



*Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias*



---

**LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO  
ANTE LA DIVERSIFICACIÓN DE UN  
AGROECOSISTEMA DE LA PAMPA HUMEDA**

**Diego Nicolás Chavarría**

Tesis

Para optar al Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias

*Córdoba, 2018*

**LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO ANTE LA  
DIVERSIFICACIÓN DE UN AGROECOSISTEMA DE LA PAMPA  
HUMEDA**

**Diego Nicolás Chavarría**

**COMISIÓN ASESORA DE TESIS**

**Director:** Dra. Silvina Vargas Gil

**Asesores:** Dr. José Manuel Meriles (Codirector)  
Dr. Juan Alberto Argüello

**TRIBUNAL EXAMINADOR DE TESIS**

Dr. Enrique Lucini  
Dra. Natalia Oro Castro  
Dr. Juan Alberto Argüello

**PRESENTACIÓN FORMAL ACADÉMICA**

**31 de mayo de 2018, Córdoba Capital**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por motivarme continuamente a seguir mis metas y por su incondicional ayuda y compañía durante esta etapa de mi carrera.

A mi directora, Dra. Silvina Vargas Gil, por su absoluta dedicación y apoyo, sus enseñanzas, sus consejos y su excelente disposición. Por escucharme y comprenderme, con paciencia y palabras de aliento que me incentivaron durante la elaboración de esta tesis.

A mi codirector, Dr. José Meriles, por brindarme sus conocimientos y acompañarme en cada paso de este camino. Por poder contar con su experiencia y sabiduría en los momentos más difíciles de este proceso.

Agradezco a mi Asesor de Tesis, Dr. Juan Argüello, por compartir sus ideas y sugerencias que contribuyeron ampliamente con la escritura de esta tesis.

A la Ing. Agr. Silvina Restovich por su colaboración y apoyo con todas las actividades de campo.

A las Ing. Agr. Mercedes Scandiani y Lucrecia Cuoretout por brindar tan abiertamente sus conocimientos en fitopatología que me ayudaron e inspiraron.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones Agropecuarias, quienes me acompañaron durante toda esta etapa, por su excelente calidad humana y por brindarme su amistad.

A todos aquellos quienes de una u otra forma colaboraron y brindaron su apoyo para la elaboración de esta tesis.

## RESUMEN

El proceso de intensificación agrícola de la pampa húmeda, ocurrido en las últimas décadas, se ha caracterizado por un creciente predominio de soja en monocultivo. El efecto de este manejo por más de tres décadas derivó en la pérdida de la fertilidad de los suelos. Sumado a esto, la pobre ejecución de rotaciones afectó los procesos biológicos edáficos e impactó negativamente en los costos económicos y ambientales de los sistemas agrícolas. La productividad de estos sistemas se encuentra fuertemente ligada a las actividades metabólicas de las diferentes comunidades microbianas que habitan en el suelo. Sus interacciones son responsables de la regulación de fenómenos ambientales clave. Por lo tanto, la información referida a las comunidades microbianas, sus actividades y participación en los procesos que determinan el funcionamiento del suelo, puede proporcionar datos necesarios para estudiar el impacto de técnicas agrícolas alternativas como la inclusión de cultivos de cobertura (CC). En este sentido, poco se conoce sobre los efectos de la diversificación agrícola mediante CC sobre la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas edáficas. El objetivo de esta tesis fue cuantificar el efecto la diversidad microbiana del suelo en respuesta a la inclusión de cultivos de cobertura (vicia, avena y nabo forrajero sembrados en combinaciones distintas) y sus interacciones con variables químicas y físicas, y con la sanidad del cultivo de soja, en la intensificación sustentable de sistemas productivos de la pampa húmeda. Se tomaron muestras de suelo a 10 cm de profundidad durante los años 2013, 2014 y 2015 de un ensayo de CC ubicado en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Se estudiaron distintos parámetros biológicos, químicos y físicos, junto a la incidencia del síndrome de muerte súbita en soja y el rendimiento del cultivo. Se observó una modificación en la estructura de las comunidades microbiana de suelo ante la diversificación del sistema agrícola, caracterizada por un aumento de biomarcadores, particularmente de bacterias Gram-negativas. El incremento en la diversidad microbiana estuvo además, asociado a una mayor actividad enzimática edáfica y una mayor eficiencia en el uso de fuentes carbonadas. Las parcelas bajo CC presentaron una mejora de la mayoría de los parámetros microbiológicos, químicos y físicos, sin afectar negativamente el rendimiento del cultivo de soja. En este sentido, una consociación de CC que incluya avena-nabo forrajero-vicia es altamente recomendable no solo para mejorar los procesos microbiológicos, sino también para proveer N adicional al cultivo. Los resultados indican que la inclusión de CC es una herramienta útil para mejorar la fertilidad del suelo y contribuir a la sustentabilidad de los sistemas agrícolas de la región pampeana.

**Palabras clave:** Microbiología, diversidad estructural, funcionalidad de suelo, sustentabilidad, síndrome de muerte súbita en soja.

## ABSTRACT

The process of agricultural intensification of the humid pampas, occurred in the last decades, has been characterized by an increasing predominance of soybean monoculture. The prevalence of monoculture for more than three decades resulted in the loss of soil fertility. In addition, a poor execution of rotations affected soil biological processes and had a negative impact on the economic and environmental costs of agricultural systems. System productivity is strongly linked to the metabolic activities of different microbial communities inhabiting the soil, since microbial interactions are responsible for the regulation of key environmental phenomena. Therefore, information on microbial communities, their functioning and participation in processes that determine soil functioning, can provide necessary data to study the impact of alternative agricultural techniques such as the inclusion of cover crops (CC). In this sense, little is known about the effects of agricultural diversification through CC on the structure and functionality of edaphic microbial communities. The objective of this thesis was to quantify the effect of soil microbial diversity in response to the inclusion of cover crops (vetch, oats and radish, sown as different mixtures of species) and their interactions with chemical and physical variables, and crop health of soybean, in the sustainable intensification of productive systems of the humid pampas. Soil samples were taken at 10 cm depth during 2013, 2014 and 2015 in a CC field trial located at the Experimental Agricultural Station INTA Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Different biological, chemical and physical parameters were studied, together with the incidence of sudden death syndrome of soybean and crop yield. An alteration in soil microbial structure was observed in plots under CC management, being this effect characterized by an increase of bacterial biomarkers, particularly Gram-negative bacteria. The increase in microbial diversity was also associated to a higher edaphic enzymatic activity and greater efficiency in the use of carbon sources. The CC plots presented an improvement of most of the microbiological, chemical and physical parameters, without negatively affecting soybean crop yield. In this sense, a CC consociation that includes vetch-oats-radish is highly recommended not only to improve the microbiological processes, but also to provide additional N to the cash crop. The results indicate that the inclusion of CC is a useful tool to improve soil fertility and contribute to the sustainability of agricultural systems in the Pampas region.

**Key words:** Microbiology, structural diversity, soil functionality, sustainability, soybean sudden death syndrome.

# TABLA DE CONTENIDO

## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Situación agrícola actual de la región pampeana .....	2
1.2. Inclusión de cultivos de cobertura como alternativa de diversificación .....	3
1.3. Importancia de los microorganismos en el funcionamiento del suelo .....	6
1.4. Estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas .....	8
1.5. La diversidad microbiana como herramienta de manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo .....	10
HIPÓTESIS .....	13
OBJETIVOS GENERALES .....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13

## CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de estudio .....	16
2.2. Diseño experimental .....	17
2.3. Muestreo de suelos .....	19
2.4. Análisis de muestras de suelo .....	21
2.4.1. Evaluar la respuesta de la diversidad microbiana del suelo (estructura y funciones de las comunidades de microorganismos) en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura, sembrados independientes o en consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo .....	21
Evaluación de la estructura de las comunidades de microorganismos mediante el análisis de la perfiles de fosfolípidos .....	21
Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados .....	23
Respiración microbiana .....	24
Actividades enzimáticas .....	25
Carbono de la biomasa microbiana .....	27
Proteínas de suelo relacionadas con Glomalina .....	28

2.4.2. Analizar la respuesta de parámetros químicos y físicos del suelo en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura, sembrados independientes o en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo .....	29
Determinación de parámetros químicos .....	29
C orgánico de suelo (COS) .....	29
Nitrógeno total (NT).....	29
Fosforo extraíble (Pe).....	30
pH de suelo .....	30
Determinación de Parámetros físicos .....	31
Densidad aparente (Dap) .....	31
Estabilidad estructural (EE).....	31
2.4.3. Establecer interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema, en correlación con la productividad de los cultivos principales (soja y maíz) .....	31
Rendimiento del grano de soja.....	31
2.4.4. Relacionar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo. ....	32
Síndrome de muerte súbita (SMS) en soja .....	32
2.4.5. Análisis estadístico .....	35

### **CAPITULO 3. RESULTADOS**

1- Evaluar la respuesta de la diversidad microbiana del suelo (estructura y funciones de las comunidades de microorganismos) en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.....	37
Evaluación de la estructura de las comunidades de microorganismos mediante el análisis de la perfiles de fosfolípidos (PLFA).....	37

Evaluación de las funciones de las comunidades de microorganismos mediante el análisis de: Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados .....	39
Actividades enzimáticas .....	41
Respiración microbiana .....	43
Carbono de la biomasa microbiana (CBM) .....	44
Proteínas de suelo relacionadas con glomalina.....	45
2- Analizar la respuesta de parámetros químicos y físicos del suelo en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo. ....	46
Determinación de parámetros químicos .....	46
Carbono orgánico de suelo (COS) .....	46
Nitrógenototal (NT) y Fósforo extraíble (Pe) .....	46
Relación C:N y pH .....	47
Determinación de parámetros físicos .....	48
3- Establecer interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema, en correlación con la productividad de los cultivos principales (soja y maíz) .....	49
Rendimiento de grano de soja.....	49
Relación entre funcionalidad microbiana y parámetros químicos y físicos edáficos .....	50
Relación entre estructura y funcionalidad microbiana .....	51
Cociente metabólico y cociente microbiano .....	54
Correlación pH y taxones microbianos .....	54
Configuración de consenso entre grupos de variables .....	56
4- Relacionar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo. ....	58
Incidencia del Síndrome de Muerte Súbita (SMS) en soja.....	58
Relación entre variables microbianas y el síndrome de muerte súbita (SMS) en soja.....	59

## **CAPITULO 4. DISCUSIÓN**

1- Evaluar la respuesta de la diversidad microbiana del suelo (estructura y funciones de las comunidades de microorganismos) en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.....	62
Estructura y biomasa microbiana edáfica .....	62
Diversidad catabólica ante la inclusión de CC .....	64
Respiración microbiana y actividad enzimática.....	65
Relaciones entre funcionalidad y estructura microbiana.....	67
2 y 3- Analizar la respuesta de parámetros químicos y físicos del suelo en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura y establecer interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema, en correlación con la productividad de los cultivos principales (soja y maíz).....	69
Cociente metabólico y cociente microbiano.....	69
Contenido de proteínas de suelo relacionadas a Glomalina .....	70
Relación entre variables químicas y variables microbiológicas .....	71
Relación entre variables físicas y variables microbiológicas .....	74
Rendimiento de grano de soja ante la inclusión de CC.....	77
Interacción entre grupos de parámetros.....	78
4- Relacionar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo. ....	80
Efecto de los cultivos de cobertura sobre el SMS en soja.....	80

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES**..... 83

## **CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA**..... 86

## LISTA DE TABLAS Y CUADROS

<b>Tabla 1.</b> Grupos de biomarcadores de ácidos grasos.....	22
<b>Tabla 2.</b> Representación de la distribución de fuentes carbonadas en una microplaca correspondiente a una parcela del ensayo .....	24
<b>Tabla 3.</b> Perfiles fosfolipídicos de suelo (nmol PLFA g <sup>-1</sup> ) en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0,05). .....	38
<b>Tabla 4.</b> Hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) Actividad deshidrogenasa (DHA; g INTF g <sup>-1</sup> ) y Actividad fosfatasa ácida (FA) en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0,05).....	42
<b>Tabla 5.</b> Carbono orgánico de suelo (COS), Nitrógeno Total (NT), Fósforo extraíble (Pe), pH, en pre-cosecha del cultivo comercial bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (avena/nabo forrajero), y Testigo (T); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0.05).....	47
<b>Tabla 6.</b> Relación C:N y pH cuantificados en pre-cosecha del cultivo comercial bajo diferentes consociaciones de CC, CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (Avena/nabo forrajero), y Testigo (T); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0.05).....	48
<b>Tabla 7.</b> Rendimiento del grano de soja y producción de materia seca de los cultivos de cobertura (CC) cuantificado durante 2013/14/15; CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (avena/nabo forrajero) y Testigo (T);.....	50
<b>Tabla 8.</b> Análisis de correlación entre variables microbiológicas, químicas y físicas estudiadas en pre-cosecha, durante los años 2013/14/15 .....	52
<b>Tabla 9.</b> Análisis de correlación entre pH y biomarcadores de taxones microbianos cuantificados en pre-cosecha, durante los años 2013/14/15 .....	55
<b>Tabla 10.</b> Análisis de correlación entre el C de la biomasa microbiana (CBM) y tres actividades enzimáticas medidas durante los años 2013/14/15 .....	55
<b>Tabla 11.</b> Análisis de correlación entre incidencia del síndrome de muerte súbita (SMS) en soja cuantificado en el estadio fenológico R5 en la campaña 2013-2014 y los taxones microbianos cuantificados en pre-cosecha .....	59

## INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Subdivisión de la Región Pampeana. [A. Pampa Ondulada; B. Pampa Interior (B1. Plana, B2. Occidental); C. Pampa Austral; D. Pampa Inundable; E. Pampa Mesopotámica]. Límites regional (- . - .), subregional (. . . .) e interprovincial (- - -). Precipitaciones medias anuales (-.-). Localidades (•): Ang, Anguil; BA, Buenos Aires; Bal, Balcarce; BB, Bahía Blanca; N, Necochea; Per, Pergamino [Sitio de estudio]; Raf, Rafaela; R, Rosario. Fuente: Hall *et al.* (1992). ..... 17
- Fig. 2.** Esquema representativo de ensayo de cultivos de cobertura (CC). Bloque (B) avena/nabo forrajero/vicia (CC2), avena/nabo forrajero (CC1) y Testigo (T). ..... 18
- Fig. 3.** Muestreo de suelos y evaluación de enfermedades en la Estación Experimental INTA Pergamino. Campañas 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015. A y B) Ensayo de cultivo de coberturas durante el periodo invernal C) Muestras de suelo dispuestas en bolsas plásticas listas para su refrigeración D) Evaluación de incidencia del Síndrome de muerte súbita en soja. .... 20
- Fig. 4.** Escala diagramática de severidad en grados para el síndrome de muerte súbita en soja. Fuente: Lenzi *et al.* (2010). ..... 34
- Fig. 5.** Análisis de componentes principales (A) y análisis de conglomerados (B) de los perfiles de fosfolípidos de suelo cuantificados en los años 2013,2014 y 2015. Las barras de error indican la desviación estándar. Abreviaciones: HMA, Hongos Micorrízicos Arbusculares; Actino, Actinobacterias..... 38
- Fig. 6.** Biplot de la diversidad de consumo de fuentes carbonadas cuantificado en 2013/14/15 en pre-cosecha del cultivo comercial (A) y en secado de cultivos de cobertura (B), bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T). ..... 40
- Fig. 7.** Promedio de desarrollo de color de celda (AWCD) cuantificado en 2013/14/15 en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente color y letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 40
- Fig. 8.** Efecto de la interacción cobertura\*secuencia para la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) en secado de los cultivos de cobertura (CC) (A) y de la actividad deshidrogenasa (ADH) en pre-cosecha de cultivos comerciales (B) cuantificada en los años 2013/14/15, bajo diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente color y letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 42
- Fig. 9.** Efecto de la interacción cobertura\*secuencia para respiración microbiana en pre-cosecha de cultivos comerciales y en secado de los cultivos de cobertura (CC) cuantificada en los años 2013/14/15, en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de CC, CC1 (Avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo

forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente color y letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 43

**Fig. 10.** Carbono de la biomasa microbiana (CBM) cuantificado en 2013/14/15 en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (Avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente color y letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 44

**Fig. 11.** Efecto de la interacción cobertura\*secuencia para el contenido de proteínas de suelo relacionadas con glomalina (PSRG) en pre-cosecha de cultivos comerciales y en secado de los cultivos de cobertura (CC) medida en los años 2013/14/15, en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente color y letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 45

**Fig. 12.** Efecto de la inclusión de cultivos de cobertura (CC) (A) y de la secuencia soja/maíz y soja/soja (B) sobre la estabilidad estructural (EE) en pre-cosecha de cultivos comerciales cuantificada en los años 2013/14/15, bajo diferentes consociaciones de CC, CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (Avena/nabo forrajero), y Testigo (T); Barras de letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 48

**Fig. 13.** Rendimiento ( $\text{Kg ha}^{-1}$ ) del grano de soja en parcelas bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (avena/nabo forrajero) y Testigo (T); Barras de diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 49

**Fig. 14.** Análisis de componentes principales (CP) (A) y análisis de conglomerados (B) correspondientes a variables de funcionalidad microbiana, variables químicas y variables físicas, cuantificadas en 2013/14/15 en parcelas bajo rotación soja/maíz y monocultivo de soja (soja/soja) con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T). Siglas: Fluoresceína de diacetato (FDA), actividad deshidrogenasa (ADH), proteínas de suelo relacionadas con glomalina (PSRG), Nitrógeno total (NT), Fosforo extraíble (Pe), Carbono orgánico de suelo (COS), estabilidad estructural (EE), densidad aparente (Dap). ..... 51

**Fig. 15.** Regresiones lineales entre C orgánico de suelo (COS) y respiración microbiana (A), hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) (B) y actividad deshidrogenasa (ADH) (C), medida en los años 2013/14/15 en pre-cosecha. ..... 52

**Fig. 16.** Relaciones entre actividades enzimáticas de suelo y PLFA bacteriano (A) y PLFA fúngico (B), medidas en 2013/14/15 en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (Avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). ..... 53

<b>Fig. 17.</b> Cociente metabólico ( $qCO_2$ ) (A) y cociente microbiano (CBM/COS) (B) cuantificados en pre-cosecha en los años 2013/14/15 en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). .....	54
<b>Fig. 18.</b> Análisis de Procrustes generalizados entre variables de funcionalidad microbiana y taxones microbianos (A), variables químicas (B) y variables físicas (C), medidas en los años 2013/14/15 en pre-cosecha en parcelas bajo rotación soja/maíz (S/M) y parcelas bajo monocultivo de soja (S/S) con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T). .....	57
<b>Fig. 19.</b> Efecto de la interacción cobertura*secuencia para la incidencia del síndrome de muerte súbita en soja y la detección de síntomas grado 3 en el estadio R5 cuantificada en la campaña 2014/15, en parcelas bajo rotación soja/maíz y monocultivo de soja (soja/soja) con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de diferente color y letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ). .....	58
<b>Fig. 20.</b> Síntomas de clorosis internerval, típicos del síndrome de muerte súbita de la soja. Fotografías tomadas en parcelas del ensayo. ....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACP	análisis de componentes principales
ADH	actividad deshidrogenasa
APG	análisis de Procrustes generalizados
AWCD	desarrollo de color de la celda
BSA	albúmina de suero bovino
°C	grado centígrado
CBM	carbono de la biomasa microbiana
CC	cultivos de cobertura
CC1	avena-nabo forrajero
CC2	vicia-avena-nabo forrajero
CLPP	perfiles fisiológicos a nivel de comunidad
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
COS	carbono orgánico de suelo
Dap	densidad aparente
EE	estabilidad estructural
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	hidrólisis de diacetato de fluoresceína
g	gramos
gr/l	gramo por litro
ha	hectárea
HMA	hongos micorrízicos arbusculares
hs	horas
IMBIV	Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

INT 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio

INTF iodo-nitrotetrazolio formazan

mg miligramo

min minutos

mL mililitro

NT nitrógeno total

PCR reacción en cadena de la DNA polimerasa

Pe fosforo extraíble

PLFA perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos del suelo

ppm partes por millón

PSRG proteínas de suelo relacionadas con la glomalina

$qCO_2$  cociente metabólico

rpm revoluciones por minuto

SAGPyA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación

SMS síndrome de muerte súbita

T testigo

Tn tonelada

Vol volumen

$\mu$ g microgramos

*“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

# **-CAPITULO 1-**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## ***1.1. Situación agrícola actual de la región pampeana***

La región pampeana de Argentina es una de las áreas con mayor capacidad para la generación de alimentos del mundo, debido a sus climas templados, adecuado régimen de precipitaciones y suelos de alto potencial agrícola (Martínez *et al.*, 2013; Barbieri *et al.*, 2015). Nuestro país contribuye actualmente con el 20% de la producción de soja (*Glycine max* L. Merr.) a nivel mundial, y aporta además el 2% de la producción global de maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.), siendo estos tres cultivos sembrados principalmente en la llanura pampeana (<http://www.fao.org>). A partir de la década de los '90 se registró un importante incremento del cultivo de cereales y oleaginosas en esta región y el área agrícola se expandió de 20 a 35 millones de hectáreas cultivadas desde ese entonces. Particularmente, el área sembrada con soja cubre actualmente más de 20 millones de hectáreas, representando aproximadamente el 60% del total del área sembrada del país (SAGPyA, 2015). Esta gran expansión del cultivo de soja fue incentivada en gran medida por la adopción de nuevas tecnologías como la siembra directa y el uso de agroquímicos y de nuevas variedades de cultivos transgénicos (Satorre, 2012). Este proceso de "agriculturización" ha generado una simplificación de los sistemas productivos actuales de la región pampeana, caracterizados por una deficiente planificación de rotaciones y preponderancia del monocultivo de soja (Botta *et al.*, 2013). El incremento de estos sistemas simplificados originó un serio deterioro de las propiedades biológicas, químicas y físicas de los suelos de la región (Martínez *et al.*, 2013). Estos sistemas presentan poca cobertura, baja estabilidad estructural, tendencia a la compactación y a una reducida infiltración (Sasal *et al.*, 2006), pérdidas de fertilidad y, disminución del rendimiento de soja (Li *et al.*, 2010). Estudios recientes mostraron que por lo general hay tres causas principales que originan dichos problemas relacionados con este tipo de sistemas agrícolas: el desequilibrio de los nutrientes del suelo, la auto-toxicidad de los exudados de las raíces y los cambios en la comunidad microbiana (Wu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Con respecto a esta última, la pérdida de biodiversidad en los agroecosistemas de la pampa húmeda ha generado preocupación acerca de las posibles consecuencias en la funcionalidad y en los servicios ecosistémicos de los suelos de la región (Sala *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta la importancia económica de la producción agrícola para nuestro país, y más aún con la ampliación de la frontera agrícola, el diseño de sistemas productivos sostenibles basados en técnicas de cultivo alternativas es una necesidad urgente (Klein *et al.*, 2012). En este escenario, surge la necesidad de preservar la salud de los suelos para sostener la productividad de los sistemas agrícolas a través de su diversificación y el empleo de prácticas culturales apropiadas.

## ***1.2. Inclusión de cultivos de cobertura como alternativa de diversificación***

Una alternativa promisorio para la producción sustentable de los sistemas agrícolas de la región pampeana, es la diversificación de especies mediante la inclusión de cultivos de cobertura (CC). Los CC son especies vegetales de ciclo invernal que se incorporan a la rotación entre dos cultivos de verano y no son pastoreados, cortados, ni incorporados al suelo, quedando los residuos en superficie luego de interrumpir su crecimiento mediante la aplicación de un herbicida (secado). Se diferencian de una pastura o de un verdeo invernal porque no son de renta directa y se desarrollan dentro de un sistema de siembra de cultivos anuales, entre el periodo de cosecha y siembra de los cultivos de verano. La biomasa producida, luego de la suspensión del crecimiento con herbicidas, queda sobre la superficie brindando protección al suelo, impactando directamente sobre variables relacionadas a los procesos de pérdida del suelo. Durante el período de crecimiento de los CC, su sistema radical interactúa con procesos del suelo, generando agregación estable, protección del Carbono (C) lábil en macroagregados y porosidad estructural. Además, en estos sistemas se minimiza la lixiviación de nutrientes móviles disminuyendo los riesgos de contaminación de cursos de agua superficiales y subterráneos (Gabriel y Quemada, 2012). Los CC dejan abundantes residuos en superficie, liberando los nutrientes contenidos en la biomasa vegetal al descomponerse, favoreciendo así al cultivo principal y reconstituyendo las propiedades del suelo. Estos cultivos invernales, también llamados “cultivos reconstituyentes de la fertilidad del suelo” son conocidos por ser multifuncionales, no sólo por mejorar el balance de C, sino también por reducir la compactación, favorecer la agregación, aumentar la infiltración, minimizar la lixiviación de nutrientes móviles, entre otros efectos (Restovich *et al.*, 2011). Más aún, los CC pueden alterar sustancialmente la comunidad posterior de

malezas, el carbono lábil y la humedad del suelo, lo cual puede tener efectos determinantes en la estructura de las comunidades microbianas edáficas (Buyer *et al.*, 2010). Las características de estos cultivos (por ejemplo, profundidad de la raíz, demanda de agua, liberación de nutrientes en la rizósfera, adaptación a las condiciones climáticas) son factores clave relacionados con la mejora de la eficiencia de uso de Nitrógeno (N) en el sistema (Gabriel y Quemada, 2012). Por lo tanto, el uso de CC y sus residuos se ha convertido en una práctica interesante, no sólo entre los productores orgánicos, sino también entre los convencionales (Campiglia *et al.*, 2012).

Los beneficios de los CC varían de acuerdo a las especies que se empleen, debido a la composición de sus residuos, exudados radiculares, características de crecimiento, etc. Por ejemplo, las leguminosas tienen capacidad para utilizar N atmosférico a través de relaciones mutualistas, de manera que manejados correctamente, los CC pueden reducir la necesidad de fertilizantes nitrogenados de los cultivos siguientes (Burket *et al.*, 1997). Las gramíneas dejan abundantes residuos en superficie con alta relación C/N, por lo que su descomposición es más lenta, lo que permite una mejor regulación de la temperatura y agua del suelo, brindándole además protección. Por otra parte, las brassicáceas también incluyen especies muy utilizadas por su capacidad para reducir la compactación del suelo, debido a que sus raíces penetran hasta las capas más profundas (Welch *et al.*, 2016). La rotación en la que se incluyen los CC, la recarga de humedad del perfil, como así también la sincronización entre la mineralización de N acumulado en la biomasa de los CC, con los requerimientos del cultivo de verano son factores fundamentales que influyen en la elección de especies como CC (Quiroga *et al.*, 2007). En aquellas secuencias agrícolas donde las gramíneas son predominantes, la inclusión de una especie leguminosa como CC generaría una mayor provisión de N mineral disponible, incrementando así el contenido proteico de los granos. Entre las especies más utilizadas pertenecientes a dicha familia botánica se encuentran la *Vicia villosa* (resistente al frío), la *Vicia sativa*, y los tréboles, como el trébol blanco, de olor, de Alejandría y encarnado (Rufo, 2003). Entre las gramíneas más empleadas como CC se encuentran el centeno, por su gran resistencia al frío, tolerancia a sequía y producción de abundante volumen de residuo, la avena, la cebada, el triticale y el raigrás. Una gramínea invernal sembrada luego de la cosecha de cultivos de verano absorbe nitratos residuales, genera una mayor provisión de C y compite con las malezas invernales (Ding *et al.*, 2006).

Por lo tanto, conociendo los efectos diferenciales según las especies que se empleen, resulta conveniente evaluar la utilización de mezclas de especies o consociaciones, para lograr mayor eficiencia. Es necesario explorar el estudio de nuevas mezclas para evaluar posibles efectos sinérgicos de las diferentes familias/especies sobre algunas propiedades del suelo. De hecho, el empleo de sistemas multi-especies podría ser una opción viable para incrementar la estabilidad ecológica y resiliencia de las comunidades de CC. Ello podría contribuir a una mayor y más consistente productividad del sistema, restableciendo, al menos, algunos servicios ecosistémicos.

La mayor limitante de los CC es el consumo de agua, por lo que el momento de secado debería ser anterior a su máxima demanda, período correspondiente a la floración, en el caso de leguminosas, ya que en este período generalmente producen la máxima fijación de N y a la encañazón en el caso de gramíneas (Álvarez *et al.*, 2013). Además, esto se encuentra fuertemente determinado por las condiciones ambientales del sitio en estudio. Sin embargo, un suelo con CC es más eficiente en capturar el agua de lluvia de la primavera, por lo que en relación al barbecho desnudo se minimizan diferencias en la disponibilidad de agua a la siembra de los cultivos estivales (Sá Pereira *et al.*, 2013). Los CC en la región pampeana húmeda no deberían afectar la disponibilidad hídrica debido a que en la mayoría de los años las precipitaciones son suficientes para el normal desarrollo de los cultivos estivales. En este sentido, Restovich y Andriulo (2013) reportaron en la Pampa Ondulada, que el uso de CC no provocó estrés hídrico en los cultivos principales (excepto en un año particularmente seco) debido a que la mayor utilización del agua se concentró en el espesor 0-30 cm el cual, generalmente, se recarga con las lluvias primaverales.

Teniendo en cuenta todas las características mencionadas, los CC podrían cumplir un rol fundamental en la rotación agrícola en sistemas de la región pampeana y representar la inclusión de una diversidad de especies vegetales en el paisaje rural argentino que contribuya a mitigar los efectos negativos del monocultivo.

### ***1.3. Importancia de los microorganismos en el funcionamiento del suelo***

Las prácticas de manejo agrícola pueden tener grandes impactos en el tamaño, la actividad, la composición y diversidad de las comunidades microbianas del suelo (Ge *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2012). Debido a que los microorganismos afectan la mayoría de las transformaciones de nutrientes, la presencia de comunidades microbianas diversas en el suelo es esencial para la sustentabilidad de los agroecosistemas (Romaniuk *et al.*, 2011). Por ende, el uso inapropiado del suelo puede alterar estas comunidades y disminuir sus interacciones benéficas (Shen *et al.*, 2010). Es decir que, dado que los microorganismos contribuyen a la nutrición y salud de las plantas, sus propiedades son de gran importancia para determinar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. Los microorganismos son cada vez más utilizados para evaluar la influencia de las prácticas agrícolas en la calidad y fertilidad del suelo. Ello se debe a su rápida respuesta, alta sensibilidad, importancia ecológica y capacidad de presentar información que integra muchos factores ambientales (Azeez *et al.*, 2010; Epelde *et al.*, 2014), siendo esenciales en la descomposición de la materia orgánica, el ciclado de nutrientes y en la formación y mantenimiento de la estructura del suelo (Van der Heijden *et al.*, 2008). La actividad enzimática total de suelo, derivada de microorganismos activos y del pool estabilizado en complejos húmicos (Burns *et al.*, 2013), juega un papel importante en la despolimerización de macromoléculas poliméricas estructuralmente diversas, que se considera el paso limitante de la velocidad en la descomposición y el potencial de mineralización de los nutrientes del suelo (Schimel y Bennett, 2004). A través de la biodiversidad microbiana y gracias a la presencia de diferentes grupos funcionales y de las interacciones entre ellos, el suelo proporciona servicios ecosistémicos clave para el desarrollo de los cultivos. Esta red de interacciones biológicas que tiene lugar en la matriz del suelo genera coalescencia entre comunidades microbianas y es determinante para la fertilidad edáfica (Rillig *et al.*, 2016). Las modificaciones ambientales producidas por diferentes prácticas agrícolas alteran las interacciones entre las comunidades microbianas (inhibiendo o promoviendo diferentes procesos), afectando inevitablemente las funciones biológicas resultantes (Rillig *et al.*, 2015). Debido a esto, la diversificación de los sistemas agrícolas podría generar cambios en las comunidades microbianas, aportando nuevas vías de interacción que beneficien la provisión de servicios ecosistémicos edáficos.

