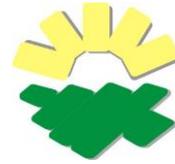




*Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Escuela para Graduados*



**IMPACTO DE DIFERENTES PRÁCTICAS
AGRÍCOLAS SOBRE LA DIVERSIDAD
MICROBIANA DEL SUELO Y LA
SUSTENTABILIDAD DE UN AGROECOSISTEMA
SOJERO DEL NORTE ARGENTINO**

Carolina Pérez Brandán

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2014

**IMPACTO DE DIFERENTES PRÁCTICAS AGRÍCOLAS SOBRE LA
DIVERSIDAD MICROBIANA DEL SUELO Y LA SUSTENTABILIDAD DE UN
AGROECOSISTEMA SOJERO DEL NORTE ARGENTINO**

Carolina Pérez Brandán

Comisión Asesora de Tesis

Director: Dra. Silvina Vargas Gil

Asesores: Dr. José Manuel Meriles (Codirector)

Dr. Hernán Apezteguía

Tribunal Examinador de Tesis

Dr. Hernán Apezteguía

Dr. Carlos Urcelay

Dr. Alicia María Thuar

Presentación formal académica

Octubre de 2014

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por acompañarme y ayudarme en el transcurso de esta etapa de mi vida.

Al mi directora, Dra. Silvina Vargas Gil, por enseñarme, guiarme, apoyarme, comprenderme, por su dedicación, su paciencia y ser siempre alentadora en el proceso de la tesis. Por ser además de una excelente persona, compañera y amiga. Por haber confiado en mí.

Al Dr. José Meriles, mi codirector, por aportarme sus conocimientos con humildad y paciencia. Por su enseñanza, por las sugerencias recibidas en el transcurso y escritura de la tesis. Por brindarme, sobre todas las cosas, su amistad.

Agradezco a mi Asesor de Tesis, Dr. Hernán Apezteguía, por sus valiosas contribuciones y consejos.

Al Ing. Agr. Javier Martín por su colaboración en los muestreos a campo.

Al personal de Laboratorio de Suelos de la EEA-INTA-Salta por su ayuda en los análisis de Laboratorio.

Al Dr. Michael Schotler y Annabel Meyer del Helmholtz Zentrum München. Institute of Soil Ecology, Department of Terrestrial Ecogenetics, Neuherberg, Alemania por sus enseñanzas y colaboración en parte de los experimentos de esta tesis.

A Jorgelina, David y Marcos, por su incondicional ayuda y apoyo, y sobre todo por su amistad.

Al Ing. Agr. Eduardo Corvalán, por su colaboración y escucha en todas las etapas de esta tesis.

A todos que de una u otra forma colaboraron y brindaron su apoyo para la realización de este trabajo.

RESUMEN

La intensificación de los sistemas agrícolas del noroeste argentino ha originado un incremento en la degradación de la calidad de los suelos, con el consecuente aumento de las enfermedades en el cultivo de soja. Al ser la microflora edáfica una herramienta ideal para determinar el deterioro del suelo, sus variaciones pueden indicar como manipular este ambiente para favorecer las poblaciones de biocontroladores y con ello la sanidad del cultivo. El objetivo de esta tesis fue evaluar el impacto del manejo bajo monocultivo vs. la rotación de cultivos, sobre la diversidad microbiana del suelo y su interacción con parámetros químicos y físicos edáficos y la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo. Se tomaron muestras rizosféricas de distintos lotes (sitios) productivos y sitios prístinos de la Localidad de Las Lajitas, Salta, durante 2009-10/2010-11/2011-12. Se evaluaron diversos parámetros biológicos, químicos y físicos, junto a la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo y el rendimiento del cultivo. La deforestación y las actividades agrícolas convencionales modificaron la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo, además de los agentes potenciales de biocontrol de enfermedades. Los manejos convencionales estuvieron asociados a bajos niveles de la mayoría de los parámetros biológicos y presentaron los mayores niveles de incidencia para todas las enfermedades registradas. Además, estuvieron asociados a mayores emisiones de óxido nitroso, lo que contribuye al calentamiento global. Se pudo determinar a *Fusarium crassisporitatum* Scandiani, T. Aoki et O'Donnell, sp. nov., como la especie más predominante en la zona de estudio. Nuestros resultados apoyan la hipótesis e indican que las prácticas de manejo conservacionistas, mejoran las transformaciones biológicas en el suelo, promoviendo la fertilidad del suelo. Fue posible validar la hipótesis planteada en este trabajo y confirmar que los manejos convencionales disminuyen la diversidad microbiológica del suelo, alterando el equilibrio entre comunidades microbianas, deteriorando sus condiciones químicas-físicas edáficas, y la sanidad del cultivo.

Palabras clave: Agricultura intensiva, diversidad estructural, diversidad funcional, microorganismos de suelo, hongos patógenos.

ABSTRACT

In the northeast region of Argentina, the intensification of the agricultural systems through the use of non- conservationist farming practices has led to a decrease of the essential nutrients available for crop growth. This brings along an increased degradation of soil quality and the consequent enlargement in diseases caused by soil-borne fungi. In relation to chemical and physical variables, little is known about the impact of agricultural practices on soil biodiversity in non-traditional areas of northern Argentina. Therefore, the principal aim of this work was to evaluate the impact of conventional farming (soybean monoculture) vs conservation management (soybean–maize rotation), on soil microbial diversity and its interaction with soil chemical and physical parameters. The incidence of soil-borne fungal diseases in soybean was evaluated as well. Soils under different management systems and native vegetation were evaluated during 3 crop cycles (2009-2010, 2010-2011 and 2011-2012) in Las Lajitas, Salta. Samples from agricultural soils were obtained from the row zone. Several biological, chemical and physical parameters were evaluated. Our studies indicate that deforestation and intensive agricultural activities modified the structure and function of soil microbial communities, including potential biocontrol agents. Monoculture was associated with low levels of biological, chemical and physical parameters and presented the highest levels of incidence of soilborne diseases. In addition, they were associated with higher emissions of nitrous oxide, which contributes to global warming. We were able to determinate *Fusarium crassispitatum* Scandiani, T. Aoki et O'Donnell, as the most dominant specie in the study area. Our results indicate that conservation management practices improve biological transformations on soil validating the hypothesis suggested in this work. It was also possible to confirm that conventional maneuvers decrease soil microbial diversity, altering the balance between microbial communities, impairing their chemical-physical edaphic conditions and crop health.

Key words: Intensive agriculture, Structural diversity and functional diversity conventional management, soilborne deseases.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Realidad agrícola del cultivo de soja en nuestro país.....	1
1.2 Manejo de cultivos en siembra directa: rotación vs. monocultivo.....	2
1.3 El suelo como recurso fundamental.....	5
1.4 Los microorganismos y su rol clave en las funciones del suelo: Cuantificación y evaluación.....	7
1.5 La diversidad microbiana en el manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo.....	10
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14

CAPÍTULO 2 . MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 SITIO DE ESTUDIO.....	16
2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
2.3 DISEÑO DE MUESTREO.....	21
Toma de muestras de suelo.....	21
2.4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	23
2.4.1. Analizar la diversidad de las comunidades microbianas del suelo en soja en diferentes sistemas productivos, en cuanto a la abundancia de microorganismos cultivables, potenciales biocontroladores, biomasa microbiana y contenido de fosfolípidos del suelo.....	23
Hongos totales.....	23
Bacterias totales.....	24
Potenciales biocontroladores.....	24

Biomasa microbiana.....	26
Carbono de la biomasa microbiana (CBM).....	26
Contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP).....	27
Perfiles de fosfolípidos (PLFA).....	27
2.4.2. Analizar la diversidad de las comunidades microbianas del suelo en soja en diferentes sistemas productivos, en cuanto a las funciones microbianas como respiración, hidrólisis de diacetato de fluoresceína y actividad deshidrogenasa y fosfatasa ácida y genes relacionados al ciclo del Nitrógeno.....	30
Respiración microbiana del suelo.....	30
Actividad enzimática.....	30
Actividad proteasa-lipasa-esterasa. Hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)..	31
Actividad deshidrogenasa.....	32
Actividad fosfatasa ácida.....	32
Cuantificación de genes relacionados al ciclo del Nitrógeno.....	32
2.4.3. Evaluar parámetros químicos y físicos del suelo en soja en diferentes sistemas productivos.....	37
Cuantificación de parámetros químicos.....	37
Carbono total (Materia Orgánica).....	37
Nitrógeno total (NT).....	37
Nitrato (NO^{-3}) y Amonio (NH_4).....	38
pH.....	38
Fósforo extractable (Pe).....	38
Conductividad eléctrica (CE) y Capacidad hídrica de saturación (CHS).....	39
Cuantificación de parámetros físicos.....	39
Textura.....	39
Estabilidad de agregados del suelo (EAS).....	39
Densidad Aparente.....	40

2.4.4. Evaluar la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo.....	40
Evaluación de enfermedades.....	40
2.4.5. Rendimiento del cultivo.....	41
2.4.6. Análisis estadístico.....	41

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

Abundancia de microorganismos cultivables: Hongos y bacterias totales y potenciales biocontroladores como <i>Trichoderma</i> spp., <i>Gliocladium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> fluorescentes y Actinobacterias.....	43
Biomasa microbiana y contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP).....	50
Contenido de fosfolípidos del suelo.....	52
Respiración microbiana, hidrólisis de diacetato de fluoresceína, actividad deshidrogenasa y actividad fosfatasa ácida.....	53
Abundancia de genes funcionales involucrados en el ciclo del Nitrógeno.....	56
Atributos microbiológicos en respuesta al manejo: Análisis de componentes Principales.....	61
Parámetros químicos del suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos	63
Parámetros físicos del suelo en sistemas bajo monocultivo de soja, rotación de cultivos y suelo prístino de bosque tropical.....	65
Correlación entre los parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo.....	67
Atributos microbiológicos, químicos y físicos en respuesta al manejo agrícola: Análisis de componentes principales.....	69
Incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en distintos sistemas	

productivos.....	70
Productividad del cultivo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos.....	73
Correlación entre los principales parámetros microbiológicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo.....	74
Atributos biológicos, químicos y físicos y su relación con la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo junto al rendimiento en respuesta al manejo agrícola: Análisis de componentes principales.....	79

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

Abundancia de microorganismos cultivables, potenciales biocontroladores, biomasa microbiana, contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) y contenido de fosfolípidos del suelo bajo monocultivo, rotación de cultivos y suelo prístino de bosques tropicales.....	81
<i>Microorganismos cultivables</i>	81
<i>Carbono de la Biomasa Microbiana</i>	84
<i>Contenido de Proteínas relacionadas a la Glomalina del suelo (GRSP)</i>	85
<i>Perfiles de fosfolípidos del suelo</i>	86
Funciones microbianas: Respiración, hidrólisis de diacetato de fluoresceína, actividad deshidrogenasa, fosfatasa ácida y genes relacionados al ciclo del Nitrógeno en sistemas bajo monocultivo, rotación de cultivos y suelos prístinos de bosque tropical.	87
<i>Enzimas microbianas</i>	87
<i>Actividad Deshidrogenasa</i>	90
<i>Genes funcionales del ciclo del Nitrógeno</i>	91
Parámetros químicos y físicos del suelo en soja en sistemas bajo monocultivo y	

rotación de cultivos	94
<i>Parámetros Químicos</i>	94
<i>Parámetros físicos</i>	98
Interacción entre los parámetros biológicos, químicos y físicos del suelo en sistemas bajo monocultivo y rotación de cultivos	99
Incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y su relación con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo en sistemas bajo monocultivo y rotación de cultivos	103
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	109
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA	111

LISTA DE TABLAS Y CUADROS

Tabla 2.1. Tratamientos con distintos tipos de manejos agrícolas.....	18
Tabla.2.2. Características de las variedades de soja incluidas en los ensayos.....	19
Tabla 2.3. Ácidos grasos de fosfolípidos comúnmente utilizados como biomarcadores para grupos específicos de microorganismos.....	29
Tabla 2.4. Componentes de la reacción de la mastermix usada para cuantificar los genes diana funcionales involucrados en el ciclo del Nitrógeno.....	35
Tabla 2.5. Set de primers y perfiles térmicos usados para la cuantificación absoluta de los genes diana funcionales involucrados en el ciclo del Nitrógeno.....	36
Tabla 3.1. Promedio de parámetros químicos del suelo en sistemas de monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	63
Tabla 3.2. Análisis de correlaciones parciales ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos de suelos provenientes de distintos sistemas productivos y suelo prístino de bosque tropical. Promedio de las campañas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	67
Tabla 3.3. Rendimiento de soja y maíz (Kg/ha) en sistemas bajo monocultivo de soja (MM) y rotación de cultivos (MR) durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	73
Tabla 3.4. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2009-2010.....	74
Tabla 3.5. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2010-2011.....	76

Tabla 3.6. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2011-2012.....

INDICE DE FIGURAS

Fig. 2.1. Ubicación de la zona de estudio, A) Fracción de mapa de la provincia de Salta donde se destaca el Departamento de Anta y sus localidades, entre ellas la localidad de Las Lajitas. B) Fotografía de un lote de producción típico de la localidad de Las Lajitas. C) Imagen satelital de la localidad de Las Lajitas donde se muestran los lotes productivos sojeros muestreados.	17
Fig. 2.2. Muestreo de suelos en sitios y bosque tropical de Las Lajitas. Campañas 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012. A) Muestra biológica dispuestas en bolsas plásticas listas para su refrigeración. B) Barreno utilizado en el muestreo modificado a 10 cm de profundidad. C) Lote de monocultivo de soja. D) Personal de apoyo realizando el muestreo químico-físico. E) Bosque tropical. F) Muestra microbiológica del bosque tropical. G y H) Lotes bajo rotación soja-maíz.....	22
Fig. 3.1. Poblaciones cultivables de hongos y bacterias totales en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012....	43
Fig. 3.2. Poblaciones cultivables de hongos potenciales biocontroladores, <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Gliocladium</i> spp. en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	45
Fig. 3.3. Poblaciones cultivables de bacterias potenciales biocontroladoras, Actinobacterias y <i>Pseudomonas</i> fluorescentes en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	46
Fig. 3.4. Poblaciones cultivables de hongos potenciales biocontroladores (<i>Trichoderma</i> spp. (A) y <i>Gliocladium</i> spp. (B)) cultivados en medio específico CRS.....	48
Fig. 3.5. Poblaciones cultivables de bacterias potenciales biocontroladoras (Actinobacterias (A) y <i>Pseudomonas</i> fluorescentes (B)) cultivados en medio Küster	

y King A y B respectivamente.....	49
Fig. 3.6. Carbono de la biomasa microbiana (CBM) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	50
Fig. 3.7. Contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	51
Fig. 3.8. Perfiles de fosfolípidos (PFLAs) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	52
Fig. 3.9. Respiración microbiana en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	53
Fig. 3.10. Actividad microbiana en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012. A) Actividad hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA). B) Actividad deshidrogenasa. C) Actividad fosfatasa ácida...	54
Fig. 3.11. Ciclo del Nitrógeno.....	56
Fig. 3.12. Número de copias de los genes funcionales <i>nifH</i> , <i>amoA</i> y <i>amoB</i> relacionados al ciclo del N en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011.....	57
Fig. 3.13. Número de copias de los genes funcionales <i>nirS</i> , <i>nirK</i> y <i>nosZ</i> relacionados al ciclo del N en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011.....	59

Fig. 3.14. Biplot del ACP para el efecto de sistemas de monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR) sobre parámetros microbiológicos del suelo durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	61
Fig. 3.15. Estabilidad de agregados del suelo (EA) y densidad Aparente (DA) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR) durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	65
Fig. 3.16. Biplot del ACP para el efecto de sistemas bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR) sobre parámetros microbiológicos, físicos y químicos del suelo durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	69
Fig. 3.17. Incidencia de las enfermedades más frecuentes encontradas en el cultivo de soja bajo monocultivo (MM) y rotación de cultivos (MR), durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011.....	70
Fig. 3.18. Incidencia de las enfermedades menos frecuentes encontradas en el cultivo de soja bajo monocultivo (MM) y rotación de cultivos (MR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.....	71
Fig. 3.19. Incidencia de las principales enfermedades encontradas en maíz bajo monocultivo (MM) y rotación de cultivos (MR), durante la campaña 2011-2012.....	72
Fig. 3.20. Biplot del ACP para el efecto de sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos sobre parámetros microbiológicos, físicos y químicos del suelo durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012, en relación a la presencia de enfermedades causadas por hongos de suelo y el rendimiento del cultivo.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Aapresid	Asociación argentina de productores en siembra directa
BSA	albúmina de suero bovino
°C	grado centígrado
DEPC	agua bidestilada
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxinucleótidos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBN	fijación biológica de Nitrógeno
FDA	hidrólisis de diacetato de fluoresceína
g	gramos
gr/l	gramo por litro
GM	grupo de madurez
GRSP	proteínas relacionadas con la glomalina
ha.	hectárea
hrs.	horas
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
INT	2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio
INTF	iodo-nitrotetrazolio formazan
mg	miligramo
mg/ml	miligramos por mililitro
min.	minutos
ml	mililitro
mM	mili molar

ng	nanogramo
NOA	noroeste argentino
nm	nanometros
nt	nucleótidos
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la DNA polimerasa
PCR q	reacción en cadena de la DNA polimerasa en tiempo real
PG	poder germinativo
PM	peso molecular
pmol	pico molar
PLFA	perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos del suelo
ppm	partes por millón
p/v	peso en volumen
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SAGPyA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
seg.	segundos
SD	Siembra directa
SYBR Green	colorante orgánico
Tn	tonelada
Vol.	volumen
v/v	volumen en volumen
µg	microgramos
µg/ml	microgramo por mililitro
µl	microlitro
µM	micromolar

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Realidad agrícola del cultivo de soja en nuestro país

Argentina tiene un vasto potencial agrícola y grandes ventajas naturales para la generación de productos agropecuarios. Esto permitió que la superficie sembrada con cultivos extensivos se expandiera en los últimos años, de manera que en el ciclo 2009/10 alcanzó la cifra récord de producción de más de 92 millones de toneladas (tn) de granos (SAGPy A, 2010). En este contexto, el cultivo de soja (*Glycine max* L.) ocupa una amplia zona ecológica que se extiende aproximadamente desde los 23° S (en el extremo norte del país) a los 39° S (en el sur) de latitud, concentrándose principalmente en la región pampeana. Es el cultivo de más rápida adopción y expansión en la historia de la agricultura argentina. De una producción nacional de 59.000 tn (1970/71), llegó en 30 años a 25.890.000 tn (2000/01) y a 40.300.000 tn en 2011/12, convirtiéndose, por su participación y aportes al valor de la producción y exportación, en el principal producto de la agricultura nacional (Aldaya *et al.*, 2010).

Argentina ocupa el décimo puesto como país agrícola según un ranking de superficie cultivada publicado por el Banco Mundial, sobre datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Con 31 millones de hectáreas (ha) agrícolas, el país se ubica por debajo de Estados Unidos, India, Rusia, China, Brasil y Australia y representa el 2,2% del área cultivada mundial total (Bolsa de Comercio de Rosario, Argentina, 2012). En Argentina, la producción agrícola se basa fundamentalmente en un paquete tecnológico que combina a los cultivos transgénicos, la siembra directa (SD) y el herbicida glifosato. Así, los cultivos transgénicos (soja, maíz y algodón) ocupan 23 millones de ha, cerca de tres cuartas partes del total sembrado en el país. A partir de la aplicación de glifosato durante la producción de los cultivos transgénicos, se potenció el uso de este herbicida lo que permitió que la superficie agrícola

argentina se expandiera hasta llegar a un 78,5 % bajo SD (Aapresid, 2012), donde la única posibilidad de control de malezas es el control químico, tanto en cultivo como durante el período de barbecho. Para el caso de la soja, en la campaña 2011-2012 y 2012-2013, la superficie cultivada en el país alcanzó los 18,7 y 19,5 millones de ha respectivamente, lo que supone un 70% de la superficie total cultivada (Bolsa de Comercio de Rosario, 2013; Agromercado, 2013) con un rinde promedio de 40,5 y 48,3 millones de tn, respectivamente (Agromercado, 2013), mientras que en la región NOA la superficie implantada con soja llegó a los 2,4 millones de ha. Dentro de la zona norte, Salta se destaca por su creciente producción, siendo para la provincia el cultivo de mayor superficie y volumen con un rinde promedio de 2,9 qq y 1,5 millones de has sembradas en la presente campaña (SAGPy A, 2012).

1.2. Manejo de cultivos en siembra directa: rotación vs. monocultivo

El desarrollo tecnológico en el sector productivo, a partir del uso de cultivos con altos rendimientos, aunque fuertemente extractivos, ha acompañado la expansión de la frontera agropecuaria, teniendo al cultivo de soja como protagonista. Por lo que, la soja cultivada bajo el sistema de SD fue avanzando sobre áreas destinadas a la implantación de pasturas para uso ganadero, transformándose prácticamente en agricultura permanente, lo que obligó a aquellas actividades a desplazarse hacia zonas marginales (Grenz *et al.*, 2007). La tendencia actual de expansión de la frontera agraria e incremento de las exportaciones está impulsada por fuerzas competitivas que continúan en aumento. Este proceso de “agriculturización” ha generado una simplificación de los sistemas productivos actuales, caracterizados por una deficiente planificación de rotaciones y preponderancia del monocultivo de soja (Botta *et al.*, 2013). Esto ha generado nuevos riesgos ambientales o bien agravado los ya existentes, requiriendo una respuesta por parte de la investigación y extensión agrícola. Entre estos riesgos están la deforestación y pérdida de biodiversidad, la contaminación de suelos y acuíferos por el creciente uso de agroquímicos, la pérdida de la fertilidad del suelo por la extracción y escasa reposición de nutrientes y la pérdida de la capacidad de resiliencia de tierras con potencial productivo, lo que aceleró algunos

procesos que comprometen la sustentabilidad de los agroecosistemas. En nuestro país, las prácticas culturales tendientes a la preservación de los recursos naturales, generalmente no son integradas a las tácticas de manejo de los cultivos (Micucci y Taboada, 2006). Por otra parte, en el intento por aumentar el rendimiento y la competitividad, las prácticas destinadas a mejorar la sustentabilidad agrícola no logran coincidir con las exigencias del mercado actual (Martín, 2012, comunicación personal). Sin embargo, el uso de herramientas conservacionistas como la SD y los sistemas de rotaciones constituyen una opción proactiva para mitigar los efectos producidos por la agriculturización y el monocultivo de soja.

El auge de la SD en la década de los 90's, supuso un sistema de cultivo sostenible que actualmente ha sido adoptado masivamente, transformándose en el paradigma de la agricultura sustentable (Buschiazzo *et al.*, 1998; Díaz-Zorita *et al.*, 2002). Originariamente, se comenzó a aplicar la siembra sin laboreo con la finalidad de proteger al suelo para evitar problemas de erosión durante el período de barbecho (Noé y Abril, 2010). Entre las ventajas de la SD están el control y reducción de la erosión eólica e hídrica del suelo, conservación de la humedad, reducción de la contaminación, aumento de la eficiencia en el ciclado de nutrientes, incremento del contenido de materia orgánica (MO), mejora en la estructuración del suelo, aumento de la permeabilidad e infiltración de agua en el perfil y mayores rendimientos (Buschiazzo *et al.*, 1998), como también reducción del consumo de combustible y de tiempo en términos de recursos humanos (Babujia *et al.*, 2010; Shrestha *et al.*, 2013). Además, la SD produce una mayor actividad y diversidad microbiana en el suelo e incrementos en las densidades poblacionales de microorganismos benéficos en comparación con la labranza convencional (Vargas Gil *et al.*, 2009), debido principalmente a una menor perturbación física de la estructura del suelo, lo que genera, a escala espacial, modificaciones en la estructura de las comunidades microbianas residentes en él (Young y Ritz, 2000). Considerando la difusión masiva que tiene la SD en nuestro país, se decidió para esta tesis, trabajar en este tipo de sistemas, ya que la adopción de esta práctica por parte de los productores es altamente significativa, en comparación a lo ocurrido en otros países (Buschiazzo *et al.*, 2007).

Entre las prácticas de manejo sustentables que se realizan bajo SD, se encuentra la rotación de cultivos. Esta práctica involucra la alternancia temporal de diferentes cultivos en el mismo espacio, lo cual tiene varios efectos positivos en el sistema productivo. Desde el punto de vista de la fertilidad del suelo, la rotación de cultivos constituye una práctica conservacionista, hace un uso balanceado de los nutrientes comparado con el monocultivo, evitando desequilibrios químicos de importancia, aunque se complementa con fertilización química que contemple las necesidades de cada cultivo (Bending *et al.*, 2002 ; Costantini *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista de las condiciones físicas del suelo, la rotación de cultivos favorece su estructura, pues distintos sistemas radiculares exploran diferentes estratos del perfil, permitiendo la colonización del suelo con raíces de diferente arquitectura (Bohme y Bohme, 2006). Además, el tipo de cobertura vegetal (restos de cosecha, enmiendas orgánicas) determinado por el cultivo involucrado en la rotación y el manejo de los rastrojos, son algunos de los factores que afectan la magnitud de la población de microorganismos, y en consecuencia la intensidad de la actividad biológica, como ha sido demostrado en estudios realizados en nuestro país (Abril *et al.*, 2005; Vargas Gil *et al.*, 2009). De hecho, las plantas son promotoras de los cambios en las comunidades rizosféricas, lo que permite que la rotación de cultivos contribuya a la inhibición de patógenos, debido a cambios en las características de la comunidad microbiana del suelo (Ding *et al.*, 2011), fundamental para el control biológico de patógenos que lo habitan (Vargas Gil *et al.*, 2009). Por otro lado, los cultivos en rotaciones cortas o monocultivo a menudo sufren el incremento de diversos patógenos en comparación con los cultivos en rotaciones más largas, o que se cultivan por primera vez (Bennett *et al.*, 2010). Aún así, algunos antecedentes evidencian que la rotación de cultivos es una práctica valiosa como manejo sustentable de los agroecosistemas, sin embargo, no asegura la ausencia de enfermedades causadas por hongos de suelo.

El monocultivo supone una práctica de manejo no conservacionista que contribuye a la baja de rendimientos en el cultivo y a la obtención de granos de mala calidad sanitaria y bajo vigor (Liu, 2011). La utilización de una sola especie genera un agotamiento de las reservas de nutrientes en el suelo y con ello una disminución de las actividades y

diversidad microbiana edáfica (Bending *et al.*, 2002). Por ello, conociendo los efectos benéficos de las prácticas agrícolas sustentables como la rotación de cultivos, debería esperarse un crecimiento y una mayor inversión en el desarrollo de este tipo de estrategias destinadas a la conservación de nuestros recursos, que son el sostén nuestra producción. En este sentido, si bien existen antecedentes en nuestro país sobre los beneficios de la rotación de cultivos en comparación con el monocultivo, es necesario contar con información que evidencie el nivel de deterioro de los suelos bajo uso agrícola en relación a situaciones de referencia como lo son los suelos prístinos en la región subtropical del norte de nuestro país.

1.3. El suelo como recurso fundamental

La calidad del suelo se ha definido como la capacidad del mismo para funcionar dentro de los límites del ecosistema a los fines de sostener la productividad biológica, mantener la calidad del medio ambiente, y promover la sanidad vegetal y animal (Doran y Parkin, 1996). Antes de la intervención humana, el suelo se encontraba en un equilibrio dinámico con el ambiente (Lal, 2004). Las perturbaciones debidas a las actividades antropogénicas, causaron una intensa degradación de los suelos que tuvieron consecuencias negativas, no solo para el ambiente, sino para la seguridad alimentaria global (Oldeman, 1992). Los registros observados de la capacidad productiva del suelo indican que la degradación inducida por el hombre constituye casi el 40% de la superficie agrícola del mundo, en principio como resultado de la erosión, la contaminación atmosférica, el uso intensivo del suelo, el cultivo extensivo de plantas, el sobrepastoreo, el desmonte de tierras, la salinización y la desertificación (Oldeman y van Engelen, 1993). Particularmente en nuestro país, en el NOA, según estudios realizadas por el INTA a través del uso de sensores remotos, se estima que el área degradada por las prácticas agrícolas inadecuadas y por efecto del desmonte superó las 7.075 has en el transcurso de solo 10 años (Volante, 2012). Durante la década del 70, el cultivo de poroto era el “dinamizador” de la actividad agrícola. El monocultivo y el sistema de labranza que se utilizaban, contribuyeron a crear condiciones favorables para la acción erosiva del agua, debido a que el suelo permanecía desprotegido durante mucho tiempo, coincidiendo con la ocurrencia de

precipitaciones intensas (García Medina, 2002). Posteriormente se incorporó a los sistemas agrícolas el empleo de la SD que reemplazó a la labranza intensiva, contribuyendo en parte a mejorar las condiciones de fertilidad del suelo en la región.

En este contexto, para desarrollar sistemas de producción sustentables, debemos preservar y mejorar la calidad del suelo. Para ello, es necesaria una evaluación de su salud para identificar las áreas agrícolas con problemas, controlar los cambios en la sostenibilidad en relación al manejo empleado, a los fines de colaborar con los organismos gubernamentales en la formulación y evaluación de políticas claras, en el marco de una agricultura sostenible (Bezdíček *et al.*, 2003).

