

CAPÍTULO 2

Comunidades microbianas del suelo: Impacto en la sostenibilidad de los cultivos extensivos en regiones templadas

Luciana Belén Silvestro^{1,2},
Germán Pacheco^{1,2}, Ferruccio
Lucrecia Manso⁴, Sebastián

tina Soledad Merlos^{1,2},
Biganzolli³, Horacio Forján⁴,
Luzia⁵, María Virginia Moreno^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Funcional,
Fac. de Agronomía, Universidad de Buenos Aires,
Argentina. Rep. de Italia # 781

²Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas
(INBIOTEC-CONICET), y Universidad de Buenos Aires
(FIBA), Mar del Plata, Argentina

³Departamento de Métodos Científicos,
Fac. de Agronomía, Universidad de Buenos Aires,
Argentina

⁴Estación Experimental Barro Colorado,
Fac. de Agronomía, Universidad de Buenos Aires,
Argentina

⁵ Instituto de Botánica Carlos Darwin,
Univ. Nac. de La Plata, Prov. Buenos Aires,
Argentina
vmoreno@faa.unicen.edu.ar

Biotecnología, (BIOLAB) CONICET-CICBA,
Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas
del Centro de la Provincia de Buenos Aires,
CP B7300, Prov. Buenos Aires, Argentina.

Departamento de Métodos Científicos y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biológicas Aplicadas
del Centro de la Provincia de Buenos Aires,
Argentina

Cultivos y Sistemas de Información, Facultad de
Agronomía, Universidad de Buenos Aires,
Argentina

Estación Experimental Barro Colorado,
Fac. de Agronomía, Universidad de Buenos Aires,
Argentina

Botánica, Fac. de Cs. Naturales y Museo,
Univ. Nac. de La Plata, Prov. Buenos Aires,
Argentina

RESUMEN

Las regiones agrícolas extensivas, lo cual da continuidad a la actividad productiva, requieren la puesta de los componentes biológicos que sustentan en ese ambiente con los organismos no se limita a

Las regiones agrícolas extensivas proyectan una expansión del área de cultivos, lo cual da continuidad a la actividad productiva, requieren la puesta de los componentes biológicos que sustentan en ese ambiente con los organismos no se limita a los procesos de intensificación. Comprender la resiliencia del suelo es crucial, dado que pueden subsistir en ese ambiente con los organismos no se limita a los organismos, parásitos o simbioses. Conocer estos organismos no se limita a el rol que juegan en el equilibrio ecológico

como degradadores de restos orgánicos y como reguladores de poblaciones de fitopatógenos y plagas; sino que implica reconocer su capacidad de producir enzimas y metabolitos secundarios de potencial uso biotecnológico. Nuestro objetivo es evaluar el efecto antropogénico y gradientes ambientales sobre la diversidad y dinámica de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas y poco o no explorados. Considerando a los hongos como uno de los eslabones fundamentales de la cadena productiva en el marco de una agricultura sustentable, se identifican las especies fúngicas obtenidas por medio de métodos clásicos y moleculares, a los efectos de obtener colecciones de interés científico/biológico y potencial uso biotecnológico. Estos estudios pretenden aportar resultados que parcialmente sustenten o modifiquen aspectos de la aplicación de las diferentes prácticas agrícolas utilizadas en agroecosistemas templados.

INTRODUCCIÓN

La producción de cultivos extensivos en las regiones templadas ha adquirido una mayor relevancia en las últimas décadas, debido a la incorporación de nuevas tecnologías. En este contexto, los países productores de cereales proyectan una expansión del área de cultivo, lo cual provocará una continuidad en los procesos de intensificación. Estos procesos implican una respuesta integrada de los componentes de las comunidades de microorganismos del suelo. Esta línea de investigación se plantea en el marco de la agricultura sustentable, cuyos objetivos son según la Sociedad Americana de Agricultura: *“una agricultura sustentable es aquella que, en el largo plazo, promueve la calidad del medio ambiente y los recursos base de los cuales depende la agricultura, provee las fibras y alimentos necesarios para el ser humano; es económicamente viable y mejora la calidad de vida de los agricultores y la sociedad en su conjunto”*. Por lo tanto, consideramos que el alcance de nuestros estudios es principalmente nacional, pero puede resultar de interés en todos los sitios del mundo donde se practiquen estos sistemas, particularmente en las regiones templadas del mundo (Chile, Uruguay, Estados Unidos de América, Canadá, Europa Occidental y algunas regiones de Australia).

