culturales para evitar la dispersión del patógeno, la mejora genética y métodos de control químico y biológico (CARDILLO 2019; TRINDADE et al. 2020).

Una de las medidas de control recomendadas es la aplicación de productos químicos para reducir la capacidad del patógeno de inducir la enfermedad. Aunque la mayoría de fungicidas tiene poca efectividad contra *Phytophthora* spp., se ha demostrado que los fosfonatos pueden ser eficaces al actuar como inductores de resistencia, estimulando los mecanismos de defensa naturales de las plantas (ROMERO et al. 2019; CARDILLO 2019; TRINDADE et al. 2020). Otra medida común incluye enmiendas calizas al suelo, cuya acción está relacionada con la capacidad del calcio de limitar la producción de esporangios y zoosporas del patógeno. Además, se ha descrito que mejora el estado nutricional de los árboles e incrementa su nivel de tolerancia a la infección (SERRANO et al, 2011; 2012; 2013; TRINDADE et al. 2020).

La presencia de fitóftora puede afectar a la microbiota del suelo. Concretamente, en encinas afectadas, se ha observado una reducción en la abundancia y diversidad de hongos ectomicorrícicos (CORCOBADO et al. 2014). Por el contrario, en aguacate (*Persea americana*) se ha visto que este patógeno no afecta a la riqueza, diversidad y estructura de la comunidad microbiana de su rizosfera (SOLIS-GARCÍA et al, 2021). Sin embargo, en otra especie, *Agathis australis*, la fitóftora si indujo cambios en la abundancia de algunos taxones bacterianos incluso aumentando la diversidad bacteriana en comparación con plantas sanas (YANG et al. 2001). También se encontraron diferencias en la diversidad y composición de la microbiota del suelo entre plantas asintomáticas y sintomáticas de afectadas por fitóftora (BYERS et al. 2020). La diversidad de respuestas al patógeno de la comunidad microbiana de la rizosfera en función de la especie vegetal pone de relevancia la necesidad de entender que efectos concretos tiene la fitóftora en encinares.

No solo las respuestas de la microbiota del suelo varían significativamente según las diferentes especies vegetales sino que también difiere en su respuesta a los tratamientos aplicados para controlar la propagación del patógeno (FAROOQ et al. 2024). Por ejemplo, la aplicación de fosfitos en aguacate redujo los daños en plantas infectadas, aumentando la abundancia y diversidad del microbioma bacteriano del suelo asociado a las plantas tratadas (FAROOQ et al. 2022). La aplicación de calcio en plantas de cacahuete (*Arachis hypogaea*) aumentó la abundancia de determinadas bacterias de la microbiota de la rizosfera, lo que mejoró la resistencia de las plantas a los patógenos del suelo (ZHANG et al. 2021). Igualmente, BOSSOLANI y colaboradores (2021) comprobaron que la enmienda caliza produjo cambios en el microbioma del suelo aumentando la fertilidad del mismo. Sin embargo, la aplicación de fosfitos sobre *Quercus robur* no alteró la abundancia y composición de bacterias del suelo (SOLLA et al. 2021). Así es importante conocer los efectos concretos del tratamiento aplicado al suelo en la microbiota en función de la especie vegetal.

El hábitat dominante en los terrenos forestales de la Comunidad de Madrid es el encinar, cubriendo casi 100.000 hectáreas. Los periodos de sequía y calor, cada vez más intensos y frecuentes en los últimos años, son la principal causa del decaimiento y muerte de las encinas madrileñas. En un estudio previo se confirmó que, desde 2004, las encinas en esta región han sido afectadas por sucesivas sequías y olas de calor, detectándose además dos focos de podredumbre radical ocasionadas por *Phytophthora cinnamomi* (RUÍZ-GALEA et al. 2022). Hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre el efecto de diferentes tratamientos para controlar la enfermedad, como la enmienda caliza y la endoterapia con fosetil de aluminio, en la microbiota del suelo asociado a Este estudio proporciona un importante conocimiento para el mantenimiento de los servicios ecosistémicos de los encinares, como la salud del suelo y la biodiversidad microbiana, esenciales para la recuperación de estos ecosistemas perturbados.

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es el análisis de la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad microbiana del suelo, tras la aplicación de tratamientos de enmienda caliza y endoterapia realizados en un encinar para el control de fitóftora.

3. Metodología

3.1 Selección de individuos para el ensayo y tratamientos aplicados.

El trabajo se ha desarrollado en la Dehesa Boyal de Colmenarejo, localizado en el municipio de Manzanares el Real, al noroeste de la Comunidad de Madrid. La finca de estudio forma parte del espacio natural protegido Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares. En un área de aproximadamente 4 ha de la finca, en la que previamente se habían detectado focos activos de *Phytophthora cinnamomi* (RUÍZ-GALEA et al. 2022).

En octubre de 2022 se aplicaron los siguientes 4 tratamientos: enmienda (se aplicó solo la enmienda caliza); fosfato (se aplicó solo endoterapia); enmienda+fosfato (se aplicó combinación de enmienda caliza y endoterapia); control (no se aplicó ningún tratamiento) (KREMER et al. 2025). Se recogieron 16 muestras de suelo de la rizosfera, correspondientes a 4 árboles de cada uno de los tratamientos realizados a distintos tiempos: previo a la aplicación de los tratamientos (T0), transcurridos 6 meses, en abril de 2023 (T6) y al año y medio de la aplicación (T18, abril de 2024).

La enmienda caliza consistió en la aplicación de una mezcla de un 50% de dolomita, compuesta por carbonato cálcico y magnesio [$CaMg(CO_3)_2$], y un 50% de sulfato cálcico [$CaSO_4$], que se aplicó manualmente sobre el suelo, esparciéndose de manera homogénea alrededor del área ocupada por la superficie de la copa del árbol, en base a la cantidad recomendada de 1.500 kg/ha (SERRANO et al. 2011; CARBONERO et al. 2021). La endoterapia consistió en inyección al tronco con el producto fitosanitario fosetil aluminio al 4% (Aliette N.º registro 15.907). Las dosis empleadas por árbol variaron en función del perímetro del tronco y se aplicaron mediante inyectores a una altura aproximada de 50 cm sobre el nivel del suelo.