En la mayoría de las situaciones, el uso de indicadores simples, conocidos como indicadores de calidad de suelo (ICS) se emplean para evaluar la calidad del mismo, constituyendo alternativas promisorias para monitorear la sostenibilidad de la implementación de tácticas de manejo (Epelde *et al.*, 2014). Además permiten identificar los efectos de las prácticas agrícolas en las diferentes propiedades del suelo y la sanidad de los cultivos, la magnitud del impacto y el grado de exposición (Brussaard *et al.*, 2007). Estos indicadores proporcionan información para caracterizar la composición, estructura y función de los sistemas agrícolas complejos (Karr, 2012), siendo algunos de ellos simples, eficaces, y fáciles de monitorear (Dale y Kline, 2013). De hecho, numerosos autores proponen que los indicadores utilizados para cuantificar la calidad del suelo deben ser sensibles para detectar cambios, fáciles de medir e interpretar, y accesibles para muchos usuarios (Nannipieri *et al.*, 2003; Benintende *et al.*, 2008; Abril *et al.*, 2009). Según Doran (1980), los ICS deben reflejar procesos del mismo, integrando sus diferentes propiedades y siendo sensibles a los cambios ambientales. Tradicionalmente los ICS incluían a los parámetros químicos y físicos de rutina realizados a las muestras de suelo en evaluaciones clásicas de monitoreo. Sin embargo, en la búsqueda de nuevos indicadores, se incursionó en el estudio de los microorganismos de suelo. En este sentido, las mediciones de la microbiota edáfica cumplen muchos de los criterios de indicadores útiles para la evaluación sostenible del uso del suelo. Debido a su abundancia, diversidad estructural y funcional y dado que además se correlacionan con funciones beneficiosas para el suelo

(Pankhurst *et al.*, 2003, Brussaard *et al.*, 2007), los indicadores biológicos o bioindicadores representan parámetros ecológicos sensibles para ser empleados como ICS.

En este trabajo no se seleccionaron indicadores, ya que esta tesis se plantea como un estudio previo a esa selección. Los indicadores serán generados posteriormente a partir de los resultados de este trabajo, siguiendo los criterios ampliamente aceptados para los indicadores de calidad/degradación de suelos, validándolos con la evaluación de varios sitios y durante tiempo prolongado.

1.4. Los microorganismos y su rol clave en las funciones del suelo: Cuantificación y evaluación

Un ecosistema sostenible depende de los flujos de nutrientes a través de los niveles tróficos, que están mediados principalmente por microorganismos (Singh *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013, Badiane *et al.*, 2001). Debido a la degradación ambiental y a las malas prácticas agrícolas, la biodiversidad intrínseca de los suelos ha sido objeto de numerosas variaciones, lo que ha dado lugar a modificaciones en el funcionamiento de las comunidades microbianas nativas de esos suelos. Como consecuencia, el resultado de estas modificaciones, en términos de la capacidad de los ecosistemas para mantener las funciones y servicios ecosistémicos, es de importancia fundamental. En este contexto, es un desafío entender y predecir los mecanismos que gobiernan las acciones de la diversidad microbiana del suelo y la relación entre esa biodiversidad y otros procesos que ocurren en el mismo (Maron *et al.*, 2011). Las funciones que cumplen los microorganismos son fundamentales para el crecimiento de los cultivos. Entre estas funciones se incluyen la descomposición de la MO en todas sus fracciones, el reciclado de material vegetal, la movilización e inmovilización de minerales y contaminantes, la mejora en la aireación del suelo, la inhibición de patógenos, el incremento de la resistencia en plantas, la estructuración física del suelo y el aumento de la nutrición vegetal promoviendo su crecimiento, entre otras. Por esto, los procesos en los que los microorganismos participan están fuertemente influenciados por el manejo agrícola bajo el que se encuentren. En este sentido, inicialmente, cuando se desmonta un bosque con fines agrícolas, el sistema se

convierte en un sistema abierto. Esta situación crea una dependencia de insumos de nutrientes externos (Brussaard *et al.*, 2007) con el fin de equilibrar la pérdida de nutrientes por efecto de las cosechas, la lixiviación y la erosión. En su climáx, los bosques nativos están en equilibrio, ya que las fuentes de Carbono (C) y nutrientes se reciclan principalmente por medio de la acción microbiana y sus interacciones. Después de la deforestación y puesta en uso del suelo, se alcanza un nuevo equilibrio (Lemenih y Fisseha, 2004). Sin embargo, y al menos en zonas tropicales y subtropicales, como las regiones del noroeste argentino, las entradas de C en los sistemas recientemente desmontados son generalmente más bajas que en los bosques nativos. Por lo tanto, las cantidades y la diversidad de compuestos Carbonados utilizados por microorganismos como fuentes de energía se reducen, lo que afecta los ciclos biogeoquímicos en el suelo (Badiane *et al.*, 2001) y en consecuencia la diversidad microbiana.

Por otro lado, no solamente las funciones microbianas son fundamentales para entender los procesos que se desarrollan en el suelo, sino también los microorganismos constituyen un enorme reservorio de diversidad genética. La evaluación de las formas de vida taxonómicas (abundancia y riqueza) contribuirá a la generación de conocimientos básicos acerca de la identificación de los taxones más representativos. 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 las relaciones entre la diversidad taxonómica y las funciones microbianas se necesitan tanto de técnicas clásicas como de alta resolución que permitan detectar relaciones biológicas de la matriz del suelo que inciden directa o indirectamente en su calidad y por último en la productividad de los cultivos. Sin embargo, los estudios sobre la cuantificación de la biodiversidad del suelo y su papel en el funcionamiento biológico del ecosistema, son menos comunes que otros estudios similares, como es el caso de los organismos asociados a la fauna edáfica (Gallardo y Aldridge, 2013). Las dificultades técnicas para explicar y caracterizar la diversidad microbiana, la falta de conocimientos sobre su distribución espacial en pequeña y a gran escala, sus implicancias en el funcionamiento del suelo, además de las relaciones en los ciclos biogeoquímicos que ocurren en el mismo, representan desafíos actuales en la cuantificación de la diversidad microbiana edáfica. Varios métodos microbiológicos se han desarrollado para estudiar la

diversidad microbiana en los suelos agrícolas (Blume *et al.*, 2002), aunque la mayor parte de nuestro conocimiento sobre el cultivo de microorganismos se basa en el estimado de 1% del total de la comunidad, que hasta ahora ha sido cultivada (Torsvik *et al.*, 1998). La aparición de técnicas moleculares de nueva generación, conjuntamente con las clásicas, se presentan como alternativas capaces de valorar una gran cantidad de microorganismos que no son cultivables en medios de cultivo (más del 99% de la microbiota total) (Liu *et al.*, 2006). Es evidente que las técnicas moleculares ofrecen la oportunidad de detectar especies raras, no cultivables y, por tanto, contribuyen a identificar los taxones de la comunidad fúngica y bacteriana del suelo complementando las limitaciones de la metodología clásica. Acompañando al conocimiento de la diversidad estructural, el estudio de la funcionalidad de la microbiota de suelo resulta más accesible a los fines prácticos, siendo su aplicación estratégica para definir condiciones o prácticas que permitan evaluar los efectos producidos por el manejo agrícola así como para seleccionar organismos edáficos con propiedades específicas para distintos fines.

En esta tesis se utilizaron técnicas innovadoras y clásicas para monitorear el efecto del manejo sobre la microbiota del suelo, con la finalidad de lograr complementariedad entre las herramientas empleadas y obtener información más acabada de la estructura y funciones microbianas. Se emplearon técnicas microbianas clásicas como el recuento en placa de hongos y bacterias totales cultivables, como así también el recuento de algunos grupos funcionales relacionados con la protección de los cultivos (hongos y bacterias biocontroladores de patógenos) y cuantificación de biomasa y respiración microbiana del suelo. También se cuantificaron las proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), una glicoproteína producida por los hongos micorrícicos arbusculares. Por otro lado, se emplearon técnicas de alta resolución que permitieron un rápido estudio de los microorganismos con fines comparativos como la construcción de perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos (PLFA). Este estudio bioquímico permite la identificación de algunos taxones microbianos a partir de la cuantificación de bioindicadores lipídicos. La actividad microbiana global se evaluó a partir de la cuantificación de enzimas relacionadas con ciclos de nutrientes (C y P) tales como aquellas vinculadas a la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), enzimas deshidrogenasas y fosfatasas ácidas mediante espectrofotómetro UV-Vis. Finalmente, las funciones microbianas relacionadas a la

dinámica de un nutriente esencial en el suelo para el crecimiento de los cultivos, como el Nitrógeno (N), pudieron ser evaluadas a partir de la cuantificación de genes específicos relacionados con la codificación de enzimas clave para el funcionamiento del suelo, a partir PCR en tiempo real (q PCR). Para complementar las determinaciones microbiológicas, se cuantificaron variables químicas y físicas del suelo.

Estas evaluaciones permitieron conocer el potencial del suelo como reservorio de biodiversidad en los diferentes ambientes evaluados en la región norte de nuestro país bajo cultivo de soja.

1.5. La diversidad microbiana en el manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo

La capacidad de un suelo de reducir la dispersión de los patógenos, se debe a muchas interacciones que se dan entre las comunidades microbianas del suelo, íntimamente relacionadas con su biodiversidad (Hoitink y Boehm, 1999). Los agroecosistemas poseen una gran riqueza de recursos biológicos para ser explorados en programas de manejo fitosanitarios, ya que varios elementos de las comunidades microbianas del suelo tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de patógenos a través del control biológico.

Tradicionalmente la sanidad de los cultivos se excluía en las definiciones de calidad del suelo, sin tener en cuenta que en el suelo habitan microorganismos fitopatógenos. Esta falta de abordaje se consideró en las definiciones actuales de “salud del suelo”, y contribuyó a incluir estos aspectos considerando al suelo como un recurso vivo, dinámico y limitado en el que confluyen múltiples factores. Aún así, el componente fitopatológico edáfico continuó siendo subestimado (Doran and Zeiss, 2000). Las enfermedades transmitidas por hongos patógenos que habitan en los suelos son difíciles de inhibir dado el estado “oculto” de los microorganismos intervinientes (Janvier, *et al.*, 2007). Además, durante mucho tiempo, los productos químicos de amplio espectro fueron ampliamente utilizados para controlar este tipo de patógenos, pero estos productos no presentaban una

acción específica, lo que potenció la eliminación de la microbiota edáfica en su conjunto, incluyendo a los patógenos y a otros microorganismos con funciones benéficas. Dada la prohibición en el uso de muchos productos químicos, fue necesario encontrar métodos alternativos inocuos para organismos no blanco y para la salud humana. De allí surgió la necesidad de implementar prácticas conservacionistas que incrementaran la riqueza nativa del suelo, como la SD y la rotación de cultivos, entre otras prácticas, sobre todo porque pueden contribuir a reducir la incidencia de la enfermedad (van Bruggen y Semenov, 2000). Sin embargo, dado que no se puede generalizar que estas prácticas sean apropiadas para el manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo, debe estudiarse en detalle la respuesta de la microbiota edáfica en interacción con la sanidad de las plantas bajo estos manejos.

En la matriz del suelo se dan complejas interacciones entre los microorganismos, quienes compiten por fuentes nutricionales, especialmente N y Hierro (Fe) actúan mediante mecanismos de antibiosis, predación, parasitismo, entre otras funciones, determinando cambios en las poblaciones de patógenos y de antagonistas, las cuales comparten un mismo nicho ecológico en el suelo y en la rizósfera (Chung *et al.*, 1998; Mazzola, 2004). Los suelos poseen capacidad biológica para restringir la progresión de la enfermedad, siendo este fenómeno otorgado por la actividad de la diversa comunidad microbiana residente en el suelo (Mazzola, 2004). Por ello, la biodiversidad confiere estabilidad y resiliencia a los ecosistemas favoreciendo la resistencia a estreses. Más aún, una reducción de la biodiversidad del suelo, especialmente la pérdida de especies clave con funciones únicas, puede conducir a un deterioro a largo plazo de su fertilidad y a la pérdida de la capacidad productiva (Vargas-Ayala *et al.*, 2000). Es por eso que, actualmente, deben desarrollarse herramientas que permitan manejar los factores bióticos y abióticos del suelo, incrementando la biodiversidad nativa, evitando así la introducción de microorganismos exógenos, que pueden alterar el equilibrio entre las poblaciones microbianas del suelo. Para ello, deben identificarse y cuantificarse inicialmente los componentes biológicos del suelo, tanto los que están directamente implicados en la actividad antagonista, como también la diversidad microbiana general del suelo, y utilizar esta información como una herramienta que permita seleccionar las prácticas más adecuadas para estos fines (Mazzola, 2004).

Como parte de la biodiversidad, se pueden cuantificar grupos funcionales con actividades específicas, como los potenciales agentes de biocontrol o biocontroladores. Se conoce que cada uno de los biocontroladores presentes en el suelo responde de forma diferente a los distintos tipos de suelo y su manejo, y en consecuencia afectan de distinta manera a los cultivos, a los patógenos y a la relación cultivos-patógenos (Meriles *et al.*, 2006; Papavizas, 1985). Dentro de los biocontroladores más difundidos están los hongos *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., y los hongos micorrízico-arbusculares y entre las bacterias encontramos a las Actinobacterias y al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes, cumpliendo distintos roles en el suelo. Estos microorganismos intervienen en el control biológico de fitopatógenos empleando diversas estrategias, *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp., poseen la capacidad de producir metabolitos volátiles secundarios que cumplen funciones de antibióticos (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991) al igual que funciones de micoparasitismo. De la misma manera, algunas cepas de Actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes también tienen capacidad antagonista. Las *Pseudomonas* producen sideróforos que impiden la captación del Fe por parte de otros hongos patógenos, mientras que las Actinobacterias utilizan su potencial antibiótico y enzimático para reducir el nivel de patógenos en el suelo (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

Se sabe que las prácticas culturales tienen una fuerte influencia en la salud del suelo y más específicamente en sus atributos biológicos, por lo que el manejo de los cultivos puede determinar el incremento o disminución de las densidades poblacionales de los microorganismos edáficos, incluidos los patógenos. Precisamente, la rotación de cultivos es una herramienta importante en la reducción de enfermedades causadas por patógenos que habitan en el suelo (Larkin, 2008). El cultivo continuo de un huésped susceptible, a través del monocultivo o de hospedantes alternativos susceptibles, pueden dar lugar a la acumulación e incremento de poblaciones de patógenos específicos, lo que resulta en una disminución en el rendimiento de los cultivos (Brussaard *et al.*, 2007). La rotación de cultivos con plantas no hospedantes susceptibles, evita este efecto perjudicial, disminuyendo las poblaciones de patógenos específicas, debido a su mortalidad natural o a las actividades antagónicas de otros microorganismos del suelo (Estevez de Jensen *et al.*, 2004). Más aún, los esquemas propuestos en la rotación de cultivos pueden estimular

algunas poblaciones microbianas específicas resultando en el desarrollo de efectos benéficos para la planta y perjudiciales para el patógeno (Mazzola, 1999).

En el norte de nuestro país, hay numerosos antecedentes sobre los desbalances ocurridos en los agroecosistemas por efecto del uso de prácticas agrícolas no sustentables, que afectaron la sanidad de los cultivos y consecuentemente su rendimiento (García Medina, 2002). Particularmente en la provincia de Salta, la intensificación agrícola ha producido un marcado incremento de enfermedades causadas por hongos de suelo en distintos cultivos. De esta manera, se registraron enfermedades como el amarillamiento del tabaco (*Rhizoctonia solani* (Khun), *Fusarium* spp. y *Ralstonia solanacearum*); las podredumbres radiculares en el cultivo de poroto (*Sclerotium rolfsii* (Sacc.) y *Rhizoctonia solani* (Khun)); mientras que en soja, se registraron aumentos de la podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid) en las últimas campañas (Pérez Brandán *et al.*, 2012). Si bien existen variadas referencias sobre prácticas de manejo que contribuyen efectivamente a la disminución de los patógenos que habitan en el suelo, el nivel de comprensión de los mecanismos implicados es todavía limitado (Bailey *et al.*, 2008). A pesar de la presencia de grupos microbianos benéficos, como los biocontroladores, las ventajas del manejo cultural adecuado y sustentable para incrementar la calidad biológica del suelo se lleva a cabo mediante acciones graduales, generalmente más lentas que los efectos producidos por los productos químicos, pero con mayor durabilidad en el tiempo y con efectos acumulativos (Bailey y Lazarovits, 2003).

Es escaso el conocimiento que tenemos sobre el impacto que están produciendo las prácticas agrícolas sobre la biodiversidad del suelo, en interrelación con variables químicas y físicas edáficas en zonas productivas no tradicionales del país, como el noroeste argentino. Por esta razón, este trabajo implica una importante contribución al conocimiento de la biodiversidad microbiana nativa de los suelos como herramienta de manejo de enfermedades causadas por hongos que habitan en el suelo. Esto permitirá comprender los mecanismos involucrados en el manejo sustentable de nuestros recursos en agroecosistemas de la zona sojera de la provincia de Salta. Es esencial entonces, aprender a combinar las tecnologías para mejorar la producción y preservar el agroecosistema en el marco de una agricultura sustentable y no de una agricultura sostenida por insumos.

HIPÓTESIS

El monocultivo de soja disminuye la diversidad de las comunidades microbianas del suelo, deteriorando las condiciones químicas y físicas edáficas asociadas, afectando la sanidad del cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto del manejo del cultivo de soja (en monocultivo y en rotación de cultivos), sobre la diversidad microbiana del suelo y su interacción con parámetros químicos y físicos edáficos y la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo que afectan al cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar la diversidad de las comunidades microbianas del suelo en soja en diferentes sistemas productivos, en cuanto a la *abundancia* de microorganismos cultivables, potenciales biocontroladores, biomasa microbiana, contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) y contenido de fosfolípidos del suelo.

- 2) Analizar la diversidad de las comunidades microbianas del suelo en soja en diferentes sistemas productivos, en cuanto a las *funciones* microbianas como respiración, hidrólisis de diacetato de fluoresceína, actividad deshidrogenasa, fosfatasa ácida y genes relacionadas al ciclo del Nitrógeno.

- 3) Evaluar parámetros químicos y físicos del suelo en soja en diferentes sistemas productivos.

- 4) Evaluar el efecto de diferentes sistemas productivos sobre la interacción entre los parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo.

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

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. SITIO DE ESTUDIO

Para cumplir con los objetivos planteados se seleccionaron lotes comerciales de soja sembrados bajo SD en la localidad de Las Lajitas, provincia de Salta. Cada lote tiene una superficie entre 40 y 60 has. Los mismos se encuentran distribuidos en la región según se describe en el mapa de la Tabla 2.1.

La localidad de Las Lajitas está ubicada en el Departamento de Anta, situado en el centro-este de la provincia a 1250 msnm (Latitud 24°53'2", longitud 65°28'23"). Esta localidad concentra el 65% de la producción provincial del cultivo de soja, con 230.000 has. Está ubicada a 230 km al este de la ciudad capital de Salta y su gran relevancia se debe al fuerte crecimiento productivo y a la continua incorporación de tecnología para el cultivo de soja principalmente (Martín, J., 2012, comunicación personal). La zona posee un clima subtropical serrano con estación seca en invierno y en verano con precipitaciones que llegan a los 850 mm intensificándose hacia el oeste al acercarse a los cerros.

Con la finalidad de comparar situaciones contrastantes de manejo y de estudiar situaciones reales, a diferencia de los ensayos de experimentación, se decidió trabajar con lotes de producción. Se seleccionaron diferentes sitios (lotes) de distintas fincas donde se realiza manejo convencional en monocultivo y manejo conservacionista en rotación. Además se seleccionaron sitios de bosque tropical adyacente a los sitios bajo manejo. Los suelos de los diferentes manejos presentan textura franca-franca arenosa, con un promedio de 2-2,70% de MO, 0,2% de N total y pH 6,6.

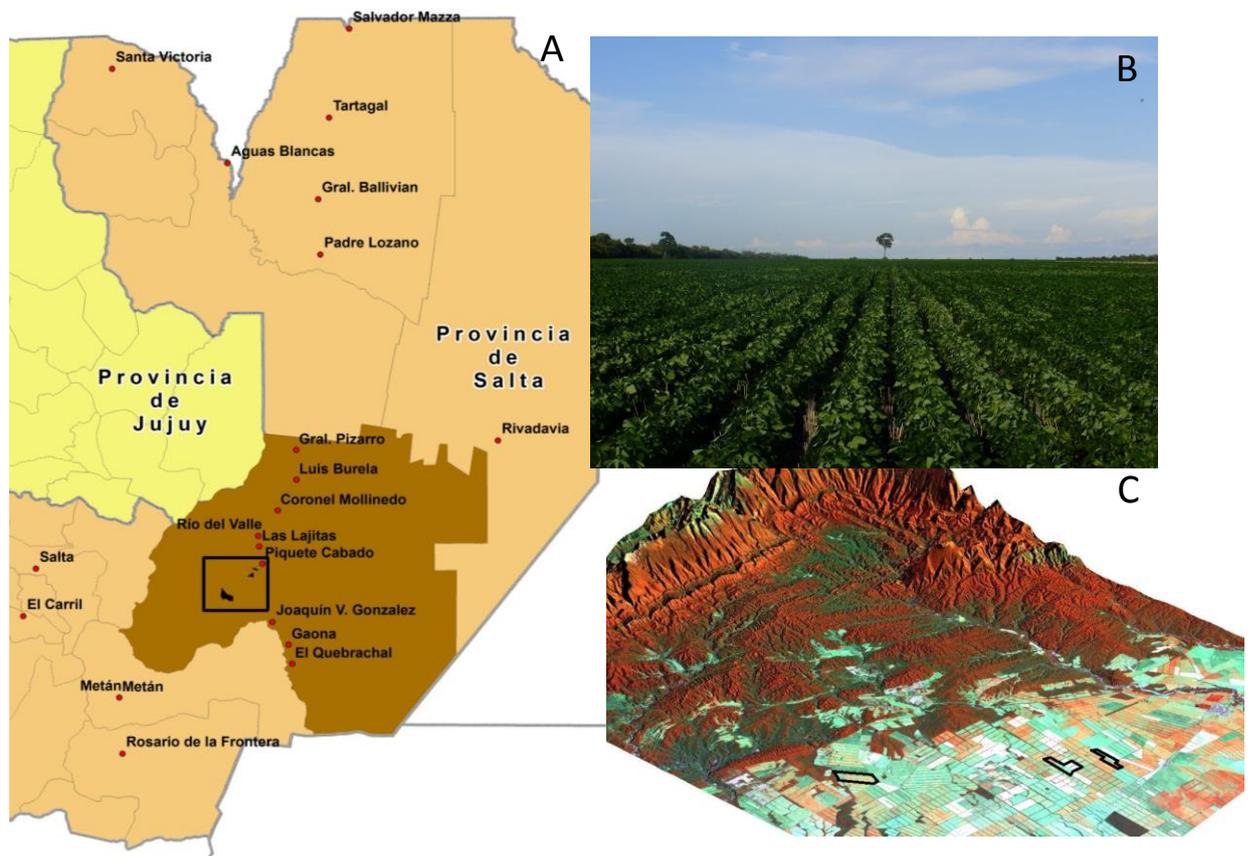


Fig. 2.1. Ubicación de la zona de estudio, A) Fracción de mapa de la provincia de Salta donde se destaca el Departamento de Anta y sus localidades, entre ellas la localidad de Las Lajitas. B) Fotografía de un lote de producción típico de la localidad de Las Lajitas. C) Imagen satelital de la localidad de Las Lajitas donde se muestran los lotes productivos sojeros muestreados.

Tabla 2.1. Tratamientos con distintos tipos de manejos agrícolas.

Situaciones de manejo	Sitios	Historia	Clasificación Textural	Ubicación geográfica
Monocultivo (MM)	MM1	Recientemente incorporados a la producción de soja, con 2 años de monocultivo	Franco/ Franco Arenoso	24 52'29.43"S 64 14'06.29"O
	MM2	6 años de agricultura. 5 años de monocultivo en SD	Franco Arenoso	24 52'93.9"S 64 15'14.3"O
	MM3	30 años de agricultura y 17 años de SD. 24 años de monocultivo de soja	Franco Arenoso	24 52'23.72"S 64 14'54.46"O
Rotación de cultivos (MR)	MR1	30 años de agricultura. 15 años en rotación con maíz	Franco Arenoso	24 50'32.82"S 64 12'45.43"O
	MR2	15 años de agricultura. 6 años en rotación con maíz	Franco Arenoso	24 50'48.18"S 64 12'46.38"O
	MR3	4 años en rotación con maíz	Franco Arenoso	24.9896600"S 64.3439000"O
Suelo Prístino (PR)	PR1	Suelo prístino de bosque tropical adyacente a los sitios bajo manejo convencional	Franco Arenoso	24 52'34.03"S 64 14'57.07"O
	PR2	Suelo prístino de bosque tropical adyacente a los sitios bajo manejo conservacionista	Franco Arenoso	24 98'42.30"S 64 34'74.90"O
	PR3	Suelo prístino de bosque tropical adyacente a los sitios bajo manejo conservacionista	Franco Arenoso	24 98'49.30"S 64 34'86.70"O

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En los tratamientos bajo manejo en monocultivo se evaluaron sitios (lotes) con diferentes años de implantación de monocultivo de soja, mientras que en los tratamientos bajo manejo en rotación se analizaron sitios con distintos años de rotación (soja- maíz) (Tabla 2.1.). Además se incluyó en el análisis sitios de suelo prístino de bosque tropical asociado a cada situación de manejo contrastante. Los lotes fueron sembrados y manejados de acuerdo a los protocolos establecidos por los productores de la zona. A la siembra, las semillas de soja fueron tratadas con el curasemilla comercial a base de Carboxim + Thiram (Vitavax Flo), para el control de malezas se empleó glifosato (Roundup) a 4litros/ha y metsulfurón metil (Zamba) a dosis de marbete, mientras que para el control de plagas se aplicó metoxifenocida (Intrepid SC.) según dosis de marbete. Las variedades de soja sembradas en ambas fincas corresponden a variedades de grupo de madurez 8 (GM VIII), de ciclos determinados de Nidera, principalmente se sembraron las variedades A8000 (Tabla 2.2.). La densidad de siembra fue de 22-26 semillas por metro lineal con un poder germinativo (PG) del 85% en promedio. A emergencia se establecieron 16-18 plantas por metro lineal con ese PG. La soja no fue fertilizada ni se le aplicaron inoculantes.

Tabla.2.2. Características de las variedades de soja incluidas en los ensayos.

Grupo de madurez/ Variedad	Ciclo	Criadero	Hábito de crecimiento	Color flor
8				
A-8000	8	Nidera	Determinado	Púrpura
NA-8010	8	Nidera	Determinado	Púrpura
NA-8413	8,4	Nidera	Determinado	Púrpura

Para los sitios bajo rotación las variedades de maíz sembradas fueron híbridos tropicales resistentes a herbicidas y a plagas de la variedad DK390 VT triple pro (Monsanto). Además, se realizaron las siguientes aplicaciones para el control de malezas: Atrazina: 2.5 l ha⁻¹ y Dual: 1.5 l ha⁻¹. El maíz se fertilizó con fosfato diamónico a razón de 50-70kg/ha, también con 20-50kg/ha de urea al voleo. Tanto el cultivo de soja como el de maíz fueron sembrados en SD. Hacia el final del ciclo de soja, en madurez fisiológica, se

realizó el muestreo de suelo y la evaluación de enfermedades causadas por hongos patógenos que habitan en suelo, repitiéndose estas evaluaciones durante 3 campañas agrícolas correspondientes a los ciclos 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

El estudio empleado se puede clasificar como *un estudio observacional* (Feinsinger, 2003). Este tipo de estudio es común en ecología y recursos naturales, donde se analizan circunstancias particulares que no tienen posibilidades de repetición como en un experimento controlado (Di Rienzo *et al.*, 2012). Por lo tanto, mientras en un experimento diseñado es posible asignar relaciones causales entre respuestas de los tratamientos, en este tipo de estudio, nos limitamos a analizar las asociaciones observadas. En esta tesis, la hipótesis de investigación nos lleva a comparar cada variable entre las condiciones de interés (monocultivo vs. rotación) teniendo como situación de referencia para cada situación el bosque tropical no disturbado (suelo prístino de monte natural).

Por ello, en los sitios de estudio se presentan *unidades de respuesta* que constituye la unidad fundamental del estudio observacional que manifiesta los efectos de las condiciones de interés. Esto se diferencia de los estudios manipulativos, en los que la unidad de respuesta puede denominarse *unidad experimental*. Mientras la unidad de evaluación es la unidad estandarizada para la cual se registran los valores de la variable de respuesta (Feinsinger, 2003).

2.3. DISEÑO DE MUESTREO

Toma de muestras de suelo

Dentro de cada sitio, en cada lote se demarcó la zona de muestreo que fue georeferenciada, presentando una superficie de 900 m². A partir de la zona demarcada se tomaron muestras de suelo para realizar las determinaciones correspondientes en el laboratorio. En cada parcela de tratamiento se establecieron seis estaciones de muestreo, siguiendo un diseño en W, a partir de las cuales se tomaron muestras de suelo compuestas por 10 submuestras. Las muestras fueron luego divididas en tres partes para la cuantificación de variables microbianas, químicas y físicas del suelo. El muestreo de suelo se realizó teniendo en cuenta metodología previa descrita en el Manual de Microbiología Ambiental (Hurst, 1997).

A partir de las muestras de suelo se realizó la determinación de variables microbiológicas, químicas y físicas. Para evaluar los parámetros microbiológicos las muestras fueron extraídas a partir de la zona cercana a la raíz, sobre el surco, hasta los primeros 10 cm de profundidad abarcando las seis estaciones de muestreo por repetición contabilizando un total de 18 muestras por tratamiento.

Para la determinación de algunas variables microbianas (bioquímicas), las muestras fueron inmediatamente colocadas en freezer a -20 °C. Mientras que para la cuantificación del resto de determinaciones microbiológicas, las muestras fueron tamizadas (malla 2mm) para ser inmediatamente colocadas en heladera y conservadas a 4° C hasta su posterior procesamiento. Paralelamente se determinó la humedad (%) de cada muestra por lo cual se tomó el peso inicial de cada muestra y luego de siete días en estufa a 90 °C se determinó el peso final.