Entre los integrantes de los microorganismos del suelo se encuentran los hongos, cuya relevancia está dada por su papel en el equilibrio de los ecosistemas. Los mismos actúan como descomponedores de la materia orgánica, proporcionan nutrientes a las plantas y son potenciales e indicadores de la salud del ecosistema. Asimismo, participan en la formación de agregados del

suelo, la estimulación del crecimiento vegetal, la patogenicidad y la supresión de enfermedades de los cultivos. De esta manera, también pueden actuar tanto como fuente o sumidero para muchos elementos, así también como agentes de producción de metabolitos secundarios de interés industrial y degradadores de agroquímicos.

La abundancia de los hongos del suelo se estimó en el orden de 10^5 - 10^6 ufc/gramo de suelo [1]. Hasta el presente, se han descrito unas 100.000 especies en el Reino Fungi, pero su número se estima en unos 5 millones [2]. El término Fungi abarca globalmente todos los organismos que pertenecen a los Eumycota (hongos verdaderos). El grupo Eumycota es monofilético y abarca unos 10 phyla, de los cuales los Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Glomeromycota son los más conocidos. La fisiología de estos organismos va a depender del tipo de metabolismo que posean y el medio edáfico en el cual se estén desarrollando. Las principales influencias del medio suelo sobre las comunidades fúngicas, están dadas por el nivel y el tipo de materia orgánica, el pH, la aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, el contenido de humedad, la aireación, la temperatura, la profundidad en el perfil del suelo, la estación del año y la composición de la vegetación nativa o cultivada.

Basándonos en estas premisas, esta línea de investigación propone la necesidad de conocer y evaluar el efecto de los pulsos o intromisiones antropogénicas ejercidas por los diferentes manejos agrícolas sobre la diversidad y la dinámica de la comunidad fúngica del suelo, y considerarla como uno de los eslabones esenciales de la cadena de producción en el marco de la agricultura sostenible. El objetivo principal consiste en utilizar/aprovechar los conocimientos de diversidad y dinámica fúngica para el desarrollo de estrategias de Manejo Integrado de micosis en cultivos extensivos en los sistemas agrícolas. Asimismo, se propone incrementar los estudios en ambientes poco/no explorados a los efectos de incorporar especies ya conocidas o no de potencial interés científico/tecnológico.

SITUACIÓN ACTUAL EN LA ARGENTINA

En nuestro país, desde el 2000 a la actualidad, se han realizado trabajos con hongos de suelos agrícolas, principalmente sustentados por metodologías convencionales basadas en el uso de medios de cultivo para estudiar la diversidad fúngica, entre otros [3]. Asimismo, en los últimos cinco años han surgido

estudios de comunidades fúngicas del suelo mediante el empleo de metodologías moleculares [4]. Siendo el más relevante en cuanto a disponibilidad de secuencias el estudio realizado por Rascovan et al. [5].

METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Al momento de estimar “la diversidad de hongos en el suelo”, se debe ser precavido. Un punto crítico es el tamaño y la heterogeneidad de las muestras, dado que se ha comprobado que afecta a la distribución y la ocurrencia de hongos en el suelo [6]. Sumado a ello, el gran número de especies que habitan el suelo las diferencias entre los sitios de estudio, la falta de personal capacitado y de manuales de identificación correspondientes para caracterizar las especies.

Durante décadas, la micología ha basado sus estudios de diversidad empleando métodos de cultivo y observación directa. Estas metodologías han permitido conocer la diversidad de hongos del suelo asociados a diferentes parámetros de calidad del suelo, a procesos de mineralización de la materia orgánica, a detectar suelos supresivos y corroborar el efecto de la aplicación de fungicidas y herbicidas [7]. El uso de las herramientas tradicionales debe considerarse como la principal herramienta de aproximación a la realidad. Sin embargo, se han enunciado las restricciones de este tipo de estudio, señalando que el porcentaje de hongos cultivables varía desde un mínimo de <1% hasta un máximo de 100%, dependiendo de los organismos y del material estudiado [8]. Sumado a esto, algunos hongos pueden permanecer morfológicamente indistinguibles en condiciones de laboratorio o bien no pueden ser cultivados, tales como aquellos hongos de nutrición biotrófica, o que no producen estructuras fértiles que permitan su identificación. Por lo tanto, muchas veces este tipo de investigaciones se ven obstaculizadas por falta de técnicas disponibles para llevar a cabo un aislamiento exhaustivo de los hongos del suelo.