3.2 Identificación taxonómica de la microbiota del suelo.

Extracción y procesamiento de ADN. El ADN se extrajo de las fracciones de la rizosfera (0,25 g) mediante el kit de aislamiento de ADN del suelo PowerSoil®-htp 96 Well, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MOBIO Laboratories, Reino Unido). La biodiversidad de la comunidad bacteriana y fúngica se evaluó mediante la secuenciación de amplicones Illumina MiSeq de los genes 16S rRNA (bacterias) y de la región del espaciador transcrito interno (ITS2) (hongos) para identificar filogenéticamente los taxones responsables. Para el 16S, las regiones hipervariables V3-V4 del gen del ARNr 16S se seleccionaron utilizando cebadores 341F (5’ CCT ACG GGA GGC AGC AG 3’) y 806R (3’.GACTACHVGGGTATCTAATCC 5’) (KLINDWORTH, et al. 2013). ITS2 se amplificó utilizando las secuencias de cebadores 5.8S-Fun (directo) (5' AACTTTYRRCAAYGGATCWCT3') e ITS4 (inverso) (AGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART) descritas en IHRMARK et al. (2012).

Secuenciación. Las muestras se secuenciaron con Illumina MiSeq (2 X 301). Las lecturas que pasaron el filtro se prepararon utilizando procedimientos estándar (MiSeq Real Time Analysis, Illumina). Los amplicones obtenidos se validaron y cuantificaron con un Bioanalyzer. Los pools equimoleculares se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se titularon mediante PCR cuantitativa utilizando el kit Kapa-SYBR FAST qPCR para LightCycler, usando una referencia estándar para la cuantificación. Luego, los amplicones se desnaturalizaron y secuenciaron en un secuenciador Illumina MiSeq, utilizando el kit de reactivos iSeq para obtener finalmente lecturas de 300 pb en pares.

Análisis de calidad y procesamiento bioinformático. La calidad de las secuencias se analizó con el programa Fastqc v0.12.1 (Andrews, 2010). Para la obtención de los ASVs (Amplicon Sequence Variants) y su asignación taxonómica se utilizó el programa RStudio versión 2023.12.0 con el paquete dada2 (CALLAHAN et al., 2016). Estos ASVs se clasificaron utilizando la función “assignTaxonomy” utilizando la base de datos SILVA versión 138.1 (QUAST et al., 2012) mientras que para los datos de ITS se utilizó la base

de datos UNITE (ABARENKOV et al., 2010).

3.3 Identificación de la respiración inducida por múltiples sustratos del suelo (MSIR).

Se evaluó la actividad catabólica de la microbioma del suelo mediante la mineralización de carbono orgánico a CO? mediante la técnica MSIR. Para ello, se utilizó el método MicroResp™ (CAMPBELL et al., 2003) adaptado por FANIN et al. (2014), empleando 15 sustratos orgánicos, agrupados en tres principales familias: (1) Azúcares: Glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, N-acetilglucosamina; (2) Aminoácidos: Asparagina, serina, glicina, glutamina, cisteína; y (3) Ácidos orgánicos: Oxálico, málico, cítrico, cetoglutárico, dihidroxibenzoico. Se analizaron tres réplicas por sustrato y un control (respiración basal con agua).

3.4 Sensibilidad térmica de los suelos (Q10).

La sensibilidad térmica microbiana (Q10) se evaluó mediante la respiración basal a temperaturas de 5, 15, 25 y 35°C. El cálculo de Q10 se obtuvo mediante la tasa de cambio de la respiración microbiana cuando la temperatura aumenta en 10ºC ($Q10=(R_2/R_1)^{(10/(T2-T1))}$), utilizando el sistema BacTrac 4300®, que mide la producción de CO? por cambios en la conductividad del medio con una trampa de KOH al 2% (ZHU et al., 2012; YOO et al., 2013; BANCALARI et al., 2019; SINGH et al., 2019).

3.5 Análisis de diversidad y estadística

Los índices de diversidad de riqueza observada, Shannon y Simpson se calcularon para estimar la diversidad taxonómica de la rizosfera de las encinas a partir de los ASV de las bacterias y de los hongos. También se analizó el índice de diversidad de Shannon para estimar la diversidad funcional de los suelos a partir de los MSIR.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para estimar el efecto del tratamiento aplicado a los suelos y la estacionalidad en la que se recogen las muestras sobre los índices de diversidad taxonómica y funcional. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se evaluaron mediante los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente.

Además, se llevó a cabo un análisis multivariante mediante NMDS utilizando las distancias de Bray-Curtis para visualizar la distribución de las muestras en función del tratamiento. Para estos análisis se emplearon los paquetes “phyloseq” junto con la función “ordinate”. El PERMANOVA permitió detectar diferencias significativas en la distribución de las muestras en función de los tratamientos y los tiempos, así como la posible interacción entre ellos. Para estos análisis se utilizó el programa RStudio versión 2023.12.0 y los paquetes estadísticos “vegan” para calcular el índice de diversidad de Shannon, “car” para realizar los tests de homocedasticidad de los modelos del ANOVA, y “cowplot”, “ggpubr” y “ggplot2” para las gráficas.

4. Resultados

4.1 Diversidad taxonómica de hongos y bacterias.

Los tratamientos del suelo no generaron diferencias significativas en la riqueza de especies. La riqueza de especies en la rizosfera de las encinas mostraron diferencias significativas en función del tiempo (Tabla 1) siendo el tercer tiempo significativamente mayor que el resto de los tiempos (Figura 1). El resto de los índices de diversidad (Shannon y Simpson) en bacterias no mostraron diferencias significativas.

Tabla 1.- Tabla de datos de ANOVA de dos vías con el Tiempo y el Tratamiento. a) Riqueza para bacterias (16S); b) Riqueza para los hongos.

Riqueza (a) Bacteria	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
[1]Se transforman los datos a logaritmo para conseguir la homogeneidad de las varianzas.	Tratamiento	3	0,0016	0,0005	1,514	0,228
	Tiempo	2	0,0088	0,0044	12,454	0,823E-05***
	Tratamiento/Tiempo	6	0,0014	0,0002	0,696	0,654
	Residuals	35	0,0124	0,0003		
Riqueza(b) Hongos	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	5652	1883	0.405	0.749
	Tiempo	2	38377	19188	4.129	0.024*
	Tratamiento/Tiempo	6	12198	2033	0.437	0.848
	Residuals	35	162621	4646		

La contribución relativa de los filos bacterianos Acidobacteriota, Actinobacteriota, Chloroflexi, Bacteroideta, no mostraron diferencias significativas ni entre tiempos ni entre tratamientos. Sin embargo, los filos Proteobacteria y Verrucomicrobiota sí mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2) siendo significativamente mayor la proporción de este filo en el tratamiento con el fosetil de aluminio que con la enmienda (Figura 2). Con respecto a la contribución de los hongos, ninguno de los filos (Mucuromycota, Mortierellomycota, Basidiomycota, Ascomycota) mostró diferencias significativas entre tratamientos y tiempos.

