



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

---

Organiza



## Efecto de los tratamientos de prevención de incendios forestales sobre las comunidades bacterianas asociadas a sitios productores de *Boletus edulis*

MEDIAVILLA, O.<sup>1,2</sup>, GEML, J<sup>3,4</sup>, OLAIZOLA, J.<sup>2</sup>, ORIA DE RUEDA, J.A.<sup>1</sup>, BALDRIAN, P<sup>5</sup>, y MARTÍN-PINTO, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible Avda. Madrid, 44 34071 Palencia.

<sup>2</sup> IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S. L. Calle Curtidores, 17 34004 Palencia.

<sup>3</sup> Eszterházy Károly University, Leányka út 6., H-3300 Eger, Hungary.

<sup>4</sup> Naturalis Biodiversity Center, Vondellaan 55, PO Box 9517, 2300 RA, Leiden, Países Bajos.

<sup>5</sup> Institute of Microbiology of the CAS, Vídenska 1083, 14220 Praga, República Checa.

### Resumen

Los ecosistemas de *Cistus ladanifer* producen hongos de alto interés, como *Boletus edulis*, uno de los hongos de mayor importancia económica a nivel mundial. Estos matorrales, son propensos a incendios forestales, de ahí, que sea indispensable realizar tratamientos preventivos. Además, las producciones de *B. edulis* han disminuido severamente en los últimos años. Es necesaria una mayor comprensión del ciclo de vida de *B. edulis* y de los factores bióticos que influyen en la formación de carpóforos para poder efectuar prácticas de gestión que faciliten la producción de *B. edulis*. Es probable que algunas bacterias estén involucradas, siendo clave en la triple simbiosis (planta-hongo-bacteria). En este estudio, utilizamos secuenciación masiva de ADN en suelo para (i) evaluar el efecto del origen del sitio y los tratamientos preventivos sobre las comunidades bacterianas; (ii) testar correlaciones entre bacterias y cantidad de micelio y producción de carpóforos de *B. edulis*; (iii) identificar bacterias indicadoras de los sitios más productivos. Nuestros resultados mostraron que el origen del sitio fue determinante en la riqueza y la composición bacteriana, mientras que los tratamientos preventivos tuvieron un menor efecto. La producción de carpóforos de *B. edulis* mostró una correlación positiva con el filo Verrucomicrobia. Algunos géneros, como *Azospirillum* y *Gemmimonas* sp., fueron identificados como indicadores de los sitios más productivos, lo que sugiere un potencial papel biológico en la fructificación de este hongo. Este estudio proporciona una mejor comprensión de los sistemas *C. ladanifer-B. edulis*.

### Palabras clave

Jarales, prevención de incendios, biología molecular, interacción de especies, especies indicadoras.

### 1. Introducción

Los ecosistemas de *Cistus ladanifer* L., han sido considerados tradicionalmente como improductivos (ORIA-DE-RUEDA ET AL., 2008), sin embargo, son capaces de albergar una gran diversidad de especies de hongos comestibles (COMANDINI ET AL., 2006). Entre ellos, el más apreciado es *Boletus edulis* Bull. capaz de producir cantidades extraordinarias de carpóforos en matorrales de *C. ladanifer* (ORIA-DE-RUEDA ET AL., 2008; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ ET AL., 2015b). Esta especie es una de las más valoradas en todo el mundo, generando grandes ingresos en los mercados mundiales (DENTINGER ET AL., 2010; CATCHESIDE & CATCHESIDE, 2012).

Estos ecosistemas, así como las comunidades fúngicas asociadas, son propensos a sufrir incendios forestales (MARTÍN-PINTO ET AL., 2006). Este hecho ha llevado a la necesidad de realizar tratamientos de manejo enfocados a la prevención de incendios, que podrían mejorar la producción de hongos (SAVOIE & LARGETEAU, 2011).

La producción de carpóforos está influenciada, además de por factores ambientales abióticos, por factores bióticos, tales como fisiología vegetal e interacciones con otros hongos y bacterias del

suelo (ANTONY-BABU ET AL., 2013). Es esencial disponer de una mayor comprensión de las comunidades bacterianas ya que estos microorganismos son clave en la triple simbiosis planta-hongo-bacteria (BARBIERI ET AL., 2005; BONFANTE & ANCA, 2009), y representan los microorganismos más abundantes en suelos forestales (HARDOIM ET AL., 2015; BALDRIAN, 2017).

Las bacterias son microorganismos ubicuos, que pueden desempeñar varias funciones simbióticas con los hongos. Algunas especies bacterianas juegan roles esenciales en el ciclo de nutrientes (PENT ET AL., 2017), y median en pasos críticos del ciclo de nitrógeno (LLADÓ ET AL., 2017), que tiene una fuerte influencia en la abundancia de hongos ectomicorrícos (FREY ET AL., 2004; ALLISON ET AL., 2007). Otras especies bacterianas participan en el ciclo de carbono (FIERER ET AL., 2013), aumentando la disponibilidad de carbono para la planta y para los hongos asociados (HONRUBIA, 2009).

Algunas bacterias también pueden actuar como bacterias facilitadoras de la micorrización (MHB), estimulando el desarrollo de micorrizas, o actuando como inhibidores y antagonistas de patógenos (FREY-KLETT ET AL., 2007). En este contexto, se han llevado a cabo estudios previos para conocer el papel de las bacterias en la producción de carpóforos de otras especies de hongos comestibles, como las trufas (SPLIVALLO ET AL., 2015). También se ha demostrado el papel de las bacterias en la formación de micorrizas de *B. edulis* (MEDIAVILLA ET AL., 2016), sin embargo, se necesita una comprensión más profunda del efecto de las comunidades bacterianas en el micelio del suelo y en la producción de carpóforos.