La degradación de suelo registrada en la región pampeana luego de décadas de manejo sostenido de monocultivo tuvo como consecuencia una disminución de la biomasa y la actividad microbiana edáfica (Vargas-Gil *et al.*, 2011). Esto repercute negativamente en el crecimiento vegetal ya que los microorganismos están involucrados en múltiples procesos que influyen sobre él (Grobela *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que las plantas bajo monocultivo presentan sistemas radicales poco saludables debido a la mayor presencia de microorganismos fitopatógenos en su rizósfera (Li *et al.*, 2006; Vargas-Gil *et al.*, 2011). Estos efectos negativos podrían ser revertidos mediante la diversificación de los sistemas agrícolas, modificando el ambiente edáfico que determina la funcionalidad del suelo. Se ha demostrado recientemente que la diversidad y estructura de la comunidad de plantas del sistema puede afectar la composición y abundancia de las comunidades microbianas como así también su actividad enzimática (Legay *et al.*, 2016). Debido a que la actividad de los microorganismos depende parcialmente de la disponibilidad de nutrientes, principalmente de N y C, la inclusión de diferentes especies vegetales podría influir en la funcionalidad del suelo debido a sus variaciones en la cantidad y calidad de esos nutrientes. Por lo tanto, las plantas pueden tener un efecto directo sobre la microbiota del suelo a través de sus características intrínsecas como ser sus rasgos morfológicos, fisiológicos y fenológicos, pero además pueden influir indirectamente modificando las condiciones ambientales de la matriz del suelo (Cantarel *et al.*, 2015). Los mecanismos subyacentes aún no se comprenden del todo, particularmente existe incertidumbre sobre cuáles son los rasgos de plantas (específicos de las especies de plantas o mediados por las condiciones ambientales) involucrados en la respuesta de los microorganismos del suelo a las especies vegetales (Paul, 2014).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, el estudio de la funcionalidad del suelo mediada por las comunidades microbianas que allí habitan permitiría explicar de manera eficiente el impacto de las diferentes prácticas agrícolas necesarias para asegurar la sustentabilidad de los sistemas agrícolas. Las relaciones que se establecen entre las diferentes comunidades microbianas conforman una extensa red de interacciones clave que desencadenan los procesos biológicos que permiten el crecimiento de los cultivos. Dado que existen aún

falencias en el conocimiento de estas relaciones, resulta necesario investigar el comportamiento microbiano en el suelo y su conexión con las diferentes especies vegetales.

#### ***1.4. Estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas***

El suelo es un recurso irremplazable que cumple un rol fundamental en la productividad agrícola y mantiene los ciclos biogeoquímicos del ecosistema terrestre, ya que los microorganismos de suelo degradan, tarde o temprano, todos los compuestos orgánicos. De hecho, entre un 80 y un 90% de los procesos biológicos que ocurren en el suelo son reacciones mediadas por microorganismos (Nannipieri y Badalucco, 2003). Las funciones que cumplen los microorganismos son fundamentales para el crecimiento de los cultivos. Entre ellas se incluyen la descomposición de la materia orgánica en todas sus fracciones, el reciclado de material vegetal, la movilización e inmovilización de minerales y sustancias contaminantes, la mejora en la aireación del suelo, la inhibición de patógenos, el incremento de la resistencia en plantas, la estructuración física del suelo, el aumento de la nutrición vegetal promoviendo su crecimiento, etc. (Pérez Brandán, 2014). Por otro lado, no solamente las funciones microbianas son fundamentales para entender los procesos que se desarrollan en el suelo, también es importante considerar que los microorganismos constituyen un enorme reservorio de diversidad genética (Fierer *et al.*, 2007). La evaluación de las formas de vida taxonómicas (abundancia y riqueza) contribuye a la generación de conocimientos básicos acerca de la identificación de las principales especies microbianas que habitan el ambiente rizosférico. Sin embargo, lo más valioso de esa información, es poder establecer la interrelación entre la diversidad estructural (grupos microbianos presentes) y funcional de las comunidades microbianas del suelo. Para entender estas relaciones se necesita tanto de técnicas que estudien la diversidad taxonómica como de aquellas que expliquen los procesos biológicos que realizan los diferentes grupos de especies en la matriz del suelo (Paul, 2014).

La diversidad microbiana describe la complejidad y variabilidad a diferentes niveles de organización biológica. Incluye la variabilidad genética dentro de los taxones microbianos (especies) y el número (riqueza) y abundancia relativa (equidad) de taxones (Torsvik y Øvreås, 2002). Dentro de la biodiversidad puede estudiarse la estructura genética

de las comunidades y la función de estas complejas comunidades existentes en el ambiente edáfico. Ello brinda información sobre el funcionamiento del suelo, ya que este puede presentar poblaciones muy variadas en cuanto a taxones presentes, pero estar funcionalmente inactivos y viceversa. Entonces, es valioso determinar el nivel de diversidad microbiana, la composición de especies y su distribución en el suelo permitiendo conocer la resiliencia y la resistencia a diferentes tipos de estrés de un sistema.

Las técnicas utilizadas para describir la composición de las comunidades microbianas, su diversidad y cambios a través del espacio, el tiempo o modificaciones en el ambiente no pueden revelar las interacciones entre los miembros de la comunidad, lo cual podría ser más importante para entender el funcionamiento del ecosistema que conocer solamente la abundancia y la diversidad, (Deng *et al.*, 2012). Por esto, consideramos necesario complementar las determinaciones de la constitución de la biota con aspectos de su funcionalidad. La capacidad de los microorganismos para desarrollar una gran variedad de funciones se debe a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una enorme cantidad de tipos de reacciones: oxidaciones, reducciones y precipitaciones, sobre los elementos componentes del suelo, que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos edáficos. En este sentido, se ha demostrado que las actividades enzimáticas del suelo funcionan como indicadores potenciales de las condiciones en las que se encuentra el suelo como respuesta al manejo agrícola (Floch *et al.*, 2011). Estas actividades están asociadas a los ciclos biogeoquímicos, la degradación de la materia orgánica y los procesos de recuperación de suelos determinando, junto con otras propiedades químicas y físicas, la calidad de un suelo (Gelsomino *et al.*, 2006). Así también, métodos como el estudio de los perfiles fisiológicos, la respiración microbiana, el C de la biomasa microbiana, entre otros, podrían proveer herramientas fundamentales para describir la funcionalidad del suelo ante sus diferentes usos.

Existen numerosas herramientas para cuantificar la constitución de la estructura de las comunidades microbianas y las funciones o procesos en los que están involucradas, siendo ideal realizarlo desde un enfoque holístico, incorporando ambos aspectos. Entre estas herramientas se encuentran técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de extracciones de ADN de suelo. Dentro de ellas, las llamadas metodologías de

“huella genética” tales como electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminal (RFLP-T) y análisis espaciador intergénico ribosomal (RISA), entre otras, proporcionan información sobre la composición de las especies, y se pueden utilizar para comparar especies comunes presentes en las muestras. Además, el estudio de perfiles fosfolipídicos de suelo (PLFA) podría demostrar el efecto de tratamientos agrícolas sobre los grandes taxones microbianos y proveer herramientas para caracterizar el impacto del manejo agrícola en los suelos (Hebel *et al.*, 2009). Para caracterizar comunidades microbianas, se podría utilizar PLFA en un primer momento para detectar diferencias entre tratamientos y subsecuentemente (si se detectan diferencias) se podría emplear algún método basado en PCR para identificar poblaciones específicas relacionadas a la respuesta detectada (Philip *et al.*, 2006).

### ***1.5. La diversidad microbiana como herramienta de manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo***

Como consecuencia de la pérdida de biodiversidad de los agroecosistemas de la región pampeana, entre otros factores, en los últimos años se ha registrado un incremento de la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en el cultivo de soja, siendo una de las principales limitantes para su ejecución (Reis *et al.*, 2002). En efecto, desde hace tiempo se reconoce que la disminución del rendimiento bajo monocultivos prolongados se asocia a patógenos del suelo, muchos de los cuales son hongos (Fiers *et al.*, 2012; Pérez Brandán *et al.*, 2013). Estos patógenos son difíciles de controlar debido a su persistencia en el suelo a través de la formación de estructuras de supervivencia, la amplia gama de huéspedes susceptibles y la ineficiencia de los controles químicos (De Coninck *et al.*, 2015). Con respecto a esto, la baja efectividad del uso de fungicidas se debe principalmente a la dificultad de penetración del producto en la canopia del cultivo para llegar al suelo y lograr proteger la raíz (Augusto *et al.*, 2010). Sumado a ello, las aplicaciones de fungicidas pueden tener efectos negativos sobre el ambiente y los consumidores, además de no ser económicamente viables en el largo plazo, debido a que dejan residuos nocivos y pueden conducir al desarrollo de cepas resistentes con el uso reiterado (Vinale *et al.*, 2008). Se prevé que en los próximos años la tendencia al monocultivo será mayor que la actual, razón por lo

que se advierte una pérdida de materia orgánica y de fertilidad natural del suelo que beneficia además el desarrollo de enfermedades de fin de ciclo en el cultivo de soja (Sá Pereira *et al.*, 2013). Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias de manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo que complementen los tratamientos tradicionales y ayuden a incrementar la eficiencia de manejo y disminuir los efectos adversos de los productos químicos.

La sanidad de los cultivos se ve afectada por la riqueza microbiana del suelo debido a que en la matriz edáfica se dan complejas interacciones entre los microorganismos, los que compiten por fuentes nutricionales, especialmente N, Fósforo (P) y Hierro (Fe), o bien actúan mediante mecanismos de antibiosis, predación, entre otras funciones (Johansson *et al.*, 2004). Esto determina cambios en las poblaciones de patógenos y de antagonistas, las cuales comparten un mismo nicho ecológico en la rizósfera (Mazzola, 2004). Las prácticas de manejo agrícola pueden influir en la biomasa microbiana, sus actividades y diversidad, afectando la capacidad de inhibir a los patógenos que habitan el suelo. En general, esta capacidad de inhibición se asocia con mayores niveles de C y una mayor actividad biológica (Stirling *et al.*, 2012). Los suelos entonces poseen capacidad biológica natural para restringir la progresión de una enfermedad, especialmente las causadas por hongos de suelo, siendo este fenómeno otorgado por la actividad de la diversa comunidad microbiana residente en el suelo. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie del suelo, existiendo una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que, en la mayoría de los casos, no se desarrolle la enfermedad (Stocco *et al.*, 2016). Desde hace algunos años se investiga la forma de incorporar estos agentes de biocontrol al suelo de manera más eficiente (Días *et al.*, 2015; Rodríguez and Sanders, 2015). Sin embargo, un enfoque en auge apunta a promover el establecimiento de microorganismos benéficos mediante el uso de estrategias de manejo que incrementen estas poblaciones naturalmente. Prácticas como el uso de enmiendas orgánicas, junto con la rotación de cultivo, y la inclusión de cultivos de cobertura que favorecen la diversificación del sistema, entre otras, podrían ser capaces de aumentar la diversidad y abundancia de poblaciones microbianas benéficas (Säle *et al.*, 2015). No obstante, bajo una mirada holística del sistema, se podría promover el aumento no solamente de poblaciones puntuales como los biocontroladores sino también la diversidad microbiana

edáfica general. Esto contribuiría a lograr un cultivo con mejor desarrollo, lo cual restringiría las posibilidades de ser afectado por un patógeno que habita en el suelo.

La diversificación de los sistemas agrícolas genera una variedad de beneficios en la matriz del suelo que repercuten en el desarrollo del cultivo. Entre estos beneficios, el incremento de la diversidad y la funcionalidad microbiana podría representar una estrategia de manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo. Esto se sustenta en el hecho de que los microorganismos asociados con las raíces de las diferentes especies vegetales tienen una importancia sustancial en su crecimiento, debido a que pueden cumplir el rol de patógenos así como también actuar como antagonistas o promover el vigor de las plantas mediante la deposición de nutrientes, antibióticos y hormonas vegetales alrededor de las raíces (De Vrieze, 2015). La comunidad microbiana asociada a las diferentes especies vegetales se conforma en respuesta al estado nutricional y las etapas de desarrollo de los diferentes genotipos de plantas, además de la presencia y el tipo de patógenos, predadores, y organismos beneficiosos de la rizosfera (Giagnoni *et al.*, 2016), como también dependiendo del tipo de suelo y fundamentalmente, de las prácticas agrícolas que se realicen. Por lo tanto, diversificar el sistema agrícola incluyendo diferentes especies vegetales podría alterar el establecimiento de las comunidades de manera distinta y a su vez afectar el estado sanitario del cultivo.

La agricultura actual enfrenta una crisis de gran magnitud relacionada al uso incorrecto de plaguicidas. El uso indiscriminado, inadecuada manipulación y aplicación de estos productos, sin protección, trajo aparejado un creciente número de problemas sanitarios y ambientales en zonas rurales de Argentina (Barri, 2010; Lucero, 2015). Sumado a esto, las exigencias cada vez más estrictas en cuanto a presencia de residuos sintéticos en productos de exportación, obligan a plantear alternativas complementarias al uso de plaguicidas. La inclusión de CC invernada se presenta entonces, como una alternativa de producción orientada a mitigar los efectos perjudiciales del monocultivo y contribuir a la mejora de la calidad de los suelos de la región pampeana y la sanidad del cultivo de soja, a través de un posible aumento de la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo. Además, este aumento podría representar una estrategia de control biológico de enfermedades en el cultivo causadas por hongos de suelo. Por lo tanto, el presente trabajo

representa una contribución importante al conocimiento de los efectos de la diversificación agrícola sobre los procesos biológicos de los suelos en la región pampeana. Esta información es necesaria para explorar una alternativa agrícola como la inclusión de CC orientada a promover la sustentabilidad de los sistemas productivos, aportando múltiples beneficios al sistema sin comprometer su productividad.

## **HIPÓTESIS**

*El incremento de la diversidad microbiana del suelo, en interrelación con variables químicas y físicas edáficas, está asociado a la diversificación de los agroecosistemas, mediante la inclusión de cultivos de cobertura (vicia, avena y nabo forrajero), promoviendo la sanidad del cultivo de soja y su productividad.*

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Cuantificar el efecto de la diversidad microbiana del suelo en respuesta a la inclusión de cultivos de cobertura (vicia, avena y nabo forrajero sembrados en combinaciones distintas) y sus interacciones con variables químicas y físicas, y con la sanidad del cultivo de soja, en la intensificación sustentable de sistemas productivos de la pampa húmeda.

### **Objetivos específicos**

**1-** Evaluar la respuesta de la diversidad microbiana del suelo (estructura y funciones de las comunidades de microorganismos) en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.

**2-** Analizar la respuesta de parámetros químicos y físicos del suelo en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.

**3-** Establecer interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema, en correlación con la productividad de los cultivos principales (soja y maíz).

**4-** Relacionar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo.

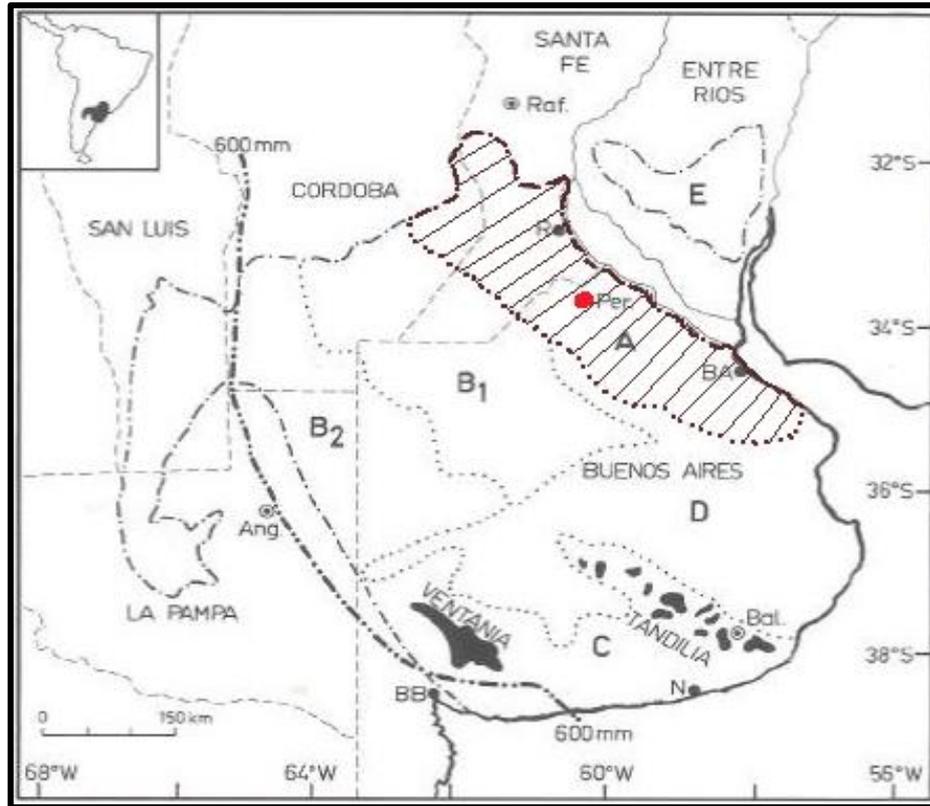
## **-CAPITULO 2 -**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## ***2.1. Sitio de estudio***

Este estudio se llevó a cabo a partir de un ensayo a campo localizado en la Estación Experimental Agropecuaria EEA INTA Pergamino (33°51'S, 60°40'W), provincia de Buenos Aires, Argentina. En esta zona, el suelo predominante es Argiudol Típico (USDA Soil Taxonomy) de la serie Pergamino con un horizonte A franco limoso sin fase erosionada (pendiente <0,3%). El clima es templado húmedo sin estación seca, con una temperatura media anual de 16,5°C (Soriano *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1992) y la media anual de precipitaciones de 971 mm para el período 1910-2010 (base de datos de red agroclimatológicos, INTA). Las precipitaciones se producen principalmente en otoño y primavera, y los meses de verano por lo general presentan déficit hídrico de diversa intensidad.

La zona se encuentra incluida dentro de la subregión de la pampa ondulada (Fig. 1), recibe esta denominación por la suave ondulación del terreno resultante de la reactivación de la erosión fluvial como consecuencia de la elevación del basamento. Las condiciones edáficas y climáticas dan a esta subregión un carácter eminentemente agrícola. Las áreas utilizadas para la ganadería se encuentran adyacentes a los cursos de agua y en zonas cóncavas anegables. Con la intensa presión que la agricultura y la ganadería han ejercido sobre la vegetación nativa, se han producido grandes cambios en la cobertura del suelo, así como en la estructura y la composición de los remanentes de pastizales (Hall *et al.*, 1992).



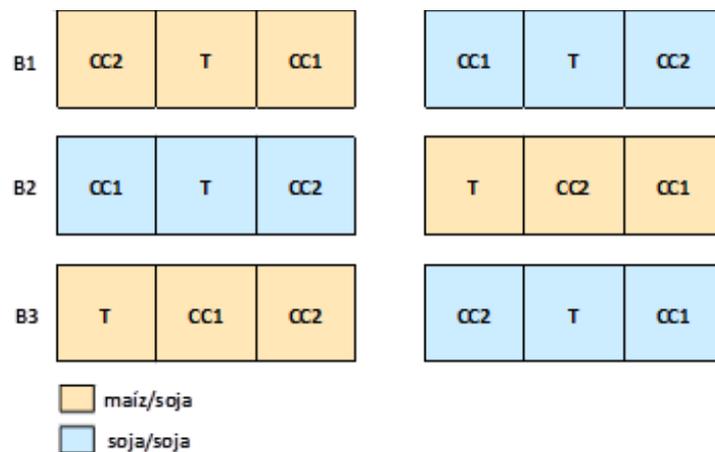
**Fig. 1.** Subdivisión de la Región Pampeana. [A. Pampa Ondulada; B. Pampa Interior (B1. Plana, B2. Occidental); C. Pampa Austral; D. Pampa Inundable; E. Pampa Mesopotámica]. Límites regional (-.-.), subregional (. . .) e interprovincial (- - -). Precipitaciones medias anuales (-.-.). Localidades (●): Ang, Anguil; BA, Buenos Aires; Bal, Balcarce; BB, Bahía Blanca; N, Necochea; Per, Pergamino [Sitio de estudio]; Raf, Rafaela; R, Rosario. Fuente: Hall *et al.* (1992).

## 2.2. Diseño experimental

El ensayo cuenta con un diseño experimental en parcelas divididas (2 factores) con un arreglo en bloques completos aleatorizados, donde la parcela principal (1° factor) es la secuencia del cultivo comercial (soja/soja y soja/maíz) y la sub-parcela (2° factor) corresponde a los cultivos de cobertura (CC) (Fig. 2). Cada uno de los tres bloques cuenta con dos parcelas principales (secuencia soja /soja y secuencia soja/maíz), dentro de las cuales se ubican tres sub-parcelas (dos consociaciones de CC y el Testigo). Cada sub-parcela del ensayo tiene un tamaño de 30 m de largo x 5 m de ancho. Las especies utilizadas como CC fueron: avena (*Avena sativa* L.), vicia (*Vicia sativa* L.) y nabo forrajero (*Raphanus sativus* L.), siendo sembradas en dos consociaciones diferentes: avena, nabo forrajero y vicia (CC2) y avena y nabo forrajero (CC1). También se incluye un Testigo sin CC. Las especies utilizadas como CC fueron evaluadas previamente en la misma zona de estudio (Restovich *et al.*, 2011) y fueron seleccionadas en este proyecto debido a sus respuestas positivas a

parámetros físicos edáficos, como estabilidad de agregados, porosidad y densidad aparente. El ensayo consta de seis tratamientos, con tres repeticiones, totalizando 18 sub-parcelas. Los tratamientos son los siguientes: 1) soja/soja CC1; 2) soja/soja CC2; 3) soja/soja Testigo; 4) soja/maíz CC1; 5) soja/maíz CC2; y 6) soja/maíz Testigo.

Este trabajo de tesis se llevó a cabo durante tres campañas agrícolas: 2013, 2014 y 2015. Tanto los cultivos comerciales como los CC fueron sembrados mediante siembra directa. Los CC se sembraron en línea inmediatamente después de la cosecha de los cultivos de soja (abril) y maíz (marzo), de cada campaña agrícola en la que se realizó el trabajo, momento en que se fertilizaron los CC con  $14,7 \text{ Kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$  (esta fertilización también incluye al Testigo). *Vicia* fue inoculada con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Viciae* inmediatamente antes de la siembra. La siembra de soja y maíz, de cada ciclo agrícola, se realizó en noviembre y septiembre, respectivamente. El maíz fue fertilizado a la siembra con superfosfato de calcio ( $150 \text{ kg ha}^{-1}$ ) y entre V5-6 con  $32 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Las fechas de siembra y cosecha de los cultivos comerciales durante cada campaña, y el patrón de distribución de las lluvias de primavera-verano de la región, imponen el límite de crecimiento de los CC. Por lo tanto, para la cosecha de maíz, sembrado en septiembre de cada año, el crecimiento de los CC fue interrumpido en invierno (estado vegetativo). Para la cosecha de soja, sembrada en noviembre de cada campaña, el secado fue realizado en primavera (etapa reproductiva). El secado del CC se realizó con glifosato a razón de  $3 \text{ l ha}^{-1}$  de producto comercial (p.a.48%). En el Testigo siempre se realizó control de malezas.



**Fig. 2.** Esquema representativo de ensayo de cultivos de cobertura (CC). Bloque (B) avena/nabo forrajero/vicia (CC2), avena/nabo forrajero (CC1) y Testigo (T).

### **2.3. Muestreo de suelos**

El muestreo de suelo se llevó a cabo en dos momentos diferentes del año agrícola, durante las tres campañas en las que se realizó el estudio (Fig. 3). El primer muestreo se realizó previo a la cosecha del cultivo comercial, en el mes de marzo, mientras que el segundo se llevó a cabo previo al secado de los CC en el mes de agosto, repitiéndose el procedimiento durante los tres años en los que se realizó el trabajo, totalizando 6 muestreos de suelo.

La metodología de muestreo fue al azar y se desarrolló de acuerdo a literatura previa (Meriles *et al.*, 2009; Vargas Gil *et al.*, 2011; Restovich *et al.*, 2012;). Seis muestras compuestas de suelo por parcela fueron tomadas desde el horizonte A, a una profundidad de 10 cm próximo a la raíz, a partir de seis estaciones de muestreo. El contenido fue colocado en bolsas plásticas, conservado en frío y transportado inmediatamente al laboratorio. Las muestras fueron divididas en tres partes para cada uno de los parámetros estudiados (microbiológicos, químicos y físicos). Después de pasar a través de tamiz de 2 mm, las muestras de suelo se almacenaron a 4°C y -20°C, según las correspondientes técnicas a emplear, antes de su análisis en el laboratorio.



**Fig. 3.** Muestreo de suelos y evaluación de enfermedades en la Estación Experimental INTA Pergamino. Campañas 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015. A y B) Ensayo de cultivos de cobertura durante el periodo invernal C) Muestras de suelo dispuestas en bolsas plásticas listas para su refrigeración D) Evaluación de incidencia del Síndrome de muerte súbita en soja.

## ***2.4. Análisis de muestras de suelo***

**2.4.1. Evaluar la respuesta de la diversidad microbiana del suelo (estructura y funciones de las comunidades de microorganismos) en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura, sembrados independientes o en consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.**

### ***Evaluación de la estructura de las comunidades de microorganismos mediante el análisis de la perfiles de fosfolípidos (PLFA)***

La estructura de las comunidades microbianas de suelo fue analizada mediante sus perfiles de fosfolípidos, de acuerdo con la metodología utilizada por Meriles *et al.* (2009), basada en Zelles (1999). Esta técnica se basa en la cuantificación de fosfolípidos constituyentes de las membranas celulares de los microorganismos, específicos de cada taxón, es decir que estos biomarcadores permiten estimar los componentes de cada comunidad microbiana. Debido a la sensibilidad, alta reproducibilidad y costo de la técnica, es una herramienta conveniente para determinar los grupos de hongos y bacterias presentes en el suelo, permitiéndonos conocer la estructura de la comunidad y como se modifica en respuesta a los diferentes tratamientos que se plantearon en los ensayos a campo.

Los ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA) comúnmente utilizados como biomarcadores de taxones microbianos se muestran en la Tabla 1. Se pesaron 8 g de cada muestra de suelo y se agregó 20 mL de una mezcla de cloroformo:metanol:buffer fosfato (1:2:0.8). Luego la muestra fue centrifugada (Cavour<sup>®</sup> VT3216) a 2500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se filtró. Al tubo con sobrenadante se agregó 10 mL de cloroformo y 10 mL de buffer fosfato (pH: 7,4), se tapó y agitó en el vortex. Se dejó reposar hasta la completa separación de las fases orgánica y acuosa. Se transfirió la fase orgánica a un nuevo tubo falcon y el solvente se evaporó utilizando N gaseoso. El residuo se resuspendió en 4 mL de cloroformo. Los lípidos del suelo fueron separados en orden creciente de polaridad mediante una cromatografía en columna rellena con 0,5 g de ácido silícico (100-200 Mesh, Sigma St Louis, MO). Los lípidos neutros y los glicolípidos se

eluyeron con 5 mL de cloroformo y 10 mL de acetona, respectivamente. Los fracción de fosfolípidos se eluyó con el agregado de 5 mL de metanol, y la metilación de los ácidos grasos se realizó con una solución de 1 mL de metanol/tolueno (1:1) y 1 mL de KOH 0,2 M incubados a 37°C durante 15 min. Los ácidos grasos metil esterificados fueron extraídos con 2 mL de hexano y la solución fue posteriormente concentrada hasta sequedad. El residuo obtenido se resuspendió en 150 µL de hexano y se midió en un cromatógrafo gaseoso de Perkin-Elmer Clarus 500 equipado con una columna Elite-5 (Crossbond 5% difenil – 95% dimetil polisiloxano) y detector de llama (FID). Los ácidos grasos fueron analizados con una pendiente térmica de 180 a 240°C a 4°C/min y una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. La cuantificación se realizó mediante el agregado de un estándar interno (19:0). Los ácidos grasos fueron identificados mediante una corrida previa de un estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos bacterianos (Bacterial Acid Methyl Esters mix, Supelco, Bellefonte, PA). La concentración total de PLFA fue estimada mediante la sumatoria de todos los ácidos grasos de fosfolípidos identificados, y utilizada como estimador de la biomasa microbiana total (Bohme y Bohme, 2006). Una nomenclatura estándar fue utilizada para describir cada PLFA: el número de átomos de C seguido por el número de dobles enlaces, separados por dos puntos. Las conformaciones cis y trans son designadas con el sufijo “c” y “t”, respectivamente. Otras notaciones son “Me” para el grupo metilo, “OH” para el hidroxilo, “cy” para los grupos ciclopropanoicos, y el prefijo “i” y “a” para las ramificaciones iso- y anteiso- de los ácidos grasos.

**Tabla1.** Grupos de biomarcadores de ácidos grasos.

Biomarcador	Ácidos grasos
Hongos	C18:2 $\omega$ 6,9
Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)	16:1 $\omega$ 5
Actinobacterias	10-metil 16:0; 10-metil 18:0
Bacterias Gram-positivas	Ácidos grasos ramificados iso- y ante-iso: i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0
Bacteria Gram-negativas	Ácidos grasos monoenoicos y ciclopropanos: 16:1 $\omega$ 9, 16:1 $\omega$ 11, cy17:0, 18:1 $\omega$ 9c, 18:1 $\omega$ 9t, cy19:0

***Evaluación de las funciones de las comunidades de microorganismos mediante el análisis de:***

***-Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados***

Una comunidad microbiana puede considerarse como una unidad funcional que está caracterizada por la sumatoria de sus propiedades metabólicas. Como alternativa, la caracterización de estas comunidades puede evaluarse mediante análisis a nivel de comunidad de patrones de utilización de fuentes de C. En este análisis, se obtienen impresiones fisiológicas mediante la inoculación de suspensiones de suelo, con las comunidades microbianas asociadas, a microplacas que contienen diferentes fuentes de C. Con el empleo de los adecuados índices de diversidad se podrán referir los valores encontrados con la diversidad catabólica del suelo. Entonces, esta técnica implica un análisis a nivel de comunidad de patrones de utilización de fuentes de carbono por parte microorganismos extraídos de una muestra natural (Chazarenc *et al.*, 2010).