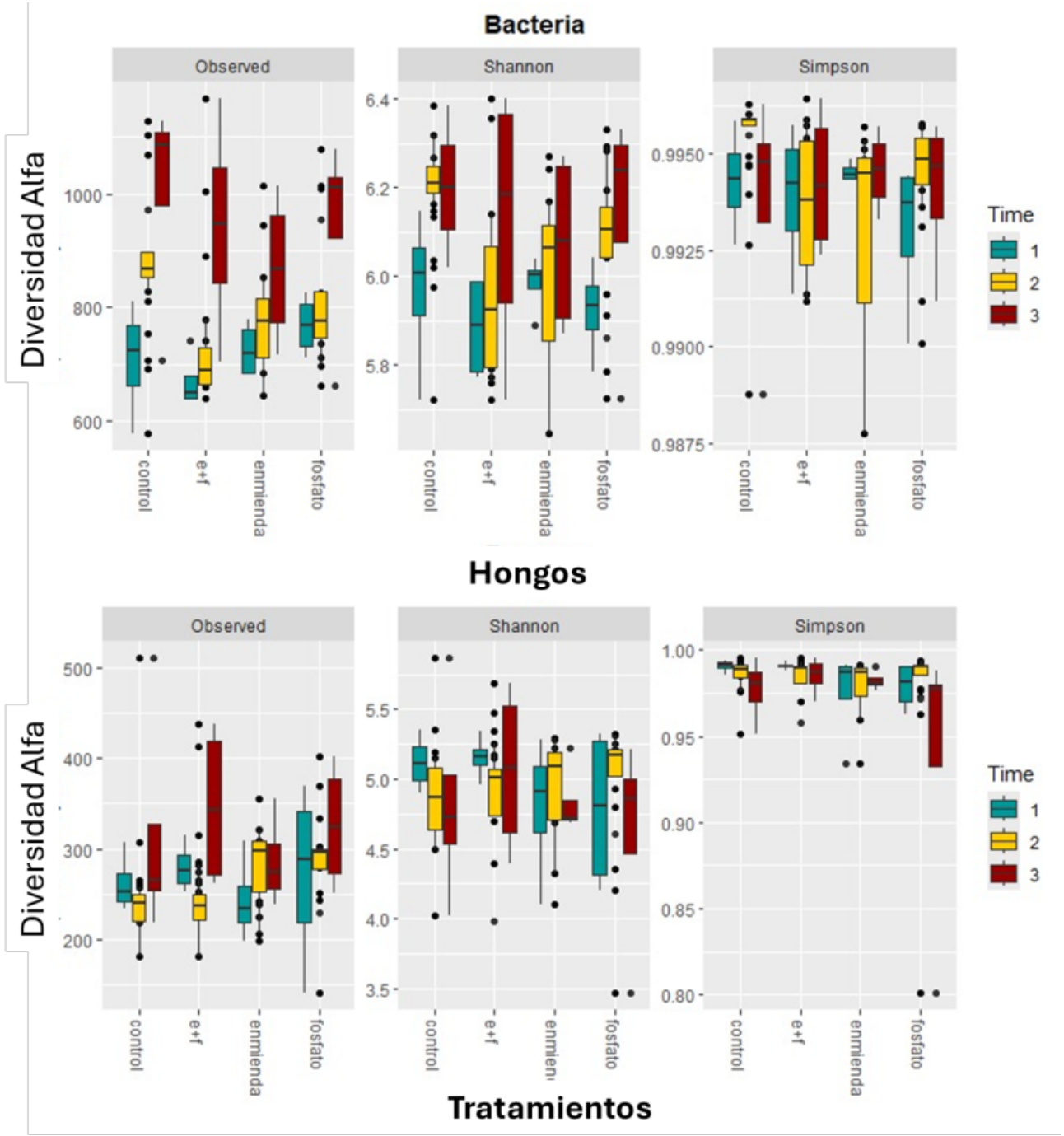


Figura 1.- Diversidad alfa para bacterias y hongos para cada uno de los tratamientos aplicados (Control sin tratamiento; enmienda caliza, fosetil de aluminio; combinación de ambos) a los suelos de las encinas afectadas por la en los tiempos 1 (antes de la aplicación de los tratamiento; octubre 2022), 2 (después de 6 meses de su aplicación; abril 2023); 3 (después de 1 año y medio de su aplicación; abril 2024).

Tabla 2.- Tabla de datos de ANOVA de dos vías con el Tiempo y el Tratamiento. a) Proporción relativa del filo bacteriano *Verrumicrobiota*; b) Proporción relativa del filo bacteriano *Proteobacteria.*

Filo Verrumicota (a) . Bacteria	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	0,011	0,003	3,639	0,020*
	Tiempo	2	0,002	0,002	2,495	0,122
	Tratamiento/Tiempo	6	0,001	0	0,738	0,533
	Residuals	35	0,041	6,3 E-4		
Filo Proteobacteria (b). Bacteria	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	0,011	0,003	3,624	0,022*
	Tiempo	2	0,003	0,002	1,404	0,259
	Tratamiento/Tiempo	6	0,006	0,001	0,952	0,471
	Residuals	35	0,037	0,001		