Hasta el momento, no se dispone de información sobre las comunidades bacterianas naturalmente presentes en la micorrosfera de *C. ladanifer-B. edulis*, y la posible influencia de los tratamientos de manejo sobre estas. Nuestra hipótesis es que las comunidades bacterianas se ven afectadas por el origen del sitio y los tratamientos de prevención de incendios realizados en estos ecosistemas. Pensamos que las bacterias podrían jugar un papel fundamental en la presencia y fructificación de *B. edulis*, pudiendo incluso algunas de ellas actuar como especies indicadoras de los sitios más productivos.

## **2. Objetivos**

El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad de comunidades bacterianas y su interacción con *B. edulis*, así como su papel potencial en la producción de carpóforos de *B. edulis* bajo diferentes tratamientos de prevención de incendios forestales. Para ello, nuestros objetivos específicos fueron (i) investigar los efectos de diferentes tratamientos de prevención de incendios y origen del sitio sobre la riqueza, la abundancia y composición bacteriana; (ii) determinar si hubo una correlación entre las comunidades bacterianas y la producción de carpóforos y micelio de *B. edulis* en el suelo; e (iii) identificar especies indicadoras bacterianas asociadas con los sitios más productivos de *B. edulis*.

## **3. Metodología**

La zona de estudio se localizó en la provincia de Zamora y está dominada exclusivamente por arbustos de *C. ladanifer*. Se caracteriza por tener clima mediterráneo, con una estación seca durante el verano y fríos inviernos. La precipitación media anual es 450-700 mm, y las temperaturas medias oscilan entre 14,5 y 15,8°C. Los datos climáticos fueron proporcionados por la estación meteorológica más cercana (Alcañices, 0724617 Longitud-UTM, 4618218 Latitud-UTM, Huso 29T y 806 m sobre el nivel del mar, Agencia Meteorológica Española). La zona de estudio estaba formada por tres zonas con diferente edad y origen: a) una masa de 8 años de edad cuyo origen fue un incendio forestal; b) una masa de 8 años de edad cuyo origen fue un desbroce de la masa; c) una masa de 20 años de edad cuyo origen fue un incendio forestal.

Los tratamientos se establecieron dependiendo de su aplicabilidad de acuerdo a la edad y características de la vegetación. Para las masas de 8 años de edad (a y b), los tratamientos llevados a cabo consistieron en diferentes niveles de reducción del combustible: 1) sin desbroce (control); 2) desbroce del 50% y 3) desbroce total. En la masa de 20 años de edad (c), los tratamientos de reducción de combustible fueron: 1) sin desbroce (control); 2) desbroce total y 3) quema controlada.

De este modo, se estudiaron tres zonas diferentes con tres tratamientos por zona, y tres parcelas por tratamiento, resultando en un total de 27 parcelas muestreadas. Las parcelas de muestreo consistieron en transectos de 2x50 m, establecidos de acuerdo a estudios previos (LUOMA ET AL., 1991; SMITH ET AL., 2002).

#### *Muestreo y trabajo molecular*

Las muestras de suelo se recogieron en diciembre de 2013. Para ello se utilizó un extractor (3,5 cm de diámetro y 26 cm de profundidad), y se tomaron 5 muestras de suelo en cada parcela, separadas 5 m entre sí, y siguiendo la forma de la parcela (TAYLOR, 2002).

Se preparó el suelo antes de llevar a cabo la extracción de ADN. Para ello, fue secado a temperatura ambiente y posteriormente tamizado con un tamiz de 1mm para eliminar piedras y elementos gruesos. Las cinco muestras de cada parcela fueron agrupadas dando como resultado una muestra de suelo compuesta por parcela.

Las extracciones de ADN se realizaron con el kit de extracción “PowerSoil® DNA Isolation Kit” (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), a partir de 0,25 g de suelo por muestra, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso. Se utilizaron los cebadores 515F y 806R-trP1 (CAPORASO ET AL., 2011, 2012) para amplificar ADNr bacteriano 16S. Para cada una de las 27 muestras se usó el siguiente protocolo de PCR: un ciclo de 95 °C durante 5 min, luego 35 ciclos de 95 °C por 20 s, 54 °C por 30 s y 72 °C por 1.5 min, terminando con un ciclo de 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se verificaron para determinar las concentraciones de ADN, utilizando el sistema avanzado QIAxcel (Qiagen, Venlo, Países Bajos). La secuenciación masiva se realizó con Ion Torrent, y se llevó a cabo en Naturalis Biodiversity Center (Leiden, Países bajos). Se utilizó el secuenciador Ion 318TMChip para permitir la mayor cobertura posible en la secuenciación.

#### *Cuantificación del micelio de *B. edulis* en el suelo y producción de carpóforos*

El ADN extraído de *B. edulis* se amplificó mediante PCR a tiempo real en un equipo de PCR a tiempo real de Applied Biosystems® 7500 (Applied Biosystems, Mannheim, Germany), usando el kit “qPCR Boletus edulis-VK” provisto por Vacunek S.L., y de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para un volumen de reacción final de 25 µl. El kit proporcionó los reactivos y enzimas necesarios, mezclados en un único master mix. El kit utiliza una sonda Taqman marcada con FAM-BHQ1® y también un control interno positivo (CIP) con cebadores y una sonda Taqman marcada con JOE-BHQ1®, que permite detectar falsos negativos causados por la inhibición. Se añadieron cinco microlitros del ADN extraído de las muestras de suelo. También se añadió un control positivo en el análisis, con una cantidad conocida de ADN.