La diversidad funcional microbiana fue estimada mediante el análisis de perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP) según Ruiz *et al.* (2008). A pesar de que CLPP evidencia solo los cambios en los patrones de consumo de sustratos carbonados de microorganismos cultivables, la técnica puede ser utilizada para analizar la actividad fisiológica de las comunidades microbianas en su relación con otras variables biológicas (Huang *et al.*, 2015). Las fuentes de C seleccionadas abarcaron un rango de calidad y complejidad de sustratos consistentes en 6 monosacaridos (D-dextrosa, D-manosa, D-fructosa, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa) un disacárido (D-lactosa), cuatro aminoácidos (DL-triptofano, L-arginina, L-asparagina, L-lisina), y una vitamina (tiamina). Se preparó una solución stock con cada fuente de C en agua destilada (3 g/L), y se almacenó a 4°C en oscuridad. Se utilizó un medio basal consistente de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (21 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (9 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,3 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,03 g/L), FeSO<sub>4</sub> (0,015 g/L), MnSO<sub>4</sub> (0,0075 g/L), NaMoO<sub>4</sub> (0,0075 g/L). Se pesaron 2 g de cada muestra de suelo y se suspendieron en 10 mL de agua destilada, posteriormente se centrifugó la suspensión de suelo. En cada celda de la microplaca se adicionó 60 µl de medio basal, 60 µl de fuente de C siguiendo el esquema presentado en la Tabla 2, y 60 µl del colorante (violeta de tretrazolio 0,0075%). Finalmente, se adicionó 60 µl de la suspensión de suelo a cada celda y las

microplacas fueron selladas con parafilm e incubadas a 25°C. Se obtuvieron lecturas mediante espectrofotometría cada 24 h durante tres días (tiempo suficiente para alcanzar el punto máximo de absorbancia y estimar la diversidad catabólica de fuentes carbonadas en cada tratamiento) utilizando un lector de placa Elisa con un filtro de 590 nm (Wallac 1420 Victor2 multi-label counter, Perkin Elmer Life Sciences). Las lecturas en cada momento de medición (unidad de fluorescencia relativa, UFR) fueron representadas en función del tiempo para obtener curvas de respiración (Allegrini *et al.*, 2015). Se calculó el desarrollo de color de la celda (AWCD) para las 72 h de medición, siendo esta determinación una función de la densidad de inóculo, promediando la absorbancia de las fuentes carbonadas y restando el valor del blanco (Garland, 1996).

**Tabla 2.** Representación de la distribución de fuentes carbonadas en una microplaca correspondiente a una parcela del ensayo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H2O	-										
B	DEXTROSA	GLUCOSA										
C	MANOSA	LACTOSA										
D	TRIPTÓF	LISINA										
E	ARGININA	THIAMINA										
F	ASPARGINA	XILOSA										
G	FRUCTOSA	GALACTOSA										
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>MUESTRA 1</b>		<b>MUESTRA 2</b>		<b>MUESTRA 3</b>		<b>MUESTRA 4</b>		<b>MUESTRA 5</b>		<b>MUESTRA 6</b>	

### ***-Respiración microbiana***

La respiración representa la oxidación de la materia orgánica hasta la formación de CO<sub>2</sub> mediada por organismos aeróbicos del suelo, que utilizan O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones (Saviozzi *et al.*, 2001). Desde el punto de vista ecológico, la respiración basal es una medida de la actividad microbiana, la tasa de descomposición de la materia orgánica y de la calidad del carbono en el suelo. Ésta resulta afectada por las condiciones ambientales, el sustrato disponible y los sistemas de manejo del suelo. Por lo tanto, la medición del CO<sub>2</sub> respirado refleja la dinámica de la biota del suelo y de los procesos metabólicos edáficos. Estos procesos varían en función de factores biofísicos y del manejo, por lo que la respiración microbiana representa un reflejo de las condiciones biológicas, químicas y físicas del suelo.

Se determinó la respiración microbiana mediante la liberación de CO<sub>2</sub> (Alef, 1995), pesando 10 g de cada muestra de suelo, las cuales se llevaron a 60% de capacidad de campo para posteriormente incubarlas con 15 mL de NaOH 0,2 N, durante un período de siete días. La liberación de CO<sub>2</sub> se estimó mediante titulación con HCl 0,2 N, fenolftaleína como indicador y CL<sub>2</sub>Ba como precipitante del NaCO<sub>3</sub> formado. Finalmente, el cálculo del CO<sub>2</sub> producido se efectuó mediante la siguiente ecuación:

$$mg\ CO_2/7días/g\ suelo = (Blanco-Tratado)*4,4/ Peso\ Seco$$

Se utilizaron blancos como Testigos con la finalidad de descontar el CO<sub>2</sub> atmosférico y las determinaciones se realizaron empleando un frasco por muestra de suelo, totalizando seis réplicas por parcela.

#### ***-Actividades enzimáticas***

Las enzimas en el suelo son fundamentales para la transformación de energía y el ciclo de nutrientes. Son responsables de la formación de moléculas orgánicas y particularmente tienen una participación vital en el ciclo del N, P y C. Cumplen un papel vital en procesos tales como la mineralización, inmovilización de nutrientes y fijación biológica de N, entre otros. Específicamente en relación con la mineralización, las enzimas participan en la transformación de compuestos orgánicos complejos a sustancias asimilables por las plantas que catalizan las etapas limitantes en la mineralización de nutrientes. Las enzimas de suelo son producidas por plantas, animales y microorganismos y pueden estar presentes en células muertas y restos celulares que son absorbidos por arcillas e incorporados en sustancias húmicas. Entre las complejas reacciones bioquímicas del suelo, las enzimas catalizan innumerables procesos, siendo consideradas como biosensores de los cambios que puedan producirse en la calidad edáfica en respuesta al manejo agrícola.

La actividad proteasa-lipasa-esterasa evaluada mediante la *hidrólisis de diacetato de fluoresceína* (FDA) es ampliamente aceptada como un método preciso y simple para medir la actividad microbiana total en una amplia gama de muestras ambientales, incluyendo los suelos. El diacetato de fluoresceína se hidroliza por enzimas extracelulares y de membrana

permitiendo la liberación de un producto final coloreado que puede medirse por espectrofotometría. Las enzimas responsables de esta hidrólisis son abundantes en el ambiente del suelo. Entre ellas se encuentran esterasas, proteasas y lipasas y están involucradas en la descomposición de muchos tipos de tejido. Por otro lado, las enzimas del tipo oxidorreductasas, como *la deshidrogenasa*, permiten tener una idea de los procesos microbianos que ocurren en el suelo debido a que se encuentran presentes únicamente en sistemas vivos, que indican además, la tasa de oxidación de la materia orgánica, de las enzimas involucradas en el ciclo del C. La determinación de la actividad deshidrogenasa se considera un parámetro clave para determinar la fertilidad del suelo. Por lo tanto, es un indicador del sistema redox microbiano, por lo que se suele considerar un buen exponente de las actividades oxidativas del suelo y un indicador general de la actividad microbiana del mismo. Finalmente, la *actividad fosfatasa ácida* es realizada por un grupo de enzimas conocidas como fosfatasas o fosfohidrolasas que hacen disponible el P para las plantas, catalizando la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de ácido fosfórico. Una de las transformaciones que producen es la mineralización de fósforo orgánico a fósforo inorgánico, son extensamente estudiadas debido a que una importante cantidad de los compuestos de fósforo orgánico se encuentra en el suelo en forma de monoésteres.

- *Actividad proteasa-lipasa-esterasa. Hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)*

Se cuantificó la actividad microbiana mediante la determinación de la hidrólisis de FDA, empleando la técnica de Adam y Duncan (2001). Se colocaron 2 g de suelo y 15 mL de buffer fosfato de potasio 60 mM pH 7,6 en erlenmeyers de 50 mL. Se agregó a los erlenmeyers el sustrato (FDA, 1,000 µg/mL) para comenzar la reacción. Luego se agitó la suspensión durante 20 min a 30°C y 100 rpm. Inmediatamente se agregó 15 mL de cloroformo/metanol (2:1 v/v) para finalizar la reacción. El contenido de los frascos fue luego transferido a tubos de centrifuga (50 mL) y centrifugados a 4000 rpm por 4 min. El sobrenadante de cada muestra se midió en espectrofotómetro UV-Vis a 490 nm.

- *Actividad deshidrogenasa*

La actividad deshidrogenasa se determinó de acuerdo a la técnica citada por García *et al.* (1997). Se colocó 1 g de suelo (60% de su capacidad de campo) en erlenmeyers de 50

mL adicionando 0,2 mL de una solución INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio) al 0,4%. La suspensión fue incubada durante 24 h a 28°C en oscuridad. El INTF formado (iodo-nitrotetrazolio formazan) fue extraído con 10 mL de metanol mediante agitación rápida durante 1 min. Luego se trasvaso la suspensión a tubos de centrifuga, centrifugado a 4000 rpm por 4 min. Inmediatamente después, el INTF fue cuantificado en espectrofotómetro UV-Vis a 490 nm.

- *Actividad fosfatasa ácida*

La actividad fosfatasa ácida se determinó pesando 1 g de suelo, el cual fue disuelto en 4 mL de solución de buffer ácida (solución de buffer llevada a pH 6,5 con HCl) y 1 mL de solución de *p*-nitrofenilfosfato 0,05 M, mezclándose el contenido durante unos segundos (Tabatabai y Bremner, 1969). La suspensión fue incubada durante 1 hora a 37°C en erlenmeyers tapados de 50 mL. Luego, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 1 mL de NaOH 0,5 M y 4 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M, para evitar la dispersión de las sustancias húmicas. La suspensión fue filtrada en tubos de ensayo de 20 mL, para finalmente determinar la absorbancia del sobrenadante a 410 nm.

### ***Evaluación de otros parámetros microbianos de carácter general:***

#### ***-Carbono de la biomasa microbiana***

La biomasa microbiana constituye el componente vivo de la materia orgánica del suelo y representa la fracción lábil, y por lo tanto responde rápidamente al efecto de perturbación o recuperación del suelo. Este parámetro puede ser estimado mediante el método de fumigación-extracción. En el mismo, los microorganismos mueren por la fumigación con cloroformo. Si se remueve el cloroformo, habrá un flujo grande de CO<sub>2</sub> ya que las células microbianas muertas serán mineralizadas por los microorganismos provenientes de la inoculación, y contribuirán a la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado. La diferencia entre el suelo sin fumigar y la cantidad de CO<sub>2</sub> emitido luego del tratamiento con cloroformo (suelo fumigado) se deberá a la cantidad de biomasa microbiana que se encontraba originalmente en el sistema.

Para determinar el C de la biomasa microbiana (CBM) se utilizó la técnica propuesta por Vance *et al.* (1987). Una alícuota de 7,5 g de suelo húmedo, previamente incubado durante 15 h a 30°C, fue fumigado con cloroformo como biosida y luego sometido a extracción con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M. La solución fue centrifugada, filtrada y un extracto de 4 mL de esta solución fue añadido a un tubo de ensayo con 1 mL de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,06 M y 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Esta solución fue digerida utilizando un baño seco a 140°C durante 30 min, y la absorbancia fue medida a 590nm en espectrofotómetro. El CBM fue estimado calculando la diferencia entre muestras fumigadas y no-fumigadas, usando un factor de corrección (kc: 0.35).

### ***-Proteínas de suelo relacionadas con glomalina***

La glomalina es una glicoproteína producida por hongos formadores de micorrizas arbusculares, relacionada directamente con el contenido de C del suelo y la estabilidad de los agregados, presentando una gran adhesividad y resistencia a la degradación. Esta glicoproteína protege a las hifas durante el transporte de nutrientes desde la planta hasta el extremo de la hifa, y desde el suelo hasta la planta. Una vez que las hifas dejan de transportar nutrientes y senescen, la glomalina contenida en sus células se libera y se acumula en el suelo, representando el 5% del contenido de C y N edáfico (Treseder & Turner, 2006). Allí esta glicoproteína actúa como un aglutinante de minerales y materia orgánica, por lo que está en directa relación con la estabilidad de agregados y la estructura del suelo. Dado que las brassicáceas (una de las especies que se empleará como CC) no forman asociaciones mutualistas con hongos micorrícicos, será de utilidad cuantificar el efecto de la presencia de glomalina en parcelas con estos cultivos en comparación con las especies que si establecen la simbiosis.

Se determinó la forma fácilmente extraíble de la glomalina, de acuerdo con Wright y Upadhyaya (1996). Se pesó 1 g de suelo y se colocó en 8 mL de citrato de sodio 20 mM (pH 7,0), esterilizando luego la solución por autoclave (121°C) durante 30 minutos. Los extractos se centrifugaron a 5000 rpm por 7 min, de donde luego se extrajo una alícuota de 1 mL la cual fue nuevamente centrifugada a 10000 rpm por 3 min. La proteína en el sobrenadante se determinó utilizando microplacas mediante el empleo de la coloración de

Bradford con albúmina de suero de bovino como estándar. Este método permite estimar el contenido de proteínas de suelo relacionadas con la glomalina (PSRG). Se midió la absorbancia mediante espectrofotometría utilizando un lector de placa Elisa con un filtro de 595 nm (Wallac 1420 Victor2 multi-label counter, Perkin Elmer Life Sciences).

**2.4.2. Analizar la respuesta de parámetros químicos y físicos del suelo en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura, sembrados independientes o en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.**

### **Determinación de parámetros químicos**

Las determinaciones químicas fueron realizadas en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV – CONICET), Córdoba, y en la Estación Experimental INTA Pergamino, Buenos Aires. Se estudió la dinámica de macronutrientes fundamentales para el desarrollo del cultivo ante la inclusión de CC y la respuesta del pH debido a su fuerte influencia en la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas. Para el análisis de estos parámetros se utilizaron las siguientes metodologías:

#### ***Carbono orgánico de suelo (COS)***

El COS está compuesto por materiales frescos sin descomponer y cadenas carbonadas muy transformadas y estables. Es uno de los principales indicadores de la calidad del suelo y está relacionado con gran cantidad de propiedades físicas, químicas y biológicas edáficas. La determinación de COS (porcentaje) se realizó por combustión húmeda con el método de Walkley-Black (Page, 1982). Como controles de la técnica se utilizaron muestras patrón proveniente del mismo suelo previamente calibradas, bajo inter-laboratorios de nivel nacional.

### ***Nitrógeno total (NT)***

Alrededor del 90-95 % del N de suelo pertenece a la fracción orgánica. Uno de los métodos más difundidos para el análisis de este elemento es el de Kjeldahl modificado. Su determinación se basa esencialmente en una oxidación húmeda (Norma IRAM, 2009). Se advierte que una pequeña proporción de compuestos orgánicos que contienen enlaces N-N y N-O, y otros inorgánicos, como nitritos y nitratos, se determinan parcialmente. La digestión se realiza por calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico y catalizadores que promueven la oxidación de la materia orgánica y la conversión del N orgánico a amonio. El digesto se alcaliniza y el amoníaco que se desprende se recoge en ácido bórico y se titula con ácido valorado para cuantificar el contenido de N (Bremner, 1996).

### ***Fosforo extraíble (Pe)***

Se realizó por medio de una solución de fluoruro de amonio y ácido clorhídrico, que remueve del suelo las formas de P fácilmente solubles en ácidos (principalmente fosfatos de calcio y algunos fosfatos de hierro y aluminio) (Método Bray Kurtz 1 modificado, Norma IRAM, 2010). El ácido clorhídrico disuelve los fosfatos cálcicos. El fluoruro de amonio disuelve el fosfato ligado al Fe y aluminio, por formación de complejos con estos iones metálicos en una solución ácida. Los iones fosfatos, presentes en el extracto de suelo, al reaccionar con una solución ácida que contiene iones molibdato y antimonio forman una molécula compleja ácida de fosfato-molibdato-antimonio. En presencia de ácido ascórbico dicha molécula se reduce y desarrolla un color azul de intensidad proporcional a la concentración de iones fosfato y adecuado para mediciones espectrométricas, las cuales se realizan a 882 nm para cuantificar el Pe (Bray y Kurtz, 1945).

### ***pH de suelo***

Se determinó por el método potenciométrico en agua destilada (Norma IRAM 2009) en una relación 1:2.5 v/v suelo: agua con un periodo de equilibrio de una hora.

## **Determinación de Parámetros físicos**

Las determinaciones físicas fueron realizadas en la Estación Experimental INTA Pergamino, Buenos Aires. Se analizó la densidad aparente de suelo y la estabilidad estructural ante la inclusión de cultivos de cobertura, parámetros relacionados con la capacidad del suelo de brindar condiciones estructurales adecuadas para el sostén y crecimiento de los cultivos. Para el análisis de estos parámetros se utilizaron las siguientes metodologías:

### ***Estabilidad estructural (EE)***

Fue determinada mediante el método de Douglas y Goss (1982). Se pesaron 10 g de agregados de 1-2 mm de diámetro a capacidad de campo que fueron puestos en tamiz de 0,5 mm y sumergidos mecánicamente en agua durante 5 min. El índice de estabilidad fue calculado según el procedimiento de Kemper's (1965):

$$EE = (\text{Peso seco agregados sobre tamiz } (<0.5\text{mm}) / \text{Peso seco agregados } (1-2\text{mm})) * 100$$

### ***Densidad aparente (Dap)***

Fue cuantificada siguiendo metodología de Burke *et al.* (1986). Se evaluó por medio de un cilindro metálico de 281cm<sup>3</sup>, el cual fue previamente enterrado en la cara horizontal de un pequeño perfil de suelo (0-10cm) realizado en cada estación de muestreo.

**2.4.3. Establecer interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema, en correlación con la productividad de los cultivos principales (soja y maíz).**

### ***Rendimiento del grano de soja***

Se cuantificó el rendimiento total (kg/ha) del cultivo de soja luego de la cosecha de los sitios, para relacionarlo con los parámetros de fertilidad del suelo.

Las interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema y la productividad de los cultivos principales (soja y maíz) se realizaron mediante los correspondientes análisis estadísticos que se describirán más adelante.

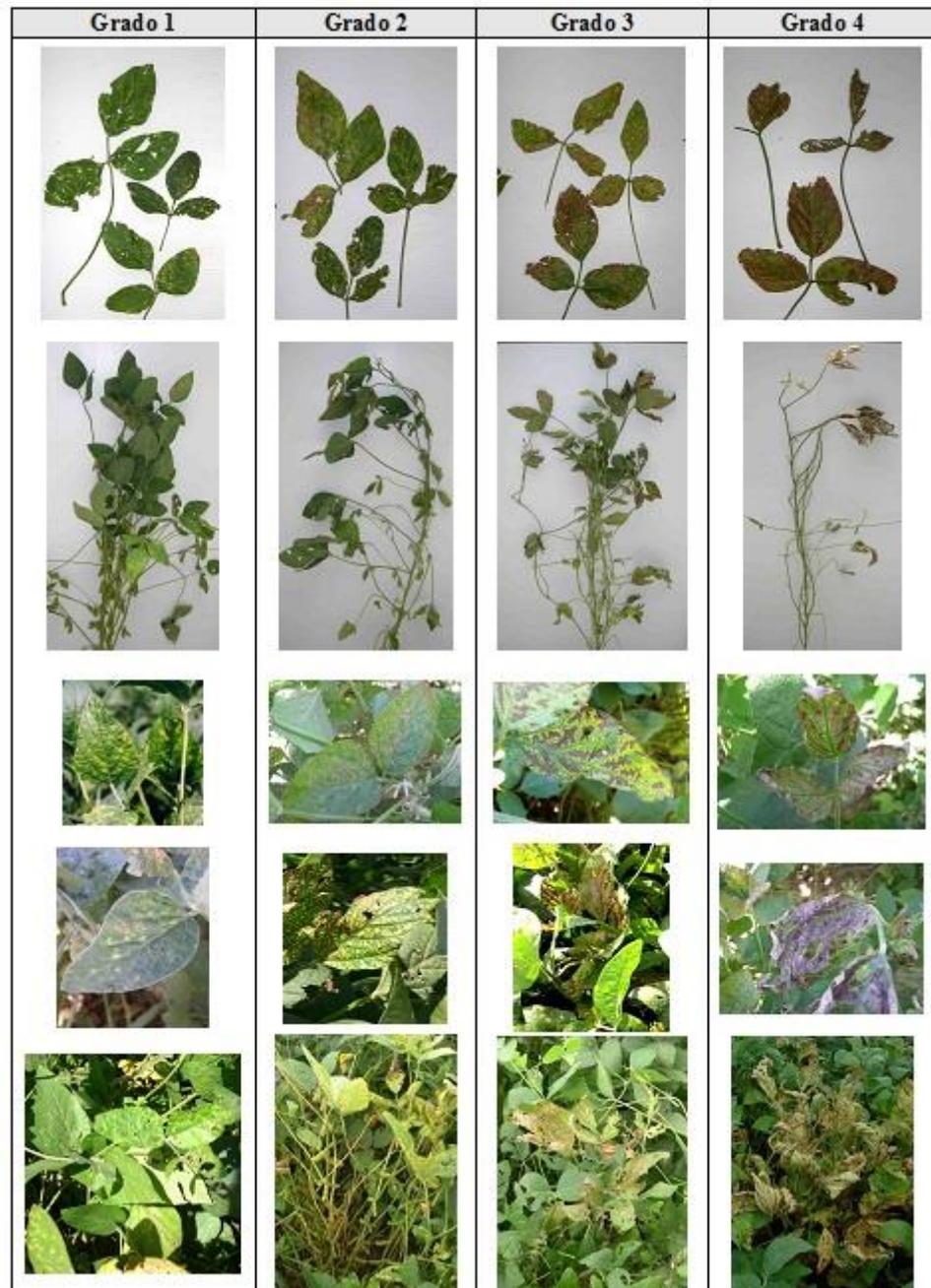
#### ***2.4.4. Relacionar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo.***

##### ***Síndrome de muerte súbita (SMS) en soja***

Se evaluó la presencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en el cultivo de soja en el estadio fenológico R4-5, período determinante para el futuro rendimiento del cultivo. Se detectó la presencia del síndrome de muerte súbita (SMS) en los años de evaluación del ensayo, por lo que se enfocaron las evaluaciones de enfermedades en la incidencia de este síndrome. El SMS es causado por un complejo de hongos de suelo pertenecientes al género *Fusarium*. En Argentina, de un total de 187 aislamientos causantes de SMS, el 87% fue identificado como *F. tucumaniae*, el 8% como *F. virguliforme*, el 4% como *F. crassistipitatum* y el 0,5% como *F. brasiliense* (O'Donnell *et al.*, 2010). Estos hongos son habitantes del suelo e infectan sólo las raíces, pero generan toxinas que son trasladadas al follaje y pueden causar clorosis y necrosis internerval, defoliación prematura y muerte de las plantas. Temperaturas menores que las normales (cerca de 15° C) y alta humedad edáfica, próximas a floración o comienzos de fructificación, favorecen el desarrollo de esta enfermedad, por mayor severidad de la podredumbre radicular. A su vez, para un óptimo desarrollo de síntomas foliares, se mencionan temperaturas del aire de 22 a 24° C. Si bien la infección se produce generalmente durante las primeras etapas del cultivo, los primeros síntomas se manifiestan a partir de floración (estadio R4-R5). La sintomatología se expresa mostrando “manchoneo” de plantas cloróticas dispersas en el lote. Los síntomas foliares típicos consisten en clorosis internerval y posterior necrosis. Se observa un menor desarrollo de la planta y podredumbre radical, por lo cual las plantas afectadas puedan ser fácilmente extraídas del suelo. En ocasiones se pueden observar signos sobre las raíces, representados por masa de conidios y manchado rojizo en el cuello de las plantas, las cuales

mueren prematuramente. La distribución en manchones de la enfermedad y la ausencia de fungicidas para su control, dificultan la estimación del efecto del SMS sobre el rendimiento en condiciones de campo con infestación natural del patógeno. Durante ciclo del cultivo de soja, el patógeno del SMS sobrevive como clamidosporas en el rastrojo o libres en el suelo. En primavera, a medida que la temperatura del suelo se eleva, las clamidosporas cercanas a las raíces de soja reciben el estímulo para germinar e infectarlas. Aunque durante el verano el patógeno puede producir esporas (macroconidios) sobre la superficie de la raíz principal, estas esporas sólo se dispersan a distancias cortas y dentro de la misma estación de crecimiento (Westphal *et al.*, 2008).

La determinación de incidencia del SMS se realizó evaluando al azar 4 estaciones de muestreo de 25 plantas cada una por sub-parcela (Lenzi *et al.*, 2010). Se contabilizaron las plantas de soja con síntomas de SMS y se asignó un grado de severidad siguiendo el esquema de la Fig. 4. Una sub-muestra de plantas con síntomas fue transportada al laboratorio para la posterior confirmación del agente causal.



**Fig. 4.** Escala diagramática de severidad en grados para el síndrome de muerte súbita en soja.  
Fuente: Lenzi *et al.* (2010).

### **2.4.5. Análisis estadístico**

Los parámetros biológicos, químicos y físicos se estudiaron mediante análisis de modelos lineales a dos factores (secuencia y cobertura) utilizando el software InfoStat-profesional (Di Rienzo *et al.*, 2013). Los datos obtenidos de las tres campañas evaluadas fueron promediados con el fin de estudiar el efecto de los tratamientos sobre las variables. Los efectos fijos fueron cobertura (CC1, CC2 y Testigo), secuencia (soja/soja y soja/maíz) y su interacción (cobertura\*secuencia), mientras que los efectos aleatorios del modelo fueron campaña y bloque. Todos los supuestos requeridos para el análisis de la varianza (ANOVA) fueron verificados. Al confirmar un valor de  $p$  estadísticamente significativo, se utilizó el test de Fisher ( $p < 0,05$ ) para comparación de medias. Siendo alguno de los efectos fijos de cobertura, secuencia o interacción no significativos estadísticamente ( $p > 0,05$ ), no se realizó la comparación de medias para dicho efecto. Para el análisis de PLFA, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados basado en distancia euclídea para caracterizar la composición de las comunidades microbianas. Se realizó ACP para analizar los datos CLPP y estudiar el efecto de los tratamientos sobre microbiana del suelo y las propiedades físicas. Las correlaciones entre variables microbiológicas, físicas y químicas se estimaron utilizando el coeficiente de Pearson con un nivel de significancia de  $p \leq 0,001$  y también se estudió el consenso entre grupos de variables realizando análisis multivariado de Procrustes.

## **-CAPITULO 3 -**

### **RESULTADOS**

**1- Evaluar la respuesta de la diversidad microbiana del suelo (estructura y funciones de las comunidades de microorganismos) en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.**

***-Evaluación de la estructura de las comunidades de microorganismos mediante el análisis de la perfiles de fosfolípidos (PLFA)***

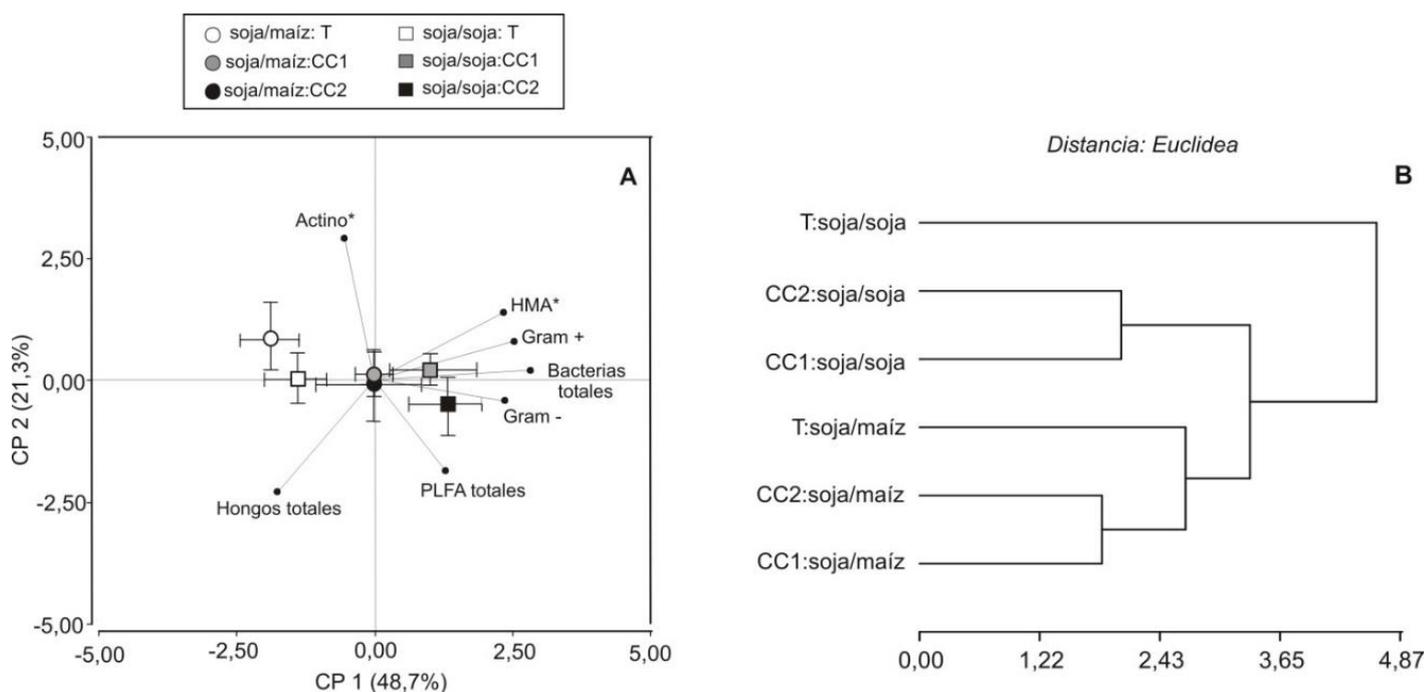
La estructura de las comunidades microbianas de suelo estimadas mediante perfiles fosfolipídicos se muestra en la Tabla 3. En los tres años durante los cuales se realizó el trabajo no se observó interacción significativa entre secuencia y CC ni tampoco efecto significativo de la secuencia de cultivo para este análisis. La biomasa total, representada mediante los PLFA totales, fue significativamente mayor en el tratamiento CC2 que en CC1 (10,3%) y que en el Testigo (21,9%). Los biomarcadores fosfolipídicos correspondientes a bacterias totales, bacterias Gram-negativas y HMA fueron significativamente mayores ante la inclusión de CC en relación con los tratamientos Testigo.

Los datos de perfiles fosfolipídicos fueron sujetos a un análisis de componentes principales (ACP) (Fig. 5-A). Las primeras componentes principales CP1 y CP2 representaron 48,7% y 21,3% de la variación total, respectivamente. En las parcelas bajo monocultivo de soja, se observó una clara separación entre el tratamiento Testigo y los tratamientos bajo CC a lo largo del CP1. En las parcelas bajo rotación soja/maíz, el tratamiento Testigo se separó de los tratamientos CC1 y CC2 también a lo largo del CP1. La mayor variabilidad en este análisis fue explicada por los biomarcadores fosfolipídicos correspondientes a comunidades bacterianas (bacterias totales, Gram-positivas, Gram-negativas). Estos resultados fueron confirmados por el análisis de conglomerados (Fig. 5-B). El dendrograma de perfiles fosfolipídicos mostró que los tratamientos Testigo tanto de parcelas bajo monocultivo de soja como de rotación soja/maíz se agruparon juntos constituyendo un grupo separado del resto de los tratamientos. Los tratamientos de CC correspondientes a rotación soja/maíz se separaron de los tratamientos de CC correspondientes a parcelas bajo monocultivo de soja, estos dos grupos se vincularon juntos a una mayor distancia Euclidea.