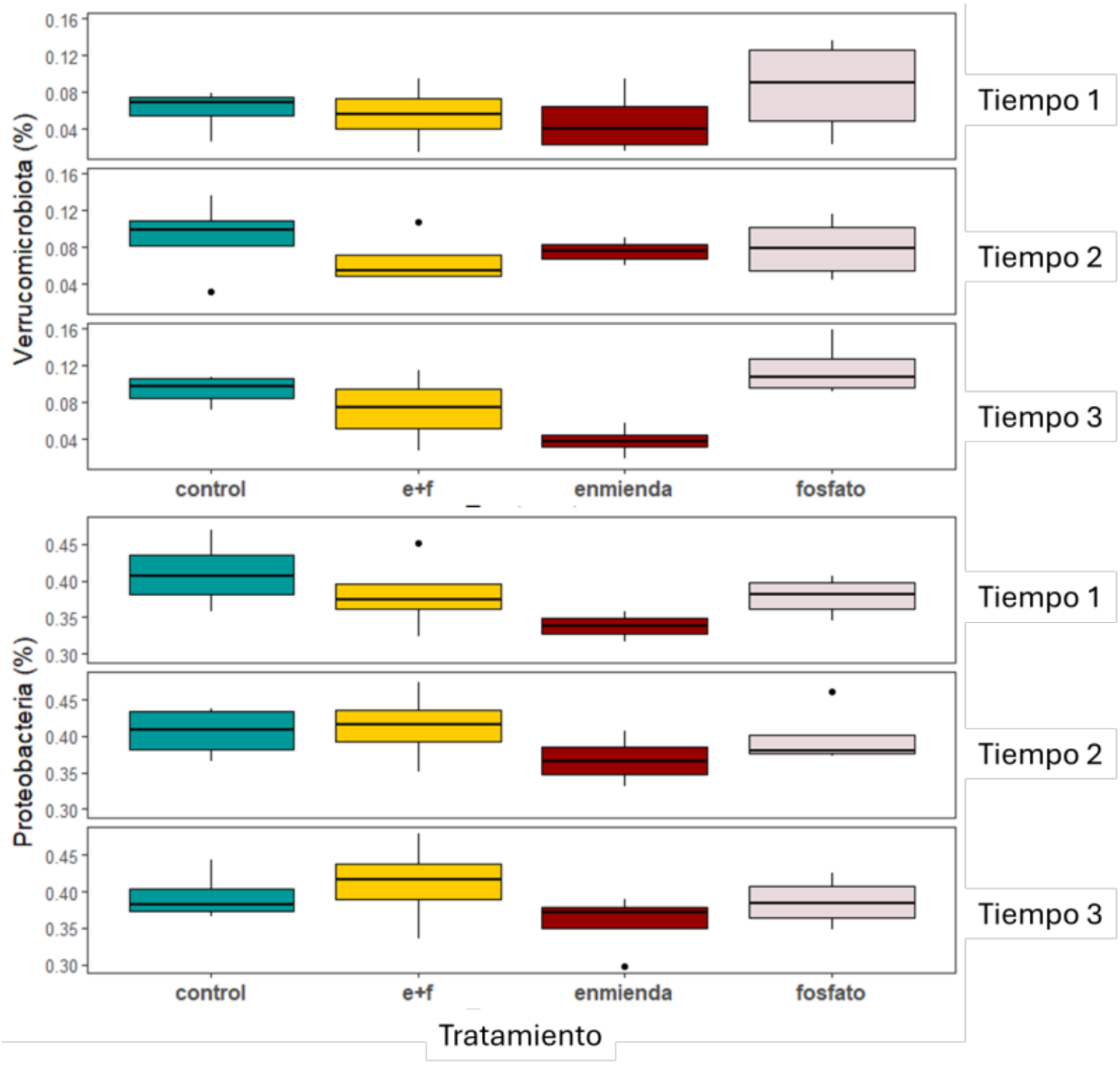
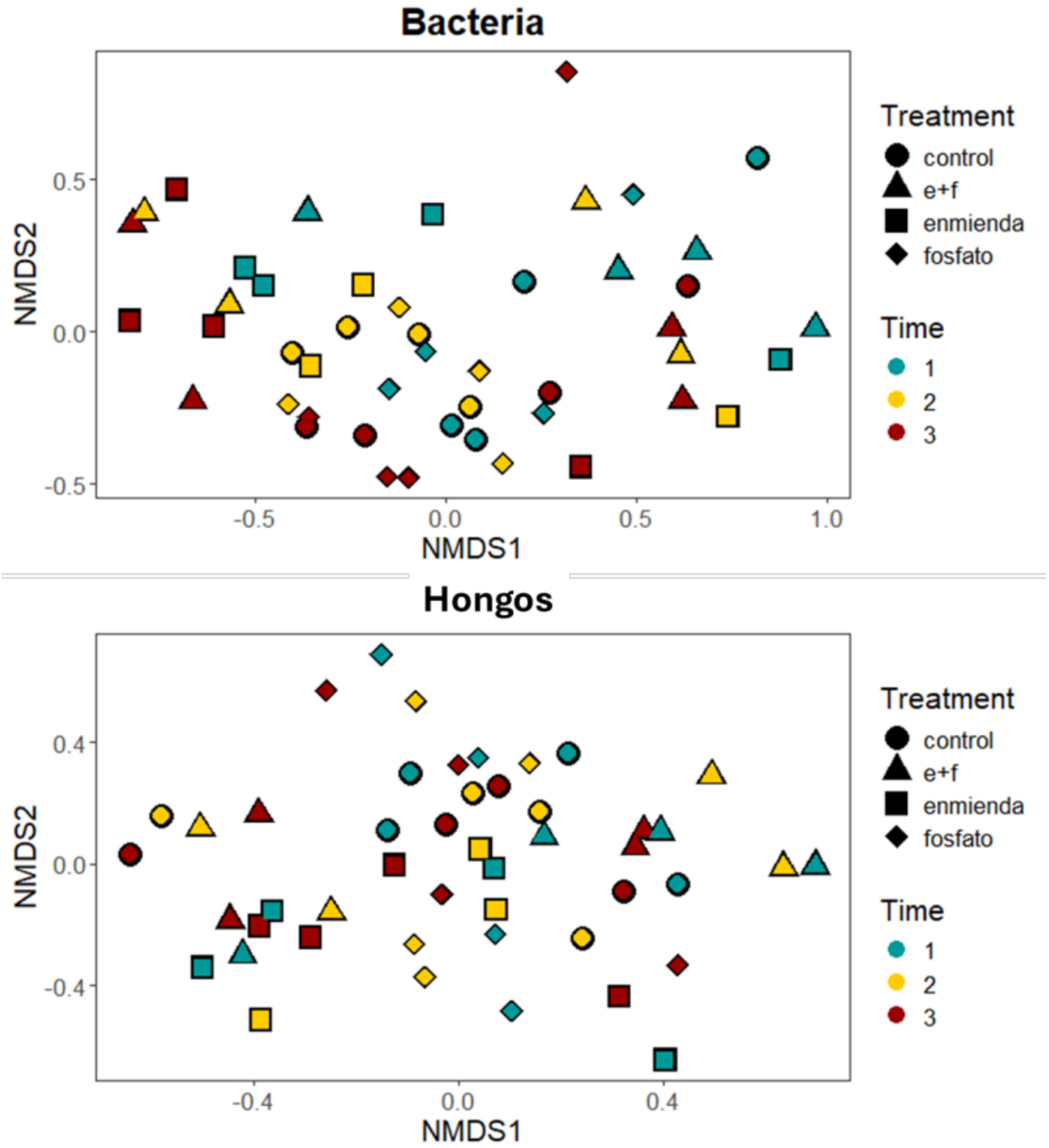