Se incluyeron tres replicas por muestra, así como un control negativo. Se generó una curva estándar con 5 puntos y tres réplicas por punto, usando cantidades conocidas de micelio. Se realizaron diluciones seriadas desde 11.400.000 a 1,140 ng de micelio/g de suelo. Las condiciones de ciclo de PCR fueron: 10 minutos a 95°C, 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos.

Para cuantificar la producción de carpóforos de *B. edulis*, se recolectaron todos los carpóforos de *B. edulis* semanalmente durante la temporada de hongos, desde 2010 a 2013. Los carpóforos fueron recolectados, transportados a laboratorio y almacenados a 4 °C, allí se midió el peso fresco (kg peso fresco ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) dentro de las 24 h después de la recolección.

### Análisis bioinformáticos

La limpieza inicial de los datos se llevó a cabo utilizando la plataforma online Galaxy (<https://main.g2.bx.psu.edu/root>). Los extremos de mala calidad se recortaron utilizando el software GENEIOUS PRO 5.6.1 (BioMatters, Auckland, Nueva Zelanda). Posteriormente, las secuencias se filtraron usando el software USEARCH V.8.0 (EDGAR, 2010). Las secuencias de calidad de todas las muestras se agruparon en unidades taxonómicas operativas (UTO) con una similitud de secuencia del 97 % y las secuencias químéricas se eliminaron usando USEARCH. Se asignaron las secuencias a grupos taxonómicos de bacterias de acuerdo a búsqueda de similitud por pares utilizando la base de datos Gold del Ribosomal Database Project (COLE ET AL., 2014). Las secuencias representativas de UTO bacterianas fueron enviadas a GenBank y registradas con los números de acceso MK323080 – MK325185.

### Análisis de datos

Comparamos la riqueza y abundancia de bacterias por filos entre los sitios de muestreo mediante ANOVA y test HSD de Tukey en R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016). Además, se llevaron a cabo análisis de regresión lineal para examinar las correlaciones entre la abundancia de los diferentes filos bacterianos y la producción de carpóforos y micelio extrarradical de *B. edulis* en el suelo. Para comparar la composición de la comunidad bacteriana, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para la tabla UTO transformada por Hellinger. Se llevaron a cabo dos ordenaciones, una basada en abundancia y otra basada en presencia/ausencia. Además, se utilizó el procedimiento de multirrespuesta por permutación (MRPP) y un análisis de permutaciones y múltiple ANOVA (PERMANOVA) (ANDERSON, 2001) para comprobar si las comunidades de bacterias fueron estadísticamente diferentes para cada origen. Finalmente, hicimos un análisis de las especies indicadoras de los sitios con mayor producción de carpóforos de *B. edulis* (DUFRÈNE & LEGENDRE, 1997) en PC-ORD. Para ello, las parcelas se clasificaron en dos categorías de acuerdo a su producción de carpóforos de *B. edulis*: se consideraron como parcelas poco productivas a aquellas con una producción entre 0 y 20 kg ha<sup>-1</sup> y aquellas que produjeron > 20 kg ha<sup>-1</sup> fueron consideradas como altamente productivas (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ ET AL., 2015a).

## 4. Resultados

### Composición taxonómica de la comunidad microbiana

Se obtuvieron 2165 unidades taxonómicas operativas (UTO) bacterianas que se clasificaron en 24 filos y 381 géneros. La mayoría de las UTO fueron identificadas a nivel de género, ya que la identificación hasta el nivel de especie fue imposible debido a las limitaciones de la base de datos. La comunidad microbiana del suelo estuvo dominada por Proteobacteria, que representó el 25% de la comunidad bacteriana, seguido de Actinobacteria (14%), Acidobacteria (11%), Planctomycetes (10%), Bacteroidetes (9%), Firmicutes (8%), Chloroflexi (5%) y Verrucomicrobia (4%). Los filos menos representativos (hasta el 9% de las UTO) tuvieron una menor dominancia; 4% de las UTO no fueron identificadas. Dentro del filo Proteobacteria, el 44% de las UTO pertenecieron a la clase Alphaproteobacteria, el 23% a Gammaproteobacteria, el 21% a Deltaproteobacteria y el 12% a la clase Betaproteobacteria.

*Relación entre la abundancia de las comunidades bacterianas y la producción de carpóforos y micelio extrarradical de *B. edulis* en el suelo.*

Para determinar la relación entre la abundancia bacteriana y la producción de carpóforos y micelio extrarradical de *B. edulis* en el suelo, se realizaron regresiones lineales para cada filo. Para la producción de carpóforos, se observó una correlación positiva con la abundancia del filo Verrucomicrobia ( $R^2 = 0.20$ ,  $P = 0.01$ ), y una correlación negativa con el filo Actinobacteria ( $R^2 = 0.20$ ,  $P = 0.01$ ) y Planctomycetes ( $R^2 = 0.14$ ,  $P = 0.03$ ). Sin embargo, no se apreciaron correlaciones entre la abundancia de ningún filo con la cantidad de micelio extrarradical de *B. edulis* en el suelo.