**Tabla 3.** Perfiles fosfolipídicos de suelo (nmol PLFA g<sup>-1</sup>) en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T) y diferentes secuencias de cultivo (soja/soja y soja/maíz); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD (P ≤ 0,05)

Cobertura	Biomasa total	Bacterias totales	Gram+	Gram-	HMA*	Hongos totales	Actino*
CC2	58,02 a	29,47 a	18,90 a	10,57 a	7,96a	3,44 a	5,38 a
CC1	52,41 b	29,24 a	18,92 a	10,31 a	7,69a	3,45 a	5,18 a
T	47,57 b	27,50 b	17,88 a	9,60 b	6,63 b	3,97 a	6,16 a
<b>P</b>							
Cobertura	0,0126	0,0075	0,1816	0,0018	0,0003	0,154	0,2275
Secuencia	0,728	0,1995	0,3439	0,1464	0,7993	0,5216	0,4796
Cobertura* secuencia	0,4143	0,3701	0,1304	0,6111	0,2998	0,9048	0,4153

\* HMA, Hongos micorrícicos arbusculares; Actino, Actinobacterias



**Fig. 5.** Análisis de componentes principales (A) y análisis de conglomerados (B) de los perfiles de fosfolípidos de suelo (nmol PLFA g<sup>-1</sup>) en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T) y diferentes secuencias de cultivo (soja/soja y soja/maíz), cuantificados en los años 2013,2014 y 2015. Las barras de error indican la desviación estándar.

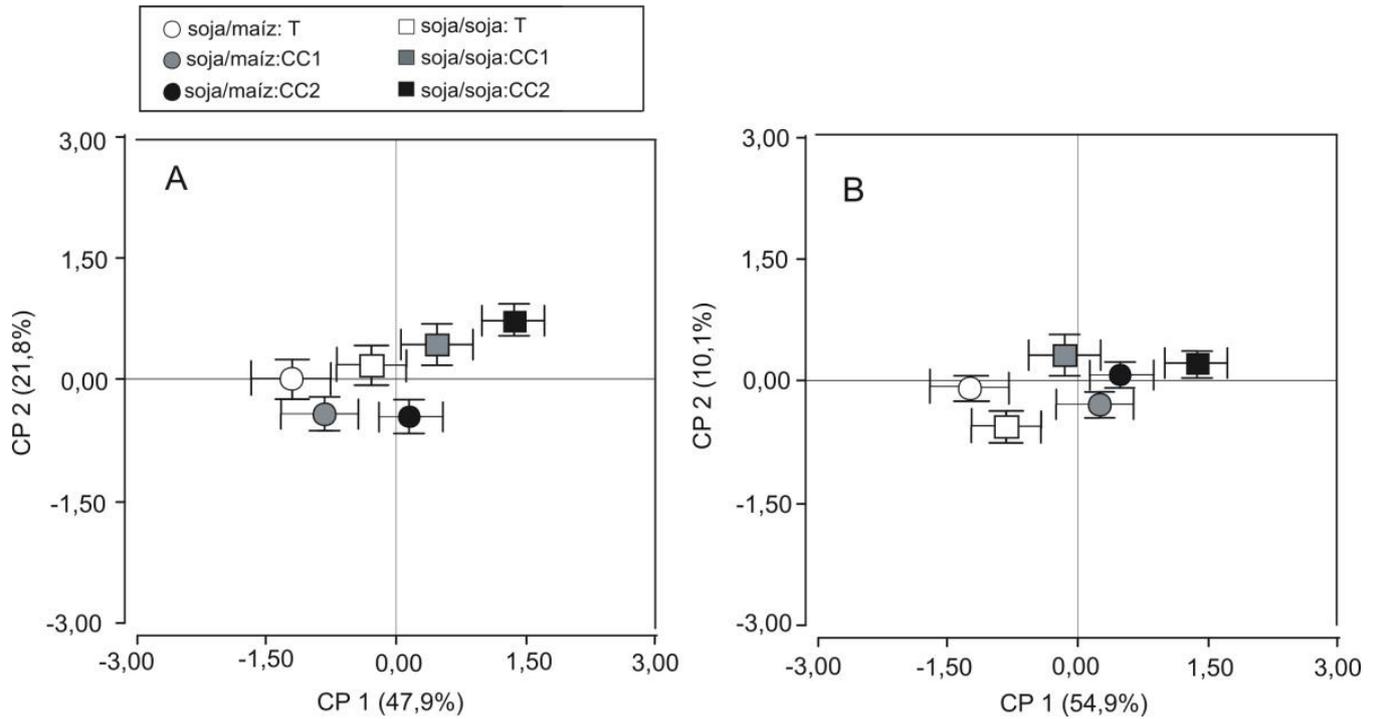
Abreviaciones: HMA, Hongos Micorrícicos Arbusculares; Actino, Actinobacterias

***Evaluación de las funciones de las comunidades de microorganismos mediante el análisis de:***

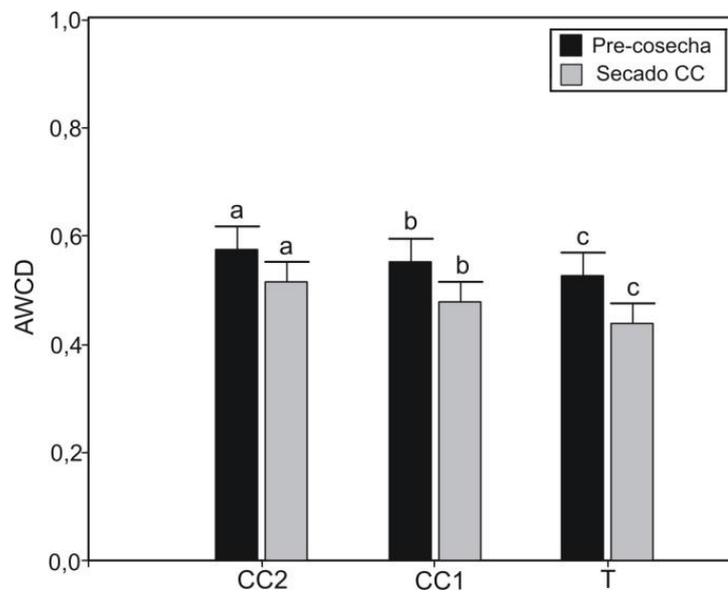
***- Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados***

Los resultados obtenidos de la utilización de sustratos carbonados con una incubación de 72 h se sometieron a un ACP. CLPP mostró un alto consumo general de los sustratos de C en los tratamientos de CC. Al momento de la cosecha de cultivos comerciales, los CP1 y CP2 representaron 47,9 y 21,8% de la varianza, respectivamente (Fig. 6-A). El tratamiento CC2 se separó de CC1 y del tratamiento Testigo a lo largo del CP1 tanto en monocultivo y parcelas bajo rotación soja /maíz. Se observó un efecto aún más marcado de la inclusión de CC en la diversidad catabólica al momento del secado de los mismos (Fig. 6-B), ya que en este momento de muestreo el CP1 y CP2 explicaron 54,9 y 10,1% de la varianza de datos, respectivamente. Al momento de secado de los CC, el tratamiento Testigo de la rotación soja/maíz fue separado de ambos tratamientos bajo CC. El mismo comportamiento se observó al momento de cosecha de cultivos comerciales en parcelas de monocultivo de soja, donde CC2 se separó de los restantes tratamientos a lo largo del CP1.

Los datos de absorbancia obtenidos de CLPP a las 72 h se utilizaron para calcular el desarrollo promedio de color de la celda (AWCD), como se muestra en la Fig. 7. El efecto de la secuencia y la interacción entre la secuencia y CC no fueron significativos para esta variable en cada momento de muestreo analizado. Al momento de cosecha de cultivos comerciales, el tratamiento CC2 (0,58) fue significativamente mayor que CC1 (0,55) y el Testigo (0,53), siendo CC1 mayor significativamente que el Testigo. La misma tendencia se observó al momento del secado de los CC, siendo el tratamiento CC2 (0,52) significativamente mayor que el CC1 (0,48) y el Testigo (0,44), además con diferencia significativa entre ellos.



**Fig. 6.** Biplot de la diversidad de consumo de fuentes carbonadas cuantificado en 2013/14/15 en pre-cosecha del cultivo comercial (A) y en secado de cultivos de cobertura (B), bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T) y diferentes secuencias de cultivo (soja/soja y soja/maíz)



**Fig. 7.** Promedio de desarrollo de color de celda (AWCD) cuantificado en 2013/14/15 en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T) y diferentes secuencias de cultivo (soja/soja y soja/maíz); Barras de mismocolor y letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### **- Actividades enzimáticas**

Durante los años de estudio se registró un incremento significativo de las actividades enzimáticas analizadas ante la inclusión de los CC (Tabla 4). La hidrólisis de FDA fue significativamente mayor en virtud de la inclusión de CC en los dos momentos de muestreo del ciclo agrícola para las tres campañas evaluadas. Al momento de pre-cosecha de cultivos comerciales, FDA fue 20,3 y 14,1% mayor en los tratamientos CC2 y CC1, respectivamente, que en el Testigo, siendo CC2 5,2% mayor que CC1. Al momento de secado de los CC, FDA fue 21,7 y 11,6% mayor en CC2 y CC1 que en el Testigo, respectivamente, y un 9,0% mayor en tratamiento CC2 en comparación con el CC1. En este muestreo se registró interacción significativa entre la cobertura y secuencia (Fig. 8-A) para esta variable, donde el tratamiento maíz/soja-CC2 y los tratamientos soja/soja-CC2 y soja/soja-CC1 presentaron los mayores valores de hidrólisis de FDA.

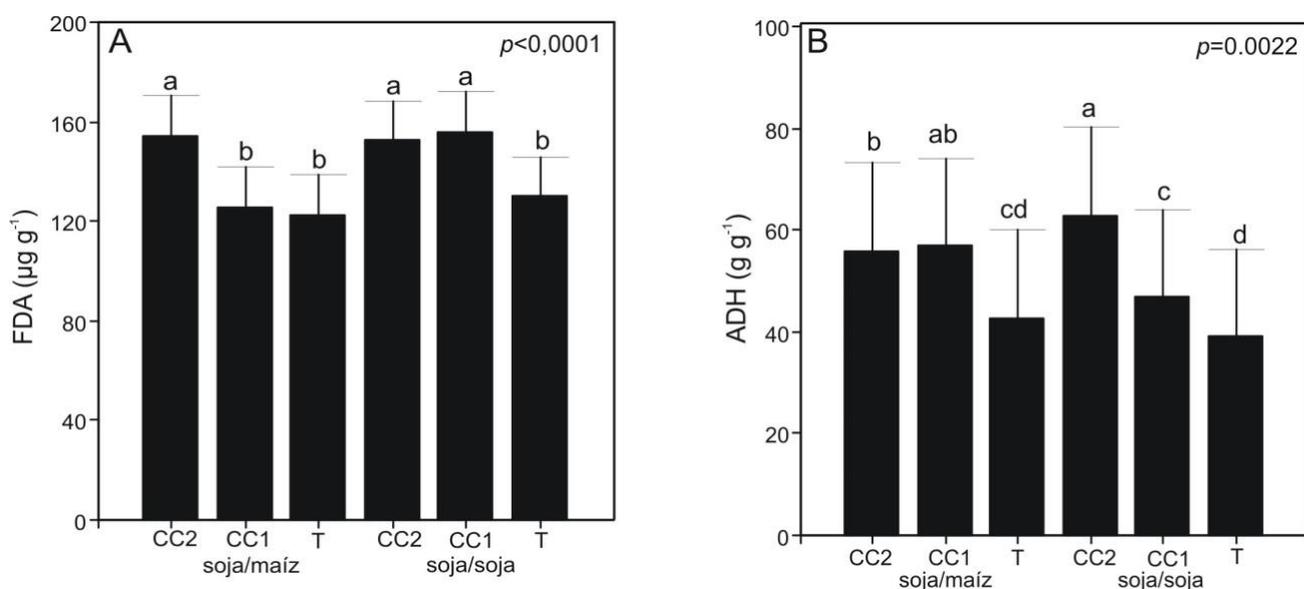
La actividad deshidrogenasa (ADH) mostró una tendencia similar a FDA. Al momento de pre-cosecha, se registró un incremento de 45,0 y 26,5%, en CC2 y CC1, respectivamente, con respecto al tratamiento Testigo, siendo CC2 14,6% mayor que CC1. En este muestreo se observó interacción significativa entre la cobertura y secuencia (Fig. 8-B) siendo el tratamiento soja/soja-CC2 el que presentó mayores valores de ADH. Al momento de secado de los CC se observó la misma tendencia, con ADH siendo 27,9 y 14,2% mayor en CC2 y CC1 que en el Testigo, respectivamente, siendo CC2 un 11,9% mayor que CC1.

La actividad de la enzima fosfatasa ácida (FA), presentó resultados similares al resto de las enzimas. En pre-cosecha, los tratamientos CC1 y CC2 fueron estadísticamente mayores que el Testigo en 23,4 y 13,4%, respectivamente para esta actividad enzimática, siendo CC2 8,8% significativamente mayor que CC1. Al secado de los CC se evidenció la misma tendencia, siendo CC2 y CC1 31,3 y 23,6% estadísticamente mayores que el Testigo, respectivamente, pero sin diferencias significativas entre CC2 y CC1.

**Tabla 4.** Hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) Actividad deshidrogenasa (DHA) y Actividad fosfatasa ácida (FA) en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T) y diferentes secuencias de cultivo (soja/soja y soja/maíz); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ )

Cobertura	Pre-cosecha			Secado de CC		
	FDA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	ADH ( $\text{g g}^{-1}$ )	FA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	FDA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	ADH ( $\text{g g}^{-1}$ )	FA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
CC2	128,19 a	59,42 a	1190,72 a	153,62 a	61,55 a	1011,56 a
CC1	121,59 b	51,82 b	1094,29 b	140,91 b	54,98 b	952,2 a
T	106,54 c	40,96 c	964,87 c	126,21 c	48,12 c	770,02 b
<b>P</b>						
Cobertura	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Secuencia	0,4916	0,2631	0,0581	0,4015	0,0596	0,0759
Cobertura* secuencia	0,2033	0,0022	0,7718	<0,0001	0,401	0,4583

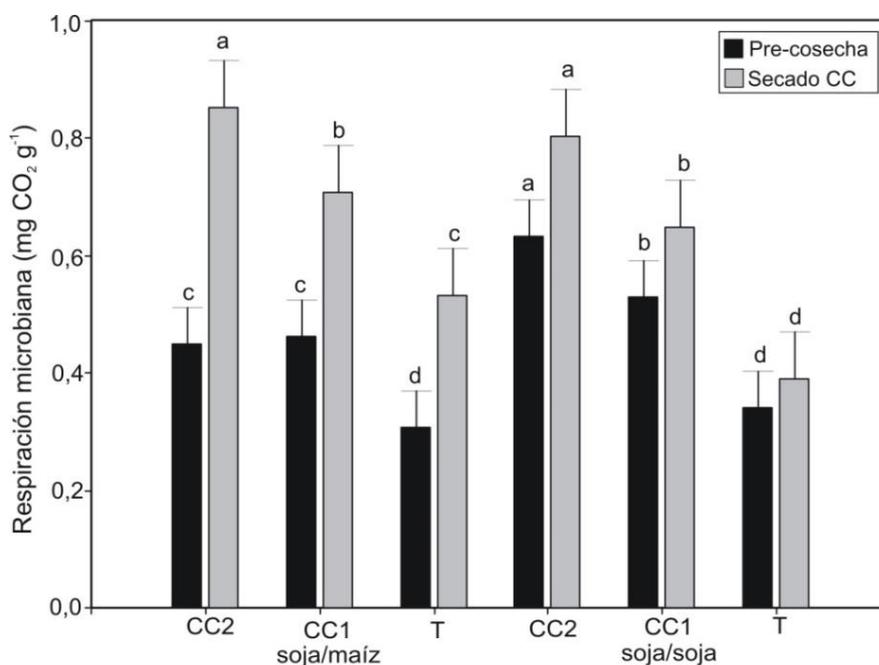
P: Nivel de significancia observado a  $P < 0,05$



**Fig. 8.** Efecto de la interacción cobertura\*secuencia para la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) en secado de los cultivos de cobertura (CC) (A) y de la actividad deshidrogenasa (ADH) en pre-cosecha de cultivos comerciales (B) cuantificada en los años 2013/14/15, bajo diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T) y diferentes secuencias de cultivo (soja/soja y soja/maíz); letras distintas son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### **-Respiración microbiana**

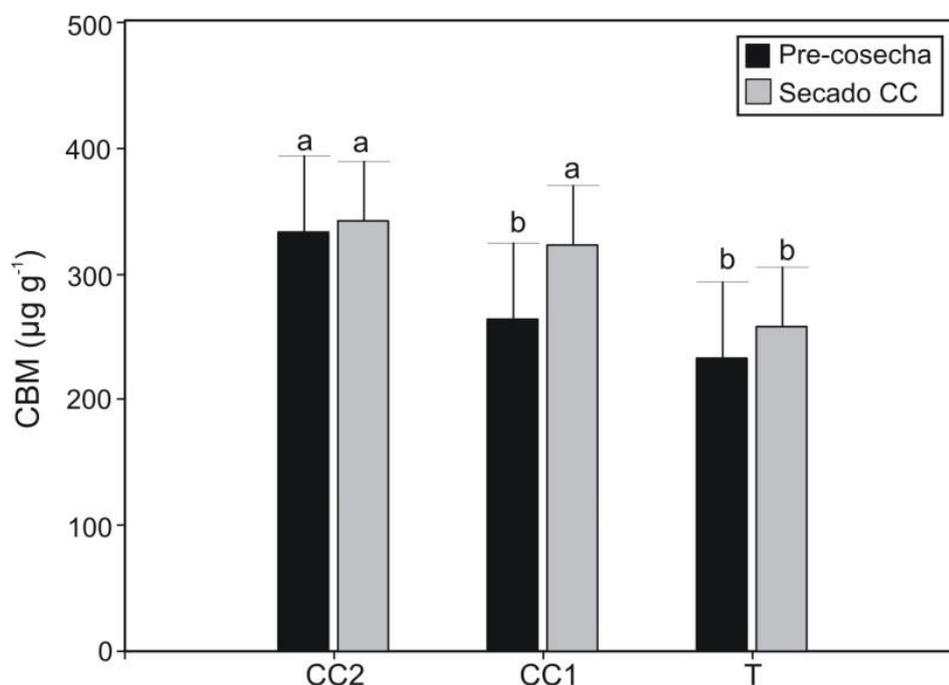
La respiración microbiana de suelo se comportó de manera similar en los dos momentos de muestreo (Fig. 9.) para los tres años en los que se realizó el estudio, presentando interacción significativa entre la secuencia y los CC. Al momento de pre-cosecha de los cultivos comerciales, se observó un incremento en la respiración microbiana de 45,1% y 48,3% en CC2 y CC1 con respecto al Testigo en parcelas bajo rotación soja/maíz. Por otro lado, en parcelas bajo monocultivo de soja se registró un aumento significativo del 85,2% y 55,8% en CC2 y CC1 con respecto al Testigo, siendo CC2 superior a CC1 en un 18,8%. El tratamiento soja/soja-CC2 presentó los mayores valores de respiración microbiana en esta época de muestreo. Al momento de secado de los CC, se observó un efecto evidente de la inclusión de la secuencia CC2 en el ensayo. En parcelas bajo rotación soja/maíz, CC2 fue 19,7% y 60,3% estadísticamente mayor que CC1 y el Testigo, respectivamente, mientras que en las parcelas bajo monocultivo de soja CC2 fue 23,1% y 105,3% mayor que CC1 y el Testigo, respectivamente. En esta época de muestreo, el tratamiento soja/maíz-CC2 presentó los mayores valores de respiración microbiana.



**Fig. 9.** Efecto de la interacción cobertura\*secuencia para respiración microbiana en pre-cosecha de cultivos comerciales y en secado de los cultivos de cobertura (CC) cuantificada en los años 2013/14/15, en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de CC, CC1 (Avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T) y diferentes secuencias de cultivo (soja/maíz y soja/soja); Barras del mismo color y letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### **-Carbono de la biomasa microbiana (CBM)**

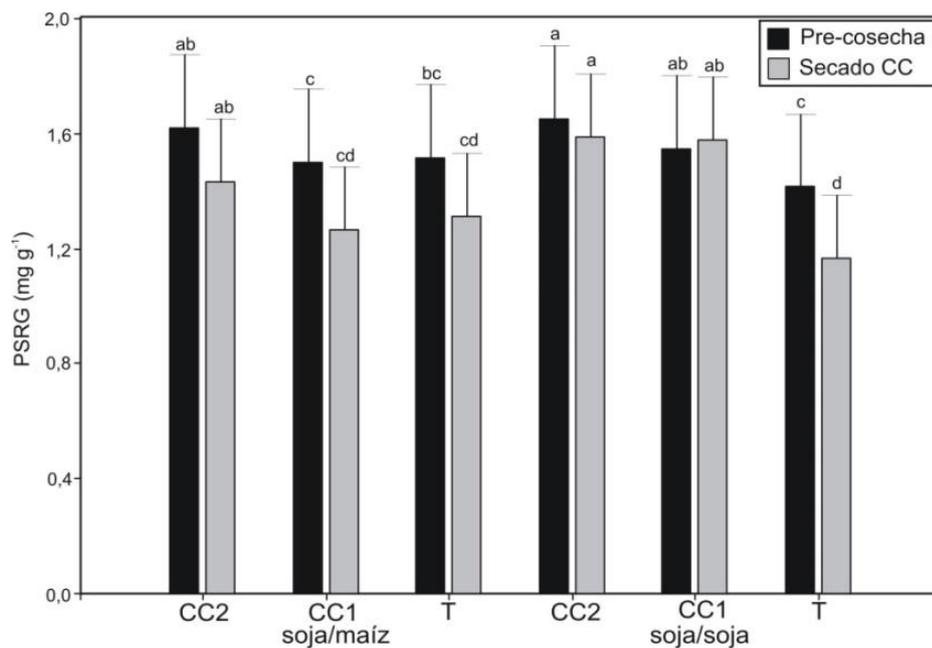
La cantidad de CBM fue claramente afectada por la inclusión de CC (Fig. 10). No se observó interacción significativa entre la secuencia y los CC, o efecto significativo de la secuencia para este análisis. Los resultados mostraron un aumento evidente en el contenido de CBM bajo la inclusión de tratamientos con CC, presentando la consociación CC2 los valores más altos para esta variable. CC2 fue 26,4% y 43,2% estadísticamente mayor que CC1 y el Testigo, respectivamente, en el momento de pre-cosecha de cultivos comerciales. Al momento de secado de CC tanto CC2 como CC1 fueron 32,8% y 25,5% estadísticamente mayores que el Testigo, respectivamente.



**Fig. 10.** Carbono de la biomasa microbiana (CBM) cuantificado en 2013/14/15 en pre-cosecha del cultivo comercial y en secado de cultivos de cobertura (CC), bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (Avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras de mismo color y letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### ***-Proteínas de suelo relacionadas con glomalina (PSRG)***

Los resultados de PSRG presentaron interacción significativa entre secuencia y CC (Fig. 11). Al momento de pre-cosecha de los cultivos comerciales, se registraron valores entre 1,55 y 1,65 mg g<sup>-1</sup> de suelo en los tratamientos bajo CC siendo superiores estadísticamente a los Testigos que no superaron 1,50 mg g<sup>-1</sup>. Los tratamientos CC2 mostraron los mayores valores con respecto a CC1 para ambas secuencias de cultivo comercial en esta época, siendo el tratamiento soja/maíz-CC1 el que presentó menor valor (1,50 mg g<sup>-1</sup>), con respecto a los otros tratamientos con CC. Al momento de secado de los CC, se observó la misma tendencia presentando los tratamientos con CC valores entre 1,43 y 1,59 mg g<sup>-1</sup> y los Testigos valores hasta 1,30 mg g<sup>-1</sup>. Se observó un menor contenido de PSRG (1,26 mg g<sup>-1</sup>) en el tratamiento maíz/soja-CC1 con respecto a los demás tratamientos con CC y el mayor fue el tratamiento soja/soja-CC2 (1,59 mg g<sup>-1</sup>).



**Fig. 11.** Efecto de la interacción cobertura\*secuencia para el contenido de proteínas de suelo relacionadas con glomalina (PSRG) en pre-cosecha de cultivos comerciales y en secado de los cultivos de cobertura (CC) medida en los años 2013/14/15, en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de CC, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras del mismo color y letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

**2- Analizar la respuesta de parámetros químicos y físicos del suelo en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.**

- **Determinación de parámetros químicos**

### ***Carbono orgánico de suelo (COS)***

El C orgánico de suelo (COS) mostró un marcado incremento en respuesta a la inclusión de CC (Tabla 5); no se observó interacción significativa entre la secuencia y los CC, o efecto significativo de la secuencia para este análisis. Al momento de cosecha de los cultivos comerciales, se observó un efecto significativo de la inclusión CC, siendo el COS estadísticamente mayor en CC2 (22,57 mg g<sup>-1</sup>) y en CC1 (22,67 mg g<sup>-1</sup>) en comparación con el tratamiento Testigo (21,18 mg g<sup>-1</sup>). Al momento de secado de los CC se registró esta misma tendencia, siendo estadísticamente mayor el contenido de COS en CC2 (26,06 mg g<sup>-1</sup>) y CC1 (25,99 mg g<sup>-1</sup>) en comparación con el Testigo (20,89 mg g<sup>-1</sup>). No se observaron diferencias significativas entre las dos mezclas de especies utilizadas como CC para esta variable.

### ***Nitrógeno Total (NT) y Fósforo extraíble (Pe)***

No se observó interacción significativa entre la secuencia y los CC o influencia significativa de la secuencia en los valores de NT y Pe, no obstante, se registró un efecto significativo de la inclusión CC para el NT en el muestreo de pre-cosecha en la consociación más diversificada (Tabla 5). Al momento de pre-cosecha de los cultivos comerciales, los valores de NT aumentaron en respuesta a la inclusión de CC2 (2,78 mg g<sup>-1</sup>), siendo estadísticamente mayor que CC1 (2,06 mg g<sup>-1</sup>), y el Testigo (1,96 mg g<sup>-1</sup>). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para los valores de Pe, que oscilaron entre 1,57 y 1,90 mg g<sup>-1</sup>. Al momento de secado de los CC, se volvió a observar la misma tendencia siendo el tratamiento CC2 (1,40 mg g<sup>-1</sup>) mayor estadísticamente a CC1 (1,19 mg g<sup>-1</sup>) y el

Testigo ( $0,99 \text{ mg g}^{-1}$ ) para la variable NT. Los valores de Pe no registraron diferencias estadísticas significativas y variaron entre  $1,98$  y  $1,72 \text{ mg g}^{-1}$ .

**Tabla 5.** Carbono orgánico de suelo (COS), Nitrógeno Total (NT), Fósforo extraíble (Pe), pH, en pre-cosecha del cultivo comercial bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (avena/nabo forrajero), y Testigo (T); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ).

Cobertura	Pre-cosecha			Secado CC		
	COS ( $\text{mg g}^{-1}$ )	NT ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Pe ( $\text{mg g}^{-1}$ )	COS ( $\text{mg g}^{-1}$ )	NT ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Pe ( $\text{mg g}^{-1}$ )
CC2	22,93 a	2,78 a	1,90 a	26,06 a	1,40 a	2,72 a
CC1	22,90 a	2,06 b	1,88 a	25,99 a	1,19 b	2,25 a
T	20,57 b	1,96 b	1,57 a	20,89 b	0,99 b	1,98 a
<b>P</b>						
Cobertura	<0,0001	0,0106	0,3425	<0,0001	0,0044	0,3084
Secuencia	0,0716	0,1853	0,5515	0,5808	0,6578	0,724
Cobertura*secuencia	0,0715	0,0970	0,3419	0,1216	0,4379	0,4932

P: Nivel de significancia observado a  $P < 0.05$

### **Relación C:N y pH**

Los valores de la relación C:N presentaron una leve disminución frente a la inclusión de CC (Tabla 6). El tratamiento soja/maíz-T presentó el mayor valor de esta relación ( $13,43$ ) seguido del tratamiento soja/soja-CC1 ( $12,51$ ), siendo el tratamiento soja/soja-CC2 el de menor valor de C:N ( $8,87$ ).

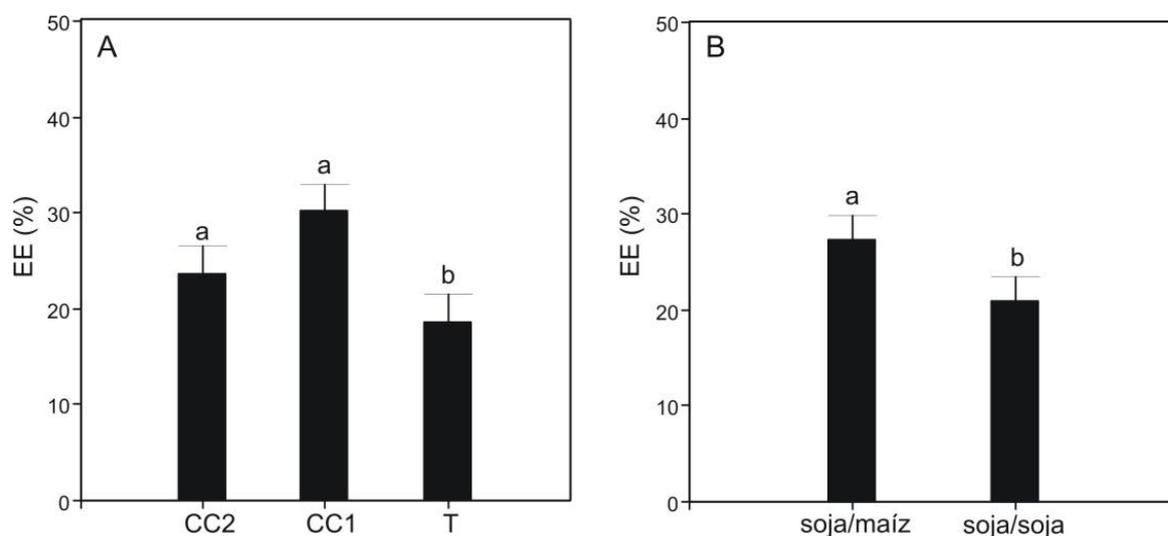
Se registraron valores levemente ácidos de pH en los suelos estudiados (Tabla 6). Los tratamientos Testigo de ambas secuencias de cultivo comercial (soja/soja y soja/maíz) presentaron los valores más bajos de pH ( $5,52$ ) siendo estadísticamente menores a los valores registrados bajo CC en la secuencia soja/soja. Los tratamientos bajo CC valores entre  $5,56$  y  $6,00$ .