Fig. 2.2. Muestreo de suelos en sitios y bosque tropical de Las Lajitas. Campañas 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012. A) Muestra biológica dispuestas en bolsas plásticas listas para su refrigeración. B) Barreno utilizado en el muestreo modificado a 10 cm de profundidad. C) Lote de monocultivo de soja. D) Personal de apoyo realizando el muestreo químico-físico. E) Bosque tropical. F) Muestra microbiológica del bosque tropical. G y H) Lotes bajo rotación soja-maíz.

2.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

2.4.1. Analizar la diversidad de las comunidades microbianas del suelo en soja en diferentes sistemas productivos, en cuanto a la abundancia de microorganismos cultivables, potenciales biocontroladores, biomasa microbiana, contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) y contenido de fosfolípidos del suelo

Se cuantificaron los microorganismos cultivables, mediante recuento de hongos y bacterias totales; y de los agentes potenciales de biocontrol del grupo de los hongos: *Trichoderma* spp., y *Gliocladium* spp., y del grupo de bacterias: Actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes, presentes en el suelo.

Hongos totales (HT)

Los hongos representan en el suelo entre 70-80 % de la biomasa microbiana total, tienen una marcada actividad heterotrófica sobre los restos vegetales, y entre sus poblaciones se encuentran grupos con actividades relacionadas al antagonismo de hongos patógenos del suelo, como *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp., conocidos agentes de biocontrol. La abundancia de hongos totales es un indicador de calidad edáfica, y si además se correlaciona este parámetro con los potenciales biocontroladores, se puede conocer el potencial de inhibición de patógenos, en un determinado suelo.

Para el recuento de hongos totales se siguió la metodología de Vargas Gil *et al.* (2009). Se tomaron submuestra de 10 g que fueron transferidas a 100 ml de agua destilada esterilizada, la suspensión fue mezclada en un agitador orbital durante 30 minutos. Se tomó 1 ml de la suspensión que fue colocado en tubos conteniendo 9 ml de agua destilada esterilizada para realizar las correspondientes diluciones de suelo, que fueron ajustadas

según fue necesario. Finalmente, una alícuota a determinar se colocó en medio de cultivo Agar papa glucosado (APG) con el agregado de rosa de bengala (20 mg/l), estreptomicina (100 mg/l), y cloranfenicol (300 mg/l). Luego de 4 días a 25 ° C se realizó el recuento de las colonias.

Bacterias totales (BT)

La cuantificación de las bacterias totales presentes en un suelo constituye un buen indicador que refleja su nivel poblacional en un suelo bajo un determinado manejo. La función básica de las bacterias es la descomposición y mineralización de los residuos orgánicos, de donde obtienen su fuente energética y alimenticia. Mediante su metabolismo liberan al medio sustancias como enzimas, proteínas, reguladores de crecimiento, metabolitos y algunos nutrientes. Los beneficios de las bacterias para los cultivos se relacionan con una mayor disponibilidad e incremento en el aporte de elementos básicos para su desarrollo y producción.

Las poblaciones de bacterias totales se cuantificaron siguiendo el protocolo de Larkin (2003). Las diluciones de suelo y las alícuotas a colocar en el medio de cultivo fueron ajustadas de acuerdo a las necesidades que surgieron durante el experimento.

Potenciales biocontroladores

Las propiedades antagonistas de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. contra patógenos fúngicos se basan en la activación de varios mecanismos que incluyen la competencia por los nutrientes y espacio, micoparasitismo, antibiosis, promoción de crecimiento y activación de las respuestas de defensa en las plantas. Debido a su capacidad para proteger a los cultivos y disminuir las poblaciones de patógenos bajo diferentes condiciones del suelo, estos hongos han sido ampliamente estudiados. Por ello, su cuantificación en el suelo supone una herramienta viable para conocer el estatus sanitario de los mismos y su potencial uso en la agricultura. De igual modo, las poblaciones de Actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes poseen la capacidad de disminuir la acción

de fitopatógenos a través de distintos mecanismos, su estudio y evaluación en el suelo representa una alternativa promisoría para disminuir el empleo de los agroquímicos que se usan en la producción agrícola.

La cuantificación de las poblaciones de hongos conocidos como biocontroladores de enfermedades, *Trichoderma sp.* y *Gliocladium sp.*, se realizó de la misma manera empleando el mismo medio de cultivo, ajustando las diluciones y alícuotas según fue necesario (Vargas Gil *et al.*, 2009).

Para el recuento de **Actinobacterias** se siguió metodología previa (Vargas Gil *et al.*, 2009), empleando el medio de cultivo de Küster modificado mediante el agregado de cicloheximida (0.15 g/l) y propionato de sodio (0.4 g/l). Las placas fueron incubadas por 7 días a 25° C en oscuridad.

Para la evaluación de **Pseudomonas fluorescentes** empleando el medio de cultivo King B (King *et al.*, 1954). Se pesaron 100 g de suelo para hacerse las diluciones necesarias a continuación. Se tomó una alícuota que fue colocada en el medio de cultivo, para dejarse las placas en oscuridad durante 4 días, realizándose el recuento mediante el empleo de luz UV.

Los datos se expresaron como unidades formadoras de colonia/g de suelo seco (UFC/g suelo seco), utilizando los valores de peso seco del suelo, y teniendo en cuenta los las suspensiones de suelos y las alícuotas empleados.

Por cada submuestra de suelo se sembraron dos cajas de Petri, totalizando doce cajas por parcela para hongos totales, *Trichoderma sp.* y *Gliocladium sp.* y doce para bacterias totales, Actinobacterias y *Pseudomonas fluorescentes*.

Biomasa microbiana

Carbono de la biomasa microbiana (CBM)

Este parámetro es considerado un indicador de cambios en la MO del suelo, es por esto que resulta muy útil ya que evidencia la respuesta del suelo frente a aportes orgánicos de diferente naturaleza. El contenido en C de la biomasa microbiana refleja el tamaño de la población microbiana total del suelo. Este índice ha sido frecuentemente estudiado porque responde de forma muy rápida y sensible a los cambios que se producen en el suelo, y además porque es uno de los pocos parámetros que controla gran parte de los procesos que involucran la transformación y ciclos de nutrientes, el mantenimiento de la MO lábil, así como la macroagregación (que favorece la retención de agua y la aireación del suelo).

Para cuantificar este parámetro se utilizó la técnica de fumigación-reinoculación e incubación (Jenkinson y Powlson, 1976, modificada por Abril *et al.*, 2005). La técnica se basa en la determinación del CO₂ liberado en la incubación de muestras con NaOH 0,2 N a 28° C durante un período de 10 días, previamente fumigadas con cloroformo durante 24 hs, defumigadas e inoculadas con suelo fresco. Simultáneamente se colocaron a incubar muestras como testigos sin fumigar. Se pesaron 20 g de suelo, se llevaron las muestras a 60 % de capacidad de campo en recipientes herméticamente cerrados y se incubaron con 15 ml de NaOH.

La evaluación del CO₂ liberado se realizó por titulación del NaOH con HCL 0,2 N, fenolftaleína como indicador y Cl₂Ba como precipitante del NaCO₃ formado. El cálculo del C-biomasa se efectuó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{C-biomasa (mg CO}_2\text{/g suelo)} = \text{C-CO}_2 \text{ fumigado} - \text{C-CO}_2 \text{ no fumigado} / 0.45$$

Se utilizaron blancos como testigos con la finalidad de descontar el CO₂ atmosférico.

Las determinaciones se realizaron empleando un frasco por submuestra de suelo, totalizando seis réplicas por parcela para cada una de los parámetros.

Contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP)

Se realizó la cuantificación de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) una glicoproteína producida por los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Esta proteína influye en la agregación del suelo, posee una gran adhesividad y resistencia a la degradación, y presenta en su estructura química entre un 30-40% de C, lo que la hace un componente importante de la MO, contribuyendo al secuestro de C en el suelo. Por otra parte, por sus características aglutinantes, la glomalina tiene íntima relación con la estabilidad de agregados del suelo ya que está involucrada en la conformación de su estructura. Por estas razones es un indicador ideal ya que su cuantificación permite establecer relaciones entre variables biológicas, químicas y físicas edáficas. Teniendo en cuenta las limitaciones que presenta la técnica para su cuantificación a partir de suelo (Rillig, 2004), la variable que se cuantifica son las proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP).

La cuantificación de GRSP, se realizó mediante espectrofotómetro UV-Visible, empleándose la técnica de Wright y Upadhyaya (1996). Se cuantificó la proteína fácilmente extractable. Se tomó 1 g de suelo tamizado a 2 mm y se colocó en 8 ml de extractante. La GRSP fácilmente extractable se determinó mediante extracción con 20 mM de citrato de sodio (pH 7,0), esterilizando luego la solución por autoclave (121° C) durante 30 minutos. Los extractos se centrifugaron a 10.000 g por 5 minutos y la proteína en el sobrenadante se determinó mediante el empleo de la coloración de Bradford con albúmina de suero de bovino como estándar (Wright y Upadhyaya, 1996). Las determinaciones se realizaron empleando un tubo de centrifuga por submuestra de suelo, totalizando seis réplicas por parcela.

Perfiles de fosfolípidos (PLFA)

La estructura de las comunidades microbianas de suelo se estudió 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, que son propios 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 fosfolípidos de ácidos grasos (PLFAs) comúnmente utilizados como biomarcadores de taxones microbianos son mostrados en la Tabla 2.3. La metodología de extracción y condiciones de análisis de los perfiles de PLFAs se realizó acorde con Bossio *et al.* (1998). En un tubo para centrífuga se pesó 10 g de suelo y se agregó 23 ml de una mezcla cloroformo/metanol (2:1). Luego la muestra fue centrifugada (Cavour ® VT3216) a 2500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se filtró en un tubo de vidrio. 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. El contenido del tubo se transfirió a una ampolla de decantación y la fase orgánica fue colectada en un balón. El solvente se evaporó (rotavapor Buchi R-215) y 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 10 ml de metanol, y la solución obtenida fue posteriormente secada con N. 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 hexano (2 alícuotas de 5 mL) 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 PLFAs 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 es 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.

Tabla 2.3. Ácidos grasos de fosfolípidos comúnmente utilizados como biomarcadores para grupos específicos de microorganismos.

Organismos	PLFAs utilizados como biomarcador
Bacterias Gram-negativa	3OH-12:0, 16:1 ω 5c, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 7t, 16:1 ω 9c, a16:0, cy17:0, 17:1 ω 8c, 18:1 ω 5c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 9c, cy19:0
Aerobios	16:1 ω 7, 16:1 ω 7t, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 7t
Anaerobios	cy17:0, cy19:0
Bacterias Gram-positiva	i14:0, i15:0, a15:0, br16:0, i16:0, a17:0, i17:0, i18:0
Gram-negativas / Gram-positivas	16:1 ω 7t + 17:1 ω 8c + 18:1 ω 7c + cy19:0 / i14:0 + i15:0 + a15:0 + i16:0 + i17:0 + a17:0
Bacterias (no específicas)	14:0, 16:0, 18:0
Actinobacterias	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0
Hongos	18:2 ω 6,9 (18:1 ω 9c, 18:3 ω 3)
Hongos / bacterias	18:2 ω 6,9 / i15:0 + a15:0 + 15:0 + i16:0 + 16:1 ω 7t + i17:0 + a17:0 + 17:0 + 18:1 ω 7c + cy19:0
Ciclopropil19 / precursor	cy19:0 / 18:1 ω 7c
Hongos VAM	16:1 ω 5c
Microeucariotas, plantas superiores	20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0
Microeucariotas	20:3 ω 6, 20:4 ω 6
Indicadores de estrés	16:1 ω 7c/ cy17:0, 16:1 ω 8c/ cy19:0
Indicadores de estrés	16:1 ω 7t/ 16:1 ω 7c, 16:1 ω 8t/ 16:1 ω 8c
Monoinsaturados	16:1 ω 7t, 18:1 ω c, 18:1 ω 7c, 16:1 ω 5c
Saturados	10:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0
Monoinsaturados / saturados	16:1 ω 7t + 17:1 ω 8c + 18:1 ω 7c + 16:1 ω 5c / 10:0 + 12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0

2.4.2. Analizar la diversidad de las comunidades microbianas del suelo en soja en diferentes sistemas productivos, en cuanto a las funciones microbianas como respiración, hidrólisis de diacetato de fluoresceína y actividad deshidrogenasa y fosfatasa ácida y genes relacionados al ciclo del Nitrógeno

Respiración microbiana del suelo

La medición del dióxido de C respirado es una estimación de la presencia microbiana en los suelos cultivados. Esto refleja la dinámica de su biota, por lo tanto, evidencia 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 mediante la liberación de CO₂ (Alef, 1995, modificada por Abril, A., 2012, com. personal). Se pesaron 10 g de suelo y 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 CO₂ se midió mediante titulación con HCl 0,2 N, fenolftaleína como indicador y CL₂Ba como precipitante del NaCO₃ formado. El cálculo del CO₂ producido se efectuó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{mg CO}_2/7\text{días/g suelo} = (\text{Blanco-Tratado}) * 4.4 / \text{Peso Seco}$$

Se utilizaron blancos como testigos con la finalidad de descontar el CO₂ atmosférico.

Las determinaciones se realizaron empleando un frasco por submuestra de suelo, totalizando seis réplicas por parcela para cada una de los parámetros.

Actividad enzimática

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. En general, más del 90% del flujo de energía en un sistema de suelo pasa a través de los descomponedores microbianos, por lo tanto, proporcionará una buena estimación de la actividad microbiana total.

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. Particularmente, las enzimas del tipo oxidoreductasas (deshidrogenasa), se cuantifican como medida generalizada de los procesos microbianos del suelo. La enzima deshidrogenasa tiene un papel fundamental en las etapas iniciales de oxidación de la MO (ciclo del C), catalizando las reacciones que degradan proteínas y péptidos, por lo que además están involucradas en el ciclo del N. Finalmente, la actividad fosfatasa ácida permite la estimación de formas de fósforo (P) disponible para las plantas por medio de la acción de un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico. Principalmente la fosfatasa ácida pertenece al grupo de las enzimas inespecíficas de las monoésterfosfato hidrolasas. Su cuantificación es posible mediante un método simple que trata la estimación colorimétrica del p-nitrofenol liberado por la actividad fosfatasa.

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 frascos de 50 ml. Se agregó a los frascos 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 2,000 rpm por 3 min. El sobrenadante de cada muestra fue filtrado en frascos cónicos y 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 expuso 1 g de suelo (60% de su capacidad de campo) a 0,2 ml de una solución INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio) al 0,4% 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, y filtrado mediante papel de filtro Whatman No. 5. El INTF fue medido en espectrofotómetro UV-Vis a 490 nm Perkin Elmer.

Actividad fosfatasa ácida

La actividad fosfatasa ácida fue cuantificada mediante el método de Tabatabai y Bremner (1969). Se pesó 1 g de suelo y se determinó el contenido de p-nitrofenol incubado a 37°C durante 1 hora en una solución tamponada de p-nitrofenilfosfato, midiéndose luego por espectrofotómetro UV-Vis a 490 nm Perkin Elmer.

Cuantificación de genes relacionados al ciclo del Nitrógeno

En sistemas agrícolas tradicionales, la Fijación Biológica de N Atmosférico (FBN) constituye uno de los factores más importantes dentro del ciclo biogeoquímico del N. El N es, por lo general, un nutriente limitante para el normal crecimiento de los cultivos. El proceso de FBN, interviene además, en la reducción del N atmosférico en amonio biodisponible lo que representa una importante fuente de N al sistema. Las entradas de N al suelo, producto de la FBN por microorganismos de vida libre, representan a veces, una fuente menor en comparación a lo que ocurre con sistemas como el de simbiosis rhizobium-leguminosa. Sin embargo, la FBN se produce en la mayoría de los sistemas y

representa la fuente más dominante de N fijado en diferentes suelos. En Las Lajitas, la fertilización inorgánica no constituye una práctica normal, de allí la importancia de evaluar el flujo de N en estos sistemas agrícolas.

Grupos filogenéticamente diversos de organismos procariotas, pertenecientes a los dominios bacteria y archaea, tiene capacidad para realizar la FBN por lo que la abundancia de los genes relacionados se puede evaluar a través de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Los genes involucrados en el ciclo del N, son: *nifH* (FBN), AOB *amoA*, AOA *amoA* (amonificación-nitrificación), *nirK*, *nirS* (reducción) y *nosZ* (reducción a N₂).

A los fines de su cuantificación, el ADN del suelo se extrajo a partir de 250 mg de suelo con el kit de extracción NucleoSpin suelo (Macherey Nagel, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El rendimiento de ADN y su pureza se midieron mediante el uso de un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies, Delaware). La cuantificación absoluta de todos los genes investigados se llevó a cabo por triplicado en un ciclador ABI Prism 7300 termociclador (Applied Biosystems, Alemania). Para la qPCR, se utilizaron 100 ng de ADN plantilla de suelo diluido, 3% BSA (albúmina de suero bovino), 10 pmol/μl de cebadores (Metabion, Alemania), 12,5 μl power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems), sulfóxido de dimetilo (Sigma, Alemania) y DEPC. La composición de la mezcla de cada reacción se presenta en la Tabla 2.4. Todas las corridas de PCR comenzaron con una activación enzimática inicial a 95 °C durante 10 min. El subsecuente perfil térmico fue diferente para cada gen, como se indica en la Tabla 2.5. La especificidad de los productos de amplificación fue confirmada por análisis de las curva de fusión (55-95°C, 0,5°C incrementos), y los tamaños esperados de la fragmentos amplificados se verificaron en un gel de agarosa teñido con bromuro al 1,5%. El protocolo de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 55°C y 45 seg a 72°C y para el periodo de elongación 15 seg a 95°C, 30seg a 60°C y 15 seg a 95°C. La fluorescencia se midió al final del periodo de incubación a 72°C. Para probar los posibles efectos inhibidores (sustancias húmicas coextraídas), sobre la amplificación por

PCR cuantitativa causada por extraídos simultáneamente de las sustancias húmicas, la dilución óptima para cada extracto de ADN fue determinado por pre-experimentos (datos no mostrados) y controles negativos (MM). Para generar las curvas estándar para cada uno de los genes diana, los productos de PCR procedentes de las cepas fueron clonados con pGEM-T easy vector (Promega, EE.UU.) y se transformaron en *Escherichia coli* Top10. Las diluciones estándar de los plásmidos clonados se utilizaron para crear las curvas estándar que variaron desde 10^1 hasta 10^6 copias del gen/ μ l. Las eficiencias de amplificación se calcularon mediante el uso de la fórmula Efectiva= $[10^{(-1/\text{pendiente})}-1]$ (Esperschütz, *et al.*, 2009).

Tabla 2.4. Componentes de la reacción de la mastermix usada para cuantificar los genes diana funcionales involucrados en el ciclo del N.

Grupo metabólico	Gen Diana	Amt (µl) componentes del ensayo						Agua DEPC
		2x power	3% BSA	Primer (10pmol µl ⁻¹)		Sulfóxido	ADN	
		SYBR Green		Forward	Reverse	de dimetilo		
Bacterias fijadoras de N	<i>nifH</i>	12,5	0,5	0,30	0,30	-	2	9,4
AOB	<i>amoA</i>	12,5	0,5	0,75	0,75	-	2	8,5
AOA	<i>amoA</i>	12,5	0,5	0,50	0,50	-	2	9,0
Bacterias	<i>nirK</i>	12,5	9,5	0,50	0,50	0,625	2	8,375
denitrificadoras	<i>nirS</i>	12,5	0,5	0,50	0,50	0,625	2	8,375
	<i>nosZ</i>	12,5	0,5	0,50	0,50	0,625	2	8,375

Tabla 2.5. Set de primers y perfiles térmicos usados para la cuantificación absoluta de los genes diana funcionales involucrados en el ciclo del N.

Gen Diana	Set Primer	Referencia	Perfil Térmico del ciclador	N° de ciclos
<i>nifH</i>	<i>nifH</i> -F-Rösch <i>nifH</i> -R-Rösch	Rösch y Bothe, 2005	95°C/45 s, 55°C/45 s, 72°C/45 s	40
<i>amoA</i>	<i>amoA</i> -1F <i>amoA</i> -2R	Treusch <i>et al.</i> , 2005	94°C/60 s, 60°C/60 s, 72°C/60 s	39
<i>amoA</i>	19F CrenamoA616r48x	Leininger <i>et al.</i> , 2006	94°C/45 s, 50°C/45 s, 72°C/45 s	40
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> -876 <i>nirK</i> -5R	Boyle-Yarwood, 2008 Michotey <i>et al.</i> , 2000	95°C/15 s, 63°C-58°C/30 s, 72°C/30 s	6''40
<i>nirS</i>	<i>nirS</i> -cd3af <i>nirS</i> -R3cd	Mayer, J. <i>et al.</i> , 2003 Simon, H. <i>et al.</i> , 2005	94°C/60 s, 57°C/60 s, 72°C/60 s	39
<i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> -F <i>nosZ</i> -R	Kloos <i>et al.</i> , 2005	94°C/60 s, 57°C/60 s, 72°C/60 s	39

2.4.3. Evaluar parámetros químicos y físicos del suelo en soja en diferentes sistemas productivos

La fertilidad del suelo, en un sentido estricto, se refiere a la capacidad de los suelos para nutrir a las plantas con elementos minerales, sin embargo, un suelo puede ser fértil y no productivo por incidencia de otros factores y cuando no se dan las condiciones favorables para la producción agrícola. Por ello, unas de las herramientas más usadas para realizar un buen diagnóstico de suelo es el análisis físico-químico.

Cuantificación de parámetros químicos

Las muestras de suelo obtenidas a partir de cada estación de muestreo fueron procesadas en el laboratorio de suelos de la EEA INTA Cerrillos, Salta, para determinar los siguientes parámetros:

Carbono total (Materia Orgánica) (CO)

El método se basa en el procedimiento propuesto por Black (1965). El C orgánico (CO) se oxida parcialmente por una solución de dicromato de potasio en medio ácido. El agregado de ácido sulfúrico aporta el medio para la reacción y el calor necesario para que se produzca la oxidación del C. El exceso de dicromato se valora mediante volumetría redox con una solución ferrosa.

Nitrógeno total (Nt)

La mayor proporción de N se encuentra en 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 MO 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).

Nitrato (NO³) y Amonio (NH₄)

Se realizó por microdestilación por arrastre de vapor mediante el agregado exactamente de 100 ml de SO₄ K₂ al 4% y microtitulado con H₂ SO₄ 0,005 N.

pH (pH)

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.

Fósforo extractable (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 P (Bray y Kurtz, 1945).

Conductividad eléctrica (CE) y Capacidad hídrica de saturación (CHS)

La CE se determinó por suspensión de la muestra de suelo en una solución de agua destilada en una relación de 1:2.5 v/v con un periodo de equilibrio inicial de una hora dejando en reposo un hora más, leyendo en celda conductimétrica ajustada con solución estándar de ClK 0,01 N (Norma IRAM, 2006).

La CHS se determinó por diferencia de peso húmedo y seco en pasta de suelo. Para ello el suelo se satura con agua a fin de solubilizar ciertos minerales. Se seca en estufa a 105°C y se determina el porcentaje (%) de saturación mediante la determinación del peso seco.

Cuantificación de parámetros físicos

Textura

Se determinó por el método de la pipeta de Robinson (USDA, 1992). Este permite cuantificar la abundancia relativa de las partículas de diámetro menor a 0,053mm, es decir, de las fracciones denominadas arcilla y limo. El método se basa en la diferente velocidad de sedimentación que tienen las partículas, de acuerdo a su diámetro, en el seno de un fluido. Finalmente se determinó el porcentaje de arena, limo y arcilla de cada muestra.

Estabilidad de agregados del suelo (EA)

Se cuantificó con el métodos de microtamices empleando el equipo “EA 250” (Corvalán *et al.*, 2000) utilizando muestras compuestas disturbadas. Para ello, fue necesario el tamizado de la muestra para seleccionar agregados de 1 a 2 mm que son colocados en microtamices de malla 0,25 mm (A.S.T.M. N° 60) donde son sometidos a la acción disruptora del agua. La EA cuantifica los agregados que permanecen inalterados luego de la tamización en agua. Se expresó como porcentaje de agregados de suelo estable

(%) y los valores pueden estar comprendidos entre 1 % para suelos fuertemente degradados y 80 % para suelos orgánicos o de bosque tropical.

Densidad Aparente (DA)

Fue cuantificada siguiendo metodología de Blake y Hartge (1986). Se evaluó por medio de un cilindro metálico de 281cm³, el cual fue previamente enterrado en la cara horizontal de un pequeño perfil de suelo (0-15cm) realizado en cada estación de muestreo.

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

Se determinó la incidencia de las principales enfermedades causadas por hongos de suelo en soja. Luego se correlacionaron los resultados obtenidos con la diversidad microbiana del suelo y el rendimiento del cultivo. Para ello se siguió la siguiente metodología:

Evaluación de enfermedades

La determinación de incidencia (% de plantas enfermas sobre el total muestreado) de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja se realizó de acuerdo a bibliografía previa (March y Marinelli, 2005). El momento de la evaluación de incidencia fue hacia el final del ciclo del cultivo, en etapa de madurez fisiológica. Se monitorearon los sitios con monocultivo y con rotación siguiendo un diseño en W, considerando 25 muestras por cada brazo y 10 plantas por muestra en el mismo surco, separadas entre sí por 30 surcos. Esta metodología es frecuentemente usada con enfermedades causadas por hongos del suelo (March y Marinelli, 2005). Las evaluaciones fueron realizadas al estado fenológico R6-R7 para evitar invasiones saprofíticas de otros patógenos.

En el campo, las plantas de soja y maíz con síntomas de enfermedades causadas por hongos de suelo se reconocieron por sus síntomas y fueron transportadas al laboratorio para la posterior confirmación del agente causal. En el laboratorio, se tomaron muestras de tejido enfermo que se colocaron en cámara húmeda. Luego de 24 horas se confirmó al microscopio óptico el agente causal de los daños observados. Solo en los casos necesarios, se realizaron siembras de tejido enfermo en medio de cultivo para determinar el patógeno involucrado. Se desinfectó el tejido con hipoclorito de sodio al 5% durante 2 minutos, y luego se colocó en medio de cultivo general (Agar papa glucosado) y/o específico en los casos en que fue necesario.

Rendimiento del cultivo (Rend)

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

2.4.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012). Como herramienta exploratoria se empleó el Análisis de Componentes Principales (ACP), con la finalidad de reducir la dimensión de las variables analizadas. Además, este análisis permitió detectar las variables que tuvieron mayor inercia en la separación de los tratamientos. Luego se realizaron Análisis de la Varianza para la diferenciación entre medias de tratamientos, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. El cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza del error experimental se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilks y gráficos de dispersión, utilizando los residuos y predichos del modelo ajustado. En los casos de incumplimiento de supuestos se realizó la transformación más conveniente. Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas mediante el uso del test de diferencias mínimas significativas (LSD) (Steel *et al.*, 1997). Se consideró a las campañas como repeticiones y no como tratamientos.

Para establecer las relaciones entre las variables microbiológicas, químicas y físicas y la incidencia de enfermedades por hongos de suelo, se empleó el análisis de correlación de Pearson ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

Abundancia de microorganismos cultivables: Hongos totales, bacterias totales y potenciales microorganismos biocontroladores: *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Pseudomonas* fluorescentes y Actinobacterias

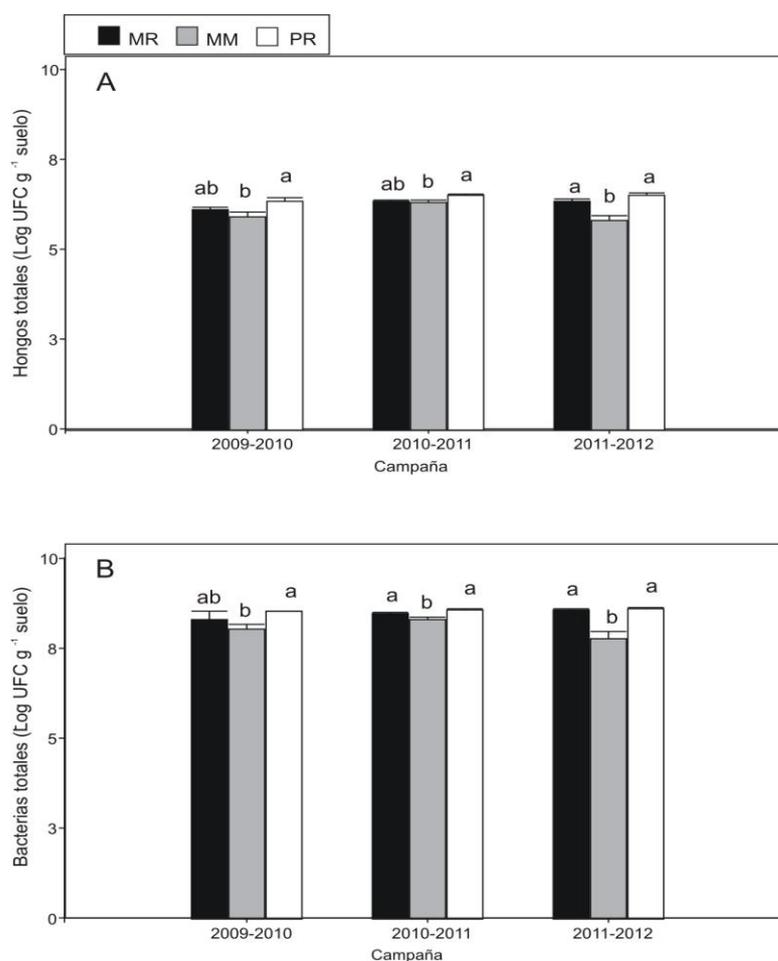


Fig. 3.1. Poblaciones cultivables de hongos y bacterias totales en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

UFC: unidades formadoras de colonia, hongos ($\times 10^4$ g⁻¹), bacterias ($\times 10^6$ g⁻¹). Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

En la Figura 3.1 se muestran las poblaciones de hongos (HT) y bacterias (BT) cultivables totales encontradas en los agroecosistemas bajo monocultivo (MM), rotación (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR). Los HT y las BT mostraron un rango poblacional de 6,70-5,26 y 8,91-7,04 Log UFC g⁻¹ suelo seco, respectivamente (Fig. 3.1). En todas las campañas evaluadas, los suelos PR mostraron mayores valores poblacionales de HT y BT cultivables en comparación con suelos bajo MM. Por otro lado, PR no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a MR. Durante las campañas 2009-2010 y 2010-2011, los HT cultivables bajo MR presentaron valores poblacionales similares a MM, mientras que en la campaña 2011-2012, MR fue superior a MM (Fig. 3.1. A). Finalmente, y a excepción de lo ocurrido durante la primera campaña, los suelos bajo MR presentaron mayores niveles poblacionales de BT cultivables que los encontrados en suelos bajo MM (Fig. 3.1. B).