*Impacto del origen del sitio y los tratamientos de prevención de incendios en comunidades bacterianas*

La riqueza bacteriana se vio significativamente afectada por el origen del sitio ( $P = 0.039$ ). La mayor riqueza bacteriana se observó en las parcelas senescentes (371) y la menor en las parcelas jóvenes quemadas (328), apreciándose diferencias significativas entre ambas ( $P = 0.002$ ). También se observó una diferencia significativa entre la riqueza bacteriana de las parcelas jóvenes quemadas y las parcelas jóvenes desbrozadas (361) ( $P = 0.013$ ). Los tratamientos de manejo preventivos solo tuvieron un efecto significativo sobre la riqueza bacteriana en las parcelas senescentes, obteniendo una riqueza bacteriana significativamente mayor en las parcelas con desbroce total que en las parcelas control ( $P = 0.008$ ). Al analizar los efectos de los tratamientos para cada filo, se observó que la riqueza de casi todos los filos tendió a aumentar en las parcelas senescentes después de realizar un desbroce total o quema controlada. La riqueza de Acidobacteria ( $P = 0.032$ ) y Proteobacteria ( $P = 0.040$ ) fue significativamente superior en las parcelas senescentes que habían sido totalmente desbrozadas. Los tratamientos afectaron significativamente la abundancia de Planctomycetes ( $P = 0.003$ ) en las parcelas senescentes tras realizar una quema controlada, mostrando la mayor abundancia.

El gráfico de ordenación NMDS (estrés: 0.0693) reveló una fuerte estructuración de las comunidades bacterianas de acuerdo al origen del sitio y, en menor medida, al tratamiento (Fig. 1). El análisis MRPP confirmó la importancia del origen del sitio en la composición de la comunidad bacteriana (tamaño del efecto  $A = 0.0907$ , probabilidad  $p < 0.00001$ ). De igual forma, el análisis PERMANOVA indicó que la composición de la comunidad bacteriana difirió significativamente entre los diferentes orígenes de sitio ( $P = 0.0002$ ).

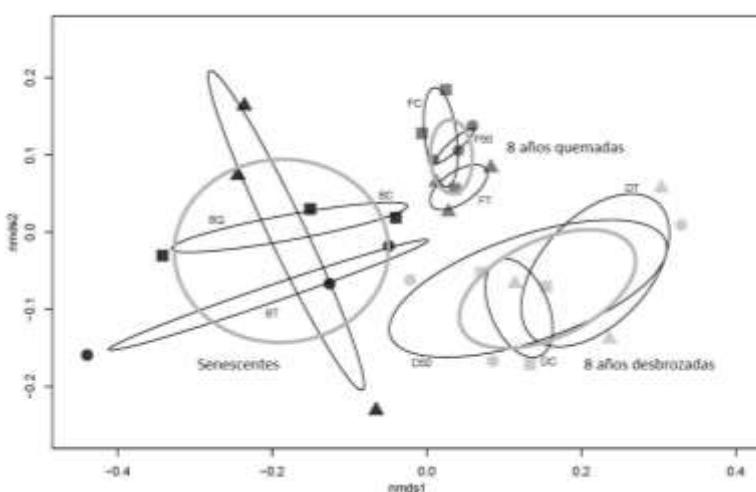


Figura 1. Gráfico de ordenación NMDS de la composición de la comunidad bacteriana entre sitios que difieren en el origen del sitio y el tratamiento. Origen del sitio: F, 8 años quemado; D, 8 años desbrozado; S, senescente. Tratamientos: C, control; 50, desbroce 50%; T, desbroce total; Q, quema controlada.

Nuestro análisis para identificar especies de bacterias indicadoras asociadas a los sitios más productivos de *B. edulis* reveló 18 UTO características de parcelas con alta producción de carpóforos de *B. edulis*, destacando varias especies de los géneros *Azospirillum* sp., *Gemmatimonas* sp. y *Opitutus* sp. (Tabla 1).

Tabla 1. Unidades Taxonómicas Operativas bacterianas consideradas especies indicadoras de parcelas altamente productivas de *Boletus edulis*.

UTO	P	Nº Acceso	% <sup>a</sup>	bp <sup>b</sup>	Nombre <sup>c</sup>	Filo <sup>c</sup>
UTO 627	0.004	DQ768106	94.7	245	<i>Archangium</i>	Proteobacteria
UTO 1240	0.0094	AJ229235	95.9	245	<i>Opitutus</i>	Verrucomicrobia
UTO 1741	0.0098	FN400860	97.6	245	<i>Mucilaginibacter</i>	Bacteroidetes
UTO 1541	0.0114	AJ229235	93.1	245	<i>Opitutus</i>	Verrucomicrobia
UTO 2893	0.0114	EF457384	97.1	245	Gp1	Firmicutes
UTO 471	0.0162	AJ535711	90.2	245	<i>Stella</i>	Proteobacteria
UTO 7	0.0214	FN400860	99.2	245	<i>Mucilaginibacter</i>	Bacteroidetes
UTO 501	0.0256	AB072735	91.0	245	<i>Gemmatimonas</i>	Gemmatimonadetes
UTO 402	0.0292	CP001854	95.9	245	<i>Conexibacter</i>	Actinobacteria
UTO 449	0.0294	AY324110	91.8	245	<i>Azospirillum</i>	Proteobacteria
UTO 2331	0.0324	AB072735	92.7	245	<i>Gemmatimonas</i>	Gemmatimonadetes
UTO 3	0.0342	HM214537	96.3	245	<i>Terriglobus</i>	Acidobacteria
UTO 2324	0.0358	X97098	95.5	245	Gp1	Firmicutes
UTO 279	0.0372	AJ401115	92.2	245	Subdivision3_genera_incertae_sedis	Verrucomicrobia
UTO 602	0.0384	FJ177532	94.7	245	<i>Ferruginibacter</i>	Bacteroidetes
UTO 2943	0.0392	EF457390	98.0	245	Gp1	Firmicutes
UTO 3279	0.0412	EF457407	100	245	Gp4	Firmicutes
UTO 1543	0.0454	AJ229235	90.2	245	<i>Opitutus</i>	Verrucomicrobia

a. %: porcentaje de similitud de la secuencia. b. pb: longitud de alineación por pares. c. Nombre y filo de la secuencia más similar en la base de datos Gold, parte del Ribosomal Database Project.