**Tabla 6.** Relación C:N y pH cuantificados en pre-cosecha del cultivo comercial bajo diferentes consociaciones de CC, CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CCI (avena/nabo forrajero), y Testigo (T); en cada columna diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ).

Tratamiento	C:N	pH
soja/maíz-CC2	10,93 <b>b</b>	5.56 <b>c</b>
soja/maíz-CC1	11,9 <b>a</b>	5.64 <b>bc</b>
soja/maíz-T	13,43 <b>a</b>	5.52 <b>c</b>
soja/soja-CC2	8,87 <b>b</b>	6.00 <b>a</b>
soja/soja-CC1	12,51 <b>a</b>	5.85 <b>ab</b>
soja/soja-T	9,87 <b>b</b>	5.52 <b>c</b>

- **Determinación de parámetros físicos**

No se observó diferencia significativa con respecto a la Dap en las tres campañas estudiadas (datos no mostrados). Por otro lado, la EE, evaluada al momento de pre-cosecha del cultivo comercial, registró una respuesta positiva a la inclusión de los CC. No se observó interacción significativa entre la secuencia de cultivo y los CC (datos no mostrados). Ambos tratamientos bajo CC generaron un incremento significativo en la estabilidad de agregados (Fig. 12-A), siendo CC1 y CC2 62,3 y 27,3%, respectivamente, mayores en relación al tratamiento Testigo. En cuanto al efecto de la secuencia agrícola, las parcelas bajo rotación soja/maíz presentaron valores 26,4% estadísticamente mayores para la EE en comparación con las parcelas bajo soja/soja (Fig. 12-B).

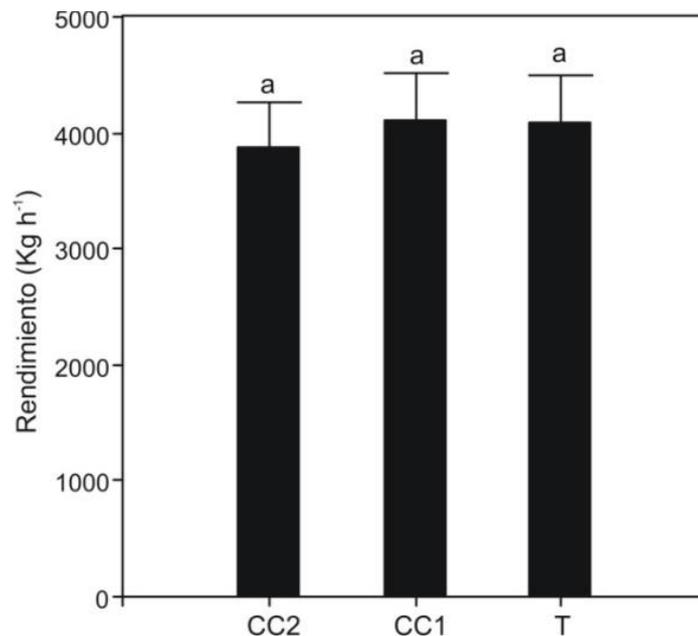


**Fig. 12.** Efecto de la inclusión de cultivos de cobertura (CC) (A) y de la secuencia soja/maíz y soja/soja (B) sobre la estabilidad estructural (EE) en pre-cosecha de cultivos comerciales cuantificada en los años 2013/14/15, bajo diferentes consociaciones de CC, CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (Avena/nabo forrajero), y Testigo (T); Barras de letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

**3- Establecer interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema, en correlación con la productividad de los cultivos principales (soja y maíz).**

***Rendimiento de grano de soja***

No se observaron diferencias estadísticas en el rendimiento del grano de soja entre los tratamientos bajo CC (Fig. 13) durante el período de estudio. El rendimiento promedio en parcelas bajo CC2 cuantificado en los tres años de evaluación fue de 3873,17 Kg h<sup>-1</sup>, en parcelas bajo CC1 fue de 4113,17 Kg h<sup>-1</sup>, mientras que el Testigo presentó un promedio de 4096,78Kg h<sup>-1</sup>. La producción de materia seca de los CC (Tabla 7) fue estadísticamente mayor en CC2 en un 25,2% con respecto a CC1, sin efecto significativo de la secuencia de cultivo comercial ( $p = 0,423$ )



**Fig. 13.** Rendimiento (Kg ha<sup>-1</sup>) del grano de soja en parcelas bajo diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (avena/nabo forrajero) y Testigo (T); Barras de diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ).

**Tabla 7.** Rendimiento del grano de soja y producción de materia seca de los cultivos de cobertura (CC) cuantificado durante 2013/14/15; CC2 (avena/nabo forrajero/vicia), CC1 (avena/nabo forrajero) y Testigo (T);

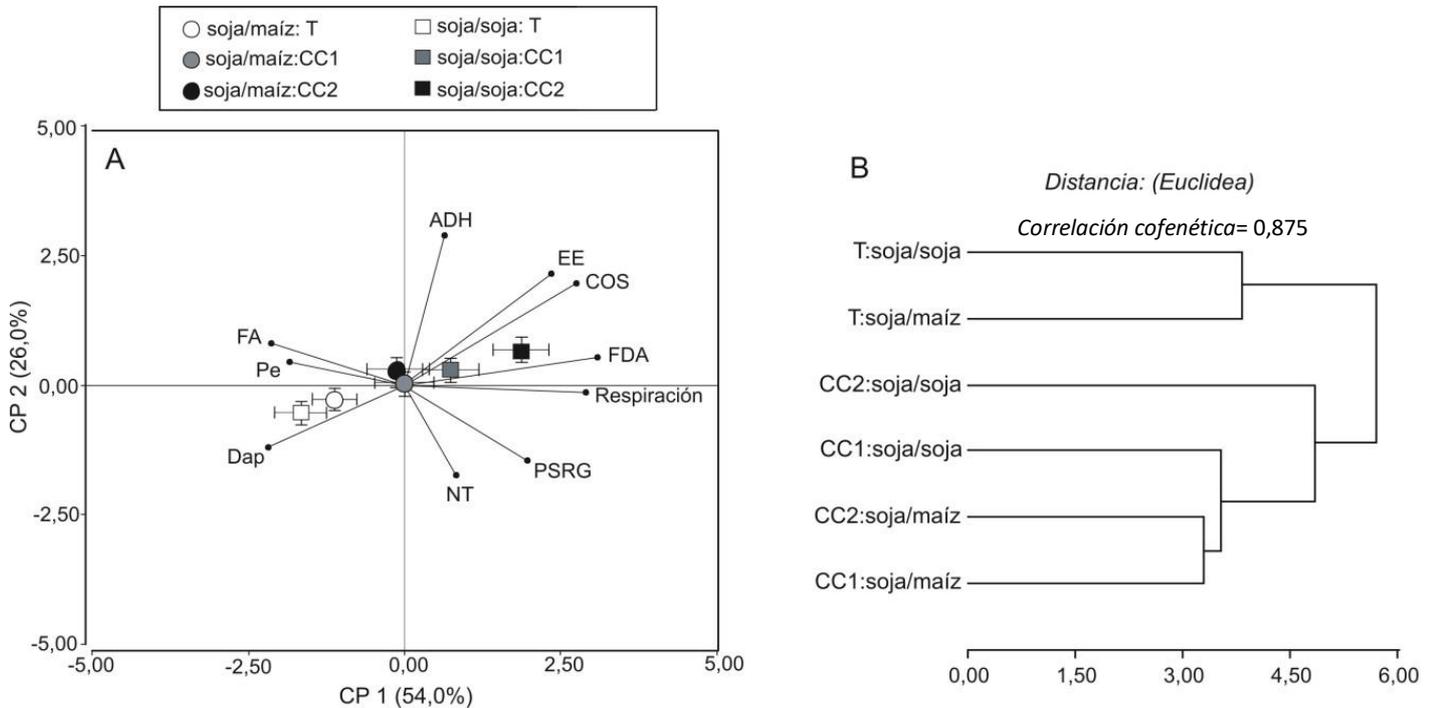
Cobertura	Rendimiento de soja	Materia seca CC
	(Kg h <sup>-1</sup> )	(Kg h <sup>-1</sup> )
CC2	3873,17 a	9332,5 a
CC1	4113,17 a	7453,67 b
T	4096,78 a	-

### *Relación entre funcionalidad microbiana y parámetros químicos y físicos edáficos*

Las relaciones entre variables correspondientes al análisis de funcionalidad microbiana y el análisis químico y físico edáfico fueron estudiadas mediante análisis multivariados (Fig. 14 – A y B) y análisis de correlación (Tabla 8). El ACP (Fig. 14-A) mostró una clara separación entre los tratamientos Testigo y los tratamientos bajo CC a lo largo de la CP1, la cual explicó 54,0% de la variabilidad, mientras que la CP2 explicó 26,0%. Además, el tratamiento soja/soja-CC2 registró una clara separación del resto de los tratamientos a lo largo de la CP1. En este análisis se puede observar que las variables COS, EE, FDA y respiración microbiana se correlacionaron positivamente entre si y mostraron una correlación negativa con la Dap, mientras que las variables FA y Pe estuvieron correlacionadas positivamente entre sí. El agrupamiento de tratamientos observado en el ACP fue verificado mediante un análisis de conglomerados (Fig. 14-B.) donde los tratamientos Testigo conformaron un grupo separado del resto de los tratamientos. Además, el tratamiento soja/soja-CC2 conformó un grupo distinto del resto para unirse a una distancia euclídea mayor a los tratamientos bajo CC.

Las relaciones entre variables observadas en el ACP fueron verificadas por el análisis de correlación (Tabla 8), donde se registraron valores del coeficiente de Pearson de 0,67; 0,57 y 0,56 entre COS y FDA, ADH y respiración, respectivamente. También, la variable PSRG se correlacionó positivamente con ADH, respiración microbiana, NT, COS y EE presentando valores de coeficiente entre 0,20 y 0,74. Las variables FA y Pe también presentaron una correlación positiva con un coeficiente de 0,58. Considerando los valores

de los coeficientes de Pearson registrados, se realizaron análisis de regresión lineal entre COS y respiración microbiana (Fig. 15-A), FDA (Fig. 15-B) y ADH (Fig. 15-C), siendo los valores  $R^2$  de 0,75; 0,79 y 0,72, respectivamente.



**Fig. 14.** Análisis de componentes principales (CP) (A) y análisis de conglomerados (B) correspondientes a variables de funcionalidad microbiana, variables químicas y físicas, cuantificadas en 2013/14/15 en parcelas bajo rotación soja/maíz y monocultivo de soja (soja/soja) con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T). Siglas: Fluoresceína de diacetato (FDA), actividad deshidrogenasa (ADH), fosfatasa ácida (FA), proteínas de suelo relacionadas con glomalina (PSRG), Nitrógeno total (NT), Fósforo extraíble (Pe), Carbono orgánico de suelo (COS), estabilidad estructural (EE), densidad aparente (Dap).

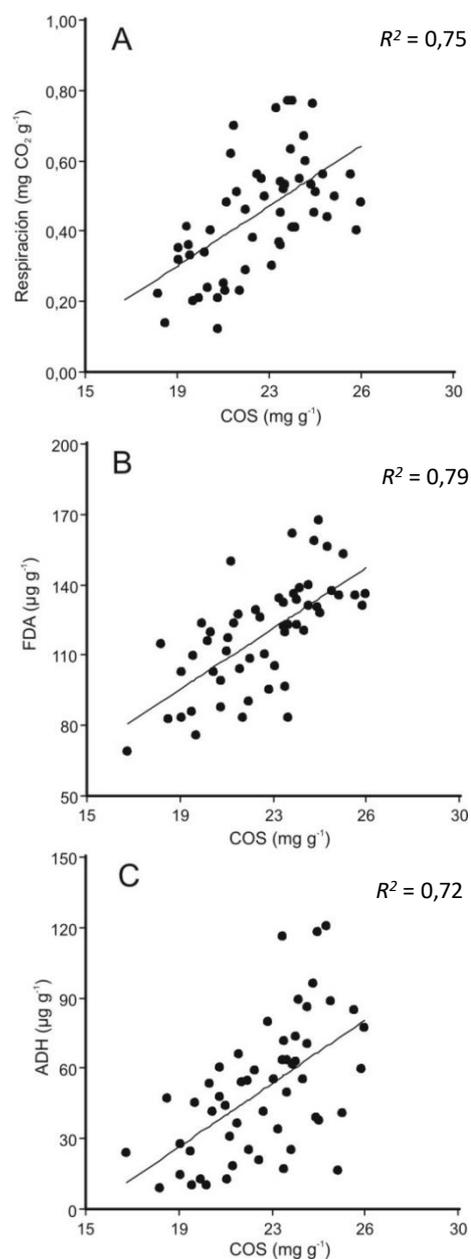
### ***Relación entre estructura y funcionalidad microbiana***

Se determinó la relación entre los principales grupos microbianos (Bacterias y Hongos) y la actividad enzimática de suelo de las tres enzimas analizadas con el objetivo de conocer la proporción de enzimas asociadas al incremento microbiano y enzimas extracelulares estabilizadas en los compuestos húmicos del suelo. La relación entre actividades enzimáticas y PLFA de bacterias totales (Fig. 16-A) registró un incremento significativo en las parcelas con tratamiento CC2 particularmente, siendo 14,2; 19,2 y 15,3%

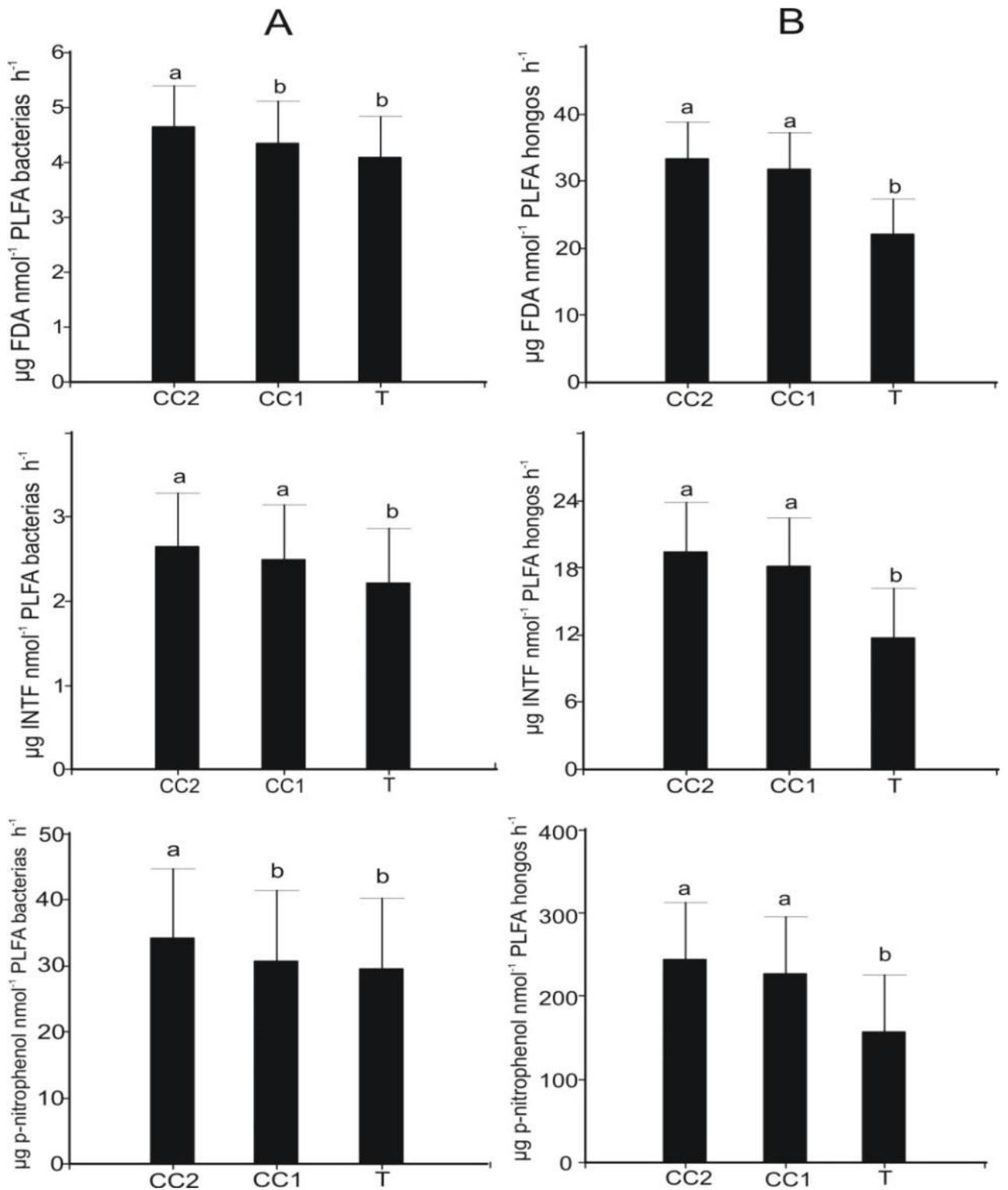
más alto que el tratamiento Testigo para la hidrólisis FDA, ADH y FA, respectivamente. La relación entre actividades enzimáticas y PLFA de hongos totales (Fig. 16-B) fue significativamente mayor para ambos tratamientos bajo CC, siendo en promedio 47,5; 59,0 y 50,0 % más alta que el tratamiento Testigo para la hidrólisis FDA, ADH y FA, respectivamente.

**Tabla 8:** Análisis de correlación entre variables microbiológicas, químicas y físicas estudiadas en pre-cosecha, durante los años 2013/14/15.

	PSRG	FDA	ADH	Respiración	Fosfatasa	Pe	NT	COS	Rendimiento	EE	Dap
PSRG	1	0,620	0,000	0,000	0,004	0,180	0,000	0,040	0,002	0,000	0,000
FDA	0,030	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,680	0,000
ADH	0,620	0,340	1	0,040	0,370	0,970	0,000	0,000	0,140	0,810	0,000
Respiración	0,200	0,560	0,110	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030	0,550	0,000
Fosfatasa	-0,160	-0,570	0,050	0,300	1	0,000	0,000	0,000	0,080	0,000	0,000
Pe	-0,070	-0,470	-0,002	-0,240	0,580	1	0,000	0,000	0,096	0,000	0,000
NT	0,740	0,320	-0,630	0,340	-0,550	-0,310	1	0,690	0,000	0,810	0,450
COS	0,120	0,670	0,570	0,560	-0,290	-0,240	-0,020	1	0,002	0,040	0,000
Rendimiento	0,170	0,330	-0,080	0,120	-0,500	-0,150	0,390	0,170	1	0,001	0,010
EE	0,220	0,020	0,010	0,030	0,200	0,480	0,010	0,110	0,180	1	0,000
Dap	-0,230	-0,480	-0,300	-0,340	0,430	0,250	-0,040	-0,290	-0,140	-0,210	1



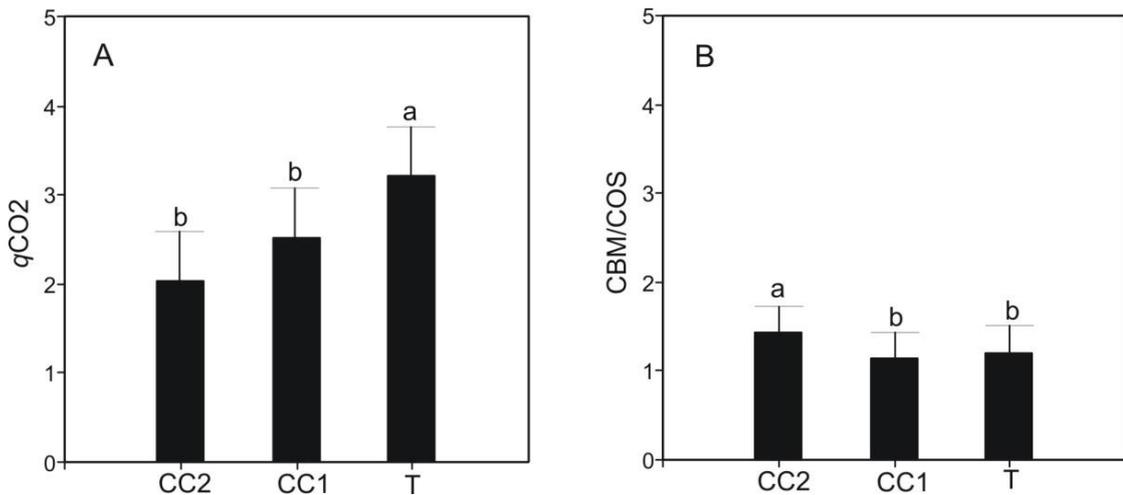
**Fig. 15.** Regresiones lineales entre C orgánico de suelo (COS) y respiración microbiana (A), hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) (B) y actividad deshidrogenasa (ADH) (C), medida en los años 2013/14/15 en pre-cosecha.



**Fig. 16.** Relaciones entre actividades enzimáticas de suelo y PLFA bacteriano (A) y PLFA fúngico (B), medidas en 2013/14/15 en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (Avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras condiferente letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### *Cociente metabólico y cociente microbiano*

El cociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) se determinó mediante la relación entre el  $\text{CO}_2$  emitido durante la respiración basal y el CBM y el cociente microbiano (CBM/COS) se determinó, mediante la relación entre el C de la biomasa microbiana, sobre el C orgánico por cien (Anderson y Domsch, 1993). Ambos cocientes registraron un efecto significativo ante la inclusión de CC (Fig. 17), sin presentar efecto de la secuencia de cultivo comercial ni efecto de la interacción cobertura\*secuencia (datos no mostrados). El  $q\text{CO}_2$  fue estadísticamente mayor en el tratamiento Testigo (3,21) que en CC2 (2,04) y CC1 (2,52), sin presentar estos últimos diferencia significativa. El efecto inverso fue observado en el CBM/COS siendo estadísticamente mayor en CC2 (1,43) que en CC1 (1,14) y el Testigo (1,21), sin presentar los últimos diferencia significativa.



**Fig. 17.** Cociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) (A) y cociente microbiano (CBM/COS) (B) cuantificados en pre-cosecha en los años 2013/14/15 en parcelas bajo rotación soja/maíz y parcelas bajo monocultivo de soja con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### *Correlación pH y taxones microbianos*

Se realizó un análisis de correlación con el objetivo de estudiar las relaciones entre los principales grupos microbianos y el pH (Tabla 9). Todos los taxones microbianos estudiados mostraron correlación significativa con el pH con un nivel de significancia de

$p < 0,001$ . Los biomarcadores correspondientes a grupos bacterianos y los HMA registraron una correlación positiva con el pH tomando valores de coeficiente de Pearson entre 0,17 y 0,37. Por otro lado, los biomarcadores correspondientes a hongos totales y actinobacterias tuvieron una correlación negativa con el pH con valores de coeficiente de Pearson de -0,13 y -0,14, respectivamente. Finalmente, los PLFA totales tomados como media de biomasa total presento una correlación positiva con el pH (0,22).

**Tabla 9.** Análisis de correlación entre pH y biomarcadores de taxones microbianos cuantificados en pre-cosecha, durante los años 2013/14/15.

<b>Variables</b>	<b>Coficiente Pearson pH</b>
<b>Bacterias Totales</b>	0,19
<b>Hongo Totales</b>	-0,13
<b>Gram-positivas</b>	0,17
<b>Gram-negativas</b>	0,20
<b>HMA*</b>	0,37
<b>Actinobacterias</b>	-0,14
<b>Biomasa total</b>	0,22

\*Hongos micorrízicos arbusculares

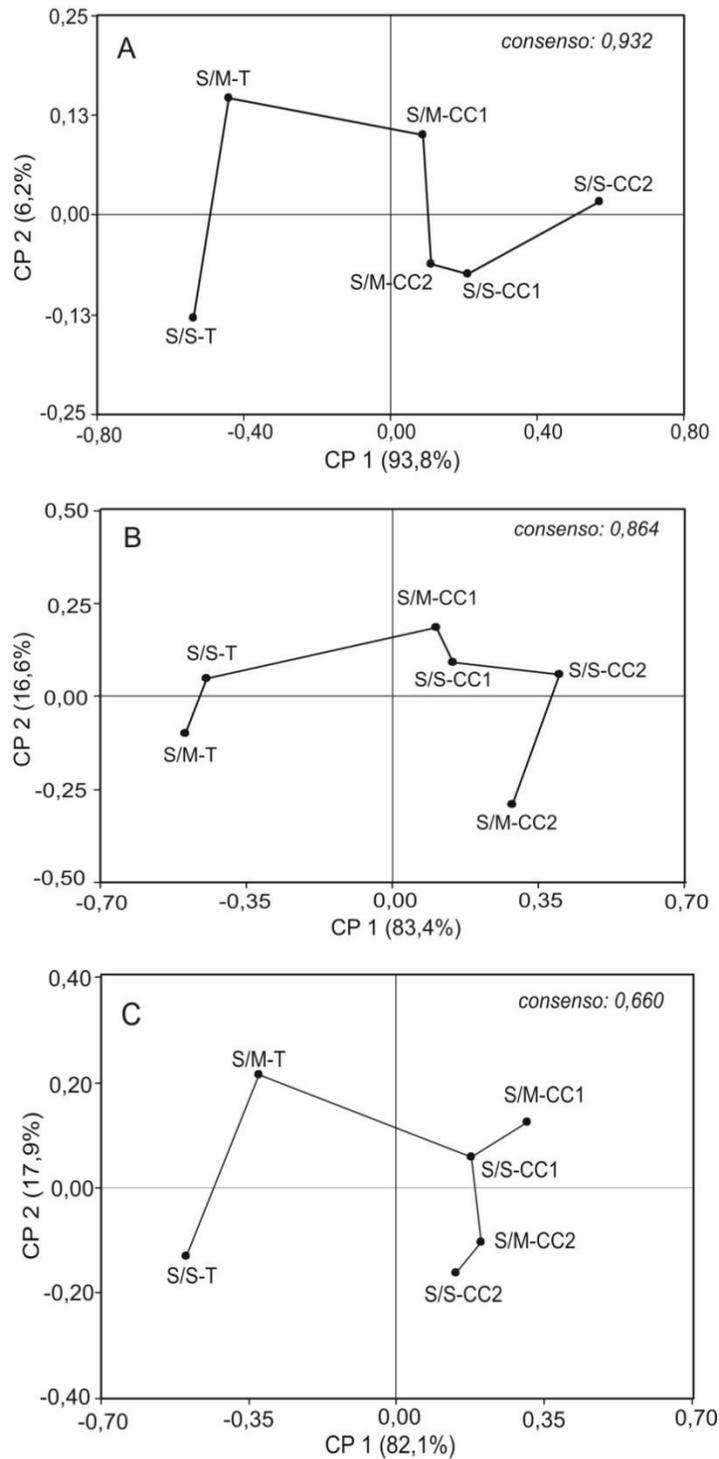
**Tabla 10.** Análisis de correlación entre el C de la biomasa microbiana (CBM) y tres actividades enzimáticas medidas durante los años 2013/14/15.

<b>Variables</b>	<b>Coficiente Pearson CBM</b>
<b>FDA*</b> ( $\mu\text{g FDA g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,46
<b>ADH*</b> ( $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,57
<b>FA*</b> ( $\mu\text{g p-nitrofenil g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,50

\*FDA, Fluoresceina de di Acetato; ADH, Actividad deshidrogenasa; FA Fosfatasa ácida

### *Configuración de consenso entre grupos de variables*

Con el objetivo de analizar el grado de concordancia entre los grupos de variables estudiadas y su influencia en la diferenciación de tratamientos se realizaron análisis de Procrustes generalizados (APG). Se conformaron cuatro grupos de variables: Funcionalidad microbiana (actividades enzimáticas-respiración microbiana- PSRG-AWCD), estructura microbiana (PLFA), variables químicas (COS-NT-Pe) y variables físicas (EE-Dap). Se obtuvieron las coordenadas principales de cada grupo de variables y se realizaron tres APG para representar la configuración de consenso entre funcionalidad microbiana con estructura microbiana (Fig. 18-A), variables químicas (Fig. 18-B) y variables físicas (Fig 18-C). Los tres APG registraron una clara separación de los tratamientos Testigo con respecto al resto de los tratamientos a lo largo de la CP 1, que en todos los casos representó más del 80% de la variabilidad total. La funcionalidad microbiana tuvo un mayor grado de concordancia con la estructura microbiana presentando un valor de consenso de 0,932. En dicha configuración se pudo observar además una clara separación del tratamiento soja/soja-CC2 del resto de los tratamientos. El APG entre funcionalidad microbiana y variables químicas presentó también un alto grado de concordancia con un valor de consenso de 0,864 y registró una separación de los tratamientos CC2 del resto de los tratamientos. Por otro lado, la funcionalidad microbiana presentó el menor grado de concordancia con el grupo de variables físicas con un valor de consenso de 0,660, sin presentar esta configuración separaciones evidentes entre tratamientos bajo CC.

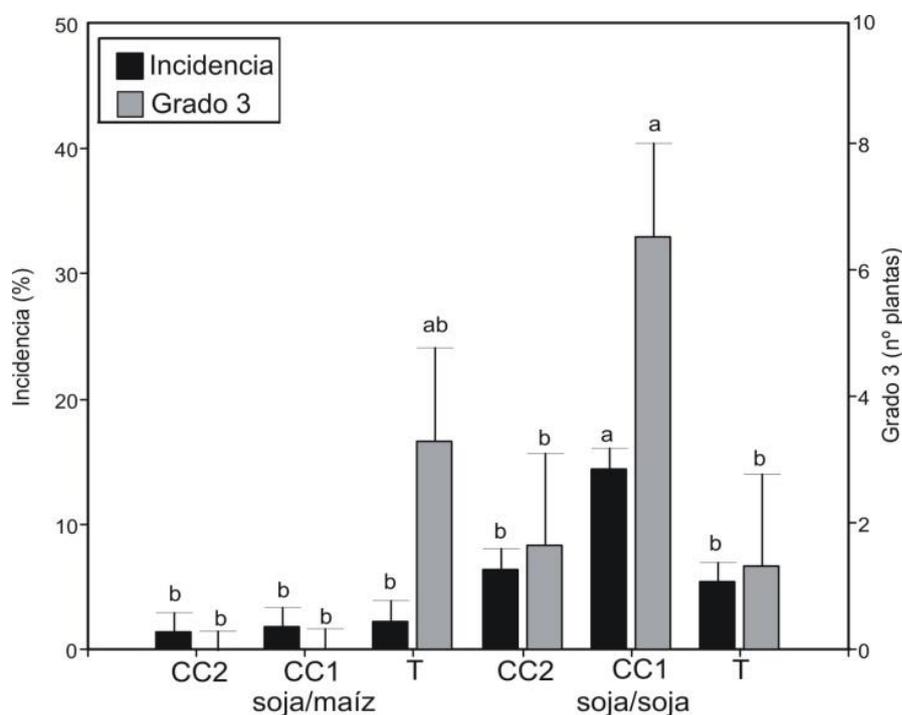


**Fig. 18.** Análisis de Procrustes generalizados entre variables de funcionalidad microbiana y taxones microbianos (A), variables químicas (B) y variables físicas (C), medidas en los años 2013/14/15 en pre-cosecha en parcelas bajo rotación soja/maíz (S/M) y parcelas bajo monocultivo de soja (S/S) con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura, CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T).