Figura 2. *Evolución de la contribución relativa de los filos bacterios que mostraron diferencias significativas para cada uno de los tratamientos aplicados (Control sin tratamiento; enmienda caliza, fosetil de aluminio; combinación de ambos) a los suelos de las encinas afectadas por la en los tiempos 1 (antes de la aplicación de los tratamientos; octubre 2022), 2 (después de 6 meses de su aplicación; abril 2023); 3 (después de 1 año y medio de su aplicación; abril 2024).*

En el análisis NMDS se observa la distribución de bacterias y hongos en función del tiempo (colores) y de los tratamientos (formas). No se identificaron grupos claros de distribución para las comunidades fúngicas y bacterianas (Figura 3). Sin embargo, el PERMANOVA mostró que tanto los tratamientos (F = 2,13, p = 0.005) como la estacionalidad (F = 1,58, p = 0.001) tuvieron un efecto significativo en la distribución y composición de las comunidades bacterianas (Tabla 3). Estos cambios significativos también se presentaron en las comunidades fúngicas, tanto por los tratamientos (F = 0,092, p = 0.002) como por la estacionalidad (F = 0,0598, p = 0.007).



Representación bidimensional del análisis NMDS de las comunidades de bacterias y hongos bajo los tratamientos de control, enmienda, fosetil de aluminio y la combinación de ambos, a lo largo de tres tiempos. Los tiempos de estudio son antes de la aplicación de los tratamientos (octubre 2022), 6 meses después (abril 2023) y 1 año y medio después de la aplicación del tratamiento (abril 2024).

Tabla 3.- El análisis PERMANOVA de las comunidades de hongos y bacterias bajo diferentes tratamientos y tiempos.**

PERMANOVA (NMDS)Bacteria	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	1,121	0,373	1,582	0,005**
	Tiempo	2	1,006	0,503	2,13	0,001***
	Tratamiento/Tiempo	6	0,965	0,168	0,681	1
	Residuals	35	8,266	0,236	0,727	
	Total	46	11,359	1		
PERMANOVA (NMDS) Hongos	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	1,44	0,48	0,092	0,002**
	Tiempo	2	0,934	0,467	0,0598	0,007**
	Tratamiento/Tiempo	6	1,364	1,364	0,087	1
	Residuals	35	11,869	0,339	0,76	
	Total	46	15,61	1		

4.2 Actividad metabólica (MSIR) de las comunidades microbianas de los suelos.

Los diferentes tratamientos no afectaron significativamente la respiración microbiana de los suelos excepto en los aminoácidos (Tabla 4). Se observó que la combinación de la enmienda de caliza con el fosetil de aluminio estimuló la respiración de los aminoácidos. Esta activación no se observó en las aplicaciones individuales de los tratamientos y tampoco se observó en el resto de las fuentes de carbono (Figura 4). Sí que existió un efecto de la estacionalidad sobre la respiración microbiana de todas las fuentes de carbono (Tabla 4) siendo el muestreo de abril (después) significativamente mayor que el octubre (antes).

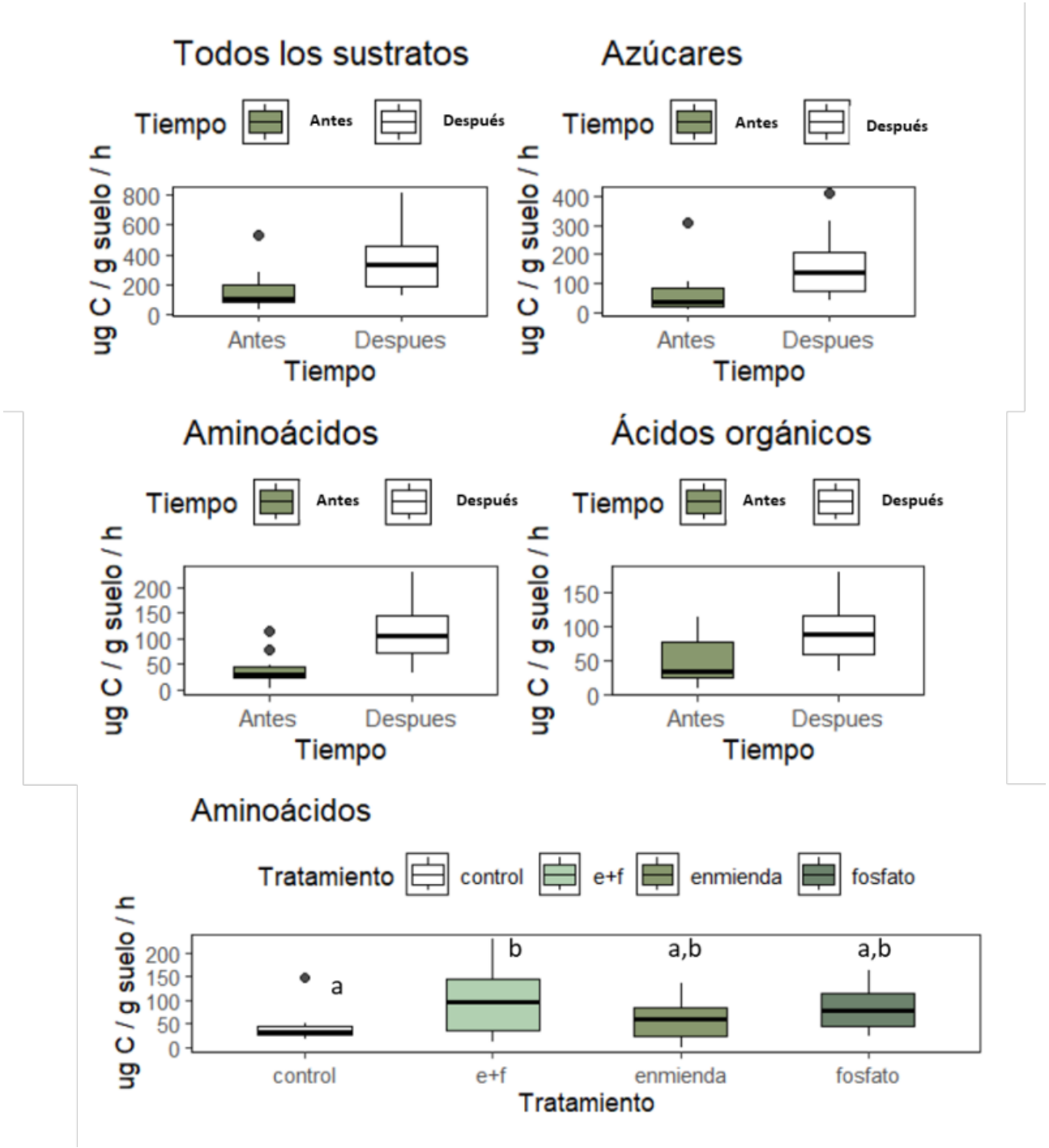


Figura 4.- Representación gráfica del ANOVA de los factores que han mostrado diferencias significativas en la respiración microbiana de los suelos asociados a las encinas afectadas por Phytophthora cinnamomi.