A modo de complementar este tipo de estudios, a partir del desarrollo de herramientas moleculares como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto a cebadores de regiones conservadas, como lo son los del DNA ribosomal (DNAr), se ha logrado identificar una fracción más grande de especies en las muestras ambientales, sobre todo de suelo [9]. Si bien son técnicas que al principio estuvieron limitadas por la escasa disponibilidad de datos de secuencias de referencia fiables, a la actualidad son muy utilizadas tanto me-

dante el uso de PCR convencional como de cuantitativa (PCR-qPCR) [9]. La PCR con cebadores para regiones conservadas, combinada con electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), ha sido una de las más utilizadas a los efectos de comparar perfiles de comunidades procedentes de diferentes muestras ambientales [10]. Esta metodología así como otras, tales como el análisis de polimorfismo mediante el uso de variación de longitud de fragmentos terminales de restricción (TRFLP), el análisis automatizado del espacio intergénico del DNAr (ARISA), [11] y la pirosecuenciación, han sido utilizados para el estudio de la diversidad de los hongos. Diversos enfoques se le han dado a estos estudios, entre ellos, la interpretación de los problemas de desarrollo, taxonomía y distribución de las especies. Con el desarrollo de estas investigaciones, la disponibilidad de secuencias del genoma de los hongos filamentosos ha incrementado, y por lo tanto, el número de estudios de los hongos ambientales también.

En los estudios enfocados a las comunidades fúngicas del suelo que se llevan a cabo en el laboratorio, se emplean tanto metodologías clásicas como moleculares: aislamiento, cultivo e identificación morfológica, a lo que se suma principalmente el uso de la PCR con cebadores adecuados con especificidad hacia DNA fúngico. Los cebadores principalmente corresponden a las regiones conservadas del DNAr, al espaciador transcrito interno (ITS), a la subregión pequeña (18S), a la subunidad 5.8S y a la subunidad grande (28S).

Las herramientas tradicionales nos han permitido y permiten aislar, conservar y conocer acerca de la biología de los integrantes de la comunidad. También nos permitieron generar colecciones de hongos de aplicación biotecnológica como aquéllos de potencial efecto antagonista, los denominados biocontroladores (ya sea de insectos o de otros hongos), de los considerados degradadores de agroquímicos (a través de procesos de biotransformación fúngica), y de aquellas especies fúngicas que se comportan como bioindicadores. En este último caso, las variaciones en su número y diversidad pueden ser una buena señal de los cambios en la actividad biológica del suelo.

Las herramientas moleculares no han permitido detectar perfiles moleculares de diferentes ambientes con gradientes antropogénicos y naturales y poder comparar su composición.

Por lo tanto, es complejo concluir si una técnica para el estudio de la diversidad es más apropiada que la otra [12]; por el contrario, se considera que son complementarias.



Figura 1. Estación Experimental Barrow, (38° 19' 25" S; 60° 14' 33" W), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Tres Arroyos, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS

A los efectos de detectar la potencialidad de los hongos del suelo como indicadores biológicos de cambios introducidos en los sistemas agrícolas, se han evaluado diferentes propiedades químicas y biológicas de los suelos. Los resultados reflejan una serie de estudios iniciados en el año 2009, dirigidos a evaluar los efectos de las diferentes prácticas agrícolas sobre la diversidad de las comunidades fúngicas del suelo cultivado (Fig. 1). Los resultados obtenidos tienen como propósito aportar conocimientos acerca del efecto de diferentes secuencias de cultivos, sistemas de labranzas y profundidades de muestreo, sobre la comunidad fúngica y la actividad biológica del suelo en sistemas agrícolas