#### 4- Relacionar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo.

##### *Incidencia del Síndrome de Muerte Súbita (SMS) en soja*

La incidencia del síndrome de muerte súbita (SMS) fue cuantificada en la campaña 2014/2015 ya que durante las restantes campañas no se registró su presencia. La evaluación se realizó en el estadio fenológico de R5 respetando las indicaciones del diagrama de severidad (Fig. 4.). Para esta determinación se registró interacción entre secuencia y cobertura tanto para la incidencia de la enfermedad como para el síntoma grado 3 (datos no mostrados). Los mayores valores de incidencia del SMS se registraron en las parcelas bajo monocultivo de soja siendo el tratamiento soja/soja-CC1 estadísticamente mayor al resto de los tratamientos para esta variable, con un valor del 14,4% de incidencia (Fig. 19.). Este mismo tratamiento fue además significativamente superior para la detección de plantas con síntomas grado 3, seguido por el tratamiento soja/maíz-T, sin ser este tratamiento estadísticamente diferente del resto de los tratamientos.



**Fig. 19.** Efecto de la interacción cobertura\*secuencia para la incidencia del síndrome de muerte súbita en soja y la detección de síntomas grado 3 en el estadio R5 cuantificada en la campaña 2014/15, en parcelas bajo rotación soja/maíz y monocultivo de soja (soja/soja) con diferentes consociaciones de cultivos de cobertura (CC), CC1 (avena/nabo forrajero), CC2 (avena/nabo forrajero/vicia) y Testigo (T); Barras del mismo color y letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### ***Relación entre variables microbianas y el síndrome de muerte súbita (SMS) en soja***

Se realizó un análisis de correlación entre las variables estudiadas y el SMS en soja (Tabla 11) mediante el cual se registró correlación significativa y negativa entre el SMS y los PLFA correspondientes a comunidades bacterianas. El coeficiente de Pearson presentó valores de -0,55, -0,19 y -0,53 para bacterias totales, Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente, mientras que para hongos totales se registró una correlación positiva con un coeficiente de 0,21. Además, se observó una correlación positiva entre el SMS y Dap de 0,32 y correlaciones negativas de -0,20 y -0,13 para las variables rendimiento y COS, respectivamente.

**Tabla 11.** Análisis de correlación entre incidencia del síndrome de muerte súbita (SMS) en soja cuantificado en el estadio fenológico R5 en la campaña 2013-2014 y los taxones microbianos cuantificados en pre-cosecha.

<b>Variables</b>	<b>Unidades</b>	<b>Coefficiente Pearson Incidencia SMS</b>
<b>Bacterias Totales</b>		-0,55
<b>Hongo Totales</b>		0,21
<b>Gram-positivas</b>	<b>nmol PLFA g<sup>-1</sup></b>	-0,19
<b>Gram-negativas</b>		-0,53
<b>HMA*</b>		-0,24
<b>Rendimiento</b>	<b>Kg h<sup>-1</sup></b>	-0,2
<b>COS*</b>	<b>mg C g<sup>-1</sup></b>	-0,13
<b>Dap*</b>	<b>%</b>	0,32

\* HMA, Hongos micorrícicos arbusculares; COS, C orgánico de suelo; Dap, Densidad aparente.



**Fig. 20.** Síntomas de clorosis internerval, típicos del síndrome de muerte súbita de la soja. Fotografías tomadas en parcelas del ensayo.

## **-CAPITULO 4 -**

### **DISCUSIÓN**

**1-Evaluar la respuesta de la diversidad microbiana del suelo (estructura y funciones de las comunidades de microorganismos) en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura sembrados en distintas consociaciones, en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo.**

### ***Estructura y biomasa microbiana edáfica***

Mediante este estudio se registró un incremento en la biomasa microbiana de suelo ante la inclusión de CC, caracterizado por variaciones en la estructura de la comunidad microbiana. En particular, los PLFA bacterianos fueron los que más aumentaron en respuesta a la inclusión CC, con la consociación de CC incluyendo vicia (CC2) presentando la mayor concentración de PLFA. Esto impactó positivamente en los procesos biológicos del suelo, independientemente de la especie de CC empleada. Estos resultados se evidenciaron además en el análisis multivariado que separó los tratamientos Testigo del resto de los tratamientos revelando una diferenciación en la composición PLFA cuando se incluyeron CC en la rotación. En relación con ello, Las diferentes especies de plantas incluidas en la rotación agrícola pueden liberar compuestos específicos a la rizósfera (Vargas Gil *et al.*, 2009), lo que puede conducir a cambios en la composición de las comunidades microbianas asociadas con el tipo de cultivo empleado. Los exudados de la raíz incluyen compuestos de bajo peso molecular, como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y otros metabolitos secundarios y compuestos de alto peso molecular, como mucílago (polisacáridos) y proteínas (el Zahar Haichar *et al.*, 2014). Por lo tanto, el aporte de nutrientes al suelo generado por la inclusión distintas especies de CC y la presencia continua de sistemas de raíces vivas en el suelo puede haber conducido a un aumento general de biomarcadores microbianos en las parcelas bajo CC.

Los resultados sugieren que la diversificación de los sistemas agrícolas que utilizan CC puede producir un aumento general en las poblaciones bacterianas del suelo, siendo las bacterias Gram-negativas más eficientes en el uso del suministro de nutrientes generados por los residuos vegetales de los CC y sus exudados radicales. Los resultados de este trabajo son consistentes con los de Heinze *et al.* (2010) y Liu *et al.* (2016), quienes registraron un

aumento en las poblaciones de bacterias Gram-negativas en suelos sometidos a la aplicación de compost. También, Buyer *et al.* (2010) reportaron un marcado incremento de las bacterias Gram-negativas ante la inclusión de CC en cultivo de tomate, mientras que las poblaciones Gram-positivas tuvieron un aumento menor al resto de los grupos microbianos. Durante las tres campañas analizadas en esta tesis, las comunidades fúngicas no presentaron un incremento significativo ante la inclusión de CC, si bien se registró mayor concentración de biomarcadores fúngicos en parcelas bajo CC que en las parcelas Testigo. En relación a ello, se reportó anteriormente que los patrones de crecimiento de los hongos, junto con su capacidad para degradar compuestos recalcitrantes como lignina y celulosa, demuestra que los hongos tienen inferiores necesidades nutricionales en cuanto a calidad de alimento en comparación con las bacterias (Güsewell *et al.*, 2009; Strickland *et al.*, 2010). Por lo tanto, estas diferencias fisiológicas entre los hongos y las bacterias y sus interacciones biológicas resultantes pueden ser la razón del dominio de PLFA bacteriano en el suelo en los tratamientos con CC, como se observa en este trabajo.

La falta de diferencia estadísticamente significativa para secuencia (Tabla 3) sugiere que el efecto de la rotación de soja con maíz no generó cambios importantes en la composición de las comunidades microbianas del suelo en el corto plazo. Por el contrario, Zhang *et al.* (2012) informaron de efectos significativos en los perfiles de PLFA en el corto plazo, a través de un aumento de la biomasa total y cambios en la estructura de las comunidades microbianas mediante el empleo de siembra directa y de rotación de soja con maíz. Si bien el efecto positivo de la rotación de cultivos no fue evidente en este trabajo durante las campañas evaluadas, se pudo comprobar el efecto negativo del monocultivo sobre la diversidad microbiana de suelo. Por lo tanto, la inclusión de CC es una herramienta útil para incrementar la fertilidad biológica edáfica.

Por su parte, el incremento en la biomasa microbiana fue registrado también mediante el estudio del CBM, siendo mayor el contenido de C microbiano en las parcelas bajo CC2. El CBM en sistemas agrícolas conservacionistas implica un aporte indispensable de carga microbiana a los sistemas y un incremento de los stocks de C orgánico, contribuyendo al aumento del secuestro de C y a una mejora en la calidad biológica del suelo. Resultados similares fueron reportados por Gichangi *et al.* (2016) quienes encontraron un incremento

en el contenido de CBM en relación con un mayor aporte de nutrientes. Este efecto se produjo en las parcelas más diversificadas en esta tesis, debido al mayor aporte de materia orgánica y fuentes de energía utilizables por las comunidades microbianas como se discutirá más adelante.

### ***Diversidad catabólica ante la inclusión de CC***

Los resultados del análisis de la funcionalidad microbiana permitieron registrar un marcado efecto ante la inclusión de CC en las parcelas agrícolas. En este sentido, el estudio de CLPP se realizó para evaluar las variaciones en la diversidad funcional y los perfiles fisiológicos entre las comunidades microbianas. Los datos aquí obtenidos sobre la utilización de sustratos reflejaron que la inclusión de CC aumentó la diversidad funcional de las comunidades microbianas. Este efecto fue más evidente cuando una tercera especie vegetal, como vicia, se incluyó en la consociación utilizada como cobertura. Por ende, los CC podrían proporcionar las fuentes de C y energía necesarias para aumentar las capacidades metabólicas microbianas de la rizósfera. Estos resultados coinciden con los de Nivelles *et al.* (2016), quienes encontraron que los suelos bajo inclusión de CC mostraron un potencial metabólico más alto que el sistema de barbecho tradicional en cultivos extensivos. La capacidad de los microorganismos para utilizar una gama de sustratos de C es fundamental para todas las funciones ecológicas de los suelos (Campbell *et al.*, 2008). Por lo tanto, los resultados de esta tesis evidencian el efecto positivo de los CC en la diversidad de consumo de fuentes de C, posibilitando la caracterización de las comunidades microbianas del suelo a través de sus propiedades metabólicas.

De la misma forma que se observara en el ACP, el tratamiento CC2 produjo el mayor aumento del AWCD, probablemente debido a la mayor cantidad y calidad de los exudados de la raíz proporcionados por esta consociación de CC. De acuerdo con esto, Lagomarsino *et al.* (2012) encontraron, a través del análisis CLPP, mayor diversidad catabólica en suelos con mayor cantidad y calidad de la materia orgánica. Zhao *et al.* (2012) también registraron que los valores de AWCD aumentaron con el incremento de los niveles totales de C orgánico, lo que indica que la actividad metabólica microbiana podría haber incrementado con el aumento de contenido total de C orgánico. Este mismo efecto fue observado por Nair y Ngouajio (2012), quienes encontraron que tanto el centeno como la consociación de centeno-

vicia pueden aumentar la actividad microbiológica de suelo. En este trabajo, se observa un aumento de la diversidad catabólica cuando una especie leguminosa, como vicia, es incluida en la consociación. Esto puede haber incrementado la provisión de N en el suelo, lo cual genera un aumento en las actividades microbianas (Garland *et al.*, 2012).

### ***Respiración microbiana y actividad enzimática***

Los resultados de respiración microbiana mostraron una tendencia clara en respuesta a la inclusión de CC, presentando los tratamientos Testigo los valores más bajos en los dos momentos de muestreo, como se esperaba. Las raíces vivas y sus exudados afectan a la actividad microbiológica, ya que proporcionan las fuentes de energía necesarias para mantener una alta biomasa microbiana del suelo y estimular la mineralización de la materia orgánica (Shahzad *et al.*, 2015). Por lo tanto, es probable que este efecto rizosférico y la materia orgánica adicional proporcionada por los CC puedan haber mejorado la funcionalidad del suelo en parcelas con CC, incrementando la respiración de los microorganismos. Este efecto fue aún más marcado en la consociación más diversificada, probablemente debido al mayor aporte de nutrientes en estas parcelas. Xi *et al.* (2012) hallaron que, en determinadas condiciones, en las que la entrada de C orgánico se limitó, un mayor aporte de dicho nutriente condujo a una mayor respiración. La respiración del suelo es considerada como un bioindicador de su calidad y su evaluación proporciona una medida del potencial global de la actividad microbiana (Dutta *et al.*, 2010). Pero se debe considerar que este parámetro no refleja la eficiencia en el uso del C por parte de las comunidades microbiológicas del suelo (Hund y Schenk, 1994).

En esta tesis, la hidrólisis de FDA, ADH y FA presentaron valores más altos en los suelos con CC en comparación con los tratamientos Testigo, lo que sugiere un aumento de la actividad microbiológica del suelo generado por la diversificación del sistema. En relación con esto, Reddy *et al.* (2003) informaron que después de tres años con trébol escarlata (*Trifolium incarnatum* L.) o centeno (*Secale cereale* L.) como CC, el suelo registró mayores valores de FDA que el suelo sin CC. De hecho, las actividades enzimáticas del suelo reflejan los efectos acumulativos de la disponibilidad de sustrato, la actividad microbiana y las condiciones ambientales (Allison *et al.*, 2011). En este sentido, Chu *et al.* (2016)

demonstraron que las actividades enzimáticas, como ADH, son indicadores de la calidad del suelo debido a su alta sensibilidad a los factores ambientales. Shahzad *et al.* (2015) encontraron que los exudados de las raíces son utilizados por los microorganismos en su mayoría para sintetizar y liberar enzimas extracelulares, mineralizando así la materia orgánica del suelo. Por lo tanto, la presencia de vegetación durante todo el año en las parcelas con CC junto con su extenso sistema de raíces podría aumentar el efecto de la rizosfera, estimulando así la producción de enzimas microbianas.

Siendo la actividad de la enzima FA fundamental en la hidrólisis del P orgánico de suelo (Marschner, 2008), los resultados de esta tesis sugieren un incremento en el potencial de mineralización de P ante una mayor diversificación del sistema. En este sentido, Wei *et al.* (2014) observaron un incremento significativo de las enzimas fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina ante un mayor aporte de residuos de cultivo al suelo, demostrando que la actividad de dichas enzimas se encuentra regulada fuertemente por el contenido de materia orgánica y la disponibilidad de P edáfico. Los resultados reflejan un mayor incremento en la actividad de FA ante la inclusión de vicia en la consociación de CC. De acuerdo con esto, Maltais-Landry (2015) observó que la inclusión de leguminosas como CC tenía un efecto mayor en la actividad FA, comprobando que esto se debe a un mayor contenido de ácidos orgánicos y una reducción de pH en la rizosfera de especies leguminosas. Sin embargo, esta relación entre el pH y la actividad FA no fue estadísticamente significativa en esta tesis.

La mayor cantidad de ADH observada sugiere un aumento en las poblaciones microbianas del suelo interviniendo activamente en la degradación de la materia orgánica, ya que ADH es una medida de la presencia de microorganismos viables y su capacidad oxidativa (Rao *et al.*, 2014). Los resultados son consistentes con los de Balota *et al.* (2014), quienes encontraron que la inclusión CC asociado con la siembra directa incrementó la actividad enzimática del suelo, especialmente cuando una leguminosa se utiliza como CC. Las variaciones observadas entre los tratamientos de CC se deben probablemente a las diferentes especies utilizadas como cobertura, ya que el tipo de CC puede modificar la síntesis de enzimas producidas por las poblaciones microbianas, promover el crecimiento de algunos microorganismos e inhibir otros (Elfstrand *et al.*, 2007). En esta tesis, hubo una diferenciación en la actividad enzimática del suelo en relación con las dos consociaciones

de CC, ya que la consociación de avena-nabo forrajero-vicia mostró los valores más altos de actividad enzimática, en relación a la consociación de avena-nabo forrajero y al testigo. Entonces, es posible que la inclusión de una especie leguminosa en la consociación de CC pueda tener un efecto de mejora en la funcionalidad del suelo. De acuerdo con esto, Velmourougane *et al.* (2013) evaluaron el impacto de los diferentes sistemas de cultivo sobre ADH y encontraron que los cultivos de leguminosas mostraron los valores más altos de la actividad de esta enzima. Por el contrario, Pérez-Brandán *et al.* (2016) observaron que la ADH presentó una respuesta poco importante ante la diversificación agrícola en sistemas productivos del norte argentino, sin relacionarse con una mayor calidad edáfica. Sin embargo, los resultados de esta tesis sugieren que el uso de tres especies vegetales diferentes como CC aumenta la capacidad oxidativa microbiana del suelo, revelando el beneficio de una consociación más diversificada en la mineralización de la materia orgánica.

Por último, los patrones de actividad enzimática asociados a los dos momentos de muestreo, en la cosecha de cultivos comerciales y en el secado de los CC, pueden estar asociados tanto con el cultivo presente en ese momento (soja y maíz en pre-cosecha y CC en secado), como también con las variaciones de temperatura y humedad. Steinweg *et al.* (2012) demostraron que tanto la humedad y la temperatura pueden controlar fuertemente la actividad enzimática. Dichos autores encontraron que la temperatura fue el factor dominante cuando la humedad del suelo no fue limitante. Sin embargo, los efectos de los factores abióticos sobre propiedades biológicas del suelo están más allá del alcance de este estudio.

### ***Relaciones entre funcionalidad y estructura microbiana***

Los resultados mostraron un incremento en el valor de las relaciones entre las actividades enzimáticas y la estructura de las comunidades de los principales descomponedores de materia orgánica (bacterias y hongos), en los tratamientos bajo CC con respecto al Testigo. Los aumentos en dichas proporciones cuando PLFA aumenta o permanece estable, indica una respuesta desincronizada de las actividades enzimáticas y los PLFA de bacterias y hongos (Nannipieri *et al.*, 2012; Zhang., 2014). Por lo tanto, los resultados sugieren que la inclusión de CC promovió una mayor actividad tanto de enzimas intra o pericelulares, asociadas con los microorganismos activos, como de enzimas

extracelulares estabilizadas por partículas reactivas de la superficie edáfica o atrapadas por las sustancias húmicas (McDaniel *et al.*, 2014). El tratamiento CC2 mostró valores superiores en las relaciones entre las actividades enzimáticas y PLFA de bacterias, con respecto a CC1, lo que indica un aumento en las actividades de enzimas extracelulares estabilizadas en el caso de la consociación CC2 en relación con los otros tratamientos. Con respecto a esto, el Zahar Haichar *et al.* (2014) demostraron que diferentes especies de plantas pueden liberar distintos exudados radicales al suelo modificando las interacciones microbianas de la rizosfera. Por lo tanto, la presencia de una leguminosa en la consociación CC2 puede haber mejorado la calidad y la cantidad de exudados radicales liberados al suelo, en comparación con la consociación sin leguminosa. Del mismo modo, Shahzad *et al.* (2015) reportaron que las plantas influyen fuertemente en la mineralización de la materia orgánica del suelo a través de sus exudados, como el resultado de años de coevolución planta-microbio. Si bien una mayor diversidad en las comunidades microbianas no supone necesariamente una mayor funcionalidad de suelo, los resultados de esta tesis muestran una estrecha relación entre ambos aspectos de la microbiología edáfica ante la inclusión de CC.

El alto valor de consenso registrado en el análisis de Procrustes realizado entre las variables de estructura de las comunidades microbianas y las variables de funcionalidad evidencia la estrecha relación que existe entre ambos grupos de variables. En este análisis se puede observar además la capacidad de las variables estructurales en conjunto con la funcionalidad edáfica para diferenciar los tratamientos bajo CC. Por lo tanto, los resultados sugieren un incremento de la biomasa de suelo como respuesta a la diversificación del sistema mediante el uso de CC, lo cual a su vez genera un aumento de la funcionalidad edáfica. En relación con esto, en este estudio también se registró una correlación positiva entre el CBM y las tres actividades enzimáticas analizadas (Tabla 10), las cuales registraron valores significativamente mayores bajo CC. Dicho efecto es tan importante como el aumento de la biomasa, ya que la capacidad de las comunidades microbiológicas del suelo de mantener su diversidad funcional puede ser más importante para la productividad y estabilidad del sistema agrícola que la diversidad microbiana (Caldwell, 2005).

**2 y 3- Analizar la respuesta de parámetros químicos y físicos del suelo en cuanto a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura y establecer interrelaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas edáficas en respuesta a la introducción de cultivos de cobertura al sistema, en correlación con la productividad de los cultivos principales (soja y maíz).**

### *Cociente metabólico y cociente microbiano*

El aumento del cociente metabólico registrado en los tratamientos Testigo en esta tesis puede estar relacionado con un menor nivel de fertilidad de suelo que puede inhibir la actividad de los microorganismos. La respiración microbiana por unidad de biomasa o cociente metabólico ( $qCO_2$ ), tiene una valiosa aplicación como una medida relativa de cuan eficazmente la biomasa microbiana está utilizando los recursos de C (Anderson y Domsch, 1993). Este efecto fue observado también por Ferreras *et al.* (2015) quienes registraron una mayor eficiencia metabólica en parcelas bajo siembra directa y CC en relación con parcelas bajo labranza, siendo el valor de  $qCO_2$  un 32% menor en siembra directa. En este sentido, los valores de  $qCO_2$  tienden a incrementarse por efecto del estrés originado por limitaciones de nutrientes o valores muy bajos o altos de pH. Entonces, valores más altos de  $qCO_2$  podrían indicar una menor calidad de los sustratos y una disminución en la eficiencia de los microorganismos en el uso del C. Los resultados sugieren un incremento de la eficiencia en el uso de los residuos vegetales ante la inclusión de CC, asociado probablemente a la mejora en las condiciones químicas y físicas del suelo registrada en esta tesis. En relación con ello, Cederlund *et al.* (2014) encontraron que la reducción del  $qCO_2$  estuvo asociada a una mayor disponibilidad de N en el suelo, más que a la disponibilidad de C incorporado mediante enmiendas orgánicas. Probablemente, el mayor contenido de N aportado por la consociación CC2 en esta tesis contribuyó a la generación de una comunidad microbiana energéticamente más eficiente.

Los altos valores de cociente microbiano registrados en el tratamiento CC2 sugieren una mayor eficiencia en la utilización del sustrato por parte de los microorganismos y una menor pérdida de C en dichas parcelas. La relación CBM/COS, conocida como cociente microbiano que representa el C asociado a la fracción viva de la materia orgánica, es un

indicador sensible de los cambios en la materia orgánica del suelo como también el estado de degradación edáfico (Hart *et al.*, 1989). Este efecto fue observado también por Prager *et al.* (2006) al comparar sistemas de cultivo agroecológicos y convencionales, siendo los primeros más eficientes en el uso de C con mayores valores de la relación CBM/COS. Los resultados de esta tesis sugieren un mayor equilibrio dinámico en la degradación de residuos en los tratamientos bajo CC y una tendencia a la estabilización en la eficiencia metabólica microbiana ante la inclusión de CC, particularmente de la consociación CC2. En resumen, la construcción de la materia orgánica del suelo se ve favorecida por la asimilación del C orgánico por la biomasa microbiana, asociado a un bajo cociente metabólico y un alto cociente microbiano.

### ***Contenido de proteínas de suelo relacionadas a Glomalina***

Los resultados muestran un claro aumento de la concentración de PSRG con la inclusión de CC, lo que sugiere una mejora en los servicios ecosistémicos en este tipo de sistema, ya que la glomalina constituye un reservorio importante de C y N en el suelo (Driver *et al.*, 2005) y también es un parámetro utilizado para evaluar la calidad edáfica (He *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha registrado que la glomalina está altamente correlacionada con el porcentaje de estabilidad de agregados en el suelo (Emran *et al.*, 2012). Es importante señalar que la fracción de Bradford-reactiva de PSRG descrita en este estudio no representa exclusivamente el contenido de glomalina suelo. Sin embargo, existe una correlación directa entre los ensayos de Bradford-reactivas y ELISA que indican la eficacia del ensayo de Bradford para proporcionar una estimación relativa de glomalina (Rosier *et al.*, 2006). También, Koide y Peoples (2013) estudiaron el comportamiento del ensayo Bradford en parcelas con soja y canola y encontraron que este método fue útil en la detección de glomalina.

En este trabajo los valores de PSRG se vieron incrementados ante la inclusión de CC, particularmente la consociación CC2 presentó valores superiores al resto de los tratamientos en ambos momentos de muestreo, en la rotación soja/maíz. La presencia de sistemas radicales durante todo el año probablemente favoreció el establecimiento de hongos micorrízicos y la consecuente producción de glomalina en el suelo. El efecto mencionado

fue levemente inferior en los tratamientos CC1 con respecto a CC2, debido probablemente a que las raíces de especies vegetales pertenecientes a la familia brasicáceas no tienen la capacidad de micorrizar. De acuerdo con esto, García-González *et al.* (2016) registraron un incremento de parámetros relacionados con HMA, entre ellos PSRG, ante la inclusión de CC en sistemas de cultivo de maíz y girasol, siendo cebada (*Hordeum vulgare* L.) el CC de mejor respuesta para dicha variable. Los datos aquí obtenidos evidencian el importante efecto de mantener el inóculo potencial de HMA durante el período invernal para favorecer el contenido de PSRG en el ciclo de cultivo comercial, con sus consecuentes efectos beneficiosos en la fertilidad edáfica. Los resultados no mostraron un efecto significativo de la rotación agrícola sobre el contenido de PSRG. En relación con esto, Preger *et al.* (2007) reportaron que la inclusión de maíz en la rotación a largo plazo incrementó la variedad y cantidad de los nutrientes del suelo, permitiendo un aumento en los niveles de PSRG. Por lo tanto, es probable que este efecto se refleje en el ensayo estudiado en esta tesis en el largo plazo. Sin embargo, la respuesta registrada ante la inclusión de CC sugiere que la fracción fácilmente extraíble de glomalina supone un parámetro sensible y útil para estudiar variaciones en las condiciones edáficas ante cambios en el manejo agrícola.

### ***Relación entre variables químicas y variables microbiológicas***

Los resultados de esta tesis sugieren que el uso de CC produce un aumento en el contenido de COS, lo cual genera beneficios en la funcionalidad del suelo proporcionando los recursos energéticos para el desarrollo de los cultivos. Este efecto fue observado tanto en la cosecha de cultivos comerciales y como en el secado de los CC. De hecho, varios estudios han informado que las prácticas de manejo, como la rotación de cultivos y la intensificación de las secuencias de cultivos mediante el uso de mezclas de CC, aumentan la retención de COS (López-Fando y Pardo, 2011). Los datos de esta tesis concuerdan con los resultados obtenidos por Nascente *et al.* (2013), quienes demostraron que el uso de especies de CC, como el mijo, aumenta la concentración de C en cultivos de arroz en Brasil. Mediante la descomposición de los residuos y el almacenamiento de C dentro de su propia biomasa o mediante la reconstrucción de nuevas estructuras de C, la biota del suelo tiene una función muy importante en los procesos de reciclaje de nutrientes y, por lo tanto, en la capacidad de un suelo para proveer al cultivo con suficientes nutrientes. En este sentido, las reservas de

COS han sido identificadas como buenos indicadores de la dinámica del C bajo diferentes prácticas de manejo agrícola (Farage *et al.*, 2007). En este sentido, Higashi *et al.* (2014) también reportaron que el uso de centeno de invierno (*Secale cereale*) mostró mayor contenido de COS que vicia vellosa (*Vicia villosa* Roth) utilizados como CC en comparación con barbecho. Estos resultados se deben probablemente a la diferente cantidad y calidad de biomasa aérea y radical incorporada en el suelo. Sin embargo, en esta tesis, no se observaron diferencias entre las dos mezclas de CC en relación con el COS, probablemente debido a que la vicia tiene una baja relación C/N y, por lo tanto, puede haber tenido un efecto no significativo en la reserva de COS. En relación con ello, Restovich *et al.* (2011) encontraron que el uso de avena como CC aumentó significativamente el contenido de COS en comparación con otras especies vegetales como nabo, cebada y vicia utilizadas como CC. En dicha investigación se observan variaciones en el contenido de COS de acuerdo con el momento de muestreo. Estas variaciones también fueron observadas en este estudio, sugiriendo que las condiciones ambientales y el tipo de cultivo influyen marcadamente en el contenido de COS.

Probablemente el mayor contenido de COS en parcelas bajo CC fue responsable de la mayor producción enzimática por parte de los microorganismos de suelo y la mayor respiración microbiana, estando estas variables positivamente correlacionadas con el mayor contenido de COS. Estos resultados demuestran el incremento en la funcionalidad edáfica generado mediante la inclusión de residuos orgánicos al suelo mediante el uso de CC. El contenido de PSRG también se correlacionó de manera positiva con el COS, como se esperaba, ya que la glomalina representa más del 5% del C orgánico (Rillig *et al.*, 2002). Además, se estima que las hifas micorrícicas junto con la glomalina contribuyen con más del 15% al C orgánico total del suelo (Miller y Jastrow 2000). Por lo tanto, técnicas como la inclusión de CC que favorecen el contenido de HMA como se ha registrado en esta tesis mediante el análisis de PLFA, son útiles para incrementar también el contenido de glomalinas y por ende de COS, con sus consecuentes efectos benéficos en la funcionalidad edáfica.

Los resultados mostraron un aumento del NT bajo la consociación CC2, la cual incluye una especie leguminosa. En relación a esto, Samarappuli *et al.* (2014) compararon

diferentes especies de CC de diferentes familias y encontraron que el uso de CC que incluían leguminosas eran los más adecuados para generar un aporte adicional de N disponible para los cultivos comerciales posteriores. Los datos de esta tesis indicaron que el NT se correlacionó positivamente con FDA, lo que demuestra que la mayor actividad microbiana general observada en parcelas bajo CC generó una mejora en la disponibilidad de N. Es decir que, la consociación avena-nabo forrajero-vicia es muy recomendable no sólo para aumentar la biomasa y actividad microbiana, sino también para proporcionar N adicional, lo que contribuiría al crecimiento de los cultivos. La relación C:N registrada en todos los tratamientos mostró valores cercanos a lo óptimo para una activa degradación de materia orgánica (C:N= 10). Sin embargo, el tratamiento soja/maíz-T presentó el mayor valor de relación C:N asociado a un bajo pH, lo cual sugiere una menor capacidad de nitrificación en estas parcelas en relación al resto de los tratamientos. En este estudio, la capacidad de la vicia para fijar N atmosférico y e incrementar su contenido en el suelo bajo CC2 influyó probablemente en la relación C:N, disminuyendo esta relación en este tratamiento y aumentando el proceso de nitrificación.

Si bien el Pe se correlacionó positivamente con la actividad de la FA, no se encontraron diferencias en relación con la inclusión de CC en el corto plazo. Los resultados son consistentes con los hallazgos de Varela *et al.* (2014), quienes informaron que la presencia de CC no afectó el contenido de P en un sistema de monocultivo de soja en Argentina. Sin embargo, la correlación positiva entre la FA y Pe aquí observada sugiere que el contenido de Pe podría ser incrementado por los CC en el largo plazo. De acuerdo con esto, Neal *et al.* (2017) demostró a través de un análisis metagenómico que ante una baja disponibilidad de P, las comunidades microbianas sintetizan exoenzimas como FA, incrementando el contenido de este nutriente. Se registró además en esta tesis una correlación significativa ( $p < 0,001$ ) y negativa (-0,28) entre el contenido de Pe y los PLFA correspondientes a HMA. Este mismo efecto fue reportado por Thounnon Islas *et al.* (2014) quienes concluyeron que en parcelas con un mayor contenido de P la asociación simbiótica no resulta tan favorable para la planta como en el caso de parcelas donde el P es más limitante.

