



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



Plántulas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) albergan comunidades microbianas taxonómicamente diversas

ROMERALO C.¹, HÖGBERG K.A.², SHERWOOD P.¹, WITZELL J.³

¹ Swedish University of Agricultural Sciences, Southern Swedish Forest Research Centre, Sundsvägen 3, SE-23053 Alnarp, Suecia.

² Skogforsk- Forestry Research Institute of Sweden, Ekebo 2250, SE-268 90 Svalöv, Suecia.

³ Forestry and Wood Technology, Linnaeus University, Växjö, Suecia.

Resumen

El microbioma es el conjunto de microorganismos que viven en un entorno determinado. Conocer las consecuencias de la gestión forestal en la diversidad biológica de los bosques es de suma importancia debido a la necesidad de adaptarse al clima y a las crecientes demandas de uso de los bosques. Sin embargo, hay una falta de estudios sobre la composición de los microbiomas en diferentes tipos de bosques y fases de desarrollo. En el presente estudio describimos la diversidad taxonómica de hongos y bacterias en plántulas de pino silvestre. Se muestraron un total de 42 plántulas jóvenes de pino silvestre en 3 localidades en el sur de Suecia en masas en regeneración. Las plántulas mostraron síntomas de alteraciones del crecimiento como ausencia de guía terminal o múltiples brotes. El estudio de las comunidades fúngicas y bacterianas se realizó a través de secuenciación masiva con la plataforma Illumina. El resultado de nuestro estudio encontró un total de 878 taxones (OTUs) de hongos y 573 OTUs de bacterias y diferencias significativas entre las localidades de muestreo y entre los síntomas de las plántulas. La diversidad detectada sugiere que incluso las plantaciones jóvenes tienen un gran valor como hábitat para la diversidad microbiana.

Palabras clave

Microbioma, plántulas, supervivencia, hongos, bacterias, secuenciación masiva.

1. Introducción

La capacidad de los bosques para proporcionar diferentes servicios ecosistémicos está estrechamente relacionada con la biodiversidad que albergan (BROCKERHOFF ET AL. 2017). Debido a la pérdida rápida y global de la biodiversidad (CEBALLOS ET AL. 2015), y debido a la necesidad de adaptarse al clima cambiante y a las crecientes demandas sobre el uso múltiple de los bosques (KEENAN 2015), es de suma importancia comprender las consecuencias de diferentes acciones de manejo forestal para la diversidad biológica en los bosques. Estudios recientes indican que los impactos de la gestión forestal sobre la biodiversidad pueden ser positivos o negativos, según el contexto ecológico y las escalas temporales y espaciales en las que se evalúan (BROCKERHOFF ET AL. 2017). Sin embargo, faltan datos sobre microbiomas en diferentes tipos de bosques, en diferentes fases de desarrollo y bajo diferentes regímenes de gestión. En particular, sabemos poco sobre los microbiomas en plántulas de regeneración y bosques jóvenes (WITZELL ET AL. 2019).

Todos los órganos de las plantas están colonizados por microorganismos cuya composición está determinada por varios factores como la edad de la planta, la especie y su estado de salud. Además, multitud de factores abióticos modulan la diversidad del microbioma asociado a la planta, incluidas las propiedades del suelo, el estado nutricional y las condiciones ambientales y climáticas (BERG ET AL. 2016). La presencia y composición de estos microorganismos influye en funciones importantes de las plantas como su fenotipo, nutrición y resistencia a ciertos patógenos o a estresores abióticos (PARTIDA-MARTÍNEZ 2011, CASTRILLO ET AL. 2017). Es por ello que la aptitud de la planta (considerando el crecimiento y la supervivencia) es la consecuencia de sus características y su

microbiota (VANDENKOORNHUYSE ET AL. 2015). Por lo tanto, los microorganismos juegan un papel crucial en el mantenimiento de las funciones del ecosistema. Como descomponedores, catalizan la transformación de la materia orgánica y mantienen procesos fundamentales como el ciclo del carbono y el nitrógeno en los ecosistemas forestales (MÜLLER ET AL. 2001; BALDRIAN 2017).