## 5. Discusión

Los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria fueron los más abundantes, lo que respalda los resultados obtenidos en estudios anteriores en suelos forestales (DEVEAU ET AL., 2016). Estos filos bacterianos suelen abundar en la mayoría de suelos (LAUBER ET AL., 2009), lo que puede estar debido a su importancia funcional (LLADÓ ET AL., 2017). La clase Alphaproteobacteria representó la clase prevalente dentro del filo Proteobacteria. Esto podría explicarse por el bajo pH de los suelos en la zona de estudio. El pH es un importante impulsor de la composición de la comunidad bacteriana (LAUBER ET AL., 2009) y en suelos ácidos suelen predominar Alphaproteobacteria y Acidobacteria (FELSKE ET AL., 1999; KAISER ET AL., 2001; BALDRIÁN ET AL., 2012; SHEN ET AL., 2013). Algunas especies de Alphaproteobacteria median en la fijación de N<sub>2</sub> (LLADÓ ET AL., 2017), que influye fuertemente en la abundancia de hongos ectomicorrícos (LAUBER ET AL., 2008). Dentro de la clase Alphaproteobacteria, géneros como *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, presentes en el suelo estudiado, albergan múltiples especies fijadoras de nitrógeno (BARBIERI ET AL., 2005).

En cuanto al análisis de correlación entre abundancia de bacterias y producción de carpóforos de *B. edulis*, estudios previos han demostrado que la interacción entre bacterias y hongos puede ser crucial (BOER ET AL., 2005), y esta interacción puede ser positiva, negativa o neutral, es decir, puede

involucrar tanto bacterias patógenas como mutualistas (BONFANTE & ANCA, 2009; DE BOER, 2017). En nuestro estudio, el filo Verrucomicrobia mostró una correlación positiva con la producción de carpóforos. BUCKLEY & SCHMIDT (2001) sugirieron que la abundancia de Verrucomicrobia podía aumentar en el suelo con el contenido de humedad. En nuestras parcelas de estudio, un aumento en la cobertura de matorrales pudo conllevar a un aumento de humedad del suelo, y se asoció con una mayor producción de carpóforos de *B. edulis*. También se apreció una correlación negativa con el filo Actinobacteria, lo que podría explicarse por su temperamento heliófilo. La abundancia de estas bacterias tendió a aumentar en ausencia de vegetación, una tendencia que observamos en los tratamientos donde se realizó un desbroce total. Este comportamiento también fue observado por ZHANG ET AL. (2016) quienes reportaron un aumento significativo del filo Actinobacteria después de realizar claras forestales. Por el contrario, la abundancia de micelio de *B. edulis* en el suelo, y consecuentemente la producción de carpóforos, tiende a disminuir al eliminar el hospedante (MEDIAVILLA ET AL., 2017).

Al analizar el impacto de los tratamientos de prevención de incendios en las comunidades bacterianas, la mayoría de los filos no mostraron una respuesta significativa en términos de riqueza y abundancia. Esto sugiere una cierta resiliencia de las comunidades bacterianas a los tratamientos de manejo forestal, y apoya los resultados de SMITH ET AL. (2008) quienes destacaron el importante papel de las bacterias en la resiliencia a las perturbaciones de los bosques y en los procesos de regeneración. Otras prácticas de manejo forestal también tuvieron un impacto menor en la composición y diversidad bacterianas (NACKE ET AL., 2011). De acuerdo a estudios previos, la vegetación dominante y el uso del suelo tuvieron una influencia mayor en las comunidades de hongos que en las de bacterias, especialmente en los hongos ectomicorrícos debido a su dependencia de la planta hospedante (BUÉ ET AL., 2009; ZINGER ET AL., 2011).

Tanto el desbroce total como la quema controlada aumentaron la riqueza bacteriana, lo que puede explicarse por un aumento de la heterogeneidad de los rodales. Las masas senescentes de *C. ladanifer* normalmente tienen una densidad de plantas tan alta que alcanzan prácticamente una cobertura total (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ ET AL., 2013), lo que proporciona una estructura bastante homogénea con una baja diversidad de nichos. Tanto el desbroce total como la quema controlada eliminan la mayor parte de los matorrales, creando nuevos nichos disponibles para los microorganismos. Por ello, cualquier perturbación sería deseable para aumentar la riqueza bacteriana (SANTILLÁN ET AL., 2018).

En términos de abundancia, el único filo que se vio afectado por los tratamientos fue el filo Planctomycetes, que pareció ser más abundante en las parcelas senescentes tras realizar la quema controlada. Otros investigadores también observaron que algunos años después de realizar la quema prescrita, los niveles de nutrientes y las tasas de mineralización disminuyeron en los suelos afectados (CHOROMANSKA & DELUCA, 2001; REICH ET AL., 2001; CARTER & FOSTER, 2004). En estas condiciones, los miembros del filo Planctomycetes al ser descomponedores de acción lenta, podrían sobrevivir (DEDYSH & KULICHEVSKAYA, 2014).

Las parcelas jóvenes quemadas mostraron el nivel más bajo de riqueza bacteriana. Esto podría deberse a que la mayoría de los filos detectados en los sitios de estudio prefieren suelos ácidos. Sin embargo, el pH en las parcelas jóvenes quemadas fue probablemente más alto que en las otras parcelas por el efecto del fuego, aumentando el pH del suelo (SHEN ET AL., 2016) debido a la deposición de ceniza (CERTINI, 2005). Los resultados obtenidos concuerdan con los de SMITH ET AL. (2008), quienes observaron que las comunidades bacterianas tendieron a recuperarse más rápido en los sitios desbrozados que en los quemados.