Además de la disponibilidad de macronutrientes, otra característica íntimamente relacionada con las comunidades microbianas del suelo es el pH. Existen múltiples factores que afectan el pH edáfico, como ser el tipo de suelo, el estatus nutricional, el contenido de arcillas y el uso del suelo entre otras (Rousk *et al.*, 2010). Además, el pH edáfico afecta a su vez el desarrollo de las comunidades microbianas del suelo y sus actividades. Los suelos estudiados en esta tesis son ligeramente ácidos, siendo los tratamientos soja/maíz-T y soja/soja-T los que presentaron valores de pH más cercanos a la acidez. Estos bajos valores de pH en los tratamientos Testigo pueden estar relacionados a la menor actividad microbiana registrada en estas parcelas y su menor contenido de biomasa microbiana total. Los grupos taxonómicos estudiados se correlacionaron con el pH de manera diferencial ya que, mientras los PLFA bacterianos incrementaron ante el aumento de pH, los PLFA fúngicos aumentaron ante una mayor acidez de suelo. Estos mismos efectos fueron registrados por Bååth y Anderson (2003), quienes observaron un mayor contenido de biomasa total y PLFA bacteriano relacionado a un mayor valor de pH. Se ha reportado que las comunidades fúngicas de suelo presentan mayor tolerancia a la acidez y son afectadas en menor medida por las variaciones del pH en relación con las comunidades bacterianas (Strickland y Rousk, 2010). Por lo tanto esto explicaría la correlación negativa entre PLFA de hongos totales y pH y las correlaciones significativas entre PLFA bacteriano y pH.

### ***Relación entre variables físicas y variables microbiológicas***

Los valores de EE registrados en relación con la inclusión de CC se condicen con el incremento registrado en la funcionalidad y estructura de las comunidades microbianas del suelo. En efecto, la EE del suelo juega un papel fundamental de la fertilidad física ya que asegura el movimiento y almacenamiento de agua y nutrientes regula el flujo de gases, promueve el desarrollo de las raíces del cultivo y de las comunidades microbianas y protege el suelo de la erosión hídrica (Luna *et al.*, 2016). Por lo tanto, técnicas agrícolas que promueven la actividad biológica del suelo son empleadas para restaurar la EE de suelos degradados, mediante el secuestro de C orgánico y la formación de agregados de suelo de compuestos estables (Ojeda *et al.*, 2015). El mayor aporte de materia orgánica generado por los CC representa una fuente de energía para microorganismos como bacterias y hongos, los cuales a su vez promueven la formación de micro y macro agregados mediante la producción de mucílagos (Lehmann and Rillig, 2015). En este sentido, mecanismos de propagación y

adhesión de los microorganismos a las partículas de suelo y la producción de polisacáridos influyen en la agregación del suelo y como productos intermedios de la degradación de residuos orgánicos (Tippkötter, 1989). Además, Las hifas de hongos pueden sujetar mecánicamente partículas gruesas de suelo y las bacterias actúan como núcleos de agregación de arcillas. De todo esto se desprende la posibilidad de usar microorganismos para mejorar la estabilidad del suelo. Los microorganismos eficientes en la degradación de almidones y lignina y producción de polisacáridos pertenecen a los géneros *Trichoderma* y *Phoma*. También los microorganismos capaces de producir exudados ricos en polisacáridos, pueden ser las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Agrobacterium* (Gisi *et al.* 1990). Estos antecedentes reflejan el impacto positivo en la estabilidad física del suelo generado a través de la inclusión de CC, como se refleja en esta tesis. Sin embargo, no se detectó diferencia entre las dos consociaciones de CC. Probablemente, la lenta respuesta de los parámetros físicos ante los cambios en el uso del suelo no logró diferenciar estadísticamente el efecto de la inclusión de vicia en la consociación de CC.

Se registró además un efecto mejorador de la EE en las parcelas bajo rotación soja/maíz en comparación con las parcelas bajo monocultivo de soja. Dicho efecto probablemente está asociado a la capacidad del sistema radical del cultivo de maíz de generar una mayor porosidad mediante la exploración radical, además de representar un mayor nivel de diversificación del sistema agrícola. De hecho, los sistemas radicales de diferentes especies vegetales, interactúan de manera disímil, generando estructuras y niveles de agregación variables, explorando de manera diferencial las porciones de suelo. (Gregory *et al.*, 2006). Esto evita la compactación edáfica ya que diferentes sistemas radicales pueden crear poros estables, que al descomponerse las raíces formen bioporos abiertos, los cuales pueden ser empleados por las raíces de cultivos posteriores. Esta perforación biológica, mediante la incorporación de especies apropiadas en la rotación, tiene efectos que pueden beneficiar la estructura del suelo (Restovich *et al.*, 2011), como se comprobó en este trabajo.

Un grupo microbiano fundamental en la formación y mantención de la estabilidad estructural es el de los HMA mediante la producción de glomalina. Varios trabajos demuestran la fuerte relación entre la concentración de glomalina y el contenido de agregados estables de suelo (Bedini *et al.*, 2009; Gispert *et al.*, 2013). Esta misma correlación

positiva fue observada en esta tesis, aunque con un bajo coeficiente de Pearson, evidenciando el efecto mejorador de los CC en la fertilidad física. La fracción fácilmente extraíble de PSRG medida en este trabajo representa el crecimiento activo de las hifas del hongo. En efecto, el papel especial de esta glicoproteína ha atraído la atención de un número creciente de investigadores (Wright y Upadhyaya, 1998; Rillig *et al.*, 2002; Fokom *et al.*, 2012) ya que puede adherirse a las partículas del suelo, formando primero micro agregados (<0,25 mm) y luego macro agregados. Considerando que la glomalina es recalcitrante pudiendo durar en los suelos de 7 a 42 años según las condiciones ambientales, el ecosistema y el manejo agrícola de los suelos (Wright y Upadhyaya, 1996), es probable que los efectos benéficos de las PSRG observados en este trabajo continúen contribuyendo con la EE también a largo plazo.

Con respecto a los resultados obtenidos en relación a la Dap, probablemente la profundidad de 10 cm de muestreo utilizada en este estudio, en la que la variación de Dap de suelo está sujeta a factores externos (maquinaria agrícola, perturbaciones climáticas, pisoteo, etc), no fue representativa del efecto de la inclusión de los CC. Esto impidió evidenciar un efecto diferencial de la inclusión de CC sobre la Dap del suelo. Los valores bajos de Dap son propios de suelos porosos, bien aireados, con buen drenaje y buena penetración de raíces, lo que permite un buen desarrollo radical. Por otra parte, los valores altos de Dap son propios de suelos compactos y poco porosos, con aireación deficiente e infiltración lenta del agua, lo cual puede provocar anegamiento, anoxia, presentando dificultades para las raíces, para elongar y penetrar hasta alcanzar el agua y los nutrientes necesarios. En estas condiciones, el desarrollo y crecimiento de las plantas es impedido o retardado consistentemente (Donoso, 1992). En esta tesis, la Dap de suelo presentó correlación negativa con las variables correspondientes a funcionalidad edáfica y la EE, lo que sugiere un efecto depresivo de las actividades microbianas ante un aumento de la Dap. Se ha informado que la materia orgánica disminuye la Dap del suelo (por tener una menor densidad que la materia mineral). De hecho, las partículas de cortezas o corcho o las fibras vegetales tienen células en su interior que contribuyen a aumentar la porosidad del suelo (porcentaje de poros), es decir, aumenta el número de poros que son capaces de retener agua o aire sin aumentar el volumen total de suelo (Restovich *et al.*, 2011). Los espacios vacíos que se forman en la interfase entre las partículas orgánicas y minerales pueden contribuir al

aumento de la conductividad hidráulica del suelo. Debido al efecto físico del tamaño de las partículas, la materia orgánica aumenta la capacidad de retención de agua de suelos arenosos y aumenta la capacidad de aireación de suelos arcillosos. Por lo tanto, la inclusión de residuos vegetales generado por los CC y su aporte de materia orgánica al suelo podría disminuir la Dap de suelo, incrementando así la actividad microbiana general y el desarrollo de los cultivos.

### ***Rendimiento de grano de soja ante la inclusión de CC***

Los rendimientos en el cultivo de soja obtenidos en este estudio no presentaron modificaciones ante la inclusión de CC durante el período evaluado. Si bien se registró una alta producción de materia seca de CC, particularmente en la consociación más diversificada (CC2), lo que no afectó negativamente el rendimiento del grano de soja. Aunque es aceptado que los CC tienen el potencial de mejorar la calidad del suelo, existe información contradictoria sobre el efecto sobre el rendimiento de esta técnica de manejo. No se ha registrado reducción del rendimiento de soja ante la inclusión de CC en la secuencia de cultivo cuando existe disponibilidad de agua libre durante la época de producción (Ruffo *et al.*, 2004; Capurro *et al.*, 2010; Restovich *et al.*, 2012). Sin embargo, Singer y Kohler (2005) reportaron reducciones en el rendimiento de la soja y acumulación de biomasa aérea como respuesta al uso de centeno (*Secale cereale* L.) utilizado como CC en Iowa. Los resultados preliminares indican que, en la Pampa húmeda, el impacto negativo de los CC en el agua almacenada sería insignificante y no produciría una disminución significativa en el rendimiento del cultivo (Fernández *et al.*, 2010). Aunque las pérdidas de rendimiento pueden ocurrir en años con baja cantidad de precipitaciones, los beneficios netos que proporcionan los CC al sistema en condiciones normales (sin estrés hídrico) justifican el empleo de esta técnica agrícola en regiones sin limitaciones hídricas.

El rendimiento de soja presentó correlaciones positivas con variables como FDA, PSRG, EE, NT y COS en este trabajo, además de una correlación negativa con la Dap. A pesar de los bajos valores de coeficiente de Pearson de estas correlaciones significativas, las mismas sugieren una relación entre dichos parámetros asociados a la fertilidad del suelo con la productividad del cultivo. Probablemente, el incremento de la funcionalidad y diversidad microbiana generados por la inclusión de los CC y sus consecuentes mejoras en el contenido

de macronutrientes como N y C y en las condiciones físicas del suelo, estén ligados a una mayor productividad en soja. Estas relaciones podrían tener un efecto más evidente en el largo plazo, como fue reportado por Lardone *et al.* (2012) en el noroeste de Buenos Aires, donde observaron que el CC de triticale secado en agosto y septiembre permitió rendimientos de soja mayores respecto a un Testigo sin CC. Sin embargo, aquellos lotes secados tardíamente (fines de octubre) afectaron negativamente los rendimientos de soja en un 12%. Por lo tanto, estudios posteriores deberían analizar el impacto a largo plazo de la inclusión de la técnica en los ambientes evaluados.

### ***Interacción entre grupos de parámetros***

En este trabajo se estudiaron las correlaciones existentes entre las diferentes variables microbianas, químicas y físicas en relación a la inclusión de CC y la relación y grados de consenso entre estos tres grandes grupos de variables. En este sentido, los parámetros relacionados a la funcionalidad fueron los más significativos al momento de diferenciar los tratamientos estudiados y presentaron una correlación positiva con el COS, como respiración, hidrólisis de FDA y ADH. A su vez, estos parámetros de actividad microbiana junto con los valores de diversidad estructural de las comunidades microbianas estimados mediante PLFA mostraron el mayor valor de consenso. Esto evidencia la fuerte relación que existe entre las diferentes comunidades y las funciones que estas desarrollan en la matriz del suelo. Es probable que la modificación del ambiente edáfico generada por el aporte de residuos vegetales y exudados radicales aportados por los CC suponga un incremento de la diversidad estructural. Este incremento se relacionó con una mayor producción enzimática, respiración y contenido de PSRG, lo cual a su vez se asoció a una mejora en las condiciones químicas y físicas del suelo. También se registró un alto valor de consenso entre variables de funcionalidad y variables químicas, probablemente debido a que la materia orgánica provee a los microorganismos del suelo la energía necesaria para su desarrollo (Campbell *et al.*, 2008).

Es conocido que en suelos con abundante cobertura el aumento en la provisión de residuos vegetales ricos en C favorece un incremento en la síntesis de enzimas extracelulares por parte de los microorganismos con el fin de descomponer la materia orgánica para obtener C (Hargreaves y Hofmockel, 2014). Por ende, los bajos aportes de C y N registrados en los

tratamientos Testigo regularon los bajos valores de variables biológicas. Este mismo efecto depresivo en la actividad biológica ante la escasa provisión de C y N fue reportada por Nivelles *et al.* (2016) en cultivos industriales con la incorporación de CC. Dichos efectos explican las correlaciones positivas observadas entre variables químicas y de funcionalidad microbiana. Sin embargo, estos efectos no se condicen con el contenido de Pe cuantificado durante las tres campañas, ya que dicho nutriente presentó correlación negativa con las propiedades biológicas, con excepción de la actividad FA. Ello probablemente tenga relación con la baja movilidad del P en el suelo y su facilidad para formar compuestos estables en la matriz edáfica, como por ejemplo la formación de fosfatos de calcio en suelos alcalinos y los fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos (Sanyal y De Data, 1991). No obstante, según los resultados de esta tesis, se registró una correlación positiva entre Pe y FA, evidenciando la influencia de la actividad microbiana en la disponibilidad de nutrientes para ser aprovechados por el cultivo.

En el caso del grupo de variables físicas, el consenso no presentó un alto valor con variables de funcionalidad, probablemente debido al cambio gradual que sufren los parámetros de este primer grupo, en contraposición con la rápida respuesta que presentan las variables de actividad microbiana ante los cambios en el manejo agrícola. En general, la EE se correlacionó de forma positiva con los parámetros microbiológicos, al contrario de la Dap que presentó correlaciones negativas con dichos parámetros, como era esperado. Este efecto, podría indicar un incremento en la calidad del suelo debido a la relación de la Dap con otras propiedades como la porosidad, la humedad de suelo y conductividad hidráulica (Dam *et al.*, 2005). En relación a esto, Larios-González *et al.* (2016) reportaron un incremento en las poblaciones bacterianas y fúngicas de suelo en relación con mejoras en la fertilidad física del suelo, explicada a través de un mayor porcentaje de porosidad y retención de humedad y una disminución de la Dap. Se observó además una importante correlación entre EE y PSRG, evidenciando una influencia directa de las poblaciones microbianas sobre un parámetro de fertilidad física. Es conocido que el revestimiento hidrófobo de la glomalina protege a las hifas de los hongos y les permite sobrevivir en condiciones adversas, impidiendo una disminución de los macroagregados del suelo en los ciclos de humedecimiento y secado durante el crecimiento del cultivo (Pérez-Brandán *et al.*, 2014).

Este mecanismo es un claro ejemplo de la importante influencia de las comunidades microbianas en la estabilidad física de los suelos agrícolas.

Mediante los análisis realizados sobre los diferentes grupos de variables estudiadas se evidenció la compleja red de interacciones que operan en la matriz del suelo y afectan la fertilidad de los sistemas agrícolas. Se pudo observar una mayor influencia de variables de funcionalidad microbiana en cuanto a la separación de tratamientos con respecto al resto de las variables.

#### **4- Relacionar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo.**

##### ***Efecto de los cultivos de cobertura sobre el SMS en soja***

Durante los años de evaluación se detectó la presencia del SMS súbita en soja en el sitio de estudio. La incidencia del SMS en soja registrada en este trabajo no mostró un efecto claro ante la inclusión de CC, sin embargo se observaron mayores niveles de incidencia en parcelas bajo monocultivo de soja con respecto a las parcelas con rotación soja/maíz. En parcelas bajo monocultivo particularmente, se registró un aumento significativo de la incidencia de SMS ante la inclusión de la consociación CC1. De acuerdo con estos resultados, Pérez-Brandán *et al.* (2014) reportaron una menor incidencia del SMS en lotes bajo rotación agrícola en comparación con lotes bajo monocultivo de soja en el Noroeste Argentino. Si bien cultivos como el maíz son hospedantes alternativos de *Fusarium*, probablemente una mejora en la salud de las raíces del cultivo y de la calidad del suelo de la rizosfera generado mediante la diversificación agrícola este asociado con una reducción en la presión de la enfermedad. En el sitio de estudio se identificaron las especies *F. tucumaniae* y *F. virguliforme* como agentes causales del SMS observado. Las pérdidas de rendimiento en lotes de producción asociadas con el SMS, en general son del orden del 5 al 15%, aunque en casos puntuales se han informado pérdidas superiores al 80% (Roy *et al.*, 1997; Westphal *et al.*, 2008) dependiendo de la especie de *Fusarium*, genotipo, edad de la planta al momento de la infección, sitio de infección en la raíz, ambiente, condiciones edáficas, propiedades físico-químicas del suelo y fecha de siembra. Si se presenta la enfermedad en estadios

reproductivos tempranos, puede producir aborto de flores y de vainas, mientras que en estadios más tardíos puede causar la disminución del número de granos por vaina y el peso de los granos. En cuanto a las recomendaciones para el manejo del SMS, algunos autores recomiendan mejorar el drenaje de los lotes y disminuir la compactación, ya que el manejo con agroquímicos no muestra eficiencia en el manejo de esta enfermedad (Lenzi *et al.*, 2010). Por lo tanto, el incremento en la estabilidad estructural registrada en las parcelas bajo CC que supone una mejora en la condición física del suelo en estos tratamientos, probablemente sea un factor importante para disminuir la incidencia de la enfermedad en años de mayor humedad edáfica, lo que se habría esperado encontrar en este trabajo

Los biomarcadores de los principales taxones microbianos mostraron correlaciones significativas con la incidencia de este síndrome, tanto las comunidades bacterianas como los HMA se correlacionaron negativamente con el SMS. En este sentido, se ha reportado que los HMA protegen las raíces del cultivo brindando a las plantas mayor resistencia contra agentes patógenos de suelo (Li *et al.*, 2013). Esto sugiere un efecto de bioprotección de las raíces del cultivo de soja. En este sentido, la mejora registrada en la actividad y diversidad microbiana en esta tesis podría generar un efecto de control de la enfermedad en el largo plazo. Esto se debe a que el SMS presenta mayor severidad cuando las condiciones físicas del suelo son pobres (drenaje inadecuado, baja estabilidad estructural y alta compactación). De acuerdo con esto, Pérez-Brandán *et al.* (2014) registraron menor incidencia del SMS en relación con una mejor condición física y funcional de suelos bajo rotación agrícola en contraste con suelos bajo monocultivo de soja. Es posible que las especies utilizadas como CC, al ser hospedantes de *Fusarium*, hayan incrementado el inóculo de la enfermedad en los primeros años del ensayo. Sin embargo, técnicas como la inclusión de CC, que tienen un impacto positivo sobre la calidad del suelo y la diversidad de la biomasa edáfica, podrían incrementar la salud del cultivo y reducir la incidencia de enfermedades en una manera sustentable a largo plazo (Abawi y Widmer, 2000).

Se observó una correlación negativa entre el SMS y el rendimiento del grano de soja en la campaña analizada, lo que demuestra la problemática creciente con relación a este síndrome y la necesidad de desarrollar métodos de control eficientes. Los métodos tradicionales utilizados para proteger los cultivos de las enfermedades causadas por hongos

de suelo se han basado en gran medida en el uso de fungicidas. Sin embargo, estas aplicaciones pueden tener fuertes efectos sobre el ambiente y los consumidores. A su vez, no son económicamente viables en el largo plazo debido a que dejan residuos nocivos y pueden conducir al desarrollo de cepas resistentes con el uso reiterado (Vinale *et al.*, 2008). Actualmente, el manejo del SMS se basa en la utilización de cultivares parcialmente resistentes, ya que no hay genotipos con resistencia completa, ni fungicidas o prácticas culturales que sean siempre efectivas para su control (Lenzi *et al.*, 2011). Resultados obtenidos por Xing y Westphal (2009), demostraron que los sistemas de producción actuales basados en la rotación anual de soja con maíz son muy vulnerables al desarrollo de complejos de enfermedades transmitidas por el suelo. Por lo tanto, enfermedades como el SMS escapan al control por métodos tradicionales, siendo necesario investigar técnicas agrícolas alternativas, como la diversificación de los sistemas, que complementen el control químico y aporten al manejo sustentable de las enfermedades causadas por hongos de suelo.

## **-CAPITULO 5 -**

### **CONCLUSIONES**

Este estudio permite identificar y caracterizar las modificaciones de la estructura y la funcionalidad de las comunidades microbianas generadas por la inclusión de dos consociaciones diferentes de CC en un agroecosistema típico de la pampa húmeda Argentina. Mediante este trabajo se concluyen los siguientes puntos:

- La inclusión de CC genera un incremento de la biomasa total de suelo y un aumento en los biomarcadores bacterianos, particularmente en las poblaciones de bacterias Gram-negativas.
- Se comprueba la relación entre el incremento de la biomasa total y los biomarcadores bacterianos con una mayor actividad microbiana, reflejada particularmente mediante la producción enzimática.
- El aumento en la actividad enzimática se explica no solo mediante el incremento de biomarcadores microbianos, sino también mediante el incremento de la actividad de enzimas extracelulares estabilizadas en compuestos edáficos.
- La fertilidad física aumenta como resultado de la modificación en la comunidad microbiana mediante la diversificación agrícola, explicada a través del incremento en las poblaciones de HMA ante la inclusión de CC, lo cual se relaciona con un mayor contenido de PSRG y una mayor estabilidad estructural.
- El aporte de COS tiene un efecto fundamental en el aumento de las actividades microbianas, al proveer los recursos energéticos necesarios para el desarrollo de los procesos biológicos edáficos. Por ende, la inclusión de CC representa una estrategia beneficiosa orientada al incremento de la actividad funcional edáfica mediante el aporte de sus residuos.
- La diversidad catabólica de las comunidades microbianas del suelo aumenta como consecuencia de la diversificación agrícola. Este efecto, sumado al incremento en la respiración microbiana y la producción enzimática revelan una mayor capacidad

microbiana para degradar los residuos vegetales aportados por los CC, particularmente en la consociación más diversificada.

- La eficiencia en el uso de la materia orgánica por parte de los microorganismos aumenta en la consociación CC2, lo cual se explica mediante un menor cociente metabólico y un mayor cociente microbiano.
- Una consociación de CC que incluya avena-nabo forrajero-vicia es altamente recomendable no solo para mejorar los procesos biológicos, como fue descrito, sino también para proveer N adicional al cultivo comercial.
- Si bien no se observó un efecto mejorador sobre la incidencia del SMS en soja ante la inclusión de CC, es posible que el aumento en la calidad de suelo registrada contribuya al manejo de esta enfermedad en el largo plazo. Por lo tanto, es necesario continuar analizando el desarrollo de esta enfermedad en relación con las mejoras edáficas registradas en este estudio.
- Teniendo en cuenta que la inclusión de una consociación de tres especies vegetales de CC en la rotación no tuvo efectos negativos sobre el rendimiento del grano de soja, el uso de esta consociación diversificada es altamente recomendable para mejorar la funcionalidad del suelo en regiones sin limitaciones hídricas.
- El incremento en la funcionalidad de suelo fue registrado tanto al momento de secado de los CC como al momento de pre-cosecha del cultivo comercial, demostrando la permanencia de estos efectos a lo largo del ciclo agrícola.
- Considerando la prevalencia del monocultivo de soja en Argentina durante las últimas décadas y sus consecuentes efectos negativos en los suelos, la diversificación agrícola mediante el uso de CC supone una alternativa de manejo viable y sus efectos deben continuar siendo investigados, utilizando diferentes consociaciones y en distintas regiones productivas del país.

Siendo la hipótesis de planificación de este estudio:

*El incremento de la diversidad microbiana del suelo, en interrelación con variables químicas y físicas edáficas, está asociado a la diversificación de los agroecosistemas, mediante la inclusión de cultivos de cobertura (vicia, avena y nabo forrajero), promoviendo la sanidad del cultivo de soja y su productividad.*

Las conclusiones obtenidas permiten de esta manera aceptar que el incremento de la diversidad microbiana del suelo, en interrelación con variables químicas y físicas edáficas, está asociado a la diversificación de los agroecosistemas, mediante la inclusión de cultivos de cobertura (vicia, avena y nabo forrajero). Sin embargo es necesario profundizar el estudio para comprender la relación entre dicho incremento con la sanidad y productividad del cultivo de soja.

## **-CAPITULO 6 -**

### **BIBLIOGRAFIA**

- Abawi GS, Widmer TL. 2000. Impact of soil health management practices on soil borne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *App. Soil Ecol.* 15(1): 37-47.
- Adam G, Duncan H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 943-951.
- Alef K. 1995. Soil respiration. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Alef, K., Nanninieri P. (Ed.). Academic Press. Harcourt Brace and Company publishers, London U.K. 214-219 pp.
- Allegrini M, Zabaloy MC, Gómez EV, 2015. Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Sci. Total Environ.* 533: 60-68.
- Allison S, Weintraub M, Gartner T, Waldrop M, 2011. Evolutionary economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. In: Shukla, G., Varma, A. (Ed.), *Soil Enzymology*. Springer, Berlin, 229-244 pp.
- Altieri M. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agric., Ecosyst. Environ.* 74: 19-31.
- Álvarez C, Quiroga A, Santos D, Bodrero M. 2013. Contribuciones de los cultivos de cobertura a la sostenibilidad de los sistemas de producción. Ediciones INTA, Anguil. 170 pp.
- Anderson T, Domsch KH. 1993. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> ( $qCO_2$ ) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25: 393-395.
- Aoki T, O'donnell K, Scandiani M. 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov. *Fusarium tucumaniae*, and *Fusarium virguliforme*. *Mycoscience.* 46:162-183.
- Augusto J, Brenneman TB, Culbreath AK, Sumner P. 2010. Night spraying peanut fungicides I. Extended fungicide residual and integrated disease management. *Plant Dis.* 94(6): 676-682.
- Azeez JO, Averbek W. 2010. Nitrogen mineralization potential of three animal manures applied on a sandy clay loam soil. *Bioresour. Technol.* 101: 5645–5651.
- Bååth E, Anderson TH. 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol. Biochem.* 35(7): 955-963.
- Balota E, Calegari A, Nakatani A, Coyne M, 2014. Benefits of winter cover crops and no-tillage for microbial parameters in a Brazilian Oxisol: A long-term study. *Agric Ecosyst Environ* 197: 31-40.
- Barbieri PA, Echeverría HE, Rozas HS, Martínez JP. 2015. Soybean and wheat response to lime in no-till Argentinean mollisols. *Soil and Till. Res.* 152: 29-38.
- Barri FR. 2010. Pueblos fumigados en Argentina: resistencia epidemiológica comunitaria al modelo económico de los agronegocios. *Ecol. Polít.*40: 67-72.

- Bedini S, Pellegrino E, Avio L, Pellegrini S, Bazzoffi P, Argese E, Giovannetti M. 2009. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1491–1496.
- Bohme L, Bohme F. 2006. Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long-term fertilization. . *Eur. J. Soil Biol.* 42: 1–12.
- Böhme L, Langer U, Böhme F. 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 109(1): 141-152.
- Botta GF, Tolón-Becerra A, Lastra-Bravo X, Tourn M, Balbuena R, Rivero D. 2013. Continuous application of direct sowing: Traffic effect on subsoil compaction and maize (*Zea mays* L.) yields in Argentinean Pampas. *Soil and Till. Res.* 134: 111-120.
- Bray RH, Kurtz LT. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-46.
- Bremner JM. 1996. Nitrogen total. En: *Methods of soil analysis: chemical methods part 3*. Sparks DK (Ed). American Society of Agronomy, Madison, USA. 1085–1122 pp.
- Burke W, Gabriels D, Bouma J. 1986. *Soil structure assessment*. A.A. Balkema. Rotterdam, 92 pp.
- Burket JZ, Hemphill DD, Dick RP. 1997. Winter cover crops and nitrogen management in sweet corn and broccoli rotations. *HortScience* 32(4): 664-668.
- Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* 58: 216-234.
- Burton J, Chen C, Xu Z, Ghadiri H. 2010. Soil microbial biomass, activity and community composition in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia. *J. Soil Sediments.* 10: 1267 -1277.
- Buyer JS, Teasdale JR, Roberts DP, Zasada IA, Maul JE. 2010. Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems. *Soil Biol. Biochem.* 42: 831-841.
- Caldwell B. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia.* 49: 637-644.
- Cambardella CA, Elliot ET. 1992. Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 777-783
- Campbell CD, Cameron C, Bastias B, Chen C, Cairney J, 2008. Long term repeated burning in a wet sclerophyll forest reduces fungal and bacterial biomass and responses to carbon substrates. *Soil Biol Biochem.* 40: 2246-2252.

- Campiglia E, Radicetti E, Mancinelli R. 2012. Weed control strategy and yield response in a pepper crop (*Capsicum annuum* L.) mulched with hairy vetch (*Vicia villosa* Roth.) and oat (*Avena sativa* L.) residues. *Crop Prot.* 33: 65-73.
- Cantarel AM., Pommier T, Desclos-Theveniau M, Diquélou S, Dumont M, Grassein F, Kastl EM, Grigulis K, Laîné P, Lavorel S, Lemauviel-Lavenant S, Personeni E, Schloter M, Poly F. 2015. Using plant traits to explain plant-microbe relationships involved in nitrogen acquisition. *Ecology.* 96(3): 788–799.
- Capurro J, Surjack J, Andriani J, Dickie Mj, González MC. 2010. Evaluación de distintas especies de cultivos de cobertura en secuencias soja-soja en el área sur de la provincia de Santa Fe. Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rosario, 224 pp.
- Casas R. 2007. Cultivos de Cobertura: una agricultura sustentable. Suplemento Campo. La Nación, 24.
- Cederlund H, Wessén E, Enwall K, Jones CM, Juhanson J, Pell M, Hallin S. 2014. Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. *Soil Ecol.* 84: 62-68.
- Chazarenc F, Brisson J, Merlin G. 2010. Seasonal and spatial changes of microorganism communities in constructed wetlands: a community level physiological profiling analysis. *Int. J. Chem. Eng.* 2010.
- Chu B, Zaid F, Eivazi F, 2016. Long-term effects of different cropping systems on selected enzyme activities. *Commun Soil Sci. Plant* 47 (6): 720-730.
- Dam RF, Mehdi BB, Burgess MSE, Madramootoo CA, Mehuys GR, Callum IR. 2005. Soil bulk density and crop yield under eleven consecutive years of corn with different tillage and residue practices in a sandy loam soil in central Canada. *Soil Till. Res.* 84 (1): 41-53.
- Danso SK, Labandera C, Pastorini D, Curbelo S. 1991. Herbage yield and nitrogen fixation in a triple species mixed sward of white clover, lotus and fescue. *Soil Biol. Biochem.* 23: 65–70.
- De Coninck B, Timmermans P, Vos C, Cammue BA, Kazan K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends Plant Sci.* 20: 91-101.
- De Prager MS, Rojas A, Pérez J, Zúñiga O, Gascó JM. 2006. Actividad y biomasa microbianas como indicadores de materia orgánica en sistemas de cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis*) en Toro, Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica,* 55(4): 7.
- De Vrieze J, Saunders AM, He Y, Fang J, Nielsen PH, Verstraete W, Boon N. 2015. Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water research.* 75: 312-323.
- Deng Y, Jiang YH, Yang Y, He Z, Luo F, Zhou J. 2012. Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics.* 13:133.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- Días T, Dukes A, Antunes PM. 2015. Accounting for soil biotic effects on soil health and crop productivity in the design of crop rotations. *J. Sci. Food Agric.* 95: 447–454.
- Ding G, Liu X, Herbert S, Novak, J, Dula A, Xing B. 2006. Effect of cover crop management on soil organic matter. *Geoderma.* 130: 229-239.
- Donoso Zegers C. 1992. *Ecología forestal*. Editorial Universitaria, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. Vol. 5, no 2, 82-104 pp.
- Douglas JT, Goss MJ. 1982. Stability and organic matter of surface soil aggregates under different methods of cultivation and in grassland. *Soil Till. Res.* 2: 155-175.
- Dutta M, Sardar D, Pal R, Kole RK. 2010. Effect of chlorpyrifos on microbial biomass and activities in tropical clay loam soil. *Environ Monit Assess* 160: 385-391.
- El Zahar Haichar F, Santaella C, Heulin T, Achouak W. 2014. Root exudates mediated interactions below ground. *Soil Biol. Biochem.* 77: 69-80.
- Elfstrand S, Hedlung K, Martensson A. 2007. Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring. *Appl Soil Ecol* 35: 610-621.
- Epelde LB, Mijangos I, Garbisu C. 2014. Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study. *Appl. Soil Ecol.* 75: 1-12.
- Farage PK, Ardo J, Olsson L, Rienzi E, Ball A, Pretty J, 2007. The potential for soil carbon sequestration in three tropical dryland farming systems of Africa and Latin America: a modeling approach. *Soil Till. Res.* 94: 457-472.
- Ferreras LA, Toresani SI, Faggioli VS, Galarza CM. 2015. Sensibilidad de indicadores biológicos edáficos en un Argiudol de la Región Pampeana Argentina. *Spanish J. Soil Sci.* 5(3). <https://sjss.universia.net/article/view/1273>
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Knight R. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(21): 7059-7066.
- Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Hingrat YL, Alabouvette C, Steinberg C. 2012. Potato soil-borne diseases, a review. *Agron. Sustain. Dev.* 32: 93-132.
- Floch C, Chevremont AC, Joanico K, Capowiez Y, Criquet S. 2011. Indicators of pesticide contamination: soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog Ecoplates. *Eur. J. Soil Biol.* 47: 256–263.
- Gabriel JL, Muñoz-Carpena R, Quemada M. 2012. The role of cover crops in irrigated systems: Water balance, nitrate leaching and soil mineral nitrogen accumulation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 155: 50-61.
- García C, Hernández MT, Costa F. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 28: 123-134.