Tabla 4.- Tabla de datos de ANOVA de dos vías con el Tiempo y el Tratamiento. a) fuentes totales; b) azúcares c) aminoácidos; d) ácidos orgánicos.

Total Fuentes de carbono (a)	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	149862	49954	2,16	0,11
	Tiempo	1	355597	355597	15,44	0,00062**
	Tratamiento:Tiempo	3	84306	28102	1,22	0,323
	Residuals	24	552581	23024		
Azúcares (b)	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	41626	13875	1,571	0,222
	Tiempo	1	83880	83880	9,501	0,005097**
	Tratamiento:Tiempo	3	22063	7354	0,833	0,4888
	Residuals	24	211867	8828		
Aminoácidos (c)	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	13374	4458	3,239	0,039*
	Tiempo	1	41122	41122	29,883	0,00001282***
	Tratamiento:Tiempo	3	8204	2735	1,987	0,142
	Residuals	24	33026	1376		
Ácidos orgánicos (d)	Factores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	Tratamiento	3	6076	2025	1,611	0,212
	Tiempo	1	15029	15029	11,96	0,002042**
	Tratamiento:Tiempo	3	3961	1320	1,05	0,388
	Residuals	24	30159	1256		

4.3 Sensibilidad térmica (Q10)

La sensibilidad térmica de la respiración microbiana del suelo, fue de 1,7 ± 0,03 lo que indica que la tasa de respiración microbiana se incrementa 1,7 veces en función de los incrementos de temperatura (Figura 5). Sin embargo, este valor se mantuvo constante y no se observaron efectos significativos de los tratamientos aplicados (F = 2,25, p = 0.10) a los suelos ni de la estacionalidad (F = 0,64, p = 0.42) (Tabla 5).

Tabla 5.- Tabla de datos de ANOVA de dos vías con el Tiempo y el Tratamiento. e) Sensibilidad térmica

Sensibilidad Térmica (e)	Factores	Df	Sum Sq	Mean 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
	Residuals	24	0.80051	0.033354		

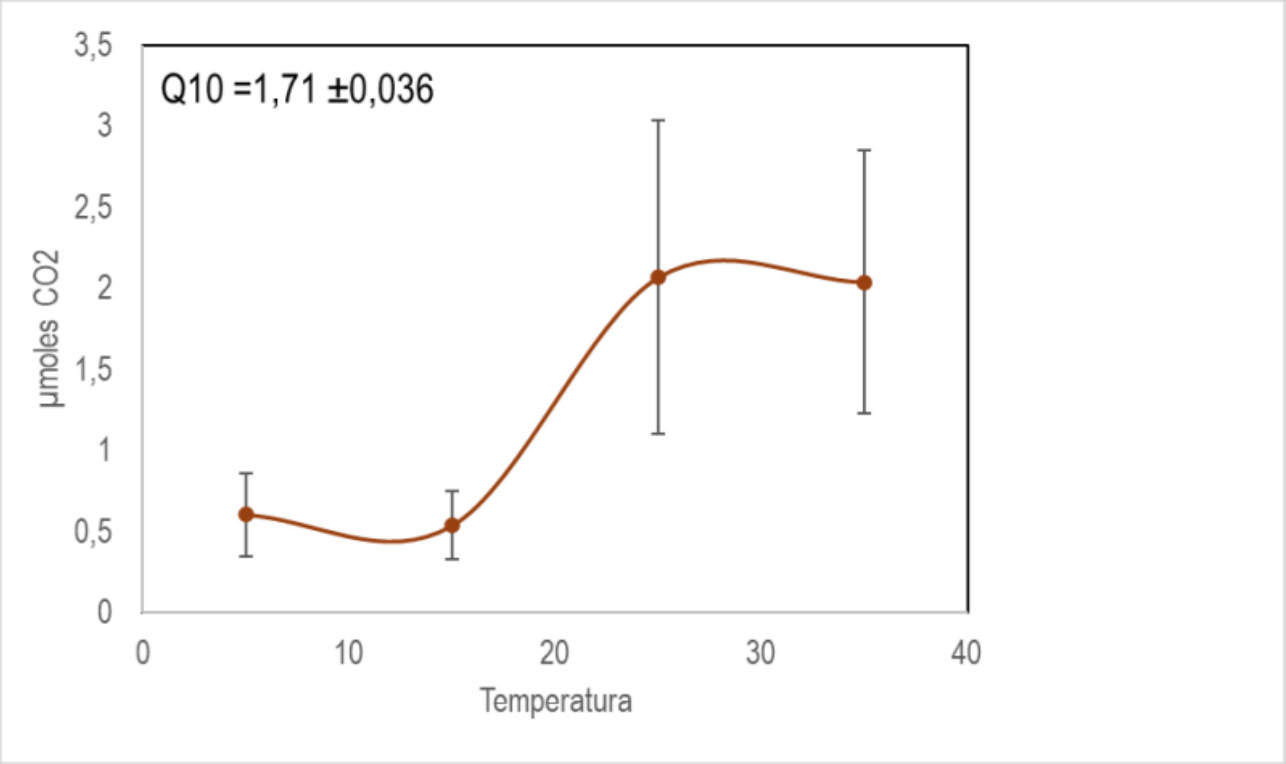


Figura 5. Respiración promedio de las comunidades microbianas en función de la temperatura (5º C, 15ºC, 25ºC y 35ºC, a partir de todas las mediciones realizadas en los suelos de los diferentes tratamientos y recogidas en los diferentes tiempos).

5. **Discusión**

En el presente estudio se evaluó el impacto de la aplicación de una enmienda caliza y endoterapia con fosetil de aluminio y su combinación sobre la microbiota del suelo en encinares afectados por *Phytophthora cinnamomi*. Los resultados obtenidos permiten discutir los efectos de estos tratamientos en términos de diversidad taxonómica y funcional de las comunidades microbianas, así como su interacción con factores estacionales.