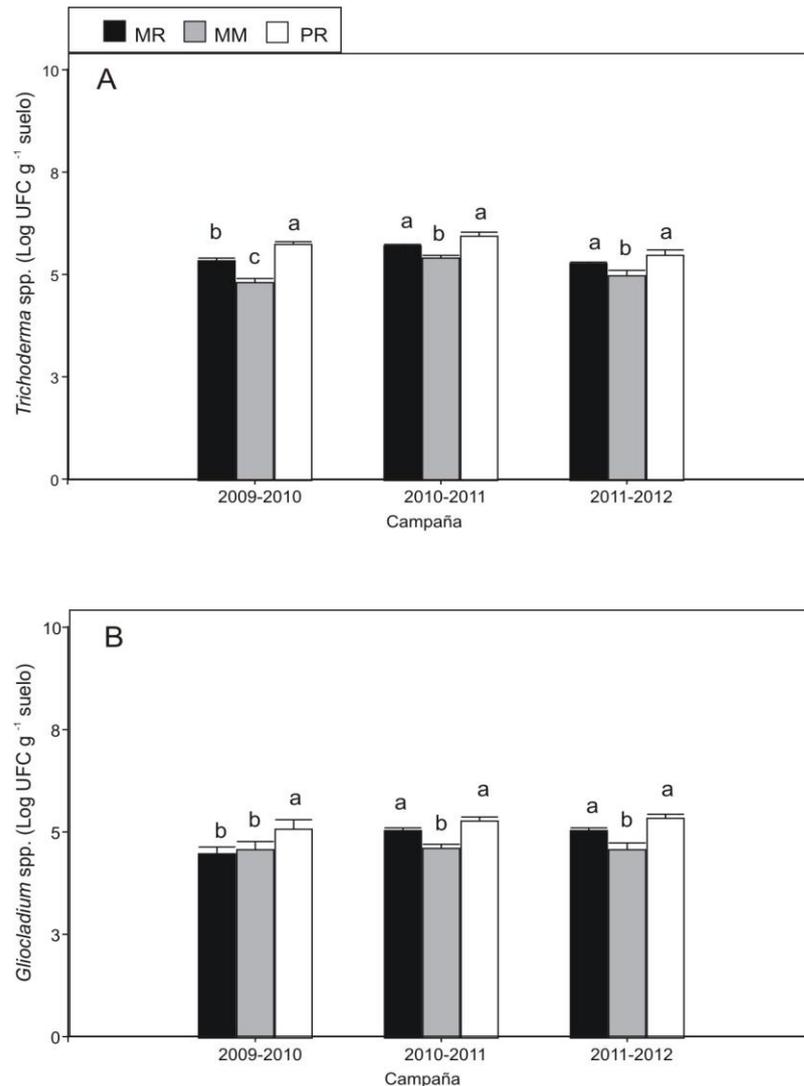


Fig. 3.2. Poblaciones cultivables de hongos potenciales biocontroladores, *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

UFC: unidades formadoras de colonia, hongos ($\times 10^4$ g⁻¹). Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test de LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

El manejo empleado afectó de distinta manera las densidades de propágulos de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. (Fig. 3.2). Los rangos poblacionales de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. fueron de 6,16-4,52 y 6,00-4,00 Log UFC g⁻¹ suelo seco, respectivamente. En todas las campañas agrícolas, los suelos bajo MM presentaron menores valores poblacionales de hongos potencialmente biocontroladores en comparación con PR (Fig. 3.2). Por otro lado, en la mayoría de las campañas evaluadas, los suelos PR y MR revelaron similares valores poblacionales de ambos biocontroladores. Sin embargo, en

la campaña 2009-2010, los niveles poblacionales de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. bajo PR, mostraron mayores valores poblacionales en comparación a MR. A excepción de lo ocurrido para *Gliocladium* spp., en la primera campaña, en los suelos bajo MR se registró un incremento de estos microorganismos en comparación con MM (Fig. 3.2.B).

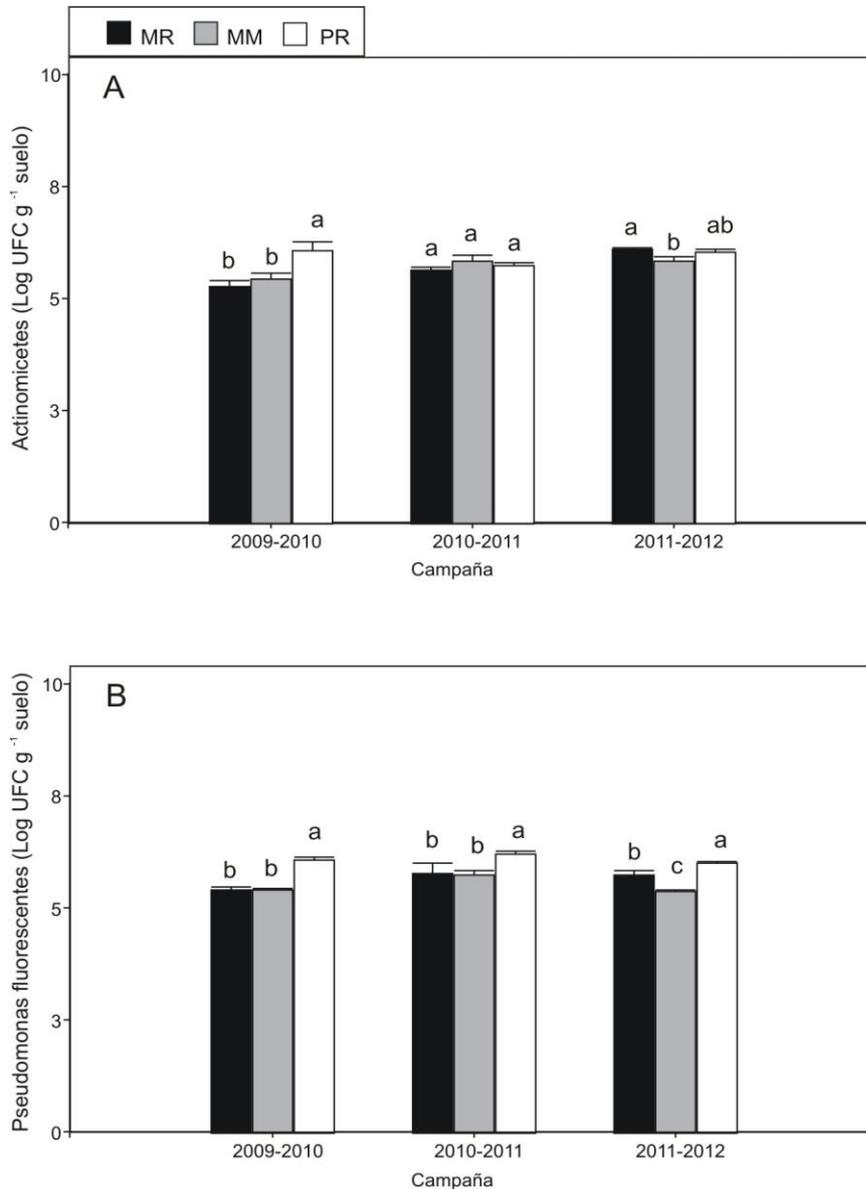


Fig. 3.3. Poblaciones cultivables de bacterias potenciales biocontroladoras, Actinobacterias y Pseudomonas fluorescentes en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

UFC: unidades formadoras de colonia, bacterias ($\times 10^6$ g⁻¹). Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

Las poblaciones de las bacterias biocontroladores actinobacterias y el grupo de pseudomonas fluorescentes fueron afectadas en diferente grado por el manejo agrícola. Las actinobacterias y pseudomonas fluorescentes presentaron un rango poblacional de 6,90-4,82 y 6,51-5,00 Log UFC g⁻¹ suelo seco, respectivamente (Fig. 3.3). En general, y en lo referente a las poblaciones de actinobacterias, PR presentó similar nivel poblacional que los suelos bajo MM, a excepción de lo ocurrido en la primera campaña, donde PR>MM (Fig. 3.3.A). De la misma manera y en general, PR mostró similares valores que MR, salvo en la primera campaña donde PR fue mayor que MR. Por otro lado, los suelos MR mostraron similar nivel poblacional que MM, a excepción de la tercera campaña donde MR fue mayor que MM.

En cuanto a pseudomonas fluorescentes y durante todas las campañas evaluadas, los suelos PR presentaron los mayores niveles poblacionales de este biocontrolador (Fig. 3.3.B). Sin embargo, las poblaciones de pseudomonas fluorescentes fueron similares en los suelos MR y MM. En la tercera campaña, los niveles poblacionales de pseudomonas fluorescentes bajo MR fueron significativamente mayores a los encontrados en MM.

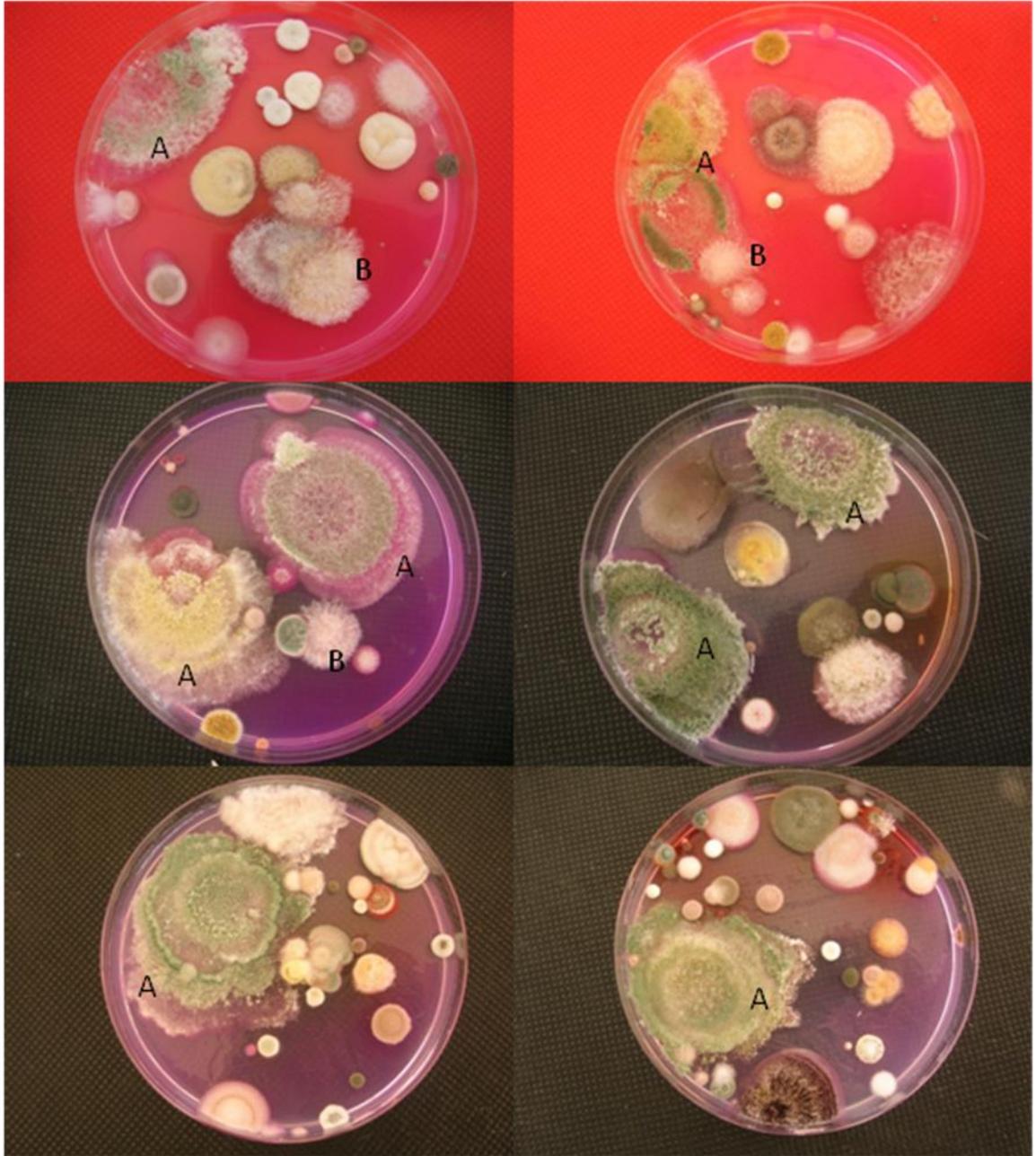


Fig. 3.4. Poblaciones cultivables de hongos potenciales biocontroladores (*Trichoderma* spp. (A) y *Gliocladium* spp. (B)) cultivados en medio específico CRS.

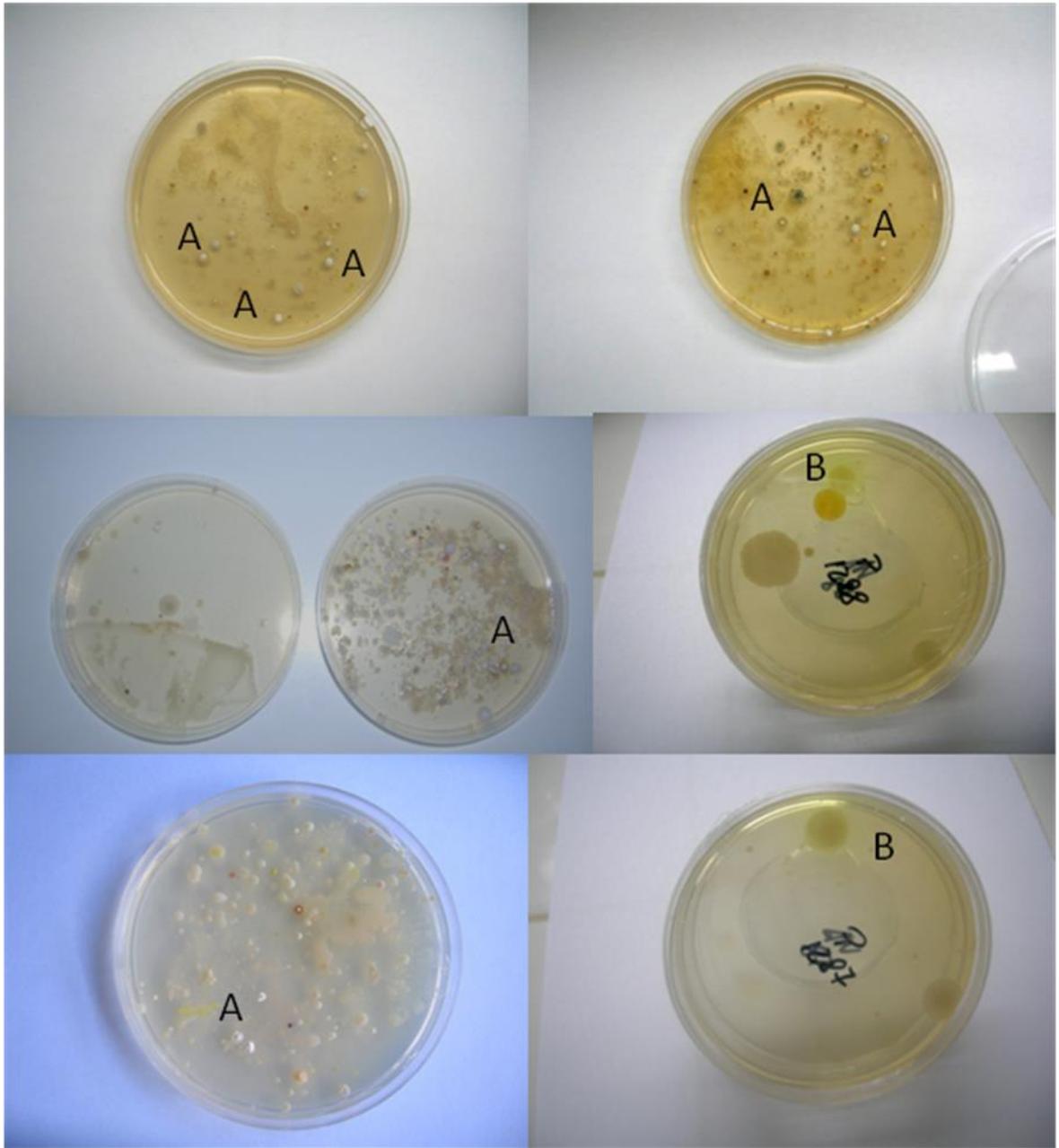


Fig. 3.5. Poblaciones cultivables de bacterias potenciales biocontroladoras (Actinobacterias (A) y *Pseudomonas fluorescentes* (B)) cultivados en medio Küster y King A y B respectivamente.

Biomasa microbiana y contenido de proteínas relacionadas con glomalina (GRSP)

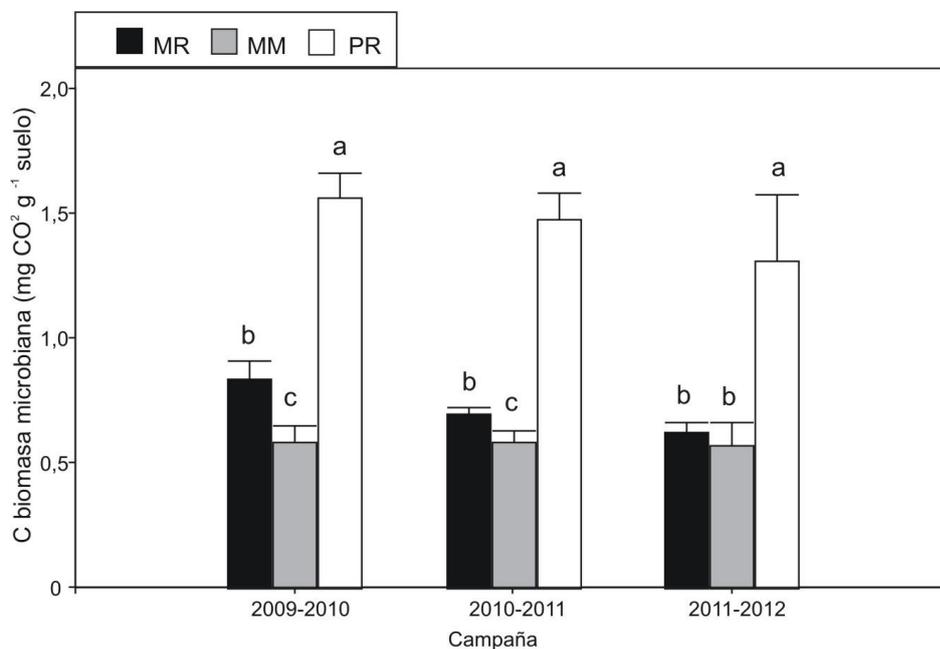


Fig. 3.6. Carbono de la biomasa microbiana (CBM) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

El contenido de Carbono de la biomasa microbiana (CBM) fue afectado de distinta manera de acuerdo al tipo de manejo empleado (Fig. 3.6). Los niveles de CBM mostraron valores entre 1,91-0,25 mg CO₂ g⁻¹ suelo seco/semana. En todas las campañas evaluadas, el contenido de CBM fue significativamente mayor en PR que en los suelos MR y MM. En general, se observó que los niveles de CBM encontrados en los suelos MR fueron mayores que los registrados en los suelos MM. Sin embargo, durante la tercera campaña, el CBM en suelos MR no mostró diferencias significativas respecto a los suelos MM.

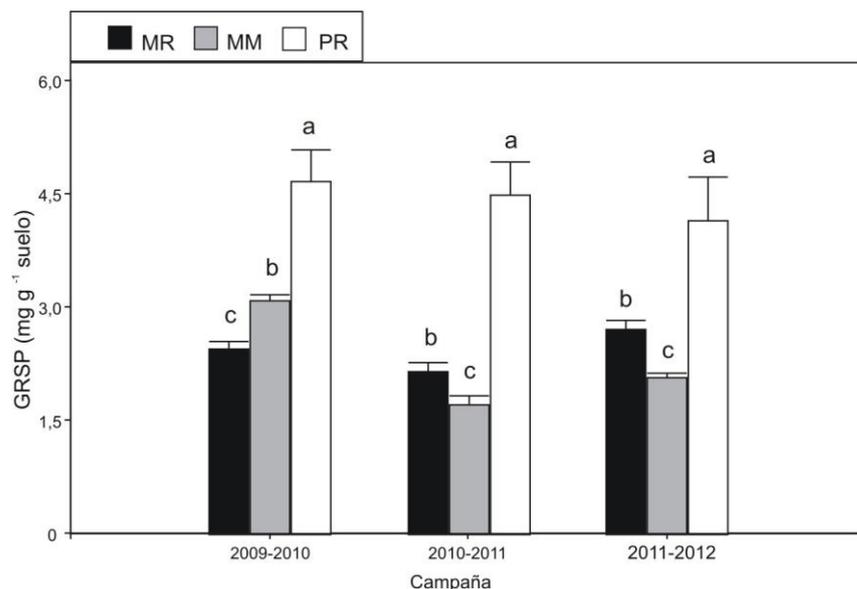


Fig. 3.7. Contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

El contenido de proteínas relacionadas a glomalina (GRSP) fue afectado de distinta manera por el manejo agrícola (Fig. 3.7). Los valores de GRSP se presentaron en el rango de 6,35-1,24 mg g⁻¹ suelo seco. Durante todas las campañas agrícolas evaluadas, el contenido de GRSP fue significativamente mayor en los suelos PR en relación a los contenidos encontrados en los suelos MR y MM. A excepción de lo ocurrido en la primera campaña, el contenido de GRSP encontrado en los suelos MR fue significativamente mayor que en los suelos MM.

Contenido de fosfolípidos del suelo

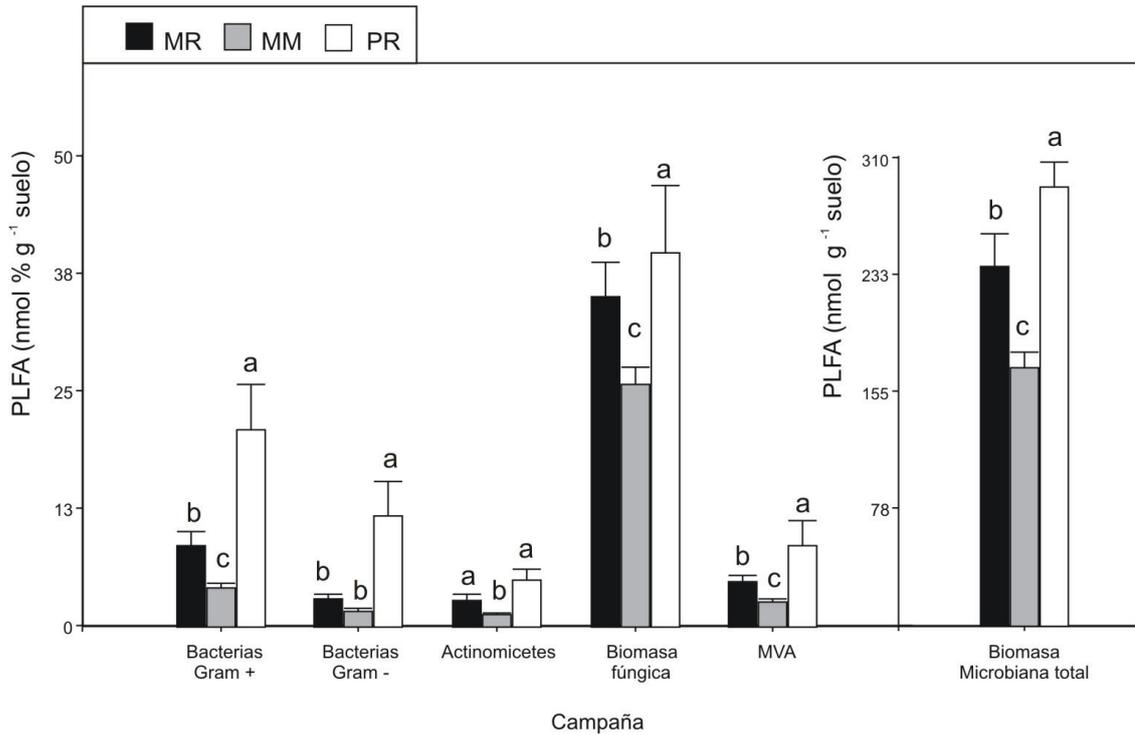


Fig. 3.8. Perfiles de fosfolípidos (PFLAs) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

La evaluación de los perfiles microbianos mediante la cuantificación de fosfolípidos (PLFAs) sólo fue estimada en la campaña 2009-2010 (Fig. 3.8). Los distintos manejos agrícolas afectaron de forma significativa la estructura de las comunidades microbianas del suelo. La totalidad de los taxones evaluados (Gram +, Gram -, actinobacterias y micorrizas vesículo-arbusculares) resultaron más abundantes en PR que en los suelos MM. A excepción de lo ocurrido con los actinobacterias, la misma situación fue observada en los suelos PR respecto a los suelos MR. Dentro de los manejos agrícolas, MR siempre presentó mayor abundancia en todos los taxones evaluados. Sin embargo, la abundancia de bacterias Gram - en ambos sistemas agrícolas fue similar. Por último, la biomasa microbiana total mostró el siguiente orden de abundancia: PR>MR>MM.

Respiración microbiana, hidrólisis de diacetato de fluoresceína y actividad fosfatasa ácida

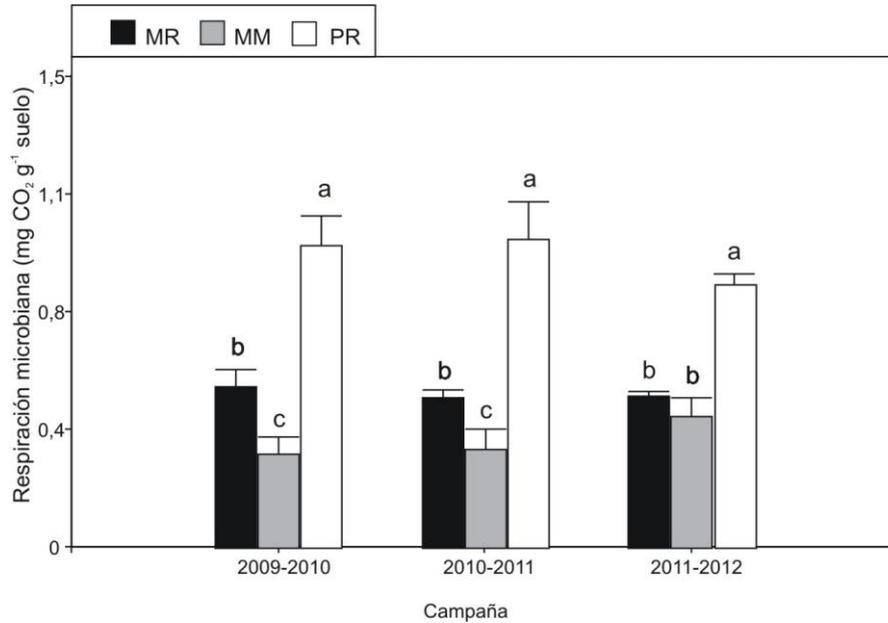


Fig. 3.9. Respiración microbiana en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

La respiración microbiana (RM) presentó valores entre 1,51-0,06 mg CO₂ g⁻¹ suelo seco/semana (Fig. 3.9). En todas las campañas agrícolas, los suelos PR presentaron los mayores niveles de RM. A excepción de lo ocurrido en la última campaña, los suelos MR mostraron niveles más elevados de RM que los suelos MM.