Al analizar la composición bacteriana, fue destacable la fuerte influencia del origen del sitio de estudio. BONFANTE & ANCA, (2009) también observaron que la composición de la comunidad

bacteriana estaba determinada por el origen del sitio. Esto también respalda los resultados obtenidos por SMITH ET AL. (2008), quienes reportaron el efecto de las claras y los incendios en la composición de las comunidades microbianas del suelo forestal. Los incendios forestales impulsan un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana debido al aumento del pH (ROUSK ET AL., 2010). BAATH ET AL. (1995) también corroboraron que un aumento en el pH del suelo debido a el fuego tuvo un efecto notable en la composición de la comunidad bacteriana. Específicamente, de los resultados obtenidos en nuestro estudio, se apreció una mayor abundancia de Firmicutes en las parcelas jóvenes procedentes de un incendio forestal. Este resultado confirma lo observado por SMITH ET AL. (2008), quienes reportaron que el filo Firmicutes era característico de suelos en los que había tenido lugar un incendio. Este filo es capaz de sobrevivir en condiciones extremas, y puede verse favorecido por los incendios forestales.

Nuestros resultados revelaron que algunas UTO bacterianas podrían ser consideradas como especies indicadoras de los sitios más productivos de *B. edulis*. Entre ellas, el género *Azospirillum* sp. representa el género mejor caracterizado, con varias especies reconocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Estas especies poseen una serie de propiedades beneficiosas, como la fijación de nitrógeno, la producción de ácido indol-3-acético (IAA) y desaminación del precursor de etileno 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (CREUS ET AL., 2005; BLAHA ET AL., 2006) Además, las plantas asociadas a comunidades de *Azospirillum* sp. desarrollan un mayor número de raíces laterales y pelos radicales, lo que mejorará no solo la cantidad de superficie radicular disponible para la absorción de nutrientes (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000), sino también el número de raíces micorrícas. También identificamos a *Gemmimonas* sp. como especie indicadora. Este género incluye varias especies de bacteria solubilizadoras de fosfato (YANG ET AL., 2017) y fijadoras de N<sub>2</sub> (KRIEG ET AL., 2010). *Opitutus* sp. fue la más predominante entre las especies indicadoras. Este género pertenece al filo Verrucomicrobia, del cual se observó una correlación positiva con la producción de carpóforos de *B. edulis*, lo que podría deberse a su papel en el ciclo del carbono (FIERER ET AL., 2013).

En base a los resultados obtenidos en este estudio, es posible sugerir algunas prácticas de manejo. Debido a que los rodales senescentes tienden a tener una menor riqueza bacteriana, una perturbación, que resultaría en el rejuvenecimiento de estas áreas, sería deseable para desencadenar un aumento en la riqueza bacteriana. Este hecho también permitiría un aumento en la producción de carpóforos de *B. edulis* y una disminución en la severidad del fuego al reducir la cantidad de combustible disponible. En este contexto, realizar prácticas de gestión mecánica (como los desbroces) parece ser la mejor opción, ya que su efecto sobre las comunidades bacterianas es menor que en el caso de la quema controlada, y este tratamiento mostró efectos favorables sobre riqueza bacteriana en nuestro estudio. Sin embargo, también sería deseable para mantener la heterogeneidad del hábitat a escala del paisaje, dejar intactos algunos parches de matorrales senescentes para maximizar la riqueza bacteriana general en la zona.

## 6. Conclusiones

Este estudio presenta información novedosa sobre las comunidades bacterianas asociadas a ecosistemas de *C. ladanifer* altamente productivos de *B. edulis* tras la aplicación de diferentes métodos de prevención de incendios, y proporciona una mejor comprensión de la triple simbiosis (planta-hongo-bacteria) involucrada en estos sistemas. Los resultados mostraron que el origen del sitio influyó significativamente en la composición bacteriana e identificó especies indicadoras de sitios altamente productivos de *B. edulis*, destacando el papel biológico que desempeñan algunos filos bacterianos. A pesar de estos hallazgos, todavía hay mucha incertidumbre sobre la asociación entre especies bacterianas y fructificación fúngica, por lo que es necesaria más investigación en este campo.

## 7. Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto de investigación VA050U17 (Junta de Castilla y León). El trabajo de laboratorio y análisis de datos se llevó a cabo en Naturalis Biodiversity Center (Países Bajos) financiado por una beca de la Universidad de Valladolid dentro del programa 'Ayudas para estancias breves en el desarrollo de Tesis Doctorales. Convocatoria 2016' y una Ayuda 'Martin & Temminck-Fellowship' de Naturalis Biodiversity Center (2018). El trabajo de Olaya Mediavilla fue desarrollado gracias a una Ayuda Predoctoral de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo.