El microbioma de una planta está compuesto por endófitos (internos) y epífitos (externos), principalmente bacterias y hongos (CHRISTIAN ET AL. 2015). Si bien la diversidad taxonómica y funcional de los microbios del suelo se ha estudiado activamente (BALDRIAN 2017), se sabe mucho menos sobre las comunidades microbianas de las partes aéreas de los árboles (WITZELL & MARTÍN 2018). Especialmente en plantas perennes (DASTOGEER ET AL. 2020) y especies forestales, la importancia del microbioma en el estrés y la resistencia a plagas puede ser muy importante (WITZELL & MARTÍN 2018). El interés en el microbioma se ve impulsado aún más por el potencial de los microbios como agentes de control biológico para la protección de las plantas (Larran et al, 2016). Un ejemplo exitoso de control biológico basado en hongos es el uso de *Phlebiopsis gigantea*, un hongo saprófita común, para controlar la pudrición de raíces producidas por el hongo *Heterobasidion annosum*. En Escandinavia, donde su uso está muy extendido, su aplicación reduce la colonización de patógenos en las superficies de los tocónes en un 89-99 % en comparación con los tocones no tratados (OLIVA ET AL., 2017). Por lo tanto, el conocimiento sobre la composición de la diversidad del microbioma podría respaldar la silvicultura sostenible en el futuro, cuando se espera que los árboles estén expuestos a un mayor estrés debido al cambio climático y la creciente amenaza de plagas y enfermedades (TRUMBORE ET AL. 2015; LEHMANN ET AL., 2020).

2. Objetivos

El objetivo del proyecto era obtener información sobre las comunidades fúngicas y bacterianas de plántulas jóvenes de pino silvestre en diferentes repoblaciones en el Sur de Suecia. Algunas de las plántulas presentaban diversos síntomas de distorsión y alteraciones del crecimiento, por lo que uno de los objetivos del estudio era conocer si las comunidades fúngicas y/o bacterianas diferían entre plántulas con distintos síntomas. Por último, se quiso estudiar si el factor localidad era determinante en la composición de estas comunidades.

3. Metodología

En noviembre de 2019, se recolectaron los brotes del año en curso ($n=42$) de plántulas de pino silvestre de 3 años de edad, en tres localidades en el sur de Suecia (Fig. 1). Los sitios habían sido regenerados con pino silvestre en 2016 y/o 2017. Las muestras se tomaron cortando los 5 cm superiores del brote terminal. Se observaron algunos síntomas de alteraciones del crecimiento como múltiples guías terminales, muchas yemas y brotes prolépticos, que se han observado recientemente en algunas plantaciones de pino silvestre.

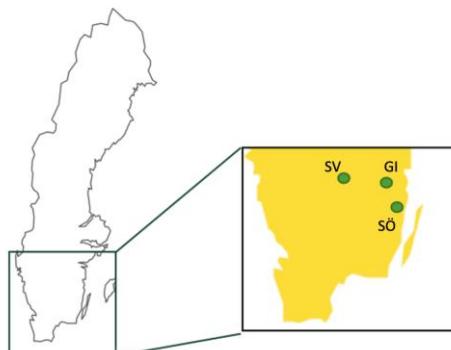


Figura 1. Mapa que muestra los lugares de muestreo del estudio en el Sur de Suecia (SV: Hultsfred; GI: Gissebo y SÖ: Döderhult).

Las muestras se etiquetaron, se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron en hielo hasta el laboratorio, donde se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Las muestras se molieron con nitrógeno líquido hasta convertirlas en un polvo fino. El ADN total se extrajo con Microbiome Soil KIT (DANAGENE, España) y las muestras se enviaron a secuenciar (Biome Makers Inc, EE. UU.) Las regiones ITS (para hongos) y 16S (bacterias) se amplificaron con varios primers personalizados WineSeq® (BECARES Y FERNÁNDEZ, 2017). Las lecturas se generaron utilizando pares de secuencias de 2 × 301 pb (pares de bases) con la plataforma Illumina MiSeq (Illumina Next Generation Sequencing, 2018). Se utilizó una biblioteca bioinformática personalizada (BECARES Y FERNÁNDEZ 2017) con el software QIIME (CAPORASO ET AL., 2010) para eliminar los adaptadores y quimeras. Posteriormente, se ajustó la calidad de las lecturas mediante clusters de Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) y se agruparon con un 97% de identidad. La asignación de la taxonomía y la estimación de la abundancia se obtuvieron mediante la comparación de los grupos de las OTU registradas en las bases de datos taxonómicas UNITE, GenBank y WineSeq® (Patente WO2017096385).

Para el estudio de la diversidad y los análisis estadísticos, se eliminaron las OTU que representaban <0,005 % del conjunto de datos y las OTU que solo aparecían una vez (con menos del 2 % de abundancia) para evitar estimaciones infladas de diversidad como resultado de lecturas erróneas (BOKULICH ET AL., 2013). La diversidad taxonómica de las comunidades (hongos/bacterias) se exploró mediante el análisis de las diferencias en la abundancia relativa de OTUs entre plántulas y fue visualizada mediante un NMDS (non-metric multidimensional scaling) en un gráfico basado en la distancia de Bray-Curtis. Para examinar los posibles cambios en la composición de la comunidad (hongos y bacterias) entre los diferentes sitios de muestreo y los síntomas de las plántulas, se realizó un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) de abundancias relativas con la función *adonis* en paquete *vegan* utilizando 999 permutaciones y la distancia Bray-Curtis. Cuando se encontraron diferencias entre los factores, se realizó una comparación por pares con el paquete *pairwise.adonis* (MARTINEZ 2019).