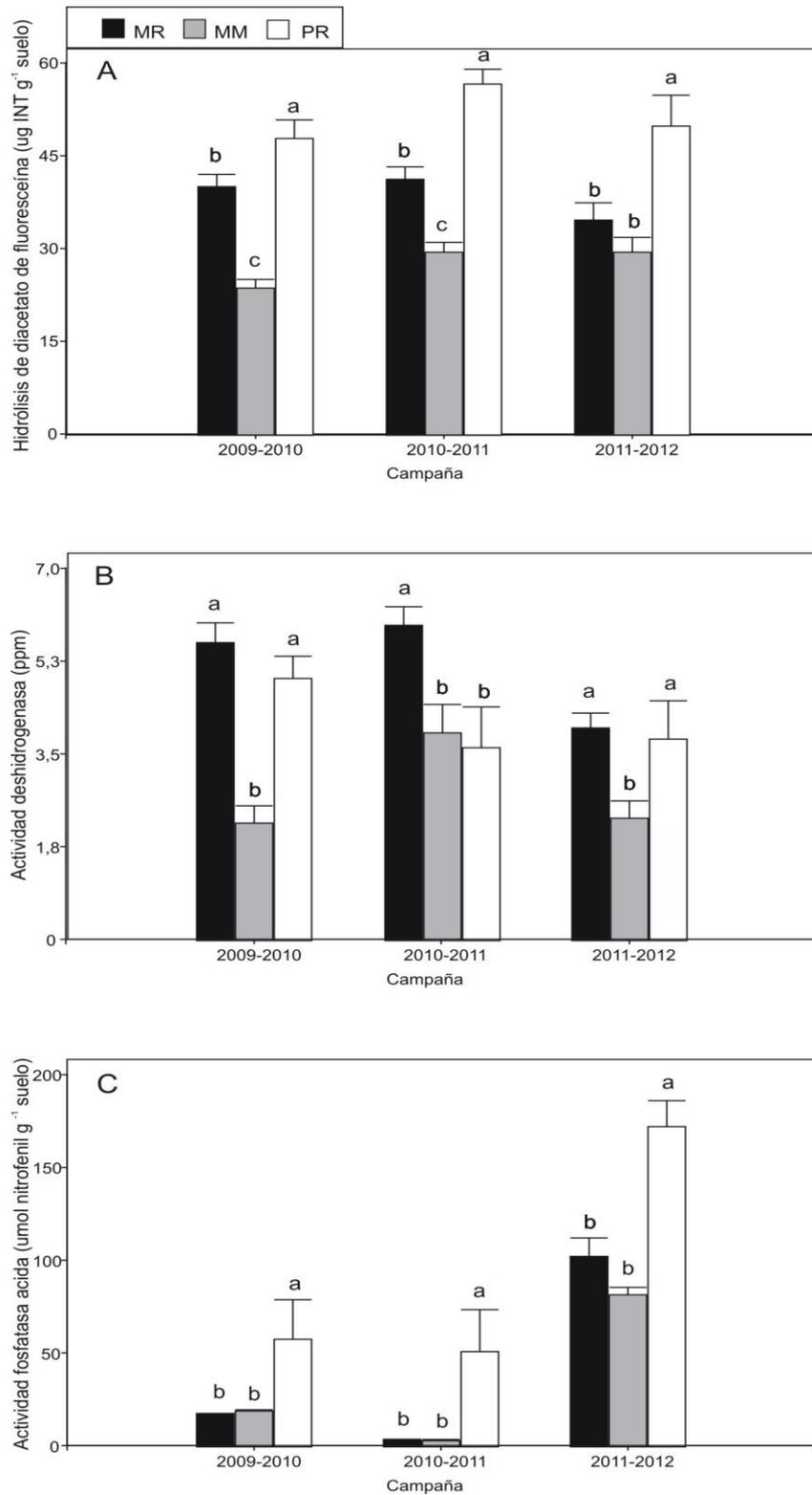


Fig. 3.10. Actividad microbiana en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012. A) Actividad hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA). B) Actividad deshidrogenasa. C) Actividad fosfatasa ácida.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

Las actividades enzimáticas del suelo variaron de acuerdo al manejo empleado (Fig. 3.10). La actividad hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), deshidrogenasa (DH) y fosfatasa ácida (FA) presentaron rangos entre 67,00-14,52 $\mu\text{g INT g}^{-1}$ suelo seco; 7,35-0,78 ppm y 229,84-1,83 $\mu\text{mol nitrofenil g}^{-1}$ suelo seco, respectivamente. Durante las tres campañas evaluadas, los suelos PR registraron altos niveles de actividad FDA y FA (Fig. 3.10 A y C). Además, la actividad FDA fue mayor en suelos MR que en suelos MM, a excepción de la última campaña. Por su parte, la actividad FA presentó similares niveles para MR y MM en todas las campañas. Contrariamente, y a excepción de la segunda campaña, la actividad DH mostró niveles similares entre PR y MR. Sin embargo, salvo lo ocurrido en la segunda campaña, los niveles de actividad DH de los suelos PR fueron más elevados que los encontrados MM. Por su parte, los suelos MR presentaron actividades significativamente superiores a los suelos MM.

Abundancia de genes funcionales involucrados en el ciclo del Nitrógeno

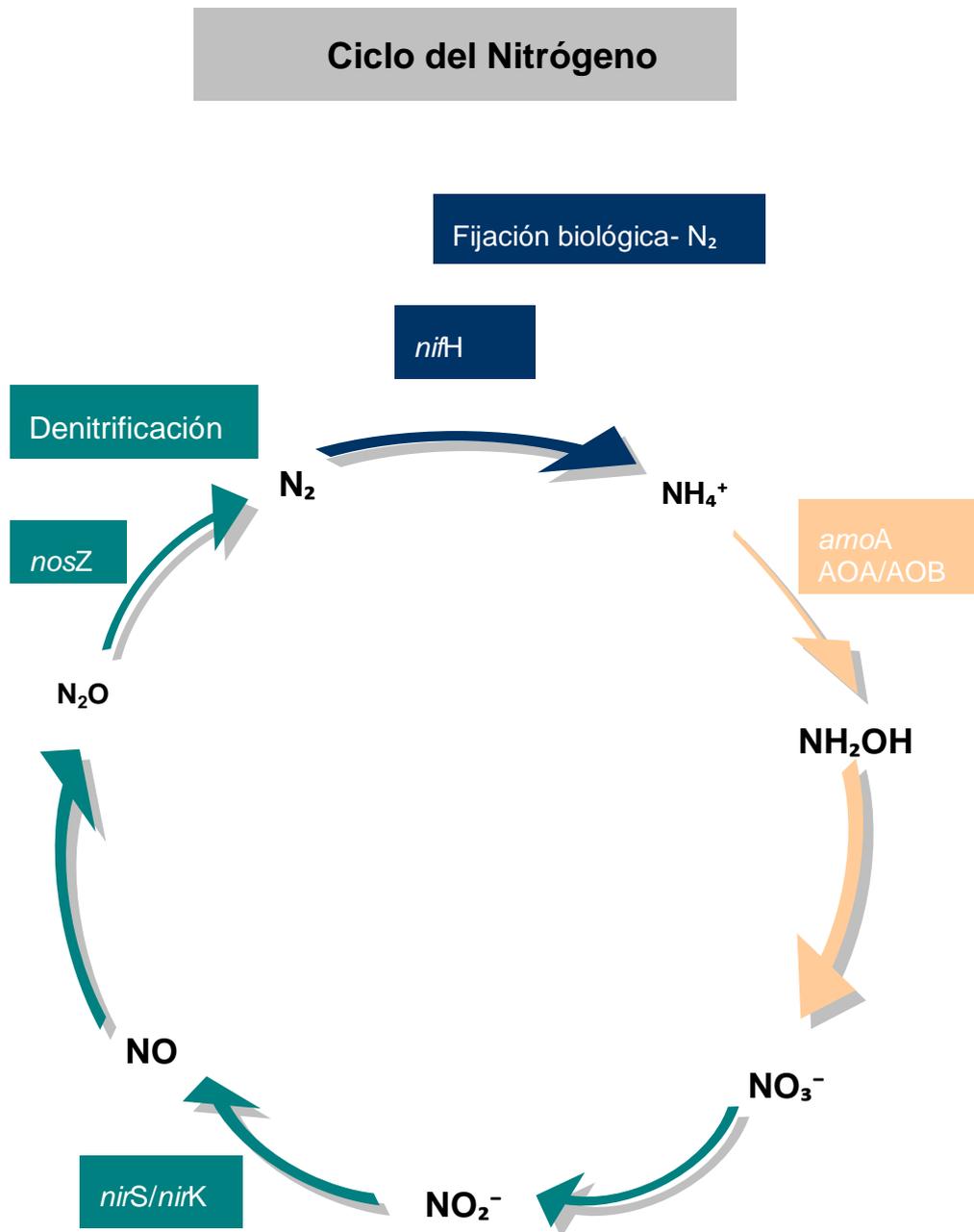


Fig. 3.11. Ciclo del Nitrógeno

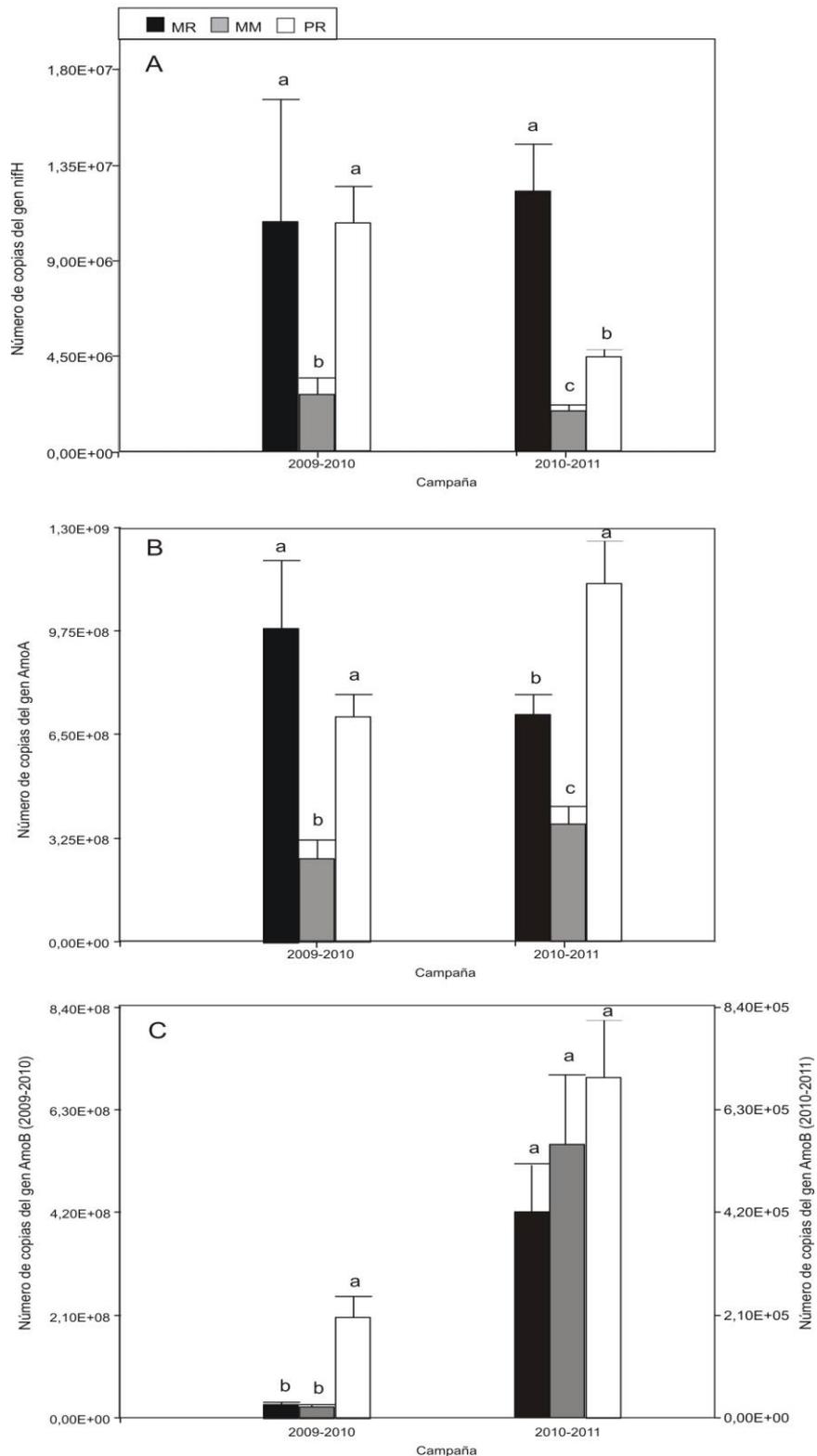


Fig. 3.12. Número de copias de los genes funcionales *nifH*, *amoA* y *amoB* relacionados al ciclo del N en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011. Número de copias de genes: ng de ADN del gen. Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

En la Fig. 3.11 se describe el ciclo del N y en la Fig. 3.12 se muestra el número de copias de genes funcionales relacionados al ciclo del N (*nifH*, *amoA*, *amoB*, *nirS*, *nirK* y *nosZ*) evaluados bajo dos sistemas de manejo contrastantes y suelo prístino de bosque tropical. Estas evaluaciones sólo se realizaron cuando se había sembrado soja como cultivo de superficie (campañas 2009-2010 y 2010-2011).

El número de copias de los genes *nifH*, *amoA*, *amoB* variaron de acuerdo al manejo empleado (Fig. 3.12). La abundancia de genes *nifH* varió entre $3,8 \times 10^6$ a $3,2 \times 10^4$ número de copias del gen (Fig. 3.12.A). Los suelos MR presentaron mayor número de copias de este gen que los suelos PR para la mayoría de las campañas evaluadas, a excepción de la campaña 2009-2010. Por otro lado, durante ambas campañas, PR y MR mostraron mayor abundancia del gen *nifH* que lo encontrado en MM. El número de copias del gen *amoA* varió entre $15,5 \times 10^7$ a $43,1 \times 10^5$ número de copias del gen *amoA* (Fig. 3.12.B). Durante la primera campaña, PR y MR registraron similares valores y difirieron significativamente de MM, donde se observó el menor número de copias de *amoA*. Durante la segunda campaña, los suelos PR mostraron mayor número de copias del gen *amoA* respecto a lo encontrado en MR y MM, siguiendo el siguiente orden decreciente: PR>MR>MM. En cuanto al gen *amoB*, el número de copias encontradas en los tratamientos varió entre $3,7 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^6$ número de copias del gen *amoB* (Fig. 3.12.C). Durante la primera campaña, el número de copias del gen *amoB* fue mayor en los suelos PR, mientras que los suelos MR y MM presentaron similares valores. Para la segunda campaña, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

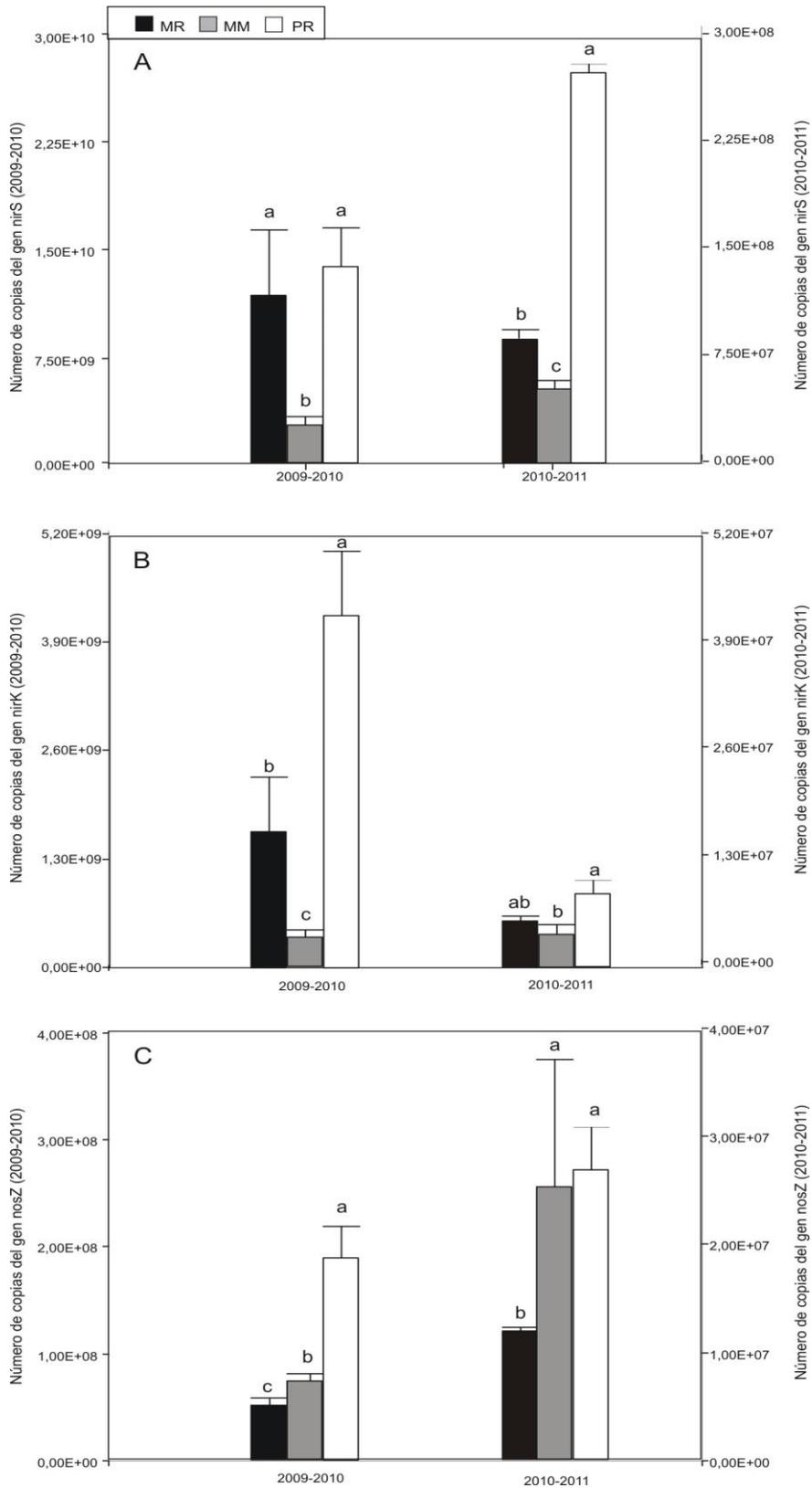


Fig. 3.13. Número de copias de los genes funcionales *nirS*, *nirK* y *nosZ* relacionados al ciclo del N en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011. Número de copias de genes: ng de ADN del gen. Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

Teniendo en cuenta todos los tratamientos y campañas evaluadas, el número de copias del gen *nirS*, fluctuó entre $29,1 \times 10^8$ a $53,8 \times 10^6$ (Fig. 3.13.A). Durante la primera campaña, los suelos PR y MR presentaron un similar número de copias del gen *nirS*, mientras que MR mostró mayores valores respecto a MM. En la segunda campaña, PR presentó la mayor abundancia de este gen, registrando el siguiente orden decreciente: PR>MR>MM. El número de copias del gen *nirK* varió entre $68,8 \times 10^7$ a $28,3 \times 10^5$ número de copias del gen *nirK* (Fig. 3.13.B). En la primera campaña, se observó que la abundancia del gen fue mayor en PR respecto a MR y MM. Por su parte, los suelos MR mostraron mayor número de copias del gen que lo registrado en los suelos MM. Durante la segunda campaña, PR presentó similares valores que MR y mayores valores que MM, mientras que MR mostró mayor abundancia del gen que MM. Por último, el número de copias del gen *nosZ*, fluctuó entre $27,9 \times 10^6$ a $25,9 \times 10^5$ (Fig. 3.13.C). En todos los tratamientos de la primera campaña, los suelos PR registraron los mayores niveles de copias del gen. A su vez, los suelos MM mostraron un mayor número de copias que los suelos MR. Durante la segunda campaña, ambos tratamientos, PR y MM, presentaron similares número de copias del gen *nosZ* y mayores valores que MR.

Atributos microbiológicos en respuesta al manejo agrícola: Análisis de componentes principales

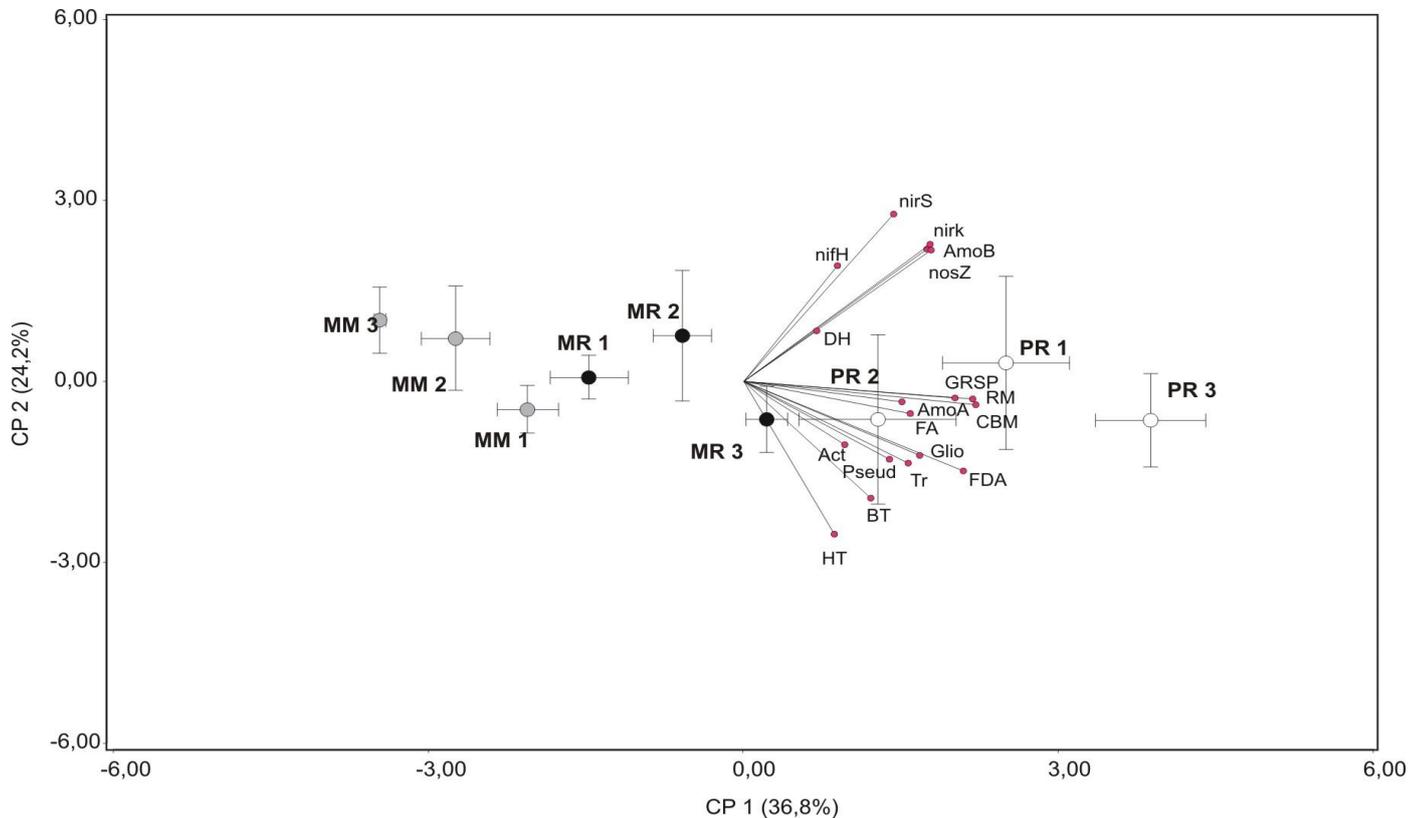


Fig. 3.14. Biplot del ACP para el efecto de sistemas de monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR) sobre parámetros microbiológicos del suelo durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

CP: Componente principal. HT: Hongos totales, BT: Bacterias totales, Tr: *Trichoderma* spp., Glio: *Gliocladium* spp, Act: Actinobacterias, Pseud: *Pseudomonas* fluorescentes, CBM: Carbono de la biomasa microbiana, GRSP: Proteínas relacionadas a la glomalina, RM: Respiración microbiana, FDA: Actividad FDA, DH: Actividad deshidrogenasa, FA: Actividad fosfatasa y genes funcionales del ciclo del nitrógeno: *nifH*, *amoA*, *amoB*, *nirS*, *nirK*, *nosZ*.

La Fig. 3.14 describe la dimensionalidad del conjunto de parámetros biológicos evaluados en los diferentes sitios geográficos. El Análisis de Componentes Principales (ACP) separó claramente los suelos agrícolas de los suelos prístinos de bosque tropical. Los ejes CP1 y CP2 explicaron el 36,8% y el 24,2% de la variabilidad total, respectivamente. A lo largo CP1, los sitios PR (PR1, PR2 y PR3) se separaron del resto de los sitios agrícolas, mientras que los sitios bajo MR, se ubicaron en el centro del plano, entre los sitios PR y MM. Los sitios bajo MM se localizaron del lado izquierdo del plano.

El sitio MM3 se separó aún más del resto de los sitios sobre CP1, mientras que el sitio PR3 se ubicó del lado opuesto. CP2 separó el sitio MM3 de los demás sitios. Las variables que más contribuyeron a las separaciones de los sitios PR de los sitios agrícolas fueron: HT, BT, Tr, Glio, CBM, GRSP, RM y FDA. Los genes que tuvieron mayor relevancia en la separación de los sitios fueron *amoA*, *amoB*, *nirK* y *nirS*. La correlación cofenética obtenida a partir del análisis de componentes principales fue de 0,922.

Parámetros químicos del suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos.

Tabla 3.1. Promedio de parámetros químicos del suelo en sistemas de monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Parámetros Químicos	Suelo Prístino de bosque tropical (PR)				Suelo bajo monocultivo de soja (MM)				Suelo bajo rotación de cultivos (MR)				
	Sitios	PR1	PR2	PR3	Media	MM1	MM2	MM3	Media	MR1	MR2	MR3	Media
CO		2,03	1,85	2,24	2,04 a	1,60	1,46	1,11	1,39 c	1,46	1,60	1,87	1,64 b
Nt		0,18	0,16	0,18	0,17 a	0,15	0,13	0,10	0,12 c	0,14	0,14	0,15	0,14 b
NO ₃ ⁻		27,77	25,27	32,33	28,45 a	41,80	18,47	12,01	24,09 b	17,78	14,05	28,33	20,05 c
NH ₄		12,74	9,59	15,33	12,55 a	13,25	7,22	7,10	9,19 b	12,50	9,11	12,33	11,31 a
pH		6,09	6,31	6,00	6,13 c	7,04	6,99	6,80	6,94 a	6,78	6,91	6,43	6,70 b
Pe		43,50	36,43	35,56	38,49 a	39,81	31,56	15,31	28,89 b	28,52	23,34	30,67	27,51 b
CE		0,68	0,65	0,72	0,68 a	0,69	0,47	0,29	0,48 b	0,33	0,30	0,73	0,45 b
CHS		29,47	29,10	28,22	28,93 a	26,87	29,78	26,84	27,83 b	27,86	28,37	27,33	27,85 b

*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en de una misma campaña. CO: Carbono orgánico (%), Nt: Nitrógeno total (%), NO₃⁻: Nitrito (ppm), NH₄: Amonio (ppm), pH: pH, Pe: Fósforo extractable (ppm), CE: Conductividad Eléctrica (mhos/cm), CHS: Capacidad Hídrica de saturación (%).

Un resumen de las principales propiedades químicas del suelo bajo MR, MM y PR se presenta en la Tabla 3.1. En general, las propiedades químicas del suelo fueron afectadas en distinto grado por el tipo de manejo agrícola empleado. Los contenidos de CO y Nt se presentaron en niveles entre 2,03-1,11% y 0,18-0,10%, respectivamente. Los niveles de CO y Nt encontrados en los suelos PR, fueron mayores que los encontrados en los suelos MM y MR, mientras que los contenidos de CO y Nt observados en MR fueron superiores a los suelos bajo MM.

El contenido de NO_3^- en los suelos evaluados varió entre 41,80-12,01 ppm. Los niveles de NO_3^- encontrados en PR fueron superiores a los suelos bajo MR y MM. Por otro lado, los niveles de NO_3^- en los suelos MR fueron inferiores a los encontrados en MM. El contenido de NH_4^+ se presentó en niveles entre 13,25-7,10 ppm. El contenido de NH_4^+ fue mayor en PR y MR en relación a MM. El contenido de NH_4^+ encontrado en MR fue significativamente mayor que el encontrado en MM.

El pH del suelo mostró valores en un rango de 7,04-6,00. Los suelos PR presentaron los niveles más bajos de pH. El pH fue más elevado en los suelos MM que en los suelos PR y MR. A su vez, el pH fue mayor en MM respecto a MR.

El contenido de Pe varió entre 43,50-15,31 ppm. El Pe fue superior en los suelos bajo PR. Se observó que los contenidos de Pe registrados en los suelos MR y MM fueron similares.

La CE varió entre 0,73-0,29mhos/cm. En general, la CE fue mayor en los suelos PR respecto a los suelos MM y MR. Además, se registró mayor CE en los suelos MM que en MR. Finalmente, la CHS se presentó en un rango entre 29,78-26,87%. La CHS fue superior en los suelos PR respecto a MM y MR. Asimismo, los suelos MM presentaron igual CHS que los suelos MR.

Parámetros físicos del suelo en sistemas bajo monocultivo de soja, rotación de cultivos y suelo prístino de bosque tropical

Los niveles de estabilidad de agregados del suelo (EA) y densidad aparente (DA) en suelos bajo MR, MM y suelos PR se presentan en la Fig. 3.15.