## 8. Bibliografía

- ALLISON, SD.; HANSON, CA.; TREDESER, KK; 2007. Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biol Biochem* 39: 1878–1887.
- ANDERSON, MJ; 2001. A new method for non parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26: 32–46.
- ANTONY-BABU, S.; DEVEAU, A.; NOSTRAND, JD VAN.; ZHOU, J.; TACON, F LE.; ROBIN, C.; FREY-KLETT, P.; UROZ, S; 2013. Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environ Microbiol* 16: 2831–2847.
- BAATH, E.; FROSTEGARD, ASA.; PENNANEN, T.; FRITZE, H; 1995. Microbial community structure and ph response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Biol Biochem* 21: 229–240.
- BALDRIAN, P; 2017. Forest microbiome : diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiol Rev* 41: 109–130.
- BALDRIÁN, P.; KOLARIK, M.; STURSOVA, M.; KOPECKY, J.; VALASKOVA, V.; VETROVSKY, T.; ZIFCÁKOVÁ, L.; SNAJDR, J.; RIDL, J.; VLCEK, C.; VORISKOVA, J; 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J* 6: 248–258.
- BARBIERI, E.; BERTINI, L.; ROSSI, I.; CECCAROLI, P.; SALTARELLI, R.; GUIDI, C.; ZAMBONELLI, A.; STOCCHI, V; 2005. New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad . 247: 23–35.
- BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; MIRZA, MS.; MOËNNE-LOCCOZ, Y; 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase- encoding gene acdS in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 455–470.
- DE BOER, W; 2017. Upscaling of fungal–bacterial interactions: from the lab to the field. *Curr Opin Microbiol* 37: 35–41.
- BOER, W DE.; FOLMAN, LB.; SUMMERBELL, RC.; BODDY, L; 2005. Living in a fungal world : impact of fungi on soil bacterial. *FEMS Microbiol Rev* 29: 795–811.

BONFANTE, P.; ANCA, I; 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: a Network of Interactions. *Annu Rev Microbiol* 63: 363–383.

BUCKLEY, DH.; SCHMIDT, TM; 2001. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiol Ecol* 35: 105–112.

BUÉ, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, RH.; UROZ, S.; MARTIN, F; 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol* 184: 449–456.

CAPORASO, JG.; LAUBER, CL.; WALTERS, WA.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, SM.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, JA.; SMITH, G.; KNIGHT, R; 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6: 1621–1624.

CAPORASO, JG.; LAUBER, CL.; WALTERS, WA.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, CA.; TURNBAUGH, PJ.; FIERER, N.; KNIGHT, R; 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci* 108: 4516–4522.

CARTER, MC.; FOSTER, CD; 2004. Prescribed burning and productivity in southern pine forests: A review. *For Ecol Manage* 191: 93–109.

CATCHESIDE, PS.; CATCHESIDE, DEA; 2012. *Boletus edulis* ( Boletaceae ), a new record for Australia. *J Adelaide Bot Gard* 25: 5–10.

CERTINI, G; 2005. Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia* 143: 1–10.

CHOROMANSKA, U.; DELUCA, TH; 2001. Prescribed fire alters the impact of wildfire on soil biochemical properties in a ponderosa pine Forest. *Soil Sci Soc Am J* 65: 232–238.

COLE, JR.; WANG, Q.; FISH, JA.; CHAI, B.; McGARRELL, DM.; SUN, Y.; BROWN, CT.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, CR.; TIEDJE, JM; 2014. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42: 633–642.

COMANDINI, O.; CONTU, M.; RINALDI, AC; 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16: 381–395.

CREUS, CM.; GRAZIANO, M.; CASANOVAS, EM.; PEREYRA, MA.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; BARASSI, CA.; LAMATTINA, L; 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasiliense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221: 297–303.

DEDYSH, SN.; KULICHEVSKAYA, IS; 2014. Acidophilic planctomycetes: expanding the horizons of new planctomycete diversity. In: Planctomycetes: Cell Structure. (Fuerst JA, ed.) Humana Press, Origins and Biology. pp: 125–139.

DENTINGER, BTM.; AMMIRATI, JF.; BOTH, EE.; DESJARDIN, DE.; HALLING, RE.; HENKEL, TW.; MOREAU, PA.; NAGASAWA, E.; SOYTONG, K.; TAYLOR, AF.; WATLING, R.; MONCALVO, JM.; McLAUGHLIN, DJ; 2010.

Molecular phylogenetics of porcini mushrooms (Boletus section Boletus). *Mol Phylogenet Evol* 57: 1276–1292.

DEVEAU, A.; ANTONY-BABU, S.; LE TACON, F.; ROBIN, C.; FREY-KLETT, P.; UROZ, S; 2016. Temporal changes of bacterial communities in the *Tuber melanosporum* ectomycorrhizosphere during ascocarp development. *Mycorrhiza* 26: 389–399.

DUFRÈNE, M.-; LEGENDRE, P; 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible assymetrical approach. *Ecol Monogr* 67: 345–366.

EDGAR, RC; 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; DE VOS, WM.; AKKERMANS, ADL; 1999. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol Ecol* 30: 137–145.

FIERER, N.; LADAU, J.; CLEMENTE, JC.; LEFF, JW.; OWENS, SM.; POLLARD, KS.; KNIGHT, R.; GILBERT, JA.; McCULLEY, RL; 2013. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. *Science* (80- ) 342: 621–624.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M; 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22–36.

FREY, SD.; KNORR, M.; PARRENT, JL.; SIMPSON, RT; 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *For Ecol Manage* 196: 159–171.

HARDOIM, PR.; VAN OVERBEEK, LS.; BERG, G.; PIRTTILÄ, M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M; 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79: 293–320.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; DE MIGUEL, S.; PUUKALA, T.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P; 2015a. Climate-sensitive models for mushroom yields and diversity in *Cistus ladanifer* scrublands. *Agric For Meteorol* 213: 173–182.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P; 2013. Post-fire fungal succession in a Mediterranean ecosystem dominated by *Cistus ladanifer* L. *For Ecol Manage* 289: 48–57.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; PANDO, V.; MARTÍN-PINTO, P; 2015b. Impact of fuel reduction treatments on fungal sporocarp production and diversity associated with *Cistus ladanifer* L. ecosystems. *For Ecol Manage* 353: 10–20.