del sudeste bonaerense. Todos los ensayos son de larga duración y se encuentran instalados en la Chacra Experimental Integrada Barrow, bajo la coordinación del Ing. Agr. Horacio Forján. A partir de los resultados obtenidos, se ha observado, en los sistemas bajo siembra directa (SD) una clara estratificación en profundidad del carbono orgánico del suelo (COS). Las actividades biológicas dependientes de la disponibilidad del COS, como lo son la respiración basal del suelo (RB) y actividades enzimáticas, han respondido de la misma manera en lo que respecta a un gradiente de profundidades. En general, estas actividades son mayores en los primeros centímetros del suelo (0-5 cm). Esto responde a que en los sistemas bajo SD, los restos vegetales quedan en superficie y la mineralización de la materia orgánica es mucho mayor ahí respecto a las capas más profundas. Sin embargo, en los ensayos evaluados en los cuales se compara una labranza del tipo SD versus una labranza convencional (LC), esta estratificación no se observó. Esto es debido a que en la LC los restos vegetales se incorporan al suelo mecánicamente, por lo tanto, las variables como la RB y las actividades enzimáticas no presentan un comportamiento diferentes entre los primeros centímetros (0-5 cm) del suelo respecto a los más profundos (5-20 cm). Se ha observado que estas propiedades del suelo dependen a su vez, de la época de muestreo; de esta manera se ve una clara estacionalidad en la respuesta de las mismas, siendo esta variable más fuerte que el tipo de labranza o la rotación de cultivos planteada para esa zona. En este contexto, nuestros resultados sugieren que las propiedades biológicas del suelo son muy dinámicas, por lo que tienen la ventaja de servir de señales tempranas de disturbios. En este estudio se pudo determinar la alta sensibilidad de las mismas respecto a la RB y al COS.

En cuanto a estructura de la comunidad fúngica de suelos agrícolas, en los estudios realizados mediante metodologías tradicionales, se ha observado una clara preponderancia de integrantes del Phylum Ascomycota por sobre los demás. Los datos de ocurrencia de aislamientos, demostraron un mayor número de propágulos fúngicos en lotes bajo manejo con pasturas, que en lotes provenientes de agricultura intensa. En general, en los resultados obtenidos no se observó un efecto directo de los sistemas de labranza o las rotaciones de cultivo sobre la diversidad alfa de las comunidades fúngicas estudiadas. Tampoco se observó una correlación entre los estimadores de diversidad y la actividad biológica del suelo. Sin embargo, sí se observó que variables como estacionalidad, profundidad y tipo de manejo modifican la estructura de la comunidad fúngica del suelo.



Figura 2. Salinas de Bustos a 1.096 m sobre el nivel del mar (S 30° 18' 09,4") (WO 67° 34' 40,6"), Provincia de La Rioja, Argentina.

En lo que respecta a intervenciones antropogénicas como resultado de la deforestación de bosques nativos, como lo son el desmonte y la implementación de sistemas agrícolas, hemos observado cambios en la estructura de las comunidades. Los resultados preliminares no han permitido detectar la diferente composición de la comunidad fúngica de suelos de monte y desmonte, respecto a aquellos donde se ha implantado soja, procedentes de la región del monte chaqueño.

Mediante metodologías moleculares (PCR-ITS-DGGE), se ha podido estimar el perfil molecular de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas, de la rizósfera de plantas nativas de la Boca de las Sierras (Prov. de Buenos Aires) y de suelos a diferentes altitudes de la provincia de La Rioja (Fig. 2). Los principales

resultados obtenidos han reflejado la diferente composición de estas comunidades reflejándose no sólo de los cultivables sino también de los no cultivables. Los perfiles obtenidos permitieron comparar las comunidades de diferentes hábitats y determinar los niveles de similitud entre las mismas.

El uso de herramientas tradicionales como lo son el aislamiento y cultivo de los hongos del suelo, nos ha permitido contar con una colección de aproximadamente 600 cultivos de interés científico y tecnológico. Entre éstos, se hallan colecciones de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp., que están siendo evaluadas como biotransformadoras de sustratos naturales y productoras de metabolitos secundarios de interés agroindustrial, entre otras potenciales aplicaciones.

POTENCIALIDADES DE LA LÍNEA DE ESTUDIO

Los hongos en los sistemas agrícolas son un eslabón fundamental en la cadena productiva. Por lo tanto, esta línea de trabajo permitirá **sustentar o modificar** aspectos de la aplicación de las diferentes prácticas agrícolas utilizadas en agroecosistemas templados. Los conocimientos generados a partir del estudio de comunidades en sistemas no agrícolas permite contar con datos de pérdidas de biodiversidad por intervenciones antropogénicas. Asimismo, permite generar colecciones de géneros de interés agro-industrial como ser *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. entre otros.