La riqueza bacteriana mostró un incremento significativo en el tercer tiempo de muestreo (T18), mientras que los índices de Shannon y Simpson no presentaron variaciones significativas. Este hallazgo indica que, aunque la cantidad total de taxones bacterianos aumenta con el tiempo, la equidad y diversidad relativa permanecen estables. Este resultado está en línea con estudios previos tales como los realizados por BOSSOLANI et al. (2021), ZHANG et al. (2021) y FAROOQ et al. (2022).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.

En cuanto a las comunidades fúngicas, no se observaron cambios significativos ni en riqueza ni en diversidad relativa. Esto podría sugerir que los tratamientos aplicados tienen un impacto limitado sobre los hongos del suelo, posiblemente porque estos tratamientos

afectan principalmente al pH y a las propiedades químicas del suelo, que son más relevantes para las bacterias (ZHANG et al., 2021).

Los tratamientos no alteraron significativamente la respiración basal ni las tasas catabólicas de los azúcares y ácidos orgánicos, pero sí estimularon la respiración de aminoácidos en el caso de la combinación de enmienda caliza y fosetil de aluminio. Este efecto puede explicarse por el aporte adicional de nitrógeno y fósforo al suelo, que actúa como fuente fácilmente asimilable para ciertos microorganismos (JOSHI et al., 2024; WANG et al., 2024). Además, la mejora en la disponibilidad de nutrientes generada por la enmienda caliza, que regula el pH del suelo y favorece la solubilidad de compuestos, podría potenciar la actividad microbiana (LI et al., 2020; 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 (PIERANTONI, 2024).

La estacionalidad tuvo un impacto significativo en 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 intracelular como extracelular, 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 sensibilidad térmica de la respiración microbiana se mantuvo constante (1,7 ± 0,03) y no presentó variaciones significativas entre tratamientos ni tiempos. Este valor, coherente con los modelos actuales (MEYER Y WELP et al., 2018), refleja que las comunidades microbianas responden de manera intrínseca a los cambios de temperatura, independientemente de los tratamientos aplicados. Este hallazgo cobra relevancia en el contexto del cambio climático, ya que sugiere que la sensibilidad térmica de las comunidades microbianas es un factor crucial en la retroalimentación del ciclo del carbono (GROMOVA et al., 2020). Sin embargo, es crucial continuar investigando los efectos a largo plazo y bajo escenarios climáticos extremos. 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. 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.

6. **Conclusiones**

La combinación de tratamientos con enmienda caliza y fosetil de aluminio muestra un

potencial prometedor para mejorar la salud del suelo y reducir el impacto de en encinares afectados. Sin embargo, los efectos sobre las comunidades fúngicas y bacterianas requieren estudios más prolongados y específicos para evaluar la sostenibilidad a largo plazo de estas prácticas.

Además, sería importante investigar cómo estos tratamientos interactúan con otros factores ambientales, como la sequía y el cambio climático, que afectan directamente a la dinámica del patógeno y la resiliencia de los ecosistemas forestales.

7. **Agradecimientos**

Proyecto FITÓFTORA MADRID de QUERCUSCARE S.L. (Ayuda INNOBONOS 2023, financiada por IMIDRA para proyectos empresariales de I+D+i). Proyectos PDR19-SECOMA y FP24-RESTAURA MADRID, financiados por IMIDRA. M. Contreras fue beneficiaria de una ayuda para la formación del IMIDRA. Agradecemos a Ana Mª Carracedo Andrés (Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares, Consejería de Medio Ambiente, Agricultura e Interior, Comunidad de Madrid) su colaboración y apoyo.

8. **Bibliografía**

ABARENKOV, K., NILSSON, R. H., LARSSON, K. H., ALEXANDER, I. J., EBERHARDT, U., ERLAND, S., HØILAND, K.; KJØLLER, R.; LARSSON, E.; PENNANEN, T.; SEN, R.; TAYLOR, A.F.S.; TEDERSOO, L.; URSING, B.M.; VRÅLSTAD, T.; LIIMATAINEN, K.; PEINTNER, U.; KÕLJALG, U.; 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi–recent updates and future perspectives. *The New Phytol* 186(2) 281 – 285

ASLAM, S.; ARSLAN, M.; NOWAK, K. M. 2024. Microbial activity, community composition and degraders in the glyphosate-spiked soil are driven by glycine formation. Sci Total Environ, 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. Int. J. Food Microbiol.306, 108268

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 Biol Biochem*.156:108188

BRASIER, C.M.; 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. Ann Sci For 53:347-358

BYERS, A.K.; CONDRON, L.; O'CALLAGHAN, M.; WAIPARA, N.; BLACK, A; 2020. Soil microbial community restructuring and functional changes in ancient kauri (*Agathis australis*) forests impacted by the invasive pathogen *Phytophthora agathidicida*. *Soil Biol Biochem* 150:108016

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

CAMILO-ALVES, C.S.P.; DA CLARA, M.I.E.; RIBEIRO N.M.; 2013. Decline of Mediterranean oak trees and its association with Phytophthora cinnamomi: a review. *Eur J Forest Res* 132:411–432

CAMPBELL, C. D.; CHAPMAN, S. J.; CAMERON, C. M.; DAVIDSON, M. S.; 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. Appl Environ Microbiol, 69(6), 3593-3599

CARBONERO, M.D.; SILLERO, M.L.; BARBACHO, J.J.; AVILA, A.; 2021. Las fertilizaciones cálcicas y su aplicación para el control de la podredumbre radical del arbolado en la dehesa. Hinojosa del Duque: Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. 1-34 pp.

CARDILLO, E.; 2019. Gestión de la presencia de *Phytophthora cinnamomi*. Buenas Prácticas Generadoras de Valor en la Gestión de la Dehesa. CICYTEX. Pp 69-79. Mérida, España.

CARRASCO, A. y cols.; 2009. Procesos de Decaimiento Forestal (la Seca), Situación del Conocimiento. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 112 pp. Córdoba.