4. Resultados

Diversidad fúngica-Se encontraron un total de 878 OTUs fúngicas (Figura 2). Los taxones más abundantes fueron *Phaeotheca fissurella*, *Phaeothecoidea spp.*, *Endoconidioma populi*, *Xenomeris juniperi*, *Lophodermium pinastri*, *Lophodermium conigenum*, *Cladosporium herbarum*, *Phacidium sp.*, *Udenomyces pyricola* y *Lewia infectoria*.

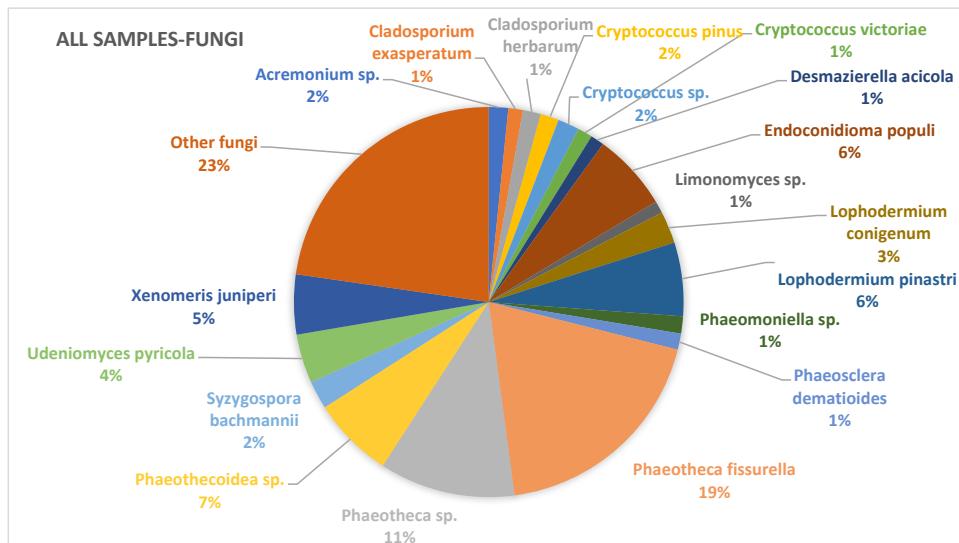


Figura 2. Principales taxones fúngicos observados en las muestras.