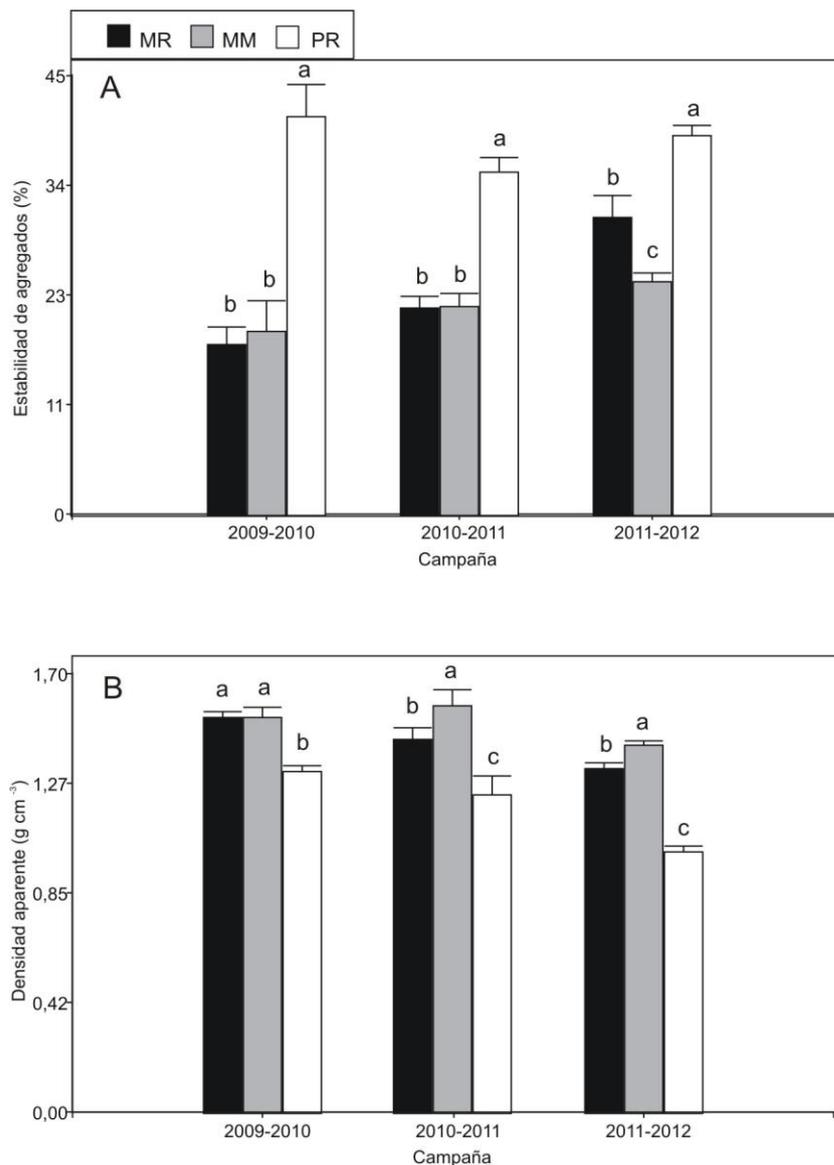


Fig. 3.15. Estabilidad de agregados del suelo (EA) y densidad aparente (DA) en suelos bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR) durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

Los niveles de EA variaron entre 50,00-11,33%. Durante las tres campañas agrícolas, los suelos bajo PR presentaron los mayores niveles de EA. Los valores de EA encontrados entre MM y MR fueron similares, a excepción de lo ocurrido en la última campaña donde se registró un notorio incremento en los suelos MR respecto a MM (Fig. 3.15.A). La DA varió entre 1,76-0,91g cm⁻³. En las tres campañas agrícolas se observó que, la DA de los suelos PR presentaron los valores más bajos. En general, la DA fue mayor en los suelos MM (Fig. 3.15.B).

Correlación entre los parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo.

Tabla 3.2. Análisis de correlaciones parciales ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos de suelos provenientes de distintos sistemas productivos y suelo prístino de bosque tropical. Promedio de las campañas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Parámetros microbiológicos												
	HT	BT	Tr	Glio	Act	Pseud	CBM	GRSP	RM	FDA	DH	FA
CO	0,54*	0,58*	0,64*	0,51*	0,51*	0,55*	0,68*	0,69*	0,80*	0,65*	0,38*	0,57*
Nt	0,62*	0,73*	0,61*	0,59*	0,51*	0,51*	0,67*	0,52*	0,68*	0,59*	0,26	0,51*
Pe	0,46*	0,38*	0,34	0,20	0,32	0,35	0,34	0,32	0,51*	0,21	0,09	0,23
EA	0,54*	0,54*	0,60*	0,52*	0,40*	0,59*	0,72*	0,74*	0,76*	0,63*	0,38*	0,50*
DA	-0,62*	-0,60*	-0,59*	-0,60*	-0,47*	-0,51*	-0,68*	-0,72*	-0,80*	-0,67*	-0,25	-0,68*

* Diferencias significativas según LSD test ($P \leq 0.05$). HT: Hongos totales, BT: Bacterias totales, Tr: *Trichoderma* spp., Glio: *Gliocladium* spp, Act: Actinobacterias, Pseud: Pseudomonas fluorescentes, CBM: Carbono de la biomasa microbiana, GRSP: Proteínas relacionadas a la glomalina, RM: Respiración microbiana, FDA: Actividad FDA, DH: Actividad deshidrogenasa y FA: Actividad fosfatasa, CO: Carbono orgánico, Nt: Nitrógeno total, Pe: Fósforo extractable, EA: Estabilidad de Agregados y DA: Densidad Aparente.

En la Tabla 3.2. se muestra el análisis de correlación efectuado entre los parámetros microbiológicos, químicos y físicos durante las campañas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012. La mayoría de los parámetros microbiológicos correlacionaron de manera estadísticamente significativa y positiva con los contenidos de CO y Nt. En general, se observó que el aumento de los contenidos de CO y Nt del suelo incrementó proporcionalmente los contenidos de HT, BT, biocontroladores, CBM, GRSP y actividades enzimáticas. Sin embargo, la actividad DH no mostró una correlación significativa con Nt y Pe, pero si lo hizo con CO y EA.

El contenido de Pe fue el parámetro que menor correlación presentó con los parámetros microbiológicos. El promedio de las evaluaciones mostró que el contenido de Pe solo correlacionó con HT, BT y RM. Por otro lado, los incrementos de Pe en el suelo no produjeron un aumento significativo en el contenido de GRSP y FA, a excepción de la última campaña donde si se observó una correlación significativa.

Se observó que todos los parámetros microbiológicos correlacionaron significativamente con la EA. En general, los contenidos de HT, BT, Tr, Glio, Act., Pseud., CBM, GRSP, RM, FDA, DH y FA, mostraron una correlación significativa y positiva en relación a los incrementos de la EA del suelo. La actividad DH mostró una correlación significativa pero bajo con la EA.

En general, los HT, BT, Tr, Glio, Act., Pseud., CBM, GRSP, RM, FDA y FA fueron inversamente proporcionales a la DA. Por el contrario, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre la actividad DH en relación a las variaciones de la DA de los suelos.

Atributos microbiológicos, químicos y físicos en respuesta al manejo agrícola: Análisis de componentes principales

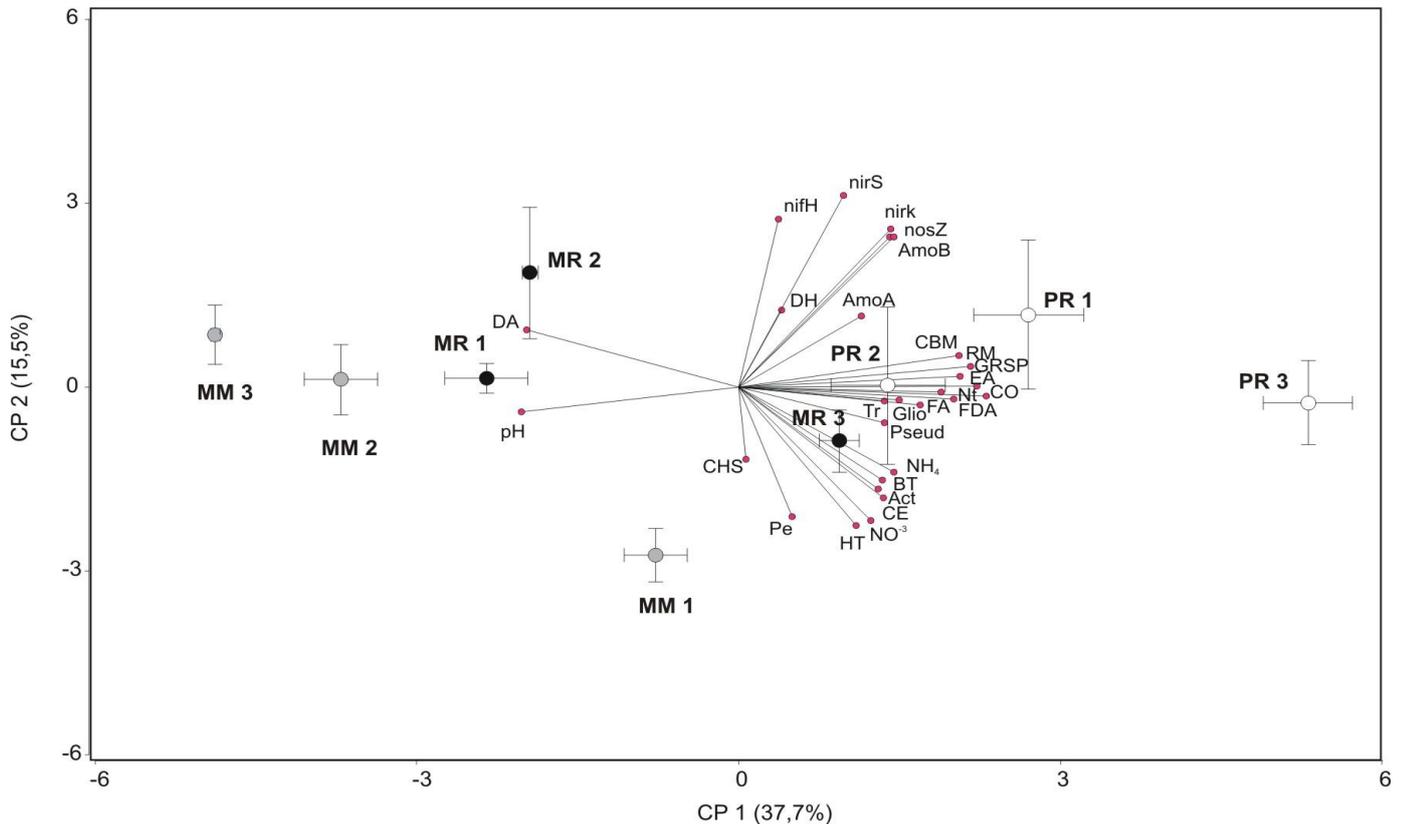


Fig. 3.16. Biplot del ACP para el efecto de sistemas bajo monocultivo de soja (MM), rotación de cultivos (MR) y suelo prístino de bosque tropical (PR) sobre parámetros microbiológicos, físicos y químicos del suelo durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

CP: Componente principal, HT: Hongos totales, BT: Bacterias totales, Tr: *Trichoderma* spp., Glio: *Gliocladium* spp, Act: Actinobacterias, Pseud: *Pseudomonas fluorescens*, CBM: Carbono de la biomasa microbiana, GRSP: Proteínas relacionadas a la glomalina, RM: Respiración microbiana, FDA: Actividad FDA, DH: Actividad deshidrogenasa, FA: Actividad fosfatasa, genes funcionales del ciclo del nitrógeno: *nifH*, *amoA*, *amoB*, *nirS*, *nirK*, *nosZ*, CO: Carbono orgánico, Nt: Nitrógeno total, NO₃: Nitrato, NH₄: Amonio, pH: pH, Pe: Fósforo extractable, CE: Conductividad Eléctrica, CHS: Capacidad Hídrica de saturación, EA: Estabilidad de Agregados y DA: Densidad Aparente.

El ACP de las variables microbiológicas, químicas y físicas separó la mayoría de los suelos bajo manejo agrícola de los suelos PR (Fig. 3.16). CP1 y CP2 explicaron un 53,2% de la variabilidad total. A lo largo del CP1, los sitios agrícolas MM y MR se separaron de los sitios PR y se dispusieron del lado izquierdo del plano.

Dentro de los sitios agrícolas, MM2 y MM3 se agruparon hacia la izquierda de MR1 y MR2, quedando MM1 separado de los tratamientos MM. Dentro del tratamiento PR, el sitio PR3 se separó hacia el lado derecho de los PR2 y PR1. PR2 quedó dispuesto cercano al centro del plano. A lo largo del eje 2, se observó que MM1 se separó del resto de los sitios agrícolas y PR, mientras que PR3 fue el que más separado estuvo de los sitios MM3 y MM2. A partir del análisis del autovectores obtenido del ACP se observó que las variables que más contribuyeron a las separaciones entre sitios agrícolas de los sitios de suelo prístino fueron: BT, Tr, Pseud, CBM, GRSP, FDA, FA, *amoB*, *nirK*, *nosZ*, CO, Nt, pH, EA, DA. La correlación cofenética observada en el ACP fue de 0,841.

Incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en distintos sistemas productivos

En las Figuras 3.17, 3.18 y 3.19 se destacan las principales enfermedades causadas por hongos patógenos de suelo durante dos campañas consecutivas.

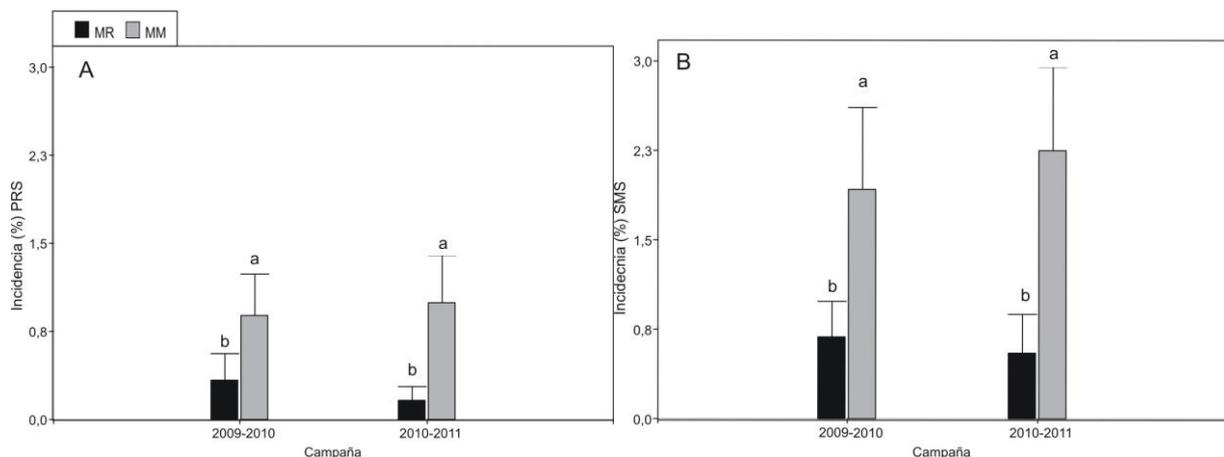


Fig. 3.17. Incidencia de las enfermedades más frecuentes encontradas en el cultivo de soja bajo monocultivo (MM) y rotación de cultivos (MR), durante las campañas agrícolas 2009-2010 y 2010-2011.

A) PRS: Podredumbre radicular de la soja causada por *Rhizoctonia solani* (Khun).

B) SMS: Síndrome de la muerte súbita causada por un complejo de especies de *Fusarium*.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

Las enfermedades más frecuentes encontradas en el cultivo de soja fueron: la podredumbre radicular de soja causada por *Rhizoctonia solani* (Khun) (PRS) y el síndrome de la muerte súbita causada por un complejo de especies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium crassistipitatum* Scandiani, T. Aoki et O'Donnell (especie predominante en la región) (SMS) (Fig. 3.17). Estas enfermedades se presentaron con diferente incidencia en el cultivo de soja (Fig. 3.17. A y B). En la campaña 2009-2010, los valores de incidencia de PRS oscilaron entre 2,00-0,67%, mientras que los de SMS lo hicieron entre 5,33-0,67%. Durante esta campaña la incidencia de PRS y SMS fue significativamente mayor en el cultivo MM que en MR.

En la siguiente campaña (2010-2011) los valores de incidencia de PRS y SMS fueron levemente superiores a los encontrados en la campaña anterior. La PRS y SMS se presentaron en un rango entre 2,67-0,33% y 6,29-0,67%, respectivamente. Al igual que en la campaña 2009-2010, la incidencia de PRS y SMS fue significativamente mayor en MM que en MR.

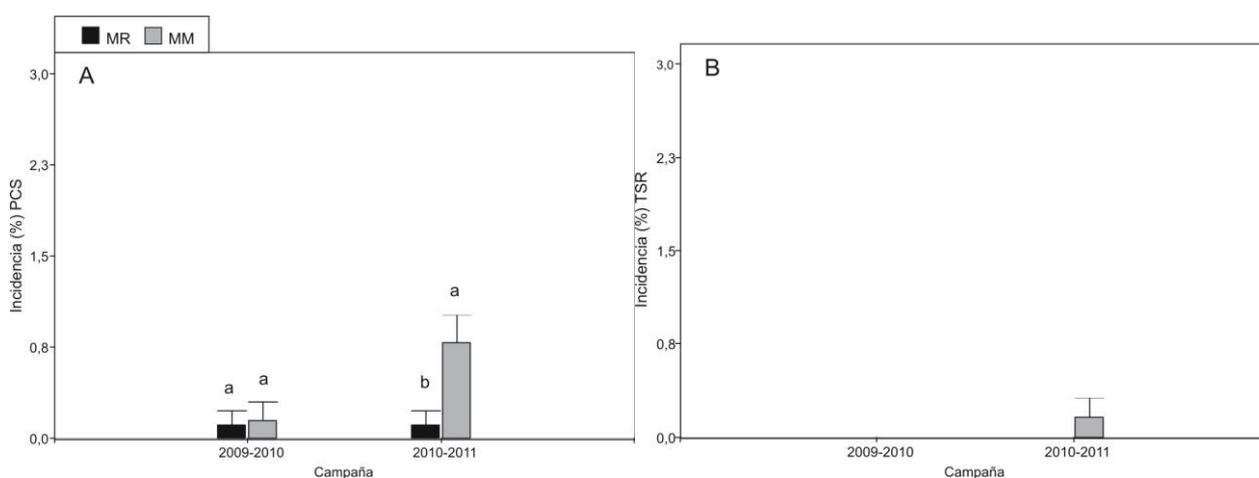


Fig. 3.18. Incidencia de las enfermedades menos frecuentes encontradas en el cultivo de soja bajo monocultivo (MM) y rotación de cultivos (MR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

A) PCS: Podredumbre carbonosa de la soja causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

B) TSR: Tizón por *Sclerotium rolfsii* (Sacc) en soja.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

Las enfermedades menos frecuentes encontradas en el cultivo de soja fueron: el tizón por *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) (TSR) y la podredumbre carbonosa de la soja causada

por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (PCS) (Fig. 3.18). Durante la campaña 2009-2010, la PCS se presentó con bajos valores de incidencia (1,33-0,67%) y no se registró la presencia de TSR (Fig. 3.17.B). En esta campaña, los niveles de incidencia de PCS encontrados en MR fueron similares a los encontrados en MM (Fig. 3.18.A).

En la siguiente campaña (2010-2011), se registró por primera vez la presencia de TSR con valores de incidencia entre 1,43-0,2%, pero solo se la encontró en el tratamiento MM (Fig. 3.18.A). Además, PCS registró rangos de incidencia entre 1,71-0,67% y su incidencia en el cultivo fue significativamente mayor en MM que en MR.

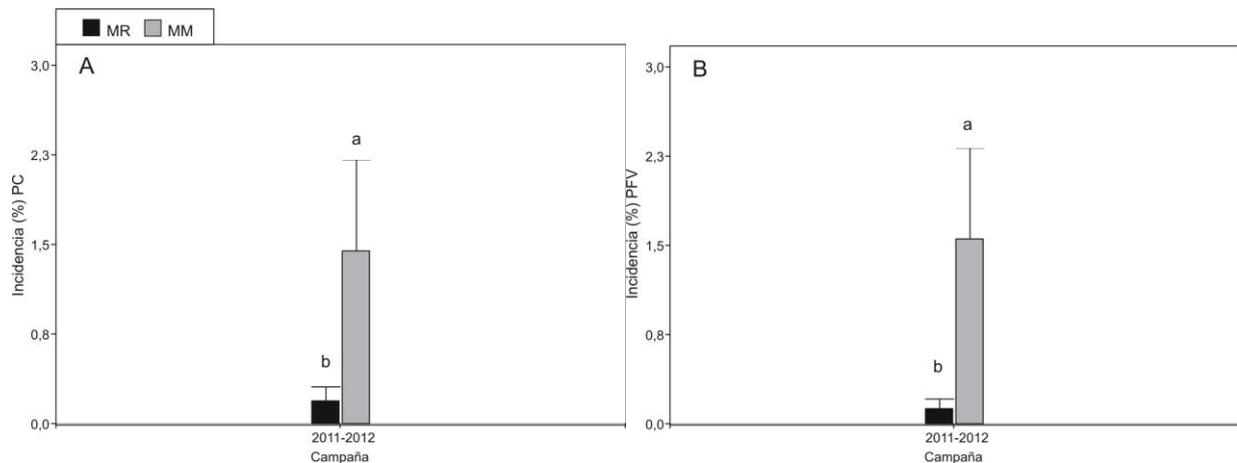


Fig. 3.19. Incidencia de las principales enfermedades encontradas en maíz bajo monocultivo (MM) y rotación de cultivos (MR), durante la campaña 2011-2012.

A) PC: Podredumbre carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

B) PFV: Podredumbre basal causada por un complejo de especies de *Fusarium*.

Barras con diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña.

Finalmente, en la última campaña (sembrada con maíz) se registraron solamente dos enfermedades: la podredumbre carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid) en maíz (PC) y la podredumbre radicular causada por diversas especies de *Fusarium*, entre los que se encuentra *Fusarium verticillioides* (PFS) (Fig. 3.19. A y B). Los niveles de incidencia de PC presentaron un rango entre 6,00-0,18%, mientras que los de PFV oscilaron entre 5,67-0,33%. De igual modo que en las campañas anteriores, el cultivo de maíz en MM presentó significativamente mayor incidencia de ambas enfermedades en comparación con MR.

Productividad del cultivo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos

Tabla 3.3. Rendimiento de soja y maíz (Kg/ha) en sistemas bajo monocultivo de soja (MM) y rotación de cultivos (MR) durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012.

Rendimiento (Kg/ha)	Soja	Maíz
2009-2010		
Monocultivo de soja	3153±50 b	nd
Rotación de cultivos	3630±35 a	7131±30
2010-2011		
Monocultivo de soja	2654±47 b	nd
Rotación de cultivos	3816±38 a	nd
2011-2012		
Monocultivo de soja	nd	6589±25 b
Rotación de cultivos	nd	7920±27 a

Letras diferentes indican diferencias significativas según el test LSD ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en una misma campaña. Nd: No determinado.

En la Tabla 3.3 se muestra el rendimiento (Kg/ha) de los cultivos bajo sistemas de monocultivo de soja (MM) y rotación de cultivos (MR), durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012. Durante las dos primeras campañas agrícolas los rendimientos de soja oscilaron entre 3684-2627Kg/ha y 4048-2129Kg/ha, mientras que los de maíz lo hicieron entre 7131-7000Kg/ha. La última campaña agrícola (2011-2012), sembrada con maíz, presentó rangos de rendimiento entre 8200-7400Kg/ha. En todas las campañas/cultivos evaluados los rendimientos obtenidos MR fueron significativamente superiores a los observados en MM.

Correlación entre los principales parámetros microbiológicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo

Tabla 3.4. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2009-2010.

Parámetros biológicos, químicos y físicos	Podredumbre por <i>Rhizoctonia solani</i> (PRS)	Síndrome de la muerte súbita <i>Fusarium crassistipitatum</i> (SMS)	Podredumbre carbonosa <i>Macrophomina phaseolina</i> (PCS)
Hongos totales (HT)	-0,32	-0,66*	-0,59*
Bacterias totales (BT)	-0,43*	-0,18	0,22
<i>Trichoderma</i> spp. (Tr.)	-0,40*	-0,49*	-0,29
<i>Gliocladium</i> spp. (Glio.)	-0,02	0,38	-0,33*
Actinobacterias (Act.)	-0,27	-0,21	-0,23
<i>Pseudomonas</i> fluorescentes (Pseud)	0,32	0,03	-0,34*
Carbono de la biomasa microbiana (CBM)	-0,54*	-0,61*	-0,42*
Glomalina fácilmente extractable (GRSP)	0,07	0,08	-0,04
Respiración Microbiana (RM)	-0,36*	-0,55*	0,24
Hidrólisis de Diacetato de Fluoresceína (FDA)	-0,34*	-0,42*	-0,27
Actividad Deshidrogenasa (DH)	-0,25	-0,40*	-0,04
Actividad Fosfatasa (FA)	-0,57*	-0,51*	0,28
Carbono Orgánico (CO)	-0,52*	-0,66*	-0,09
Nitrógeno total (Nt)	-0,67*	-0,60*	-0,03
Fósforo extractable (Pe)	-0,60*	-0,72*	0,24

Tabla 3.4. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2009-2010. Continuación.

Parámetros biológicos, químicos y físicos	Podredumbre por <i>Rhizoctonia solani</i> (PRS)	Síndrome de la muerte súbita <i>Fusarium crassistipitatum</i> (SMS)	Podredumbre carbonosa <i>Macrophomina phaseolina</i> (PCS)
Estabilidad de Agregados del suelo (EA)	-0,45*	-0,50*	-0,23
Densidad Aparente (DA)	0,39	0,45*	0,24
Rendimiento (Rend)	-0,56*	-0,67*	-0,36*

* Diferencias significativas según test LSD ($P \leq 0.05$).

Durante la campaña 2009-2010, la PRS correlacionó negativa y significativamente con la mayoría de las variables microbiológicas, químicas y físicas (Tabla 3.4). Sin embargo, de los microorganismos cultivables evaluados, PRS sólo correlacionó negativa y significativamente con *Trichoderma* spp. En general, en cuanto a las actividades microbianas, la PRS se asoció negativamente con RM, FDA y FA. Por su lado, los incrementos de incidencia de PRS estuvieron asociados significativamente a las disminuciones en los contenidos de la mayoría de los parámetros químicos y físicos. Respecto a SMS, la enfermedad correlacionó negativa y significativamente con la mayoría de los parámetros microbiológicos, químicos y físicos. Dentro de los biocontroladores evaluados y al igual que lo ocurrido con la PRS, el SMS solo correlacionó negativamente con *Trichoderma* spp., y no se observó una correlación estadísticamente significativa con los demás agentes de biocontrol. A excepción de lo ocurrido con GRSP, las demás variables químicas y físicas analizadas correlacionaron negativamente con la presencia de SMS. Por último, PCS solo correlacionó negativa y significativamente con HT, Glio, Pseud, CBM y DA.

Tabla 3.5. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2010-2011.

Parámetros biológicos, químicos y físicos	Podredumbre radicular por <i>Rhizoctonia solani</i> (PRS)	Síndrome de la muerte súbita <i>Fusarium crassistipitatum</i> (SMS)	Podredumbre carbonosa <i>Macrophomina phaseolina</i> (PCS)	Podredumbre radicular por <i>Sclerotium rolfsii</i> (PSR)
Hongos totales (HT)	-0,65*	-0,69*	-0,44*	-0,12
Bacterias totales (BT)	-0,80*	-0,81*	-0,49*	-0,33
<i>Trichoderma</i> spp. (Tr)	-0,63*	-0,73*	-0,58*	-0,29
<i>Gliocladium</i> spp. (Glio)	-0,71*	-0,76*	-0,63*	-0,46*
Actinobacterias (Act)	-0,32*	-0,34*	0,10	-0,02
<i>Pseudomonas</i> fluorescentes (Pseud)	-0,15	-0,19	-0,31	0,06
Carbono de la biomasa microbiana (CBM)	-0,39*	-0,46*	-0,40*	-0,12
Glomalina fácilmente extractable (GRSP)	-0,49*	-0,57*	-0,55*	-0,28
Respiración Microbiana (RM)	-0,68*	-0,75*	-0,58*	-0,37*
Hidrólisis de Diacetato de Fluoresceína (FDA)	-0,55*	-0,66*	-0,66*	-0,31
Actividad Deshidrogenasa (DH)	-0,28	-0,20	-0,10	-0,20
Actividad Fosfatasa (FA)	-0,24	-0,37*	-0,37*	-0,08
Carbono Orgánico (CO)	-0,64*	-0,70*	-0,45*	-0,33
Nitrógeno total (Nt)	-0,68*	-0,73*	-0,43*	-0,38*
Fósforo extractable (Pe)	-0,45*	-0,43*	-0,08	-0,26
Estabilidad de Agregados del suelo (EA)	-0,44*	-0,50*	-0,40*	-0,23
Densidad Aparente (DA)	0,75*	0,75*	0,43*	0,36*
Rendimiento (Rend)	-0,71*	-0,50*	-0,43*	-0,21

* Diferencias significativas según test LSD ($P \leq 0,05$).

Durante la campaña 2010-2011 (Tabla 3.5.) las enfermedades encontradas en el cultivo de soja fueron más frecuentes y presentaron mayor incidencia que las observadas en la campaña anterior (Fig. 3.17). En esta campaña y en lo referido a la incidencia de la PRS y el SMS, se observó una correlación negativa y significativa entre la mayoría de las variables microbiológicas, químicas y físicas evaluadas. A excepción de lo ocurrido con Pseud., DH y FA, los incrementos de incidencia de PRS y SMS correlacionaron significativamente con las disminuciones en los contenidos de los parámetros evaluados, incluso con los de agentes de biocontrol. Por su parte, la PCS correlacionó significativa y negativamente con la mayoría de los parámetros microbiológicos, químicos y físicos. Dentro de los biocontroladores, la PCS correlacionó negativamente con *Trichoderma* spp., y *Gliocladium* spp. Por último, el TSR sólo correlacionó con las variables *Gliocladium* spp., RM, Nt y DA, pero no lo hizo con el resto de los parámetros evaluados.

Tabla 3.6. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2011-2012.

Parámetros biológicos, químicos y físicos	Podredumbre radicular por <i>Fusarium verticillioides</i> (PFS)	Podredumbre carbonosa por <i>Macrophomina phaseolina</i> (PC)
Hongos totales (HT)	-0,38*	-0,36*
Bacterias totales (BT)	-0,77*	-0,70*
<i>Trichoderma</i> spp. (Tr)	-0,75*	-0,70*
<i>Gliocladium</i> spp. (Glio)	-0,47*	-0,39*
Actinobacterias (Act)	-0,70*	-0,75*
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pseud)	-0,43*	-0,32
Carbono de la biomasa microbiana (CBM)	-0,59*	-0,56*

Tabla 3.6. Análisis de correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los principales parámetros microbiológicos, químicos y físicos del suelo y las enfermedades causadas por hongos de suelo en sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos del este de la Provincia de Salta durante la campaña 2011-2012. Continuación.