HONRUBIA, M; 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *An del Jardín Botánico Madrid* 66: 133–144.

KAIser, O.; PÜHLER, A.; SELBITSCHKA, W; 2001. Phylogenetic Analysis of Microbial Diversity in the

Rhizoplane of Oilseed Rape (*Brassica napus* cv. Westar) Employing Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent Approaches. *Microb Ecol* 42: 136–149.

KRIEG, NR.; STALEY, JT.; BROWN, DR.; HEDLUND, BP.; PASTER, BJ.; WARD, NL.; LUDWIG, W.; WHITMAN, WB; 2010. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second ed. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 948 pp.

LAUBER, CL.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N; 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Appl Environ Microbiol* 75: 5111–5120.

LAUBER, CL.; STRICKLAND, MS.; BRADFORD, MA.; FIERER, N; 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem* 40: 2407–2415.

LLADÓ, S.; LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; BALDRIAN, P; 2017. Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiol Mol Biol Rev* 81: 1–27.

LUOMA, DL.; FRENKEL, RE.; TRAPPE, JM; 1991. Fruiting of hypogeous fungi in Oregon Douglas-Fir forests: seasonal and habitat variation. *Mycología* 83: 335–353.

MARTÍN-PINTO, P.; VAQUERIZO, H.; PEÑALVER, F.; OLAIZOLA, J.; ORIA-DE-RUEDA, JA; 2006. Early effects of a wildfire on the diversity and production of fungal communities in Mediterranean vegetation types dominated by *Cistus ladanifer* and *Pinus pinaster* in Spain. *For Ecol Manage* 225: 296–305.

MEDIAVILLA, O.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; OLAIZOLA, J.; SANTOS-DEL-BLANCO, L.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P; 2017. Insights into the dynamics of *Boletus edulis* mycelium and fruiting after fire prevention management. *For Ecol Manage* 404: 108–114.

MEDIAVILLA, O.; OLAIZOLA, J.; SANTOS-DEL-BLANCO, L.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P; 2016. Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula. *Mycorrhiza* 26: 161–168.

NACKE, H.; THÜRMER, A.; WOLLHERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHÖNING, I.; SCHRUMPF, M.; ROLF, D; 2011. Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS One* 6: 1–12.

ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P.; OLAIZOLA, J; 2008. Bolete productivity of Cistaceous scrublands in Northwestern Spain. *Econ Bot* 62: 323–330.

PENT, M.; PÖLDMAA, K.; BAHRAM, M; 2017. Bacterial Communities in Boreal Forest Mushrooms Are Shaped Both by Soil Parameters and Host Identity. *Front Microbiol* 8: 836.

REICH, PB.; PETERSON, DW.; WEDIN, DA.; WRAGE, K; 2001. Fire and vegetation effects on productivity and nitrogen cycling across a forest-grassland continuum. *Ecol Soc Am* 82: 1703–1719.

Rousk, J.; BAATH, E.; BROOKES, PC.; LAUBER, CL.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, JG.; KNIGHT, R.; FIERER, N; 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4: 1340–1351.

SANTILLÁN, E.; SESHAN, H.; CONSTANCIAS, F.; DRAUTZ-MOSÉS, DI.; WUERTZ, S; 2018. Frequency of disturbance alters diversity , function , and underlying assembly mechanisms of complex bacterial communities.

SAVOIE, JM.; LARGETEAU, ML; 2011. Production of edible mushrooms in forests: Trends in development of a mycosilviculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 971–979.

SHEN, C.; XIONG, J.; ZHANG, H.; FENG, Y.; LIN, X.; LI, X.; LIANG, W.; CHU, H; 2013. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biol Biochem* 57: 204–211.

SHEN, J.; CHEN, CR.; LEWIS, T; 2016. Long term repeated fire disturbance alters soil bacterial diversity but not the abundance in an Australian wet sclerophyll forest. *Sci Rep*: 1–10.

SMITH, JE.; MOLINA, R.; Huso, MMP.; LUOMA, DL.; MCKAY, D.; CASTELLANO, MA.; LEBEL, T.; VALACHOVIC, Y; 2002. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigaeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotationage, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, USA. *Can J Bot* 80: 186–204.

SMITH, NR.; KISHCHUK, BE.; MOHN, WW; 2008. Effects of wildfire and harvest disturbances on forest soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 74: 216–224.

SPLIVALLO, R.; DEVEAU, A.; VALDEZ, N.; KIRCHHOFF, N.; FREY-KLETT, P.; KARLOVSKY, P; 2015. Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma. *Environ Microbiol* 17: 2647–2660.

STEENHOUT, O.; VANDERLEYDEN, J; 2000. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses : genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Lett* 24: 487–506.

TAYLOR, AFS; 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant Soil* 244: 19–28.

TEAM, RC; 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

YANG, Y.; WANG, N.; GUO, X.; ZHANG, Y.; YE, B; 2017. Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by hightthroughput pyrosequencing. *PLoS One* 12: e0178425.

ZHANG, X.; LIU, S.; LI, X.; WANG, J.; DING, Q.; WANG, H.; TIAN, C.; YAO, M.; AN, J.; HUANG, Y; 2016. Changes of soil prokaryotic communities after clear-cutting in a karst forest: evidences for cutting-based disturbance promoting deterministic processes. *FEMS Microbiol Ecol* 92: pii: fiw026.

ZINGER, L.; LEJON, DPH.; BAPTIST, F.; BOUASRIA, A.; AUBERT, S.; GEREMIA, RA.; CHOLER, P; 2011. Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS One* 6: e0019950.