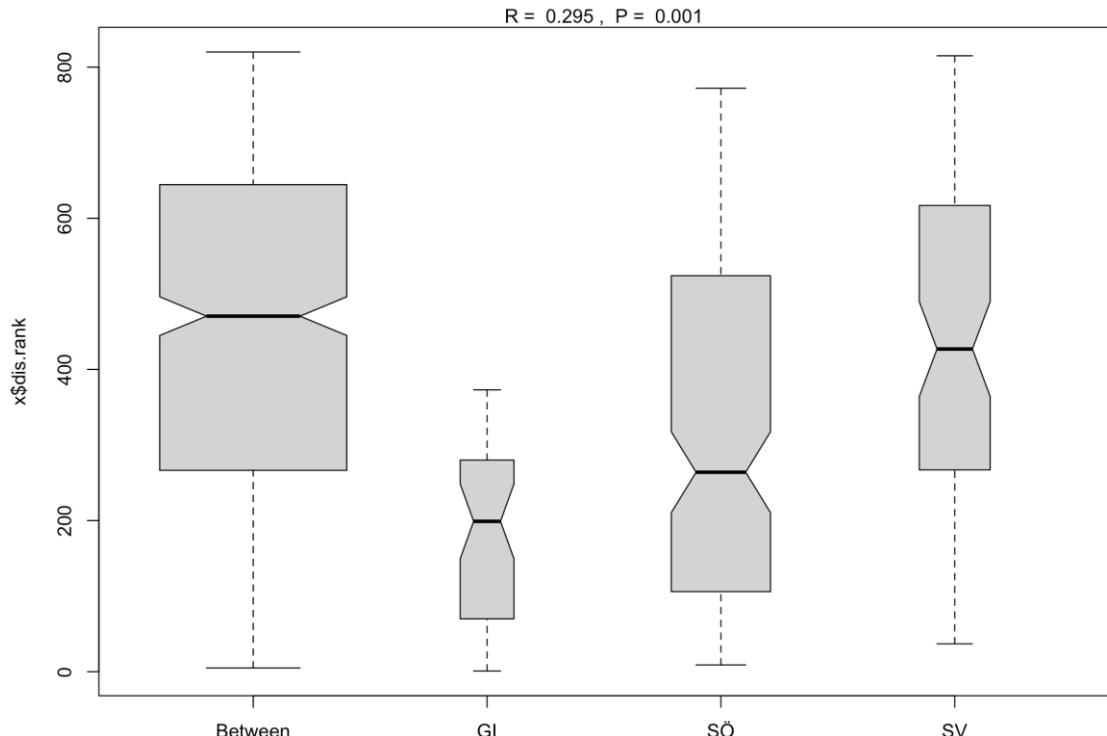


Figura 3. Gráfico de análisis de similitud de comunidades fúngicas entre distintas localizaciones (SV: Hultsfred; GI: Gissebo y SÖ: Döderhult).

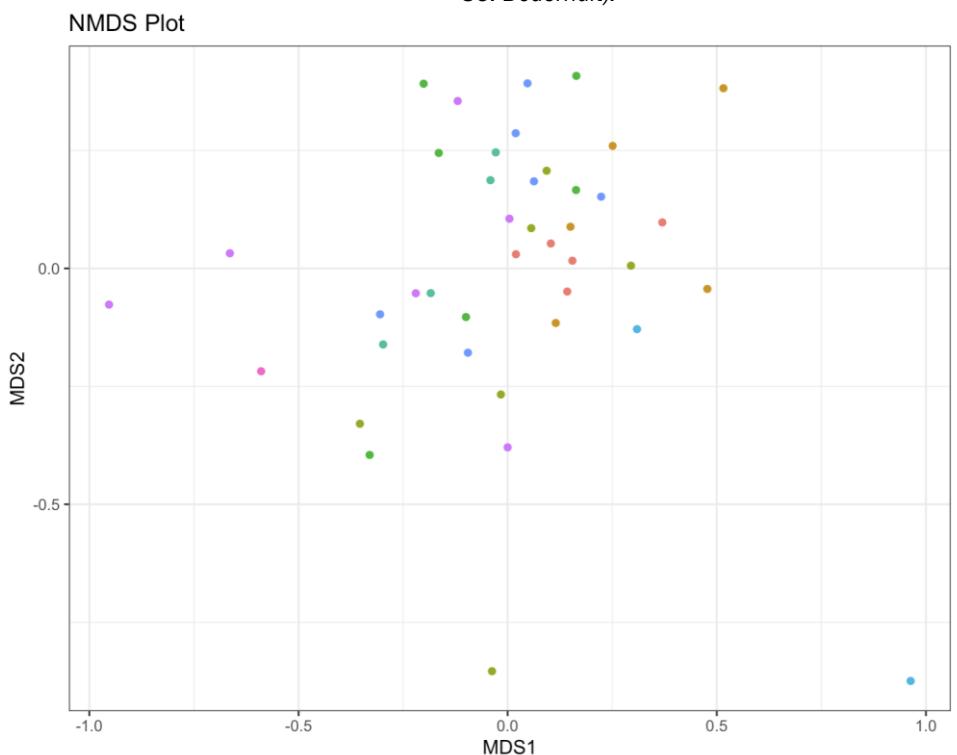


Figura 4. NMDS en el que se ven los diferentes síntomas (BR: buena formación de brotes, DÄ: mala formación de brotes, DT: múltiples guías; KB: sin guía terminal; MK: muchas yemas; NF: regeneración natural; NO: sin síntomas; PR: brotes de verano; SP: herbívoros). Los puntos representan las muestras. Las muestras cuya comunidad fúngica es más similar están más próximas.

La Figura 3 muestra que el factor “localidad” provocó diferencias significativas en la abundancia relativa de comunidades fúngicas (PERMANOVA, $p=0,001$). La comparación por pares mostró diferencias de comunidades fúngicas entre Hultsfred (SV) y Döderhult (SÖ) ($p=0,003$) y entre Hultsfred (SV) y Gissebo (GI) ($p=0,003$). El factor “síntoma” provocó diferencias significativas en la abundancia relativa de comunidades fúngicas (PERMANOVA, $p=0,030$) (Figura 4). La comparación por pares mostró que se encontraron diferencias entre las comunidades fúngicas de plantas con brotes de verano (PR) y mala formación de brotes (DÅ) ($p=0,017$), brotes de verano (PR) y buena formación de brotes (BR) ($p=0,020$) y muchas yemas (MK) y mala formación de brotes (DÅ) ($p=0,033$).