CORCOBADO, T.; VIVAS, M.; MORENO, G.; SOLLA, A; 2014. Ectomycorrhizal symbiosis in declining and non-declining Quercus ilex trees infected with or free of Phytophthora cinnamomi. For Ecol Manag 324:72-80

COSTA, D.; FREITAS, H.; 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

DÍAZ-MARTÍNEZ, P.; PANETTIERI, M.; GARCÍA-PALACIOS, P.; MORENO, E.; PLAZA, C.; MAESTRE, F.T.; 2023. Biocrusts modulate climate change effects on soil organic carbon pools: insights from a 9-year experiment. *Ecosystems* 26 (3) 585 – 596

FANIN, N.; HÄTTENSCHWILER, S.; 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.; 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*. *Front Microbiol* 13:870900

FAROOQ, Q.U.A.; McCOMB, J.A.; HARDY, G.E.S.; BURGESS, T.I.; 2024. Soil amendments for management of Phytophthora root rot in avocado and their impact on the soil microbiome. J Plant Pathol 106:439–455

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 Sci* 53 377 – 382.

IHRMARK, K.; BÖDEKER, I.T.; CRUZ-MARTINEZ, K.; FRIBERG, H.; KUBARTOVA, A.; SCHENCK, J.; STRID, Y.; STENLID, J.; BRANDSTRÖM-DURLING, M.; CLEMMENSEN, K.E.; LINDAHL, B.D.;2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region--evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecol* 82(3) 666 – 677

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.

KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHWEER, T., PEPLIES, J., QUAST, C., HORN, M., GLÖCKNER, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next- generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 41 (1), e1.

KREMER, C., ÁVILA, A., MÁRQUEZ, M., USCOLA, M., RUÍZ-GALEA, M., FRIERO, E., CONTRERAS, M., VILLARREAL, C. y HERNÁNDEZ, I. Efecto de la aplicación de tratamientos para el control de Phytophthora cinnamomi en un encinar afectado por seca. 9CFE Gijón 2025.

LI, Z.; WANG, J.; WU, Y.; HU, J.; CONG, L.; YANG, C.; SUN, J.; 2022. Changes in soil properties and the phoD-harboring bacteria of the alfalfa field in response to phosphite treatment. Frontiers in Microbiology, 13, 1013896.

MACHMULLER, M. B.; MOHAN, J.E.; MINUCCI, J.M.; PHILLIPS, C.A.; WURZBURGER, N.; 2016. Season, but not experimental warming, affects the activity and temperature sensitivity of extracellular enzymes. *Biogeochemistry* 131 255 – 265

MEYER, N.; WELP, G.; AMELUNG, W.; 2018. The temperature sensitivity (Q10) of soil respiration: Controlling factors and spatial prediction at regional scale based on environmental soil classes. *Glob Biogeochem Cycles* 32(2) 306 – 323.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P.; O'HARA, RB; SIMPSON, G.; SOLYMOS, P.; STEVENS, MHH.,; SZÖCS, E.; WAGNER, H.; 2020. Vegan community ecology package version 2.5

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. Appl Soil Ecol 201, 105481.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O.; 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41(DI) D590 – D596

ROMERO, M.A.; GONZÁLEZ, M.; SERRANO, M.S.; SÁNCHEZ M.E.; 2019. Trunk injection of fosetyl-aluminium controls the root disease caused by *Phytophthora cinnamomi* on *Quercus ilex* woodlands. *Ann Appl Biol* 174: 313-318

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. 8º Congreso Forestal Español. Ed. Sociedad Española de Ciencias Española. ISBN 978-84-941695-6-4. Lleida.

SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, M.E., SÁNCHEZ SOLANA, J.E.; NAVARRO CERRILLO, R.M.; FERNÁNDEZ REBOLLO, P.; TRAPERO CASAS, A.; 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol San Veg Plagas*,29:87-108

SÁNCHEZ, M.; CAETANO, P.; FERRAZ, J.; TRAPERO, A.; 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *For Pathol* 32: 5-18

SERRANO, M.; FERNÁNDEZ, P.; SÁNCHEZ, M; 2011. La fertilización cálcica para el control de la podredumbre radical de la encina. *Vida Rural* 335:14-19

SERRANO, M.S.; DE VITA, P.; FERNANDEZ-REBOLLO, P.; HERNANDEZ, M.: 2012. Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*. 132: 271-279

SERRANO, M.S.; FERNANDEZ-REBOLLO, P.; DE VITA, P.; SÁNCHEZ M.E.; 2013. Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain. *Agrofor Syst* 87: 173-179.

SINGH, J.; BHUNIA, H.; BASU, S.; 2019. Adsorption of CO2 on KOH activated carbon adsorbents: Effect of different mass ratios. J Environ Manage 250, 109457.

SOLANKI, A. C.; GURJAR, N.S.; SHARMA, S.; WANG, Z., KUMAR, A.; SOLANKI, M.K.; DIVVELA, P.K.; YADAV, K.; KASHYAP, B.K.; 2024. Decoding seasonal changes: soil parameters and microbial communities in tropical dry deciduous forests. *Front Microbiol* 15 1258934

SOLÍS-GARCÍA, I.A.; CEBALLOS-LUNA, O.; CORTAZAR-MURILLO, E.M.; DESGARENNES, D.; GARAY-SERRANO, E.; PATIÑO-CONDE, V.; Guevara-Avendaño, E.; Méndez-Bravo, A.; REVERCHON, F; 2021. *Phytophthora* root rot modifies the composition of the avocado rhizosphere microbiome and increases the abundance of opportunistic fungal pathogens. Front. Microbiol. 11:574110

SOLLA, A; MORENO, G.; MALEWSKI, T.; JUNG, T.; KLISZ, M.; TKACZYK, M.; SIEBYLA, M.; , PÉREZ, A.; CUBERA, E.; HRYNYK, H.; SZULC, W.; RUTKOWSKA, B.; MARTÍN, J.A.; BELBAHRI, L.; OSZAKO, T.; 2021. Phosphite spray for the control of oak decline induced by *Phytophthora* in Europe. *For Ecol Manag* 485: 118938

TRINDADE, M; MOREIRA, A.C.; CARDILLO, E.; et al.; 2020. Gestión y prevención de la enfermedad causada por *Phytophthora cinnamomi* en dehesas y montados. INIAV, I.P. y CICYTEX. 57 pp. ISBN: 978-84-09-20350-5.

WANG, Y.; TANG, D. W. 2024. Soil chemical fumigation alters soil phosphorus cycling: effects and potential mechanisms. Front. Plant Sci., 15, 1289270.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; MENGE, J.A.; 2001. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. FEMS Microbiol Ecol 35:129–136.

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. J. Korean Soc. Environ. Eng., 34(1), 55-62.

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 Microbiol. 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 Int. J. Food Microbiol., 159(1), 54-58