- García-González I, Quemada M, Gabriel JL, Hontoria C. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal activity responses to winter cover crops in a sunflower and maize cropping system. *App. Soil Ecol.* 102: 10-18.
- Garland JL. 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol. Biochem.* 28: 213-221.
- Ge TD, Nie SA, Wu JS, Xiao HA, Hong Y, Wang S, Kozo I, Huang DF. 2011. Chemical properties, microbial biomass, and activity differ between soils of organic and conventional horticultural systems under greenhouse and open field management. *J. Soil Sediments* 11: 25-36.
- Gelsomino A, Badalucco, L., Ambrosoli, R., Crecchio, C., Puglisi, E., Meli, S. 2006. Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: a case study of agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2069-80.
- Giagnoni L, Pastorelli R, Mocali S, Arenella M, Nannipieri P, Renella G. 2016. Availability of different nitrogen forms changes the microbial communities and enzyme activities in the rhizosphere of maize lines with different nitrogen use efficiency. *Appl. Soil Ecol.* 98: 30-38.
- Gichangi EM, Njarui DM, Gatheru MJ, Magiroi KW, Ghimire SR. 2016. Effects of brachiaria grasses on soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in soils of the semiarid tropics of Kenya. *Trop Subtrop Agroecosys.* 19(2): 193-203.
- Gispert M, Emran M, Pardini G, Doni S, Ceccanti B. 2013. The impact of land management and abandonment on soil enzymatic activity, glomalin content and aggregate stability. *Geoderma.* 202-203: 51–61.
- Gregory PJ. 2006. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *Eur. J. Soil Sci.* 57: 2-12.
- Grobelak A, Napora A, Kacprzak M. 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecol. Eng.* 84: 22-28.
- Güsewell S, Gessner MO. 2009. N:P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Funct. Ecol.* 23: 211-219.
- Hall RA, Rebella CM, Ghersa JP. 1992. *Culot Field-crop systems of the pampas* C.J. Pearson (Ed.), *Field Crops Ecosystems. Ecosystems of the World*, Elsevier, Amsterdam, 413–450 pp.
- Hargreaves S, Hofmockel K, 2014. Physiological shifts in the microbial community drive changes in enzyme activity in a perennial agroecosystem. *Biogeochemistry* 117: 67-79.
- Hart PS, August JA, West AW. 1989. Long-term consequences of topsoil mining on select biological and physical characteristics of two New Zealand loessial soils under grazed pasture. *Land Degrad. Dev.* 1(2): 77-88.

- Hebel CL, Smith JE, Cromack JK. 2009. Invasive plant species and soil microbial response in the cascade range of Oregon. *Appl. Soil Ecol.* 42: 150–159.
- Heinze S, Raupp J, Joergensen RG. 2010. Effects of fertilizer and spatial heterogeneity in soil pH on microbial biomass indices in a long-term field trial of organic agriculture. *Plant Soil.* 328: 203–215.
- Higashi T, Yunghui M, Komatsuzaki M, Miura S, Hirata T, Araki H, Kaneko N, Ohta H. 2014. Tillage and cover crop species affect soil organic carbon in Andosol, Kanto, Japan. *Soil Till. Res.* 138: 64-72.
- Hillel, D. 1980. *Fundamentals of soil physics.* London Academic Press, Inc., 413 pp.
- Hund K, Schenk B. 1994. The microbial respiration quotient as indicator for bioremediation processes. *Chemosphere* 28(3): 477-490.
- Jenkinson D, Powlson D. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. *Methods for measuring soil biomass.* *Soil Biol. Biochem.* 8: 209-213.
- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48(1): 1-13.
- Klein E, Katan J, Gamliel A. 2012. Soil suppressiveness to *Meloidogyne javanica* as induced by organic amendments and solarization in greenhouse crops. *Crop Prot.* 39: 26-32.
- Lagomarsino A, Grego S, Kandeler E, 2012. Soil organic carbon distribution drives microbial activity and functional diversity in particle and aggregate-size fractions. *Pedobiologia* 55(2): 101-110.
- Lardone AV, Barraco M, Scianca C, Álvarez C, Díaz-Zorita M. 2012. Cultivos de cobertura en sistemas con soja bajo siembra directa. *Actas del XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo y XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo.* Mar del Plata, 162 pp.
- Larios-González RC, Salmerón-Miranda F, García-Centeno L. 2016. Fertilidad del suelo con prácticas agroecológicas y manejo convencional en el cultivo de café. *La Calera.* 14(23): 67-75.
- Le Bissonnais Y. 1996. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodibility: I. Theory and methodology. *Eur. J. Soil Sci.* 47: 425-437.
- Lehmann A, Rillig MC. 2015. Understanding mechanisms of soil biota involvement in soil aggregation: a way forward with saprobic fungi? *Soil Biol. Biochem.* 88: 298–302.
- Lenzi L, Masiero B, Fuentes F, Distéfano S, Salines L. 2010. Comportamiento de cultivares de soja frente al síndrome de la muerte repentina. Campañas 2006/07 a 2009/10. Informe de Actualización Técnica N°17. Soja. Actualización 2010:31-40 ISSN 1851-9245.
- Lenzi L, Godoy J, Scandiani MM, Distéfano de Vallone S, Salines LA. 2011. Efecto del síndrome de la muerte súbita sobre el rendimiento de plantas de soja. Informe de actualización técnica, EEA Marcos Juárez, N° 21.

- Li C, Li X, Kong W, Wu Y, Wang J. 2010. Effect of monoculture soybean on soil microbial community in the Northeast China. *Plant soil* 330 (1-2) 423-433.
- Li W, Zhan C, Jiang H, Xin G, Yang Z. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed, *Mikania micrantha* H.B.K. *Plant Soil*. 281: 309-324.
- Li Y, Liu Z, Hou H, Lei H, Zhu X, Li X, Tian C. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi-enhanced resistance against *Phytophthora sojae* infection on soybean leaves is mediated by a network involving hydrogen peroxide, jasmonic acid, and the metabolism of carbon and nitrogen. *Acta Physiol. Plant*. 35(12): 3465– 3475.
- Li ZF, Yang YQ, Xie DF, Zhu LF, Zhang ZG, Lin WX. 2012. Identification of autotoxic compounds in fibrous roots of *Rehmannia* (*Rehmannia glutinosa* Libosch.). *PLoS one*. 7(1): e28806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028806>
- Liu E, Yan C, Mei X, He W, Bing SH, Ding L, Liu Q, Liu S, Fan T. 2010. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China. *Geoderma* 158: 173–180.
- Liu S, Maimaitiaili B, Joergensen RG, Feng G. 2016. Response of soil microorganisms after converting a saline desert to arable land in central Asia. *App. Soil Ecol*. 98: 1-7.
- López-Fando C, Pardo M, 2011. Soil carbon storage and stratification under different tillage systems in a semi-arid region. *Soil Till. Res*. 111: 224-230.
- Lucero FG. 2015. Problemas y conflictos ambientales. Estado de situación de la ciudad de Río Cuarto (Córdoba, Argentina). *Rev. Univ. Geogr*. 24(2): 69-89.
- Luna L, Miralles I, Andrenelli MC, Gispert M, Pellegrini S, Vignozzi N, Solé-Benet A. 2016. Restoration techniques affect soil organic carbon, glomalin and aggregate stability in degraded soils of a semiarid Mediterranean region. *Catena*. 143: 256-264.
- Maltais-Landry G. 2015. Legumes have a greater effect on rhizosphere properties (pH, organic acids and enzyme activity) but a smaller impact on soil P compared to other cover crops. *Plant soil* 394(1-2): 139-154.
- Marinari S, Liburdi K, Masciandaro G, Ceccanti B, Grego S. 2007. Humification-mineralization pyrolytic indices and carbon fractions of soil under organic and conventional management in central Italy. *Soil Till. Res*. 92: 10-7.
- Marschner P. 2008. The role of rhizosphere microorganisms in relation to P uptake by plants. The ecophysiology of plant-phosphorus interactions, Springer, Netherlands. 165-176 pp.
- Martínez PJ, Barbieri PA, Sainz Rozas HR, Echeverría HE. 2013. Inclusion of cover crops in cropping sequences with soybean predominance in the southeast of the humid Argentine pampa. *Open Agric. J*. 7 (Suppl. 1): 3-10.
- Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Ann. Rev. Phytopathol*. 42: 35-59.

- McDaniel MD, Tiemann L, Grandy A. 2014. Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? a meta-analysis. *Ecol. Appl.* 24: 560-570.
- Meriles J, Vargas Gil S, Conforto C, Fighi G, Lovera E, March GJ, Guzmán C. 2009. Soil microbial communities under different soybean cropping systems: characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil Till. Res.* 103: 271-281.
- Miller RM, Jastrow JD. 2000. Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biol. Biochem.* 22(5): 579-584.
- Mulvaney RL. 1996. Nitrogen-Inorganic Forms. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T. and Sumner, M.E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods. Part 3.* Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 1123-1184 pp.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, Landi L, Pietramellara G, Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54(4): 655-670.
- Nannipieri P, Giagnoni L, Renella G, Puglisi E, Ceccanti B, Masciandaro G, Fornasier F. 2012. Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biol. Fertil. Soils.* 48: 743-762.
- Nascente AS, Li Y, Costa Crusciol C, 2013. Cover crops and no-till effects on physical fractions of soil organic matter. *Soil Till. Res.* 130: 52-57.
- Neal AL, Rossmann M, Brearley C, Akkari E, Guyomar C, Clark IM, Allen E, Hirsch PR. 2017. Land use influences phosphatase gene microdiversity in soils. *Environ. Microbiol.* 19(7): 2740-2753.
- Nilsson MC, Wardle DA, DeLuca TH. 2008. Belowground and aboveground consequences of interactions between live plant species mixtures and dead organic substrate mixtures. *Oikos* 117: 439-449.
- Nivelle E, Verzeaux J, Habbib H, Kuzyakov Y, Decocq G, Roger D, Catterou M. 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *App. Soil Ecol.* 108: 147-155.
- O'donnell K, Sink S, Scandiani M, Luque A, Colletto A, Biasoli M, Lenzi L, Salas G, González V, Ploper Ld, Formento N, Pioli R, Aoki T; Yang Xb, Brice Aj. 2010. Soybean sudden death syndrome species diversity within North and South America revealed by multilocus genotyping. *Phytopathology* 100:58-71.
- Ojeda G, Ortiz O, Medina CR, Perera I, Alcañiz JM. 2015. Carbon sequestration in a limestone quarry mine soil amended with sewage sludge. *Soil Use Manag.* 31: 270-278.
- Page AL. 1982. *Methods of soil analysis.* Number 9. American Society of Agronomy. Soil Science Society of America, Inc. Segunda Edición, Page, A.L. (Ed.) Madison, Wisconsin, USA. 1159 pp.

- Paul EA. 2014. Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic Press (Ed.), Colorado State University, USA. No. 4, 188-193 pp.
- Pérez-Brandán C, Arzeno JL, Huidobro J, Conforto C, Grümberg B, Hilton S, Bending GD, Meriles JM, Vargas-Gil S. 2013. The effect of crop sequences on soil microbial, chemical and physical indicators and its relationship with soybean sudden death syndrome (complex of *Fusarium species*). Span J. Agric. Res. 12(1): 252-264.
- Pérez-Brandán C. 2014. Impacto de diferentes prácticas agrícolas sobre la diversidad microbiana del suelo y la sustentabilidad de un agroecosistema sojero del norte argentino. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina. 134 pp.
- Pérez-Brandán C, Huidobro J, Grümberg B, Scandiani MM, Luque AG, Meriles JM., Vargas-Gil S. 2014. Soybean fungal soil-borne diseases: a parameter for measuring the effect of agricultural intensification on soil health. Can. J. Microbiol. 60(2): 73-84.
- Pérez-Brandán C, Huidobro J, Galván M, Vargas-Gil S, Meriles JM. 2016. Relationship between microbial functions and community structure following agricultural intensification in South American Chaco. Plant Soil Environ. 62(7): 321-328.
- Philip W, Ramsey A, Matthias C, Rilliga, Kevin P, Ferisb P, William E, Holbena P, James E, Gannon A. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. Pedobiologia. 50: 275-280
- Preger AC, Rillig MC, Johns AR., Du Preez CC, Lobe I, Amelung W. 2007. Losses of glomalin-related soil protein under prolonged arable cropping: A chronosequence study in sandy soils of the South African Highveld. Soil Biol. Biochem. 39(2): 445-453.
- Quiroga A, Carfagno P, Eiza MJ, Michelena R. 2007. Resultados parciales de la red de ensayos de cultivos de cobertura: Inclusión de cultivos de cobertura bajo agricultura de secano en la región semiárida pampeana. General Villegas y General Pico, Buenos Aires. 1-14.
- Rao MA, Scelza R, Acevedo F, Diez MC, Gianfreda L, 2014. Enzymes as useful tools for environmental purposes. Chemosphere 107: 145-162.
- Reddy KN, Zablotowicz RM, Locke MA, Koger CH, 2003. Cover crop, tillage, and herbicide effects on weeds, soil properties, microbial populations, and soybean yield. Weed Sci. 51 (6): 987-994.
- Reis EM, Trezzi Casa R, Carmona M. 2002. Prácticas alternativas de manejo para una agricultura sustentable agroecología: El camino para una agricultura sustentable" (Ed.) Santiago Sarandón. Capítulo "Elementos para el Manejo de enfermedades". 275- 308 pp.
- Restovich SB, Sasal MC, Irizar AB, Rimatori F, Darder ML, Andriulo AE. 2005. Rotación con maíz vs. monocultivo de soja: efecto sobre los stocks de carbono y nitrógeno edáficos. Pp. 208. En: VIII Congreso Nacional de Maíz. Rosario. Santa Fe. Argentina.

- Restovich SB, Andriulo AE, Améndola C. 2011. Introducción de cultivos de cobertura en la rotación soja-maíz: efecto sobre algunas propiedades del suelo. *Ciencia del Suelo* 29: 61-73.
- Restovich SB, Andriulo AE, Portela SI. 2012. Introduction of cover crops in a maize–soybean rotation of the Humid Pampas: Effect on nitrogen and water dynamics. *Field Crops Res.* 128: 62-70.
- Restovich SB, Andriulo AE. 2013. Cultivos de cobertura en la rotación soja-maíz: biomasa aérea, captura de nitrógeno, consumo de agua y efecto sobre el rendimiento en grano. En: C. Alvarez A, Quiroga D, Santos M, Bodrero M, Contribuciones de los cultivos de coberturas a la sostenibilidad de los sistemas de producción. La Pampa: Ediciones INTA. 29-35 pp.
- Rillig MC, Wright SF, Eviner VT. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil.* 238: 325–333.
- Rillig MC, Antonovics J, Caruso T, Lehmann A, Powell JR., Veresoglou SD, Verbruggen E. 2015. Interchange of entire communities: microbial community coalescence. *Trends Ecol. Evol.* 30(8): 470-476.
- Rillig MC, A Lehmann, 2016. Soil microbes and community coalescence. *Pedobiologia* 59 (1-2): 37-40.
- Rodríguez A, Sanders IR. 2015. The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J.* 9: 1053–1061.
- Romaniuk R, Giuffre L, Costantini A, Nannipieri P. 2011. Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. *Ecol. Indic.* 11: 1345 -1353.
- Rousk J, Brookes PC, Bååth E. 2010. The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. *Soil Biol. Biochem.* 42(3): 516-520.
- Roy KW, Rupe JC, Hershman DE, Abney TS. 1997 Sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis.* 81: 1100-1111.
- Rufo ML. 2003. Factibilidad de inclusión de cultivos de cobertura en Argentina. *Actas XI Congreso de AAPRESID.* Santa Fe, Argentina. 171-176 pp.
- Ruiz DE, Montecchia MS, Correa OS, Pucheu NL, Soria MA, García AF. 2008. En: *Actas del XLIV Annual Meeting-Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research.* Carlos Paz, Córdoba, Argentina. Characterization of pristine and agricultural soils by catabolic profiling of microbial communities. p102. ISSN 0327 9545 (print).
- Sá Pereira E, Galantini J, Quiroga A. 2013. Sistemas de cultivos de cobertura de suelo de otoño-invierno: sus efectos sobre la disponibilidad de agua. En C. Alvarez, A. Quiroga, D. Santos, y M. Bodrero, Contribuciones de los cultivos de coberturas a la sostenibilidad de los sistemas de producción. La Pampa: Ediciones INTA. Capítulo 10. 76-82 pp.

- SAGPyA. 2015. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación La Agricultura en la Argentina. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de Argentina. Ministerio de Economía, Buenos Aires, Argentina.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Leemans R. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*. 287(5459): 1770-1774.
- Säle V, Aguilera P, Laczko E, Mäder P, Berner A, Zihlmann U, van der Heijden MA, Oehl F. 2015. Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 84: 38–52.
- Samarappuli D, Johnson B, Kandel H, Berti M. 2014. Biomass yield and nitrogen content of annual energy/forage crops preceded by cover crops. *Field Crops Res.* 167:31-39.
- Sanyal SK, De Data SK. 1991. Chemistry of phosphorus transformation in soil. En: *Advances in soil science*. Springer (Ed.), New York, NY, 1-120 pp.
- Sasal MC, Andriulo AE, Taboada MA. 2006. Soil porosity characteristics and water movement under zero tillage in silty soils in Argentinian Pampas. *Soil Till. Res.* 87: 9-18.
- Satorre EH. 2012. Recent changes in Pampean agriculture: possible new avenues to cope global change challenges. En: Slafer, Araus (Ed.), *Crop Stress Management and Climate Change*; CABI Series No. 2, 47–57 pp.
- Saviozzi A, Levi-Minzi R, Cardelli R, Riffaldi R. 2001. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant soil.* 233(2): 251-259.
- Schimel JP, Bennett J. 2004. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85: 591-602.
- Shahzad T, Chenu C, Genet P, Barot S, Perveen N, Mougin C, Fontaine S, 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biol. Biochem.* 80: 146-155.
- Shannon D, Sen A, Johnson DA. 2002. Comparative study of the microbiology of soil structure under organic and conventional regimes. *Soil Use Manage.* 18: 274-83.
- Shen JP, Zhang LM, Guo JF, Ray JL, He JZ. 2010. Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China. *Appl. Soil Ecol.* 46: 119 -214.
- Soriano A, León RC, Sala OE, Lavado RS, Deregibus VA, Cauhépé MA, Scaglia OA, Velázquez CA, Lemcoff JH. 1991. Rio de la Plata grasslands. R.T. Coupland (Ed.), *Temperate Subhumid Grasslands. Ecosystems of the World. Part 8. Natural Grasslands*, Elsevier, Amsterdam, 367–407 pp.
- Steinweg JM, Dukes J, Wallenstein M, 2012. Modeling the effects of temperature and moisture on soil enzyme activity: Linking laboratory assays to continuous field data. *Soil Biol. Biochem.* 55: 85-92.

- Stirling GR, Smith MK, Smith JP, Stirling AM, Hamill SD. 2012. Organic inputs, tillage and rotation practices influence soil health and suppressiveness to soilborne pests and pathogens of ginger. *Australas. Plant Path.* 41: 99-112.
- Stocco MC, Mónaco CI, Abramoff C, Lampugnani G, Salerno G, Kripelz N, Consolo VF. 2016. Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of Septoria leaf blotch of wheat. *World J. Microb.Biot.* 32(3): 1-10.
- Strickland MS, Rousk J. 2010. Considering fungal: bacterial dominance in soils—methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biol. Biochem.* 42(9): 1385-1395.
- Tabatabai MA, Bremner JM. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301–307.
- Tian J, Fan M, Guo J, Marschner P, Li X, Kuzyakov Y. 2012. Effects of land use intensity on dissolved organic carbon properties and microbial community structure. *Eur. J. Soil Biol.* 52: 67-72.
- Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5(3): 240-245.
- Thougnon Islas AJ, Eyherabide M, Echeverría HE, Rozas HS, Covacevich F. 2014. Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrícicos nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires con manejo contrastante. *Rev. Argent. Microbiol.* 46(2): 133-143.
- Treseder KK, Turner KM. 2006. Glomalin in ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71:1257–1266.
- USEPA U. Environmental Protection Agency. 1974. Methods for chemical analysis of water and wastes. US Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Support Laboratory, Cincinnati, OH, USA.
- USEPA U. Environmental Protection Agency. 1993. Methods for chemical analysis of water and wastes. US Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Support Laboratory, Cincinnati, OH, USA.
- Van Der Heijden MG, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11(3): 296-310.
- Vance E, Brookes P, Jenkinson D. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707.
- Varela M, Scianca C, Taboada M, Rubio G. 2014 Cover crop effects on soybean residue decomposition and P release in no-tillage systems of Argentina. *Soil Till. Res.* 143:59-66.
- Vargas Gil S, Meriles JM, Conforto C, Figoni G, Basanta M, Lovera E, March GJ. 2009. Field assessment of soil biological and chemical quality in response to crop management practices. *World J. Microbiol.Biotechnol.* 25:439-448.

- Vargas-Gil S, Meriles J, Conforto C, Basanta M, Radl V, Hagn A, March GJ. 2011. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *Eur. J. Soil Biol.* 47(1): 55-60.
- Velmourougane K, Venugopalan MV, Bhattacharyya T, Sarkar D, Pal DK, Sahu A, Ray SK, Nair KM, Prasad J, Singh RS. 2013. Soil dehydrogenase activity in agro-ecological sub regions of black soil regions in India. *Geoderma* 197: 186-192.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. 2008. Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40(1): 1-10.
- Wei K, Chen Z, Zhu A, Zhang J, Chen L. 2014. Application of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy in determining phosphatase activities and P composition in soil aggregates influenced by tillage and residue management practices. *Soil Till. Res.* 138: 35-43.
- Welch RY, Behnke GD, Davis AS, Masiunas J, Villamil MB. 2016. Using cover crops in headlands of organic grain farms: Effects on soil properties, weeds and crop yields. *Agric. Ecosyst. Environ.* 216: 322-332.
- Westphal A, Abney TS, Xing LJ, Shaner GE. 2008. Sudden death syndrome of soybean. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0102-01.
- Williams SM, Weil RR. 2004. Crop cover root channels may alleviate soil compaction effects on soybean crop. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68(4): 1403-1409.
- Wright SF, Upadhyaya A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161: 575–586.
- Wright SF, Upadhyaya A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant soil.* 198(1): 97-107.
- Wu LK, Wang HB, Zhang ZX, Lin R, Zhong ZY, Lin WX. 2011. Comparative metaproteomic analysis on consecutively *Rehmannia glutinosa*–monocultured rhizosphere soil. *PLoS ONE* 6, e20611.
- Xi X, Wang L, Tang Y, Fu X, Le Y, 2012. Response of soil microbial respiration of tidal wetlands in the Yangtze River Estuary to increasing temperature and sea level: A simulative study. *Ecol Eng* 49: 104-111.
- Xing L, Westphal A. 2009. Effects of crop rotation of soybean with corn on severity of sudden death syndrome and population densities of *Heterodera glycines* in naturally infested soil. *Field Crops Res.* 112(1): 107-117.
- Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilman D. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology.* 84: 2042–2050.
- Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils.* 29: 111-129.

- Zhang B, Li Y, Ren T, Tian Z, Wang G, He X, Tian C. 2014. Short-term effect of tillage and crop rotation on microbial community structure and enzyme activities of a clay loam soil. *Biol. Fertil. Soils*. 50: 1077-1085.
- Zhao Y, Li J, Wang Z, Yan C, Wang S, Zhang J. 2012. Influence of the plant development on microbial diversity of vertical-flow constructed wetlands. *Biochem. Syst. Ecol.* 44: 4-12.
- Zhu B, Yi L, Guo L, Chen G, Hu Y, Tang H, Xiao C, Xiao X, Yang G, Acharya SN, Zeng Z. 2012. Performance of two winter cover crops and their impacts on soil properties and two subsequent rice crops in Dongting Lake Plain, Hunan, China. *Soil Till. Res.* 124: 95-101.

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

## PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

1. Verdenelli R. A., Conforto C., Perez-Brandan C., Chavarria, D., Rovea, A., Vargas-Gil S., Meriles J. (2013) Integrated multivariate analysis of selected soil microbial properties and their relationships with mineral fertilization management in a conservation agriculture system. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science* 63(7): 623-632.
2. Chavarria, D., Verdenelli R. A., Muñoz E., Conforto C., Restovich S., Andriulo A., Meriles J., Vargas-gil S. (2016) Soil microbial functionality in response to the inclusion of cover crop mixtures in agricultural systems. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Volume 14, Issue 2, e0304. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016142-8395>
3. Chavarría, D., Verdenelli, R., Serri, D., Restovich, S., Andriulo, A., Meriles, J., Vargas-Gil, S. (2016) Effect of cover crops on microbial community structure and related enzyme activities and macronutrient availability. *European Journal of Soil Biology*, 76, 74-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.07.002>

## PUBLICACIONES EN ACTAS DE CONGRESOS

1. D. Chavarría., E. Muñoz., C. Conforto., S. Restovich., A. Andriulo., J. Meriles y S. Vargas Gil. 2013. Actividad microbiana en respuesta a la inclusión de cultivos de cobertura en sistemas agrícolas de la pampa húmeda. IX Reunión Nacional Científico-Técnica De Biología De Suelos, 04 – 06 de septiembre. Santiago del estero, Argentina.
2. D. Chavarría., E. Muñoz., C. Conforto., S. Restovich., A. Andriulo., J. Meriles y S. Vargas Gil. 2013. Efecto de la diversificación de sistemas agrícolas de la pampa húmeda sobre la concentración de glomalina. IX Reunión Nacional Científico-Técnica De Biología De Suelos, 04 – 06 de septiembre. Santiago del estero, Argentina.

- 3.** D. Chavarría., E. Muñoz., C. Conforto., S. Restovich., A. Andriulo., J. Meriles y S. Vargas Gil. 2013. Diversidad de consumo de fuentes carbonadas en respuesta a la inclusión de cultivos de cobertura en sistemas agrícolas de la pampa húmeda. IX Reunión Nacional Científico-Técnica De Biología De Suelos, 04 – 06 de septiembre. Santiago del estero, Argentina.
- 4.** D. Chavarría., E. Muñoz., C. Conforto., S. Restovich., A. Andriulo., J. Meriles y S. Vargas Gil. 2014. Efecto de la diversificación de agroecosistemas pampeanos sobre la funcionalidad microbiológica edáfica. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo II Reunión Nacional “Materia Orgánica y Sustancias Húmicas” 05 - 09 de mayo. Bahía Blanca, Argentina.
- 5.** D. Chavarría., D. Serri., S. Restovich., A. Andriulo., J. Meriles y S. Vargas Gil. 2015. Beneficios de la inclusión de cultivos de cobertura sobre la funcionalidad microbiológica edáfica. IV Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos, 28 - 30 de abril. Esquel, Argentina.
- 6.** D. Chavarría., R. Verdenelli., D. Serri., S. Restovich., A. Andriulo., J. Meriles y S. Vargas Gil. 2015. Efecto de la inclusión de cultivos de cobertura en la estructura de las comunidades microbianas de suelo. IV Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos, 28 – 30 de abril. Esquel, Argentina.
- 7.** D. Chavarría., D. Serri., S. Restovich., A. Andriulo., M. Scandiani., A. Luque., L. Couretot., J. Meriles y S. Vargas Gil. 2015. Efectos de la rotación agrícola en el control del síndrome de muerte súbita en soja. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 7 - 9 de octubre. Santa fe, Argentina.
- 8.** Chavarría, D., Serri, D., Restovich, S., Andriulo, A., Meriles, J., Vargas Gil, S. Efecto del empleo de cultivos de cobertura sobre la concentración de glomalina en el suelo. XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rio Cuarto, 27 al 01 de Junio de 2016.

9. Chavarría, D., Serri, D., Rorig, M., Grasso, D., Restovich, S., Andriulo, A., Meriles, J., Vargas Gil, S. Biodiversidad bacteriana del suelo en respuesta a la inclusión de cultivos de cobertura. XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rio Cuarto, 27 al 01 de Junio de 2016.

10. D. Chavarría., S. Serri., L. Jacquelin., L. Couretot., M. Scandiani., A Luque., S. Restovich., A. Andriulo., J. and S. Vargas Gil Meriles. 2017. Effect of Agroecological Management of Agricultural Systems on the Impact of Sudden Death Syndrome. WUN Symposium cum Research Summit on Impacts of Grain Legume Research & Development in Developing Countries, June 08-15. Hong Kong, China.

## PREMIOS Y DISTINCIONES

### **Ganador de competencia de proyectos sobre leguminosas**

**Evento:** *WUN Symposium cum Research Summit on Impacts of Grain Legume Research & Development in Developing Countries.* June 08-15, 2017. Hong Kong, China.

**Organizador:** Chinese University of Hong Kong (CUHK) - VITASOY®