Parámetros biológicos, químicos y físicos	Podredumbre radicular por <i>Fusarium verticillioides</i> (PFS)	Podredumbre carbonosa por <i>Macrophomina phaseolina</i> (PC)
Glomalina fácilmente extractable (GRSP)	-0,35*	-0,30
Respiración Microbiana (RM)	-0,60*	-0,55*
Hidrólisis de Diacetato de Fluoresceína (FDA)	-0,52*	-0,45*
Actividad Deshidrogenasa (DH)	-0,63*	-0,53*
Actividad Fosfatasa (FA)	-0,27	-0,27
Carbono Orgánico (CO)	-0,67*	-0,62*
Nitrógeno total (Nt)	-0,67*	-0,60*
Fósforo extractable (Pe)	-0,47*	-0,44*
Estabilidad de Agregados del suelo (EA)	-0,43*	-0,37*
Densidad Aparente (DA)	0,30	0,29
Rendimiento	-0,53*	-0,59*

* Diferencias significativas según test LSD ($P \leq 0.05$).

Cuando se analizaron las correlaciones obtenidas en la campaña 2011-2012 se observó una marcada correlación negativa y significativa entre las variables analizadas (Tabla 3.6). Las dos enfermedades encontradas en maíz, PC y PFS correlacionaron negativamente y significativamente con casi todos los parámetros biológicos, químicos y físicos, a excepción de FA, DA y GRSP (solo en PC). Asimismo, la PFS se correlacionó negativamente con los incrementos en las poblaciones de todos los biocontroladores, mientras que PC lo hizo con todos a excepción de Pseud.

Atributos microbiológicos, químicos y físicos y su relación con la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo junto al rendimiento en respuesta al manejo agrícola: Análisis de componentes principales

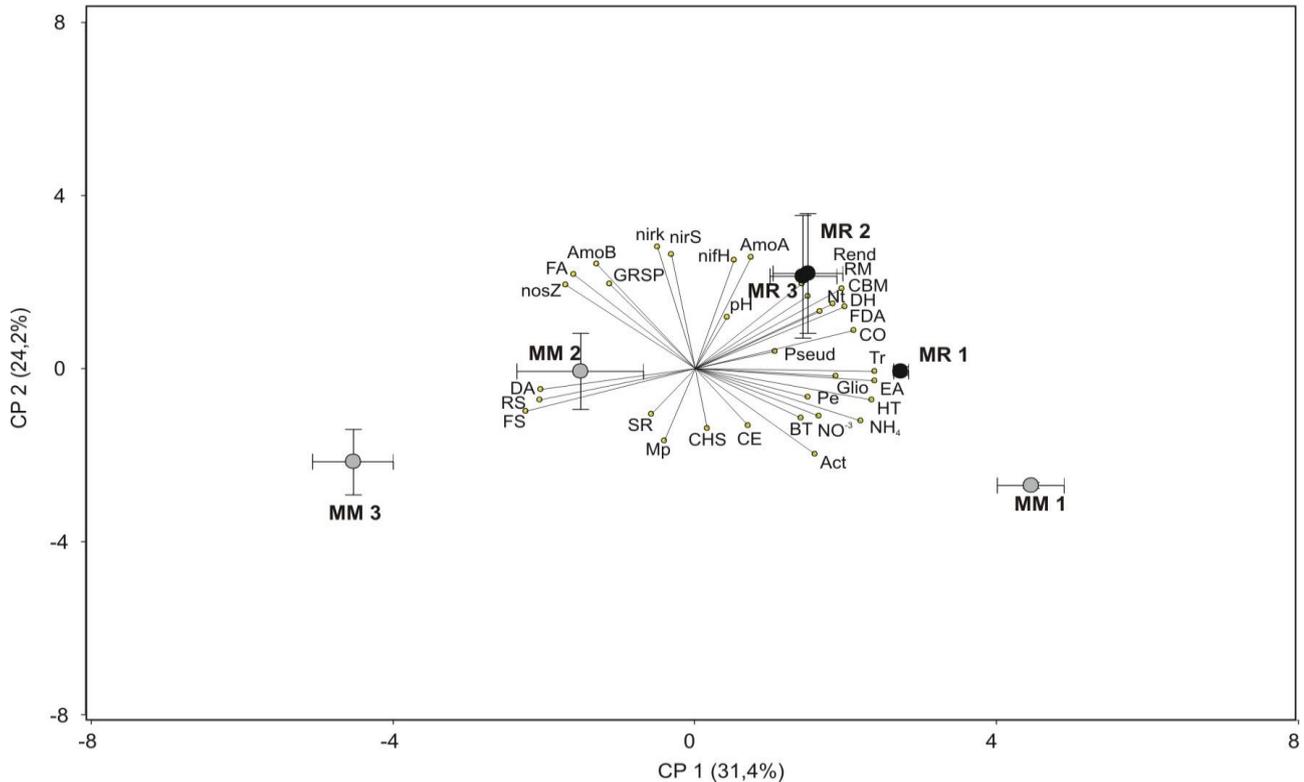


Fig. 3.20. Biplot del ACP para el efecto de sistemas bajo monocultivo de soja y rotación de cultivos sobre parámetros microbiológicos, físicos y químicos del suelo durante las campañas agrícolas 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012, en relación a la presencia de enfermedades causadas por hongos de suelo y el rendimiento del cultivo.

CP: Componente principal, HT: Hongos totales, BT: Bacterias totales, Tr: *Trichoderma* spp., Glio: *Gliocladium* spp, Act: Actinobacterias, Pseud: *Pseudomonas* fluorescentes, CBM: Carbono de la biomasa microbiana, GRSP: Proteínas relacionadas a la glomalina, RM: Respiración microbiana, FDA: Actividad FDA, DH: Actividad deshidrogenasa, FA: Actividad fosfatasa, genes funcionales del ciclo del nitrógeno: *nifH*, *amoA*, *amoB*, *nirS*, *nirK*, *nosZ*, CO: Carbono orgánico, Nt: Nitrógeno total, NO_3^- : Nitrato, NH_4 : Amonio, pH: pH, Pe: Fósforo extractable, CE: Conductividad Eléctrica, CHS: Capacidad Hídrica de saturación, EA: Estabilidad de Agregados y DA: Densidad Aparente, Rend: Rendimiento, PRS (RS): *Rhizoctonia solani*, PCS (Mp): *Macrophomina phaseolina*, PFC (FS): *Fusarium Crisipitatum*, PSR (SR): *Sclerotium Rolfsii*.

Ambos ejes de CPs (CP1 y CP2) explicaron el 55.60% de la variabilidad total. El ACP separó los sitios bajo MM de los sitios bajo MR (Fig. 3.20). A lo largo de CP1 se observó una clara diferenciación entre los sitios MM3 y MM2, respecto al sitio MM1 que

se dispuso del lado opuesto. Asimismo, sobre el lado izquierdo del plano el sitio MM3 se separó del sitio MM2. Los sitios MR1, MR2 y MR3 se agruparon de derecha a izquierda cerca del centro del plano. A lo largo del eje 2 se observó similar tendencia, MM1 se separó claramente de MM3 y MM2, diferenciándose también de MR1, MR2 y MR3. Las variables que más contribuyeron a la separación de los sitios MM3 y MM2 fueron: PRS (RS), PFS (FS) y DA, mientras que las variables que más contribuyeron a la separación de los sitios MR1, MR2, MR3 de MM1 fueron: HT, Tr, Act, RM, CBM, FDA, DH, CO, NH₄, EA y rendimiento de la soja. La correlación cofenética para este análisis fue de 0,945.

DISCUSIÓN

Abundancia de microorganismos cultivables, potenciales biocontroladores, biomasa microbiana, contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) y contenido de fosfolípidos del suelo bajo monocultivo, rotación de cultivos y suelo prístino de bosques tropicales.

Microorganismos cultivables

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio y en base a la generación de conocimiento adquirida en esta tesis, las distintas prácticas de manejo empleadas en la localidad de Las Lajitas, en la región de Anta, al este de la provincia de Salta, modificaron la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo y su relación con los parámetros químicos y físicos edáficos, alterando en consecuencia la sanidad del cultivo de soja.

Una de las principales causas de pérdida de biodiversidad microbiana en los bosques nativos es sin duda el avance de la frontera agropecuaria (SAGPyA, 2012), ya que produce cambios poblacionales en los microorganismos del suelo y en sus funciones (Hungría *et al.*, 2009). Debido a que miles de has. han sido desmontadas para el cultivo de diferentes especies agrícolas, en particular soja, en los últimos diez años, se generaron distintas situaciones de estrés, sometiendo a los microorganismos a modificaciones en sus mecanismos para su supervivencia, crecimiento y multiplicación.

En nuestro estudio, el manejo agrícola influyó negativamente en las densidades poblacionales de HT, BT y potenciales biocontroladores, respecto a los sitios de referencia. En general, los niveles poblacionales de HT, BT, *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp.,

Actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes fueron mayores en los suelos prístinos de bosque tropical (PR) respecto a los sitios agrícolas. Un mayor impacto en las poblaciones microbianas fue registrado en los sitios donde se realizó manejo bajo monocultivo de soja (MM). Por lo general, las poblaciones de BT, *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., Actinobacterias y *Pseudomonas* fluorescentes, bajo MM, presentaron una menor abundancia respecto a las mismas poblaciones microbianas estimadas en PR. Bajo rotación de cultivos (MR), los HT fueron similares en todos los sitios, mientras que los valores poblacionales de BT fueron iguales que PR y mayores que MM. Bajo MR, los potenciales biocontroladores registrados se presentaron en mayores niveles respecto a MM, sin embargo, fueron similares en los suelos prístinos.

La presencia y supervivencia de las poblaciones de hongos y bacterias del suelo se ve afectada por el manejo agrícola (Vargas Gil *et al.*, 2008, Meriles *et al.*, 2009). La elevada rentabilidad de la soja en la provincia de Salta y en el país, hace que el cultivo de esta especie agrícola se realice habitualmente bajo monocultivo. Por este motivo, es de esperar que los suelos sin rotación de cultivos, presenten alteraciones en sus poblaciones microbianas edáficas. En este sentido, existe una copiosa evidencia sobre la participación del monocultivo de soja en la disminución de la diversidad y abundancia de las poblaciones de microorganismos del suelo (Fanin *et al.*, 2011 y Crecchio *et al.*, 2007).

Sin embargo, existen pocos trabajos que establezcan comparaciones sobre la dinámica estructural y funcional de dichas poblaciones bajo distintos manejos agrícolas en el NOA argentino. Algunos autores sostienen que las prácticas de manejo convencionales pueden originar un desbalance inmediato entre los microorganismos del suelo, principalmente entre las poblaciones de hongos totales (Zhang y Chu, 1998). Por el contrario, Wu *et al.* (2013a) sostienen que el efecto del monocultivo sobre las poblaciones edáficas sólo es apreciable a largo plazo. En el presente estudio, los valores poblacionales de HT observados bajo los sistemas agrícolas fueron similares a los suelos PR. Estos resultados sugieren que las poblaciones fúngicas presentan una elevada tolerancia a las situaciones de estrés. Es ampliamente conocido que las estrategias ecológicas de los hongos son más complejas que las de bacterias, lo que permitiría a estas últimas responder más rápidamente a los cambios producidos (Álvarez *et al.*, 1995). Los hongos son

considerados K estrategias en relación a las bacterias (R estrategias), ya que poseen diversas ventajas a la hora de enfrentar los disturbios en su ambiente (Bailey *et al.*, 2002). Los menores requerimientos energéticos que presentan los hongos en relación a las bacterias, además de una mayor eficiencia para transformar los sustratos carbonados en C microbiano, podría favorecer el establecimiento de las comunidades fúngicas en los manejos mejoradores y en ambientes prístinos (Frey, 2007). Los hongos compiten eficazmente por los restos de madera (lignocelulosa) y restos vegetales, presentando una celulólisis más efectiva en relación a las bacterias, por lo que su participación en los primeros estadios de una perturbación, como lo que ocurre en un desmonte, sería más activa.

Por otro lado, Shen *et al.* (2008) y Meriles *et al.* (2009) observaron también que las poblaciones de potenciales biocontroladores presentaron una marcada disminución bajo manejos convencionales, viéndose particularmente afectadas por el incremento en los años de implantación de la soja. Al respecto, Dighton *et al.* (1997) y Vargas Gil *et al.* (2011) observaron una disminución en las poblaciones de *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. y Actinobacterias por efecto de prácticas no conservacionistas y sistemas agrícolas convencionales. Sin embargo, estos autores no incluyeron en sus estudios el efecto de distintos años de implementación del manejo convencional. Varios reportes han señalado que el monocultivo genera alteraciones en el microambiente rizosférico, lo que beneficia el establecimiento de ciertas poblaciones de microorganismos y condiciona el de otras (Bastida *et al.*, 2008; van Elsas, 2000; Elmholt y Labouriau, 2005). En el presente estudio, los residuos de maíz aportados por el cultivo en la rotación tuvieron un efecto benéfico sobre las poblaciones de *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., y *Pseudomonas* fluorescentes. Autores como Meriles *et al.* (2009), Larkin (2003) y Shen *et al.* (2013), afirmaron que los residuos aportados por el cultivo anterior son capaces de alterar las poblaciones de *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. y otros biocontroladores como las Actinobacterias y *Pseudomonas*. El componente biológico de un sistema a través del manejo del CO y N aportado por los distintos sistemas radiculares, principalmente los aportados por los residuos de la planta, se ven influenciados por la calidad de los residuos del cultivo anterior (Galantini y Rosell 2006). En concordancia, Doran *et al.* (2006) indicaron que los residuos de maíz dejados por plantas C4 producen grandes cantidades de C comparados con los de soja, lo que puede haber inducido el aumento principalmente de

las poblaciones de *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., favoreciendo el desarrollo de las poblaciones de HT y BT registradas en los tratamientos MR. Estos resultados resaltan los efectos de la inclusión del maíz en los sistemas de rotación de cultivos y su impacto sobre el establecimiento de microorganismos benéficos.

Carbono de la Biomasa Microbiana

El contenido de Carbono de la biomasa microbiana (CBM) se presentó en rangos similares a lo registrado por diversos autores (Iglesias, 2008). Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto cómo la rotación de cultivos puede favorecer el incremento en los contenidos de CBM. En la mayoría de las campañas evaluadas, el contenido de CBM fue mayor en PR y menor en los sitios bajo MM. Particularmente, el sitio con más años de monocultivo (MM3) presentó los niveles más bajos de CBM. Es ampliamente conocido que la rotación de cultivos favorece el ciclado de nutrientes y mejora las condiciones de microclima rizosférico (Kandeler *et al.*, 1999). En el presente trabajo, la inclusión de leguminosas durante el barbecho junto con el empleo de cultivos con gran aporte de material vegetal al suelo contribuyó al incremento de los stocks de C microbiano. Es probable que el aumento de CBM registrado en los manejos conservacionistas haya lentificado la mineralización del C en comparación con los suelos bajo monocultivo de soja. Similares resultados fueron observados por Nyamadzawo *et al.* (2009) cuando estudiaron el efecto de la rotación de cultivos (barbecho-maíz) y el monocultivo sobre el contenido CBM asociado al C mineralizable y al CO. La disminución de CBM registrada en los sistemas convencionales también podría estar relacionada con los procesos físicos que ocurren en los suelos bajo monocultivo. La compactación del suelo producida por la SD o la maquinaria agrícola propicia un particular ambiente para el crecimiento de las ciertas poblaciones microbianas en detrimento de otras (Salinas-García *et al.*, 2002 y Wight *et al.*, 2005). El CBM en sistemas agrícolas conservacionistas supone un aporte indispensable de carga microbiana a los sistemas y un incremento de los stocks de CO, contribuyendo al aumento del secuestro de C y a una mejora en la calidad biológica del suelo.

Contenido de Proteínas relacionadas a la Glomalina del suelo (GRSP)

En el presente trabajo los niveles de proteínas relacionadas a la glomalina (GRSP) fueron coincidentes con otras investigaciones llevadas a cabo bajo distintos manejos agrícolas (Rillig *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2007 y Haddad *et al.*, 2009). Los niveles más altos de GRSP fueron registrados en suelos PR, mientras que los más bajos fueron observados en MM. En todas las campañas evaluadas, los sitios MR presentaron mayores niveles de GRSP que aquellos bajo MM. Al respecto, Wright *et al.* (2005) reportó un incremento de los niveles de GRSP en suelos bajo manejos mejoradores en comparación con los manejos convencionales. Del mismo modo, otros autores (Preger *et al.*, 2007; Wright y Upadhyaya, 1998) informaron 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 GRSP. Existen indicios (Wright *et al.*, 2007) de que algunos sistemas agrícolas sustentables favorecen la producción de GRSP y en consecuencia contribuyen a la agregación del suelo. Se sabe que el contenido de glomalina representa el 3,2% del C total en sistemas conservacionistas (Lovelock *et al.*, 2004) y más del 5% del CO (Rillig *et al.*, 2002). Por otro lado, se estima que las hifas micorrícicas junto con la glomalina contribuyen con más del 15% al CO total del suelo (Miller y Jastrow 2000). El manejo de nuestros recursos, a través de la diversificación de cultivos, debería permitir el incremento del contenido de GRSP, contribuyendo a la producción y al mantenimiento de las hifas de los hongos micorrícicos. Varios autores reconocen la importancia de la GRSP, especialmente debido a que su contenido no se reduce en el suelo por sus características recalcitrantes (Rillig *et al.*, 2003 y Preger *et al.*, 2007), siendo esto solo aplicable a las cuantificaciones de la GRSP total. La GRSP fácilmente extraíble actúa como un agente de unión transitoria con las partículas elementales del suelo, ya que es una proteína de reciente deposición, lo que permite evidenciar variaciones como resultados de cambios en el ambiente (Rillig *et al.*, 2010 y Rillig, 2004). En el presente trabajo de tesis se evaluó la GRSP fácilmente extraíble, que suele asociarse a variaciones por efecto de las prácticas culturales. Según lo observado en este estudio y sobre la base de los resultados de otros autores (Rillig *et al.*, 2003) se sugiere que, a pesar de que la SD, contribuye a preservar los contenidos de GRSP, se deben reforzar las estrategias que coaccionen para mejorar las condiciones del suelo a través del empleo de tácticas conservacionistas (Haddad *et al.*, 2009; Wright y Upadhyaya, 1996). Finalmente, según los resultados obtenidos en este

trabajo, las cuantificaciones de GRSP podrían constituir indicadores sensibles para medir los impactos de determinadas prácticas de manejo.

Perfiles de fosfolípidos del suelo

El estudio de perfiles de fosfolípidos (PLFA) permitió la identificación de 14 ácidos grasos, comúnmente reportados por otros autores (Rahman *et al.*, 2008). Además, fueron identificados otros ácidos grasos microbianos en concentraciones cercanas al límite de detección. Por esta razón, y con la finalidad de evitar errores en el análisis, estos últimos ácidos grasos no fueron incluidos en el presente análisis.

El presente trabajo reveló un importante impacto de los diferentes manejos agrícolas sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelo. Tanto las bacterias Gram + como Gram -, presentaron una abundancia superior en PR respecto del resto de los tratamientos. Las bacterias Gram + provenientes de los suelos bajo MR mostraron valores de abundancia máxima respecto del resto de los sistemas agrícolas. Estos resultados concuerdan parcialmente con los encontrados por Bossio *et al.* (2005), quien reportó una mayor abundancia de bacterias Gram + en suelos prístinos, en comparación con suelos agrícolas.

De manera similar, aunque menos marcado, los suelos PR y MR presentaron la mayor abundancia de biomasa fúngica total y hongos micorrízico-arbusculares. Estos resultados podrían estar asociados al mayor contenido de MO en los suelos PR y MR respecto a los suelos bajo monocultivo y a la alta sensibilidad de los hongos micorrízicos frente al manejo cultural (Albertsen *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2013). En concordancia, los suelos bajo MR presentaron valores de abundancia microbiana similares a los obtenidos en sistemas agrícolas de monocultivo (Wixon y Balser, 2013). Otros reportes también han señalado el impacto de los manejos no-conservacionistas sobre la estructura genética de las comunidades microbianas del suelo en zonas tropicales y subtropicales (Bossio *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2006; Aboim *et al.*, 2008).

La biomasa microbiana total es un importante parámetro utilizado en test ecológicos, ya que los microorganismos forman una parte vital en la cadena de producción de agroalimentos (Beelem y Doelman, 1997). En el presente trabajo los sistemas bajo MR presentaron una biomasa total similar a la de suelos prístinos. Por otro lado, los suelos provenientes de sitios bajo MM mostraron los niveles más bajos de biomasa microbiana total. Ambos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores (Pankhurst *et al.*, 2003), y podrían estar relacionados con las diferencias en el aporte de C lábil y otros nutrientes provistos por el rastrojo y los residuos específicos de cada cultivo (Montecchia *et al.*, 2011). Además, se encontró una buena correlación entre el contenido de biomasa microbiana cuantificada por la técnica de fumigación-incubación y los contenidos microbianos estimados por análisis de perfiles de PLFA. Dichas correlaciones han sido reportadas previamente por otros autores (Brito *et al.*, 2013 y Meriles *et al.*, 2009).

Funciones microbianas: Respiración, hidrólisis de diacetato de fluoresceína, actividad deshidrogenasa, fosfatasa ácida y genes relacionados al ciclo del Nitrógeno en sistemas bajo monocultivo, rotación de cultivos y suelos prístinos de bosque tropical.

Enzimas microbianas

La respiración microbiana del suelo (RM), actividad hidrolizante del diacetato de fluoresceína (FDA), actividad deshidrogenasa (DH) y actividad fosfatasa ácida (FA) se vieron significativamente afectadas por los distintos manejos agrícolas. En las tres campañas evaluadas se registró una mayor actividad de RM, FDA y FA en suelos PR respecto a los demás tratamientos, mientras que RM y FDA fueron mayores en MR respecto a MM. La actividad FA se presentó con similares valores entre MR y MM.

Se sabe que en los suelos prístinos de bosque tropical, como los evaluados en este trabajo, las tasas de actividad enzimática total, son significativamente más altas que en los suelos bajo monocultivo de soja, por el aporte constante de residuos de distintos orígenes.

De hecho, estudios realizados por Brackin *et al.* (2013) mostraron que inicialmente un suelo agrícola presenta un 50% menos actividad enzimática que un suelo de bosque tropical, por lo que la actividad FDA ha sido sugerida como un posible indicador para medir la actividad microbiana general, debido a que las enzimas lipasas, proteasas y esterases presentan alta ubicuidad en los suelos y están involucradas en la hidrólisis de FDA (Gillian y Duncan, 2001 y Green *et al.*, 2006). En los bosques tropicales, estas enzimas descomponen los biopolímeros complejos presentes en el suelo, por lo que su actividad en este tipo de sistemas es mayor. Esto demuestra porqué la actividad FDA fue mayor en el tratamiento PR, lo que sugiere además, que una mayor producción de enzimas extracelulares, no constituye un factor limitante en este tipo de suelos. Del mismo modo, sabemos que el pH ácido característico de los suelos prístinos de bosque tropical favorecen el establecimiento de microorganismos solubilizadores de P, dado el mayor aporte de residuos de distinto tipo en los sitios sin disturbar, lo que potenciaría el incremento de FA en los tratamientos PR, como lo ocurrido en el presente trabajo. Similares resultados fueron observados por Singh *et al.* (2012) y Tang *et al.* (2011) sobre la dinámica de ciertas actividades y enzimas microbianas, como RM, FDA y FA, en suelos considerados de bosque tropical y suelos degradados por el manejo antrópico. Ellos mostraron que estas actividades se presentaron en mayores niveles en los suelos prístinos en relación a los suelos bajo uso agrícola.

Por otro lado, de acuerdo a Wardle (2002), las propiedades microbiológicas del suelo pueden ser fluctuantes según distintos niveles de perturbación. Sin embargo, la extrema perturbación, como ocurre bajo la presión de selección impuesta por el monocultivo a largo plazo, pueden reducir la actividad y crecimiento microbiano del suelo y llevar a la predominancia de un menor número de especies y, por lo tanto, provocar la reducción de la diversidad y la funcionabilidad de las enzimas intervinientes en los ciclos biogeoquímicos (Wardle, 2002), como lo observado en la mayoría de los parámetros funcionales evaluados en este trabajo. Además sustenta la idea que, la deforestación de los bosques nativos y la degradación del suelo debido a la producción continua de cultivos, son algunos de los cambios más importantes y significativos inducidos por el hombre (Doran *et al.*, 1996).

Los manejos MM presentaron bajos niveles de RM, FDA y FA, ocurriendo lo contrario en MR. Esto se encuentra en concordancia con lo expresado por autores como Fanin *et al.* (2011) y Crecchio *et al.* (2007) que mostraron como el efecto a largo plazo de ciertos monocultivos y su relación con el manejo conservacionista y suelos prístinos de bosque tropical, afectaron significativamente las actividades enzimáticas en los suelos evaluados.

Se sugiere, a partir de la evidencia aportada por los datos de esta tesis, que ante un evento de perturbación, las funciones microbianas se ven afectadas en primera instancia, en comparación a lo que ocurre con la estructura de la comunidad microbiana. Debido a que el crecimiento de los microorganismos está limitado por las fuentes lábiles de P y C en el suelo, las cuales les proporcionan un rápido acceso a la energía, los menores contenidos enzimáticos se observaron en los manejos convencionales de largo plazo en relación a los manejos conservacionistas (Singh *et al.*, 2012, Acosta-Martínez *et al.*, 2008 y Franchini *et al.*, 2007). Sin embargo, existen reportes que afirman que las primeras diferencias funcionales se atribuyen principalmente a las labranzas más que a los años de cultivo de algunas especies de interés agrícola (Hungria *et al.*, 2009 y Souza *et al.*, 2013). Este hecho también fue observado por numerosos autores (Brackin *et al.*, 2013; Vargas Gil *et al.*, 2009, Meriles *et al.*, 2009 y Yuan y Yue, 2012), que sostienen que la agricultura de larga data reduce considerablemente las actividades enzimáticas de los suelos bajo uso agrícola. Esto indicaría además, que en los suelos bajo manejo en monocultivo, la incorporación de MO en forma de humus, es relativamente baja comparada con los suelos bajo manejo conservacionista y más aún con los suelos prístinos del bosque tropical. En estos últimos se incrementa la disponibilidad de fuentes carbonadas, (además de otras fuentes nutricionales), lo que determina un incremento de las actividades enzimáticas, ocurriendo lo contrario en suelos bajo monocultivo de soja. Además, la adición de C exógeno en los suelos en rotación estimula la oxidación biológica y con ellos los niveles de RM y la actividad enzimática en su conjunto. Se sugiere que el efecto de los manejos MR fue marcado en las funciones microbianas, lo que favoreció su incremento, esto fue detectado en los sitios con distintos años de manejo bajo monocultivo de soja de este estudio. De hecho, al constituir una herramienta de manejo sustentable, la implementación de la rotación, supone una mejora también en las condiciones funcionales de los suelos evaluados, lo que indicaría que los efectos benéficos pueden darse a corto plazo, situación

que también fue reportada por diversos autores (Hungría y Vargas, 2000, Franchini *et al.*, 2007).

Actividad Deshidrogenasa

Respecto a lo ocurrido con la actividad deshidrogenasa (DH), se observó una respuesta diferente a la registrada con las demás enzimas evaluadas en este trabajo. En general, la actividad DH se presentó en similares niveles en los suelos PR y en MR. Del mismo modo y en general, los sitios bajo MM presentaron menor actividad DH que los sitios MR, por lo que la rotación de cultivos favoreció el incremento de la actividad DH. La enzima DH es una enzima intracelular que se encuentra activa en las células vivas y constituye un indicador importante de la actividad microbiana del suelo (Tabatabai, y Bremner 1969 y Trasar-Cepeda *et al.*, 2008). En consecuencia también constituye un indicador del sistema redox microbiano, por lo que se la suele considerar como un buen exponente de las actividades oxidativas del suelo y un indicador general de la actividad microbiana del mismo (Bach *et al.*, 2013; Nannipieri *et al.*, 2003). Se ha demostrado que, la incorporación continua de residuos frescos al suelo, aumenta la actividad DH del suelo, lo que podría explicar porque esta enzima se presentó en mayor nivel en los suelos MR en relación a los suelos MM. De hecho, varios autores informaron que la DH es mucho mayor en sistemas bajo rotación de cultivos que bajo monocultivo (Velmourougane *et al.*, 2013, y Zhang *et al.*, 2010). Postulamos que el mayor contenido de CO que vuelve al suelo estimula la DH, por ello se observó significativamente mayor actividad DH, en los manejos MR, que en los MM. Sin embargo, esta situación no explica que en los suelos PR, la DH encontrada fuera igual y en una campaña menor, que la encontrada en los sitios bajo MR. Una explicación a esta situación es que la actividad DH tiene un papel fundamental en las etapas iniciales de descomposición de la MO (Ross, 1971) y debido a que la MO en los suelos prístinos de bosque tropical se encuentra más estabilizada, las entradas del material vegetal lignificado son difíciles de digerir siendo más importantes que lo que ocurre en suelos bajo rotación de cultivos. También es probable que en PR, la MO al encontrarse estabilizada, sufra otros procesos diferentes a la oxidación primaria, en comparación a lo que sucede con los residuos de cosecha en los tratamientos conservacionistas. Aparentemente, la presencia de árboles y arbustos de los bosques tropicales, por sus características, condicionan el desarrollo de ciertos parámetros del suelo desde un punto de

vista microbiológico, además de generar un ambiente edáfico más ácido. Al ser la enzima DH una enzima intracelular y susceptible a las bajas de pH (Ross, 1971), es posible que en PR, esta actividad esté determinada por otros grupos microbianos diferentes a los encontrados en los tratamientos MM y MR, lo que en definitiva determinaría el comportamiento observado. Además de esto, se deben considerar, otros factores del lugar (la composición de especies, el tipo de canopia, la textura del suelo y la disponibilidad de nutrientes) y los datos climáticos estacionales, que en definitiva, para algunos autores, son las grandes determinantes de las variaciones de la DH, más aún que las prácticas de manejo antrópico (Quilchano *et al.*, 2002 y Badiane *et al.*, 2001).