Diversidad bacteriana- Se identificaron un total de 573 OTUs bacterianas (Figura 5). Los taxones más abundantes fueron *Bryocella sp.*, *Buchnera aphidicola*, *Burkholderia andropogonis*, *Burkholderia bryophila*, *Enterobacter sativa*, *Granulicella sp.*, *Hamiltonella defensa*, *Luteibacter rhizovicinus*, *Massilia sp.*, *Metilocella sp.*, *Pantoea sp.*, *Pedobacter sp.*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas graminis*, *Rahnella carotovorum*, *Serratia symbiotica*, *Singulisphaera sp.*, *Sphingomonas dokdonensis*, *Uzinura sp.* y *Uzinura sp.*

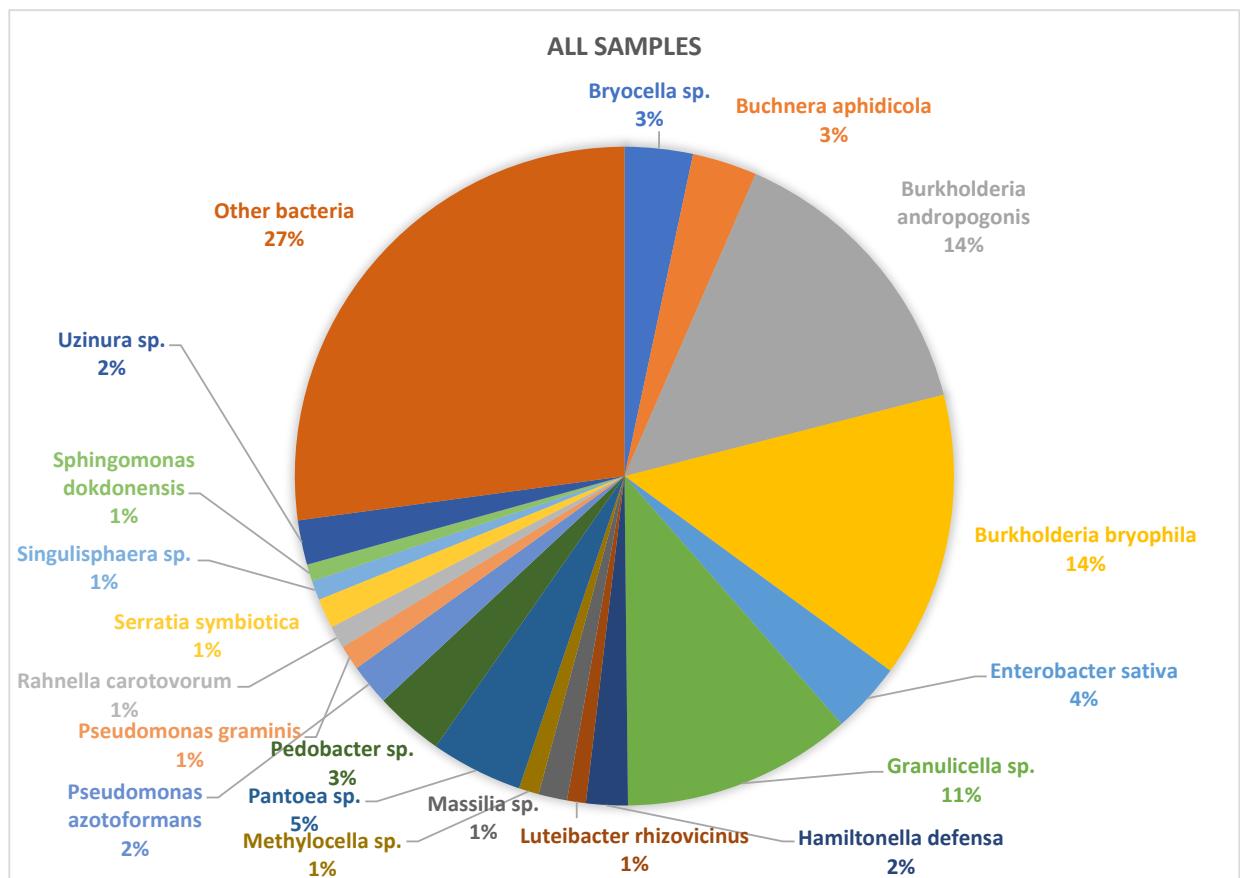


Figura 5. Principales taxones bacterianos observados en las muestras.

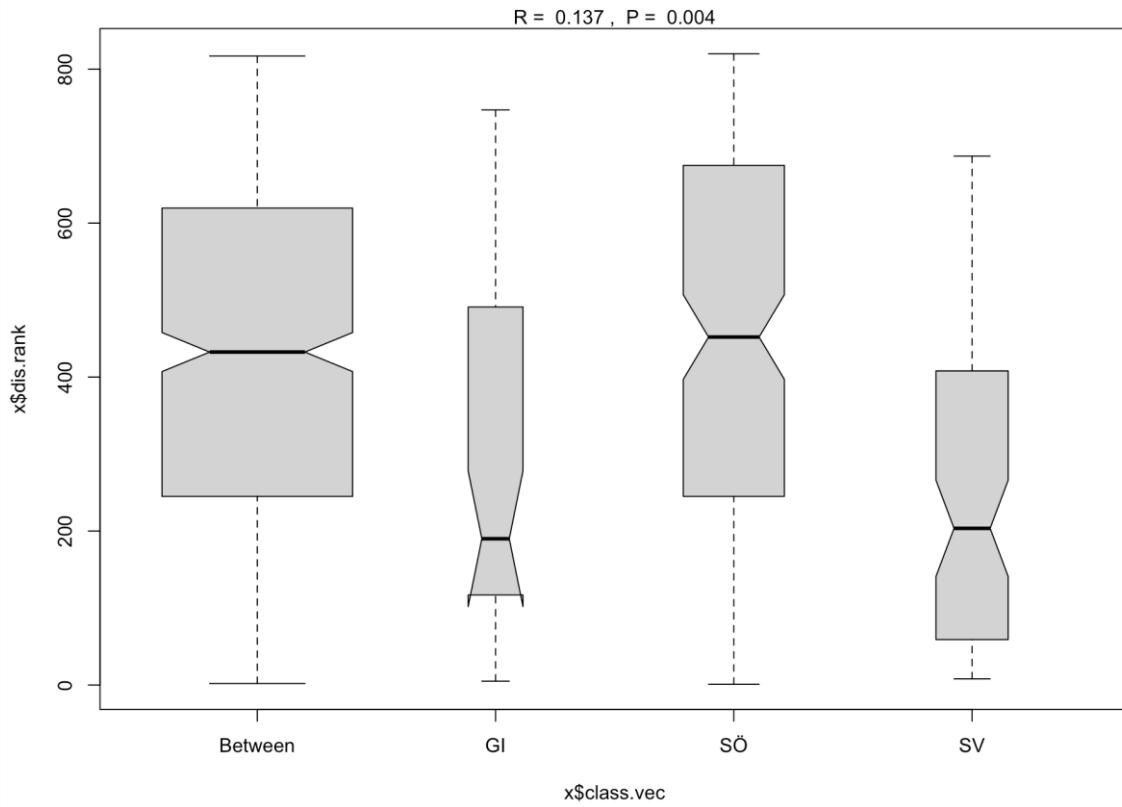


Figura 6. Gráfico de análisis de similitud de comunidades bacterianas entre distintas localizaciones (SV: Hultsfred; GI: Gissebo y SÖ: Döderhult).

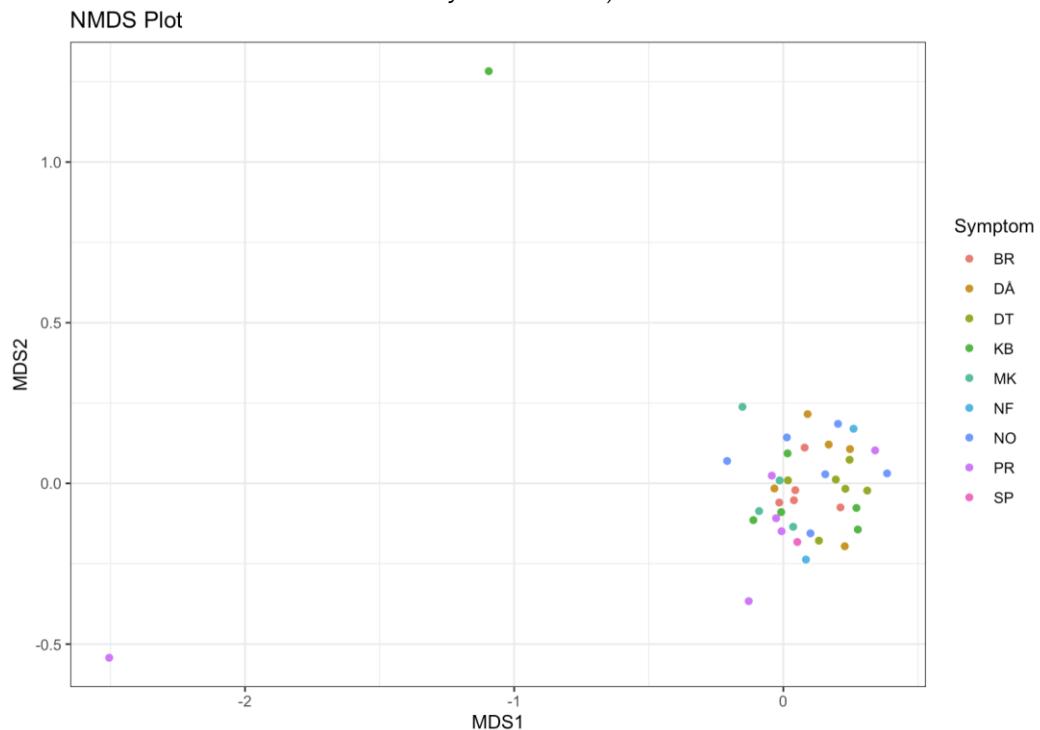


Figura 7. NMDS en el que se ven los diferentes síntomas (BR: buena formación de brotes, DA: mala formación de brotes, DT: múltiples guías; KB: sin guía terminal; MK: muchas yemas; NF: regeneración natural; NO: sin síntomas; PR: brotes de verano; SP: herbívoros). Los puntos representan las muestras. Las muestras cuya comunidad bacteriana es más similar están más próximas.

En el caso de las comunidades bacterianas, el factor “localidad” también provocó diferencias significativas en la abundancia relativa de comunidades fúngicas ($p=0,004$). La comparación por pares mostró diferencias de comunidades fúngicas entre Hultsfred (SV) y Döderhult (SÖ) ($p=0,001$) y entre SV Hultsfred (SV) y Gissebo (GI) ($p=0,003$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la abundancia relativa de comunidades bacterianas ($p=0,081$) entre muestras con distintos síntomas.

5. Discusión

El número de taxones fúngicos/bacterianos mostró una rica diversidad microbiana en unas pocas muestras. La localidad fue el factor que explicó la mayoría de las diferencias tanto de los taxones fúngicos como bacterianos. La colonización de las plantas por microorganismos no es aleatoria; es un proceso dirigido que se destaca por la existencia de patrones de co-ocurrencia específicos y redes microbianas (CARDINALE ET AL., 2015). La complejidad del microbioma y las reglas de su ensamblaje comunitario aún no se comprenden completamente. En nuestro estudio, las muestras pertenecientes a distintas localidades presentaron un microbioma diferente, tanto fúngico como bacteriano, lo que podría estar explicado por el inóculo ambiental, ya que se sabe que la localidad es uno de los factores ambientales que explican la distribución geográfica de los microorganismos (THIEGART ET AL. 2020).

En nuestro estudio, se encontraron diferencias en los taxones fúngicos pero no en los bacterianos entre diferentes síntomas. Se ha sugerido que la planta puede modular su microbiota para adaptarse dinámicamente a su entorno. Para comprender mejor el nivel de dependencia de las plantas de los componentes microbióticos, es necesario determinar la microbiota a diferentes escalas y la dinámica temporal, ya que se ha descubierto que la autorregulación intraespecífica es mucho más importante que la adaptación ambiental (VANDENKOORNHUYSE ET AL. 2015). Es probable que la dinámica del microbioma asociado al huésped haya evolucionado conjuntamente para mantener la funcionalidad y el estado físico del huésped (BJÖRK ET AL. 2017) lo que podría explicar la presencia de comunidades fúngicas diferentes en nuestras plantas.

En resumen, la diversidad microbiana detectada en plántulas de pino silvestre fue notable y sugiere que incluso las plantaciones jóvenes tienen un valor considerable como hábitat para la diversidad microbiana. Los resultados establecen una línea de base para los microbiomas de plántulas de pino en los bosques jóvenes, sirviendo así como punto de referencia para evaluar las diferentes medidas de gestión y regeneración y los impactos ambientales en la sucesión de comunidades microbianas (dinámica temporal y posibles efectos prioritarios). Además, será útil en estudios futuros que exploren la posible conexión de ensamblajes microbianos, genotipos y resistencia fenotípica a los impactos dinámicos de estrés abiótico y biótico de diferentes prácticas silvícolas. En el futuro, se recomiendan más análisis para determinar si los síntomas observados fueron producidos por la presencia de ciertos hongos o bacterias.

6. Conclusiones

El número de taxones fúngicos y bacterianos mostró una rica diversidad de microorganismos en plántulas jóvenes de pino silvestre en masas de regeneración. En nuestro estudio, la localización fue el factor que explicó la mayoría de las diferencias tanto de los taxones fúngicos como bacterianos, probablemente debido al diferente inóculo ambiental. Se encontraron diferencias en los taxones fúngicos (pero no en los bacterianos) entre diferentes síntomas, aunque no todos los síntomas se correlacionaron con una comunidad específica. Se requieren más análisis para determinar si los síntomas observados fueron producidos por la presencia de ciertos microorganismos.

7. Agradecimientos

El estudio ha sido financiado por el Instituto Forestal Sueco (Skogforsk). CR recibe un proyecto MSCA-IF del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la UE (nº 845419), y JW un proyecto del Consejo Sueco de Investigación Formas (nº 2016-00907).

8. Bibliografía

BALDRIAN, P. (2017) Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 41, Issue 2, 109-130.

BECARES, A., FERNANDEZ, A., 2017. Microbiome based identification, monitoring and enhancement of fermentation processes and products. WO 2017/096385A1. <https://patents.google.com/patent/US20180363031A1/en>.

BERG, G., RYBAKOVA, D., FISCHER, D., CERNAVA, T., VERG`ES, M.C.C., CHARLES, T., CHEN, X., COCOLIN, L., EVERSOLE, K., CORRAL, G.H., KAZOU, M., KINKEL, L., LANGE, L., LIMA, N., LOY, A., MACKLIN, J.A., MAGUIN, E., MAUCHLINE, T., MCCLURE, R., MITTER, B., RYAN, M., SARAND, I., SMIDT, H., SCHELKLE, B., ROUME, H., KIRAN, G.S., SELVIN, J., DE SOUZA, R.S.C., VAN OVERBEEK, L., SINGH, B.K., WAGNER, M., WALSH, A., SESSITSCH, A., SCHLOTER, M., 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 1–22.

BOKULICH, N.A., MILLS, D.A., 2013. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2519–2526.

BROCKERHOFF, E.G., BARBARO, L., CASTAGNEYROL, B. et al. (2017). Forest biodiversity, ecosystem functioning and the provision of ecosystem services. *Biodivers Conserv* 26, 3005–3035.

CAPORASO, J.G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F.D., COSTELLO, E.K., FIERER, N., PEN`A, A.G., GOODRICH, J.K., GORDON, J.I., HUTTLEY, G.A., KELLEY, S.T., KNIGHTS, D., KOENIG, J.E., LEY, R.E., LOZUPONE, C.A., MCDONALD, D., MUEGGE, B.D., PIRRUNG, M., REEDER, J., SEVINSKY, J.R., TURNBAUGH, P.J., WALTERS, W.A., WIDMANN, J., YATSUNENKO, T., ZANEVELD, J., KNIGHT, R., (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.

CARDINALE, M., GRUBE, M., ERLACHER, A., QUEHENBERGER, J., BERG, G., (2015). Bacterial networks and co-occurrence relationships in the lettuce root microbiota. *Environ. Microbiol.* 17, 239–252.

CASTRILLO, G., TEIXEIRA, P.J.P.L., PAREDES, S.H., LAW, T.F., DE LORENZO, L., FELTCHER, M.E., FINKEL, O.M., BREAKFIELD, N.W., MIECZKOWSKI, P., JONES, C.D., PAZ-ARES, J., DANGL, J. L., (2017). Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature* 543, 513–518.

CEBALLOS, G., EHRLICH, P.R., BARNOSKY, A.D., GARCÍA, A., PRINGLE, R. M., PALMER, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 1, e1400253.

KEENAN, R.J. Climate change impacts and adaptation in forest management: a review. *Annals of Forest Science* 72, 145–167 (2015).

MÜLLER MM, VALJAKKA R, SUOKKO A, HANTULA J. (2001). Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Mol Ecol* 10(7): 1801-1810.

PARTIDA-MARTINEZ, L.P., HEIL, M., 2011. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front. Plant Sci.* 2, 100.

SANCHEZ-CANIZARES, C., JORRÍN, B., POOLE, P.S., TKACZ, A., 2017. Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 188–196.

THIERGART, T., DURÁN, P., ELLIS, T. ET AL. (2020). Root microbiota assembly and adaptive differentiation among European *Arabidopsis* populations. *Nat Ecol Evol* 4, 122–131.

VANDENKOORNHUYSE, P., QUAISER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A., DUFRESNE, A., (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 206, 1196–1206.

WITZELL J, BERGSTRÖM D, BERGSTEN U (2019) Variable corridor thinning - a cost-effective key to provision of multiple ecosystem services from young boreal conifer forests? *Scand J For Res* 34:6, 497-507.

WITZELL J, MARTÍN JA (2018). Endophytes and forest health. In: A. M. Pirtilä and A. C. Frank (eds.), *Endophytes of Forest Trees*, Forestry Sciences 86, Springer International Publishing AG, Springer Nature, pp 261-282.