Los resultados de este trabajo coinciden con los encontrados por Rutigliano *et al.* (2004), que muestra que la presencia de abundante cobertura vegetal influye en el desarrollo microbiano y su actividad DH. Sin embargo, otros estudios son necesarios para corroborar estos resultados.

Genes funcionales del ciclo del Nitrógeno

Debido a la ausencia de fertilización en los sistemas agrícolas de Las Lajitas, el estudio de la dinámica de las transformaciones biológicas del N en el NOA argentino resulta de gran interés. Nuestros resultados revelaron que el número de copias de genes funcionales relacionados al ciclo del N variaron diferencialmente de acuerdo al manejo agrícola empleado. En general, los suelos PR mostraron una alta proporción de los genes funcionales *nifH*, *amoA*, *amoB*, *nirS* y *nirK*. En ocasiones, dichos genes se presentaron en igual proporción en los suelos PR y MR. A excepción de *amoB*, el manejo MR siempre presentó mayor números de copias de dichos genes. Una particular respuesta se observó en el gen *nosZ*. Si bien el gen *nosZ* se presentó en mayor proporción en los suelos PR, el MM también mostró mayores niveles que MR.

En el presente estudio, la fijación biológica de N evaluada a través de la cuantificación de los genes *nifH* se vió favorecida por el manejo conservacionista. El elevado número de copias de este gen encontrado en los sitios bajo MR supone una situación mejoradora, originada en los sistemas de rotación de cultivos. Al respecto,

autores como Zehr *et al.* (2003); Coelho *et al.* (2009) y Zou *et al.* (2011) cuantificaron el número de copias del gen *nifH* en suelos con distintos gradientes de perturbación, como bosques naturales, suelo bajo monocultivo de soja y suelo bajo manejo conservacionista. Los autores mostraron que las situaciones intermedias de perturbación presentaron un incremento significativo en el número copias del gen *nifH*, a diferencia de lo ocurrido para los otros tratamientos. Además, nuestros resultados también coinciden con los trabajos realizados por Prosser *et al.* (2012), quien afirmó que la mayor diversidad de microorganismos del suelo (fijadores de N, incluidos), pueden mantenerse aún en los niveles intermedios de perturbación. Bajo esta situación, las actividades antrópicas que permitan la aireación y oxigenación en el suelo, podrían estimular las poblaciones de microorganismos, protegiendo la biodiversidad y la estabilidad de los ecosistemas y aumentando la tasa de fijación biológica de N (Silgram y Shepherd, 1999; Jackson *et al.*, 2003). En concordancia, nuestro estudio reveló un mayor número de copias gen *nifH* en los sitios bajo manejo MR en relación a los sitios prístinos de referencia. La escasez relativa de algunos genes funcionales del ciclo del N en PR, indica tasas relativamente bajas de mineralización neta. Esta afirmación se encuentra en analogía con la observación de que los suelos prístinos tienden a tener tasas brutas relativamente altas de mineralización de N, mientras que las tasas netas son mayores en los suelos agrícolas adyacentes (Ward *et al.*, 2005).

En relación a lo ocurrido con los genes *nifH*, se sabe que el tamaño de las poblaciones de bacterias AOB (especialmente las del dominio archaea (*amoA*)), generalmente son más altas bajo situaciones de perturbación intermedio, como las asociadas a los manejos conservacionistas, en relación a situaciones no perturbadas (Martir-Torres *et al.*, 2013; Cavagnaro *et al.*, 2008). Bajo este contexto, a pesar de que los sitios PR presentan consistentemente más MO del suelo en comparación con MM y MR, se observó en general, igual abundancia de genes *amoA* respecto a los sitios MR. Los genes AOB se encuentran en la mayoría de los ambientes aeróbicos donde el amonio está disponible a través de la mineralización de la MO o mediante entradas de fuentes de N antropogénicas externas, como fertilizantes y residuos, además de la fijación biológica de N (Kowalchuk *et al.*, 2000). Por otro lado, se sabe que las archaeas *amoA* constituyen el principal y predominante grupo de bacterias oxidantes del amonio en distintos ambientes. La detección de secuencias *amoA* en condiciones extremas soporta la idea de la ubiquidad

de este tipo de bacterias (Jung *et al.*, 2011), por lo que su presencia en los tratamientos bajo rotación de cultivos no es inusual. De hecho, varios autores (Limpiyakorn *et al.*, 2011; Leininger *et al.*, 2006 y Schleper *et al.*, 2010) mostraron que las archaeas *amoA* son más abundantes que las bacterias *amoB* en distintos ambientes naturales. El bosque tropical y los tratamientos conservacionistas que presentan en general pH más bajo, se ven favorecidos por el incremento de las archaeas *amoA*. Se ha demostrado que las archaeas *amoA* son más estables y no responden tan sensitivamente a las diferencias ambientales como su contraparte bacterias *amoB*, como lo revela este estudio. Además, se lo considera el grupo más contribuyente a la oxidación biológica del N orgánico. De hecho, ciertas investigaciones muestran que las archaeas oxidantes del amonio no se ven afectadas por el contenido de amonio en el suelo, mientras que el pH del suelo pareciera ser el factor más importante que determina la abundancia de las bacterias AOB (parámetro que no se vió modificado en los tratamientos de esta tesis).

Los genes *nirS* y *nirK* se presentaron en mayor proporción en los suelos PR, aunque en ocasiones MR mostró similares niveles de estos genes que los encontrados en suelos PR. Estos genes intervienen en las primeras etapas de denitrificación, a través de la reducción del nitrito a óxido nítrico, por lo que se sugiere que en MR, esta etapa del ciclo del N se encuentra en normal funcionamiento. Sin embargo, no se observó esta situación en *nosZ*, donde se presentó en mayor proporción en los MM que en MR, lo que sugiere caminos incompletos en las etapas de denitrificación del ciclo del N, y apoya los resultados obtenidos por otros autores (Jung *et al.*, 2011 y Shen *et al.*, 2013). Esta situación se puede atribuir a mayores emisiones de óxido nitroso en suelos bajo MM. Se sabe que el óxido nitroso es un gas con efecto invernadero que contribuye al calentamiento global y al cambio climático. Se lo considera más perjudicial que el CO₂ y el metano (Zumft y Heinz, 2007) por lo que su detección temprana es de importancia en los sistemas agrícolas convencionales. Debido a que el suelo bajo MM en este trabajo, presentó mayor número de copias de *nosZ*, se pone en evidencia el gran impacto que tuvieron los monocultivos en las distintas etapas del ciclo del N, sobre todo en las etapas finales de denitrificación que llevarían a una mayor producción de óxido nitroso. Esto supone una importante alteración del normal funcionamiento del ciclo del N en un ecosistema, en especial de uso agrícola. De esta manera, a partir de estos descubrimientos se podrá difundir la importancia de la pérdida de diversidad biológica con el consecuente aumento de las emisiones de gases

invernaderos, y contribuir a su mitigación. Como se indica en este trabajo, los sitios bajo manejo MR se vieron beneficiados a partir de las menores pérdidas de N por denitrificación y por el incremento de la fijación biológica de N.

Por lo expuesto, podemos resumir que los parámetros asociados a las funciones microbianas son más sensibles que los demás parámetros evaluados para monitorear los cambios en el uso del suelo por efecto de las prácticas de manejo, lo que demuestra su utilidad como indicadores de la calidad del suelo en las regiones subtropicales (Hungria *et al.*, 2009 y Souza *et al.*, 2013; Vargas Gil *et al.*, 2009 y Meriles *et al.*, 2009).

Parámetros químicos y físicos del suelo en soja en sistemas bajo monocultivo y rotación de cultivos.

Parámetros Químicos

En este estudio, los parámetros químicos del suelo variaron en función del manejo empleado. En general, los parámetros químicos como CO, Nt, Nitrato (NO^{-3}) y Amonio (NH_4), Fósforo extractable (Pe), Conductividad eléctrica (CE) y Capacidad hídrica de saturación (CHS), fueron afectados negativamente por el manejo agrícola en relación a las situaciones prístinas de referencia. En general, tampoco se observaron diferencias entre manejos de suelo, por lo que se puede inferir que estos parámetros no permitieron evidenciar los efectos a largo plazo de la rotación de cultivos vs el monocultivo. Sin embargo, durante la última campaña, el CO aumentó considerablemente en MR respecto a MM, mostrando que en algunos sitios bajo MR el efecto de la rotación de cultivos fue efectivo y permitió mejorar las condiciones del suelo.

Según la clasificación agronómica realizada por Corvalán *et al.* (2000) los suelos de este estudio presentan una buena aptitud agrícola, donde los parámetros de fertilidad evaluados en este trabajo (CO, Nt y Pe) permitieron clasificar a los suelos de Buenos a Regulares. Los contenidos de CO, Nt y Pe fueron menores en los manejos agrícolas en relación a los suelos prístinos, lo que demuestra el efecto negativo que tienen algunas

prácticas antrópicas sobre los parámetros químicos del suelo. Existe abundante información sobre los efectos que producen las prácticas agronómicas en los parámetros químicos de fertilidad del suelo (Micucci y Taboada, 2006; Buschiazzo *et al.*, 2001). Números estudios realizados en Argentina muestran cómo el CO, Nt se ven afectados por las prácticas convencionales debido al bajo aporte de material vegetal y la ausencia de rotaciones de cultivos adecuadas (Buschiazzo *et al.*, 1997). Esta situación en Las Lajitas no es ajena, y las pérdidas de MO por efecto del manejo son subestimadas. En este contexto, la implementación de la SD y el no-laborear el suelo, podría aumentar los contenidos de CO y parámetros asociados. Con este simple manejo del suelo se podría mejorar las condiciones estructurales y su entorno químico y físico, además de promover un mejor desarrollo radicular. La situación actual en Las Lajitas no ayuda a establecer conductas sustentables por parte de los productores. Existen varios reportes que muestran el efecto que produce a largo plazo el monocultivo de soja de hasta 20 años de implantación, llegando a la conclusión que la soja continua produce una reducción del 19% en el CO y Nt del suelo, en comparación con lo ocurrido en las rotaciones con sorgo-trigo-soja, con mayores aportes de material vegetal al suelo (Dou *et al.*, 2013). Otros estudios (Chen *et al.*, 2009) mostraron que la soja en monocultivo produce una mayor extracción de los nutrientes del suelo, además de un bajo aporte de residuos, repercutiendo en disminuciones de los contenidos de CO y Nt del suelo. En Argentina, el monocultivo de soja reduce entre un 20 y 30% el CO en el suelo, lo que impacta a largo plazo en el rendimiento de los cultivos (Sa Pereira *et al.*, 2012). Algunos reportes sostienen que los manejos convencionales en monocultivo, aún bajo SD, generan una importante pérdida de la calidad del suelo y reducen la productividad debido a la pérdida de nutrientes. En el presente trabajo, las reducciones de CO estuvieron en promedio ubicadas en rangos similares respecto a los contenidos observados en los suelos prístinos. Estudios realizados por Kelley *et al.* (2003) mostraron el efecto benéfico de los manejos conservacionistas sobre algunos parámetros químicos del suelo. Dicho estudio concluyó que la rotación de cultivos incrementa un 25% los contenidos de CO y Nt en las capas superficiales del suelo comparados con los manejos convencionales. En el presente estudio observamos un incremento significativo de la MO del suelo en la última evaluación, cuando la soja fue precedida por maíz en la rotación, comparada con el monocultivo. Los resultados de este trabajo se encuentran en concordancia con lo reportado por Chen *et al.* (2009), quién informó que los residuos de maíz duplicaron el contenido de CO, Nt del suelo y otros

atributos químicos del suelo, en comparación con el monocultivo de soja. Dicho efecto resultó en un aumento del contenido de MO del suelo en presencia de residuos de maíz. El CO está compuesto por residuos de cosechas, restos microbianos y microfauna. Las ganancias netas o pérdidas de CO del suelo dependen de las velocidades relativas de los aportes externos de CO al sistema, como la biomasa vegetal que se pierde a través de la eliminación de residuos debida a los sistemas de labranza o a la escasez de residuos que dejan algunos cultivos en la rotación (Spargo *et al.*, 2008 y Kelley *et al.*, 2003). Las pérdidas de MO, debido al mal uso de la tierra, son difíciles de detectar ya que se producen muy lentamente en años, como se evidenció en los sitios bajo manejo agrícola en el presente trabajo. Aún así, la implementación de sistemas conservacionistas serán siempre las mejores alternativas.

Por su parte y en general, los contenidos de NO_3^- y NH_4 se presentaron en niveles similares en suelos bajo MM y MR. Es ampliamente conocido que las tasas de nitrificación son significativamente más altas en los manejos conservacionistas que en los suelos bajo monocultivo. Sin embargo, en este estudio, no pudimos detectar diferencias entre ambos manejos. Aún así, el sitio con más años de monocultivo (MM3) presentó los menores valores de ambos parámetros. Es muy probable que al haberse producido una disminución en el contenido de CO, en los suelos bajo MM los procesos de descomposición de la MO no se lleven a cabo normalmente, de manera que habrá menos sustrato disponible para los microorganismos que intervienen en la mineralización (incluido la del Nt del suelo y con ello menores valores de NO_3^- y NH_4). Por otro lado, se estima que en los suelos de bosques tropicales, el aporte constante de hojarasca y residuos forestales haya contribuido a que las bacterias nitrificadoras colaboren en los incrementos de NO_3^- y NH_4 .

Durante las dos primeras campañas, el contenido de Pe fue similar en los suelos prístinos y entre los manejos agrícolas. Hacia la tercera campaña se observaron diferencias entre los sitios PR, MM y MR. Es de esperar que, en las primeras etapas de implementación de manejos agrícolas (cuando se produce el desmonte y la quema de árboles) resulten alterados el equilibrio de las poblaciones microbianas y los ciclos biogeoquímicos. Esta situación pudo observarse en el sitio MM1. Si bien se espera una pérdida masiva de nutrientes durante la limpieza y quema de los árboles, inmediatamente después del desmonte, se produce una mayor disponibilidad inmediata y pasajera de

nutrientes en el suelo, incluido el Pe. Después del desmonte, el CO del suelo se volatiliza en la forma de CO₂. Sin embargo, el Pe sufre otras alteraciones más complejas (Tiessen *et al.*, 1992). Durante la quema de bosques, una fracción del Pe preexistente en la vegetación se pierde en forma de partículas liberadas a la atmósfera y se deposita más allá de la quema, contribuyendo a la fertilidad de los sitios vecinos. El resto del Pe se deposita en forma carbonizada en la parte superior del suelo, junto con el material orgánico parcialmente quemado. Numerosos estudios han mostrado un aumento de P después de la quema y posterior implementación del cultivo. Así lo demuestran los valores observados de Pe en el presente estudio, aunque este efecto sea contrarrestado con el tiempo, llegando a un equilibrio, pero sin superar los valores originales (Janssen *et al.*, 1990).

Los valores de CE en PR, fueron los más elevados, mientras que MM presentó mayores niveles de este parámetro respecto a MR. En general, la CHS mostró similares estimaciones en PR, MM y MR, lo que indicaría la ausencia de cambios en el contenido hídrico del suelo por efecto de las prácticas agrícolas durante el período ensayado.

El pH fue más ácido en el suelo prístino respecto a los sitios bajo manejo agrícola. Las hojarascas, resinas y corteza de los árboles y arbustos que componen la vegetación natural de los bosques prístinos, fueron probablemente los responsables de la acidificación registrada en los suelos de PR y del posterior incremento de la CE en el suelo. Mtambanengwe *et al.*, (2006), sostienen que los suelos ácidos implican una baja en la calidad del suelo, excepto en el óptimo rango de pH 6 a 7, como lo ocurrido en el presente trabajo. Algunos autores sugieren que las pérdidas de MO por efecto de las prácticas convencionales, pueden incrementar la retención de cationes, alterando el efecto tampón del pH, la infiltración del agua en el perfil del suelo, y disminuyendo la CE y la CHS (Fares y Polyakov, 2006). Sin embargo, estos efectos no pudieron ser constatados en los manejos conservacionistas del presente estudio.

Parámetros físicos

En este estudio los parámetros físicos del suelo variaron en función del manejo empleado. Los mayores valores de estabilidad de agregados del suelo (EA), fue encontrada en los sitios PR. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre MM y MR, salvo en la última campaña, donde MR superó ampliamente a MM. Por su parte, la densidad aparente (DA) fue mayor en suelos bajo MM respecto a MR y fue menor en suelos PR. Se estima que esta situación podría llevar a una continua disminución de los agregados del suelo y a un aumento de la DA debido a la compactación del suelo sufrida por los años de manejo convencional en monocultivo. En este sentido, Alekseeva *et al.* (2009) reportaron disminuciones en EA por efecto de los manejos convencionales en relación a situaciones prístinas. Estos autores concluyeron que valores altos de EA indican que el suelo mantiene mejor estructura y aireación, una mayor infiltración y una menor escorrentía. En la estructura del suelo se sostienen muchas de las funciones más importantes del ambiente edáfico, por lo que el mantenimiento de niveles aceptables de EA por efecto de buenas prácticas agrícolas representa un desafío importante a considerar. A su vez, en nuestro estudio, la EA correlacionó positivamente con los contenidos de CO y Nt, por lo que su incremento por efecto de los manejos conservacionistas fue sumamente beneficioso y se vio plasmado en las posteriores evaluaciones. Numerosos estudios fundamentan los beneficios de los manejos conservacionistas en la mejora de la EA del suelo. Hernández-Hernández y López (2002), observó una disminución drástica en los macroagregados estables al agua en los suelos cultivados en comparación con los suelos prístinos de bosques tropicales. Según estos autores, la disminución fue más acentuada en el caso de los suelos bajo manejo convencional respecto al bosque nativo principalmente durante la estación lluviosa por efecto de la compactación del suelo. Además, estos autores observaron que los suelos de bosques prístinos y los que estaban bajo rotación tenían mayor estabilidad de agregados, debido a las mejoras en su condición física.

Los parámetros químicos y físicos del suelo evaluados en el presente trabajo permitieron discriminar los efectos de los manejos agrícolas respecto a las situaciones prístinas, pero no siempre fueron capaces de diferenciar los efectos producidos entre manejos. Sin embargo, su evaluación y monitoreo es una de las formas más adecuadas de

evaluación de la fertilidad edáfica. La comprensión integrada y holística de los parámetros químicos y físicos juntos a los biológicos representará la forma futura de evaluación de la calidad de los agroecosistemas.

Interacción entre los parámetros biológicos, químicos y físicos del suelo en sistemas bajo monocultivo y rotación de cultivos.

En el presente estudio se registraron correlaciones significativas entre los parámetros biológicos, químicos y físicos del suelo. En general, la mayoría de los parámetros biológicos, como HT, BT, Tr, Glio, Act, Pseud, CBM, GRSP, RM, FDA y FA, mostraron una correlación positiva y significativa con los contenidos de CO y Nt del suelo. Al estar la actividad microbiana heterotrófica total limitada por la baja disponibilidad de sustrato, sobre todo de CO y Nt, en los manejos agrícolas, se obtuvieron bajos recuentos de HT, BT, y potenciales agentes de biocontrol (Tr, Glio, Act y Pseud) cuando los niveles de la mayoría de los parámetros químicos fueron bajos. Sabemos que estos microorganismos obtienen sus fuentes nutricionales de diferentes pooles disponibles de MO del suelo (Singh *et al.*, 2007). Ryals *et al.* (2014) y Hubbard *et al.* (2013) mostraron que determinados tipos de coberturas vegetales, como los sustratos con ligninas con altos contenidos de CO y N, favorecen el incremento en los recuentos de HT y BT del suelo y de los agentes potenciales de biocontrol. Esta afirmación podría explicar las correlaciones positivas obtenidas en el presente trabajo. La acumulación de residuos de alta calidad tiende a mejorar el crecimiento y la reproducción de los biocontroladores del suelo (Salinas-García *et al.*, 2002). Por otro lado, el aporte de fuentes nitrogenadas y carbonadas debido al ingreso de residuos de maíz tiende a promover el incremento de algunas poblaciones microbianas del suelo (Pankhurst y Lynch, 1995; Bowles *et al.*, 2014; Bernard *et al.*, 2012 y Kladivko, 2001), generando un microhábitat con fluctuaciones menos marcadas de la humedad y temperatura, proporcionando a estos biocontroladores un ambiente más húmedo, con el consiguiente aumento de las actividades observadas en este trabajo.

Es ampliamente aceptado que los bajos contenidos en CO y Nt pueden reducir la RM, el CBM, y las actividades enzimáticas (Kaur *et al.*, 2000). De hecho, los bajos ingresos de CO y Nt a partir de la MO en suelos con escasa cobertura vegetal, determinan

los bajos niveles de algunos parámetros biológicos encontrados en el presente trabajo y en otros (Motavalli *et al.*, 2003; Yoshitake *et al.*, 2007 y Gnankambary *et al.*, 2008). La cobertura vegetal actúa como protectora de la biomasa microbiana contra la degradación y limita la mineralización de la MO (Traoré *et al.*, 2007; Thirukkumaran y Parkinson, 2002; Vance y Chapin, 2001 y Gnankambary *et al.*, 2008). Esto hace que, en el presente trabajo, las correlaciones entre el CO, Nt y la actividad enzimática global sean significativas y positivas. A su vez, el aumento del CO del suelo podría otorgar una mayor capacidad en la estabilización de las enzimas microbianas que intervienen en los ciclos biogeoquímicos frente a perturbaciones antrópicas (Bending *et al.*, 2002). De hecho, al ser la biomasa microbiana del suelo un constituyente lábil de la MO, actúa como fuente y sumidero de los nutrientes de las plantas (Singh *et al.*, 2012 y Smith *et al.*, 2000) regulando el funcionamiento de las actividades enzimáticas.

Por otra parte, durante las tres campañas evaluadas, todos los parámetros biológicos monitoreados no siempre correlacionaron positiva y significativamente con los contenidos de Pe. En los casos en los cuales si se observó correlación, a medida que el contenido de Pe aumentó, también lo hizo el contenido de HT, BT, potenciales biocontroladores como Actinobacterias y Pseudomonas fluorescentes, RM y actividad FA pero ésta sólo en la última evaluación. Las correlaciones entre Pe y GRSP fueron estadísticamente significativas y presentaron una asociación interesante lo cual es difícil de alcanzar bajo condiciones de campo. Al respecto, varios autores (Rillig *et al.*, 2002; Thoughton *et al.*, 2014) sugieren que el empleo de cultivos susceptibles a la micorrización, como el maíz y el sorgo en los manejos conservacionistas mejoran con los incrementos de Pe. Además, estos cultivos favorecen e incrementan el micelio viable externo, las esporas de hongos HMA y en consecuencia el contenido de GRSP en los suelos, facilitando de este modo la absorción de P por los cultivos siguientes y en forma indirecta la estabilidad de los agregados del suelo (Kabir y Koide, 2000 y Karasawa *et al.*, 2002). Se sabe que las altas concentraciones de Pe están negativamente correlacionadas con la diversidad de HMA, sin embargo, la presencia de dosis bajas de Pe estimula la micorrización y con ello la disponibilidad de GRSP, lo que podría haber ocurrido en este trabajo. A su vez, esto hace que se mejoren los parámetros químicos y físicos asociados a la actividad biológica e incrementen los contenidos de HT y BT (Alguacil *et al.*, 2010; Bedini *et al.*, 2007; Yoshitake *et al.*, 2007;

Singh *et al.*, 2009 y Dijkstra *et al.*, 2010), posibilitando las correlaciones positivas observadas en este trabajo.

Durante la última campaña, la actividad FA aumentó proporcionalmente al contenido de Pe. Este resultado sugiere que las distintas formas en que se encuentra el P en el suelo no están en exceso, permitiendo y potenciando la actividad de la enzima FA a formas de P disponibles. Se sabe que la actividad FA se ve favorecida por los incrementos de los contenidos de fuentes fosforadas en el suelo, incluso las disponibles (Redel *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando los niveles de Pe son elevados (por ejemplo por efecto de la fertilización), la actividad FA se ve inhibida (Borie *et al.*, 2002). Este mecanismo “feedback” podría explicar el mayor contenido de Pe en los sitios recién incorporados al manejo agrícola. Del mismo modo, frente a la ausencia de fertilización y a partir del aporte continuo de P por efecto de los residuos dejados en los manejos conservacionistas, la actividad FA se vio beneficiada.

Las propiedades físicas del suelo como EA y DA también son importantes en la determinación de la actividad microbiana potencial y su dinámica. Es ampliamente conocido que los residuos en la superficie del suelo pueden afectar alguna de sus propiedades físicas, como la resistencia a la penetración, la retención de agua, la EA y la DA (Muñoz *et al.*, 2007). En nuestro estudio, los parámetros biológicos HT, BT, Tr, CBM, GRSP, RM, FDA y FA correlacionaron positiva y significativamente con la EA, donde los niveles más altos fueron registrados en PR y en MR, mientras que la DA lo hizo de manera inversa. Varios autores mostraron que las prácticas conservacionistas pueden contribuir a la mejora en la agregación del suelo (Doran 1980; Spedding y Spencer, 1995). La retención de residuos carbonados en los suelos, puede directamente afectar la EA y DA, mejorando la estructura del suelo y aumentando la diversidad de poblaciones de microorganismos edáficos y sus actividades enzimáticas (Roldán *et al.*, 2006). Tang *et al.* (2011) reportaron que los residuos de maíz favorecen la formación de agregados del suelo. Sin embargo, al aplicar un fungicida y bactericida sobre los tratamientos con residuos, se produjo un profundo declive en las poblaciones de HT y BT del suelo. En consecuencia en el contenido de CBM y la actividad microbiana general fue reducida junto con la EA. Esto demuestra la profunda influencia de las poblaciones de HT y BT, que junto con la producción de hifas externas y varios compuestos carbonados (como los polisacáridos

extracelulares), contribuyen a la formación de la estructura del suelo. En el presente trabajo se establecieron marcadas correlaciones significativas entre estos parámetros. Por su lado, otros estudios encontraron correlaciones significativas y positivas entre la EA y el CBM, en diferentes ensayos de larga duración, las que estuvieron en concordancia con lo observado en este estudio (Roldán *et al.*, 2006; Cosentino *et al.*, 2006 y Bossuyt *et al.*, 2001). De hecho, Hernández-Hernández *et al.* (2002) evaluaron la distribución de CBM en el suelo y su importancia en el establecimiento y formación de los agregados estables del suelo, bajo manejo convencional y conservacionista. Ellos observaron una mayor proporción de CBM en sistemas de manejos conservacionistas, que estuvo asociada a una mayor formación de los macroagregados del suelo. Los autores concluyeron que, el empleo de sistemas de manejo conservacionistas en ecosistemas de degradados bajo cultivo intensivo, es de vital importancia. Al no producirse una perturbación severa en el suelo, el contenido de CBM aumentaría, mejorando la estabilidad estructural de macroagregados en el perfil. Estos que son aspectos cruciales para el mejor funcionamiento del agroecosistema. Consecuentemente esto permitió y resultó en un aumento del CBM, de las funciones en el suelo y en definitiva un mejor crecimiento y exploración radicular. En este trabajo, las prácticas de conservación disminuyeron la DA y aumentaron la EA, optimizando la distribución de los poros y su conectividad debido a una mejor estructuración y actividad biológica en el suelo, junto a una adecuada distribución en el perfil de los organismos con capacidades benéficas, lo que se vio plasmado por las correlaciones positivas y significativas que se obtuvieron entre parámetros.

Es interesante destacar también que la EA correlacionó positivamente con los contenidos de GRSP. En concordancia, Rillig *et al.* (2002, 2006, 2010) obtuvieron altas correlaciones entre estos mismos parámetros, estimados en suelos de similar textura a los utilizados en nuestro estudio. Es conocido que el revestimiento hidrófobo de las glicoproteínas 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. Además, la producción de GRSP es capaz de aumentar el flujo de CO en el suelo y por lo tanto, mejora la agregación del suelo. Para Rillig *et al.*, (2002) y otros autores (Bending *et al.*, 2002, Spedding *et al.*, 1995 y Holt, 1997), después de 10 años de manejos de conservación, la interacción entre distintos parámetros de fertilidad del suelo, como el CO, Nt, y Pe podrían influir

indirectamente en la EA, favoreciendo su incremento en los suelos, además de proporcionar recursos para la biota del suelo.

Por todo lo expuesto, los atributos biológicos, químicos y físicos que caracterizan a los sistemas agrícolas tradicionales están sujetos a múltiples y complejas interacciones y fluctuaciones, debido principalmente a las prácticas antrópicas, además de las intrínsecas naturales a las que están sometidas. Su monitoreo y seguimiento contribuirán a fortalecer las evaluaciones de calidad edáfica y a comprender los mecanismos implicados en la dinámica compleja del sistema suelo y su interacción con el cultivo empleado.

Incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y su relación con la diversidad microbiana edáfica y la productividad del cultivo en sistemas bajo monocultivo y rotación de cultivos.

En este trabajo las principales enfermedades encontradas con mayor incidencia en el cultivo de soja, fueron: el síndrome de la muerte súbita (SMS) y la podredumbre radicular de la soja causada por *Rhizoctonia solani* (Khun) (PRS). El SMS estuvo causado por un complejo de especies de *Fusarium*, entre los cuales se pudo determinar a *Fusarium crassistipitatum* Scandiani, T. Aoki et O'Donnell como la especie más predominante en la zona de estudio. Hasta el momento, este patógeno no ha sido reportado en la región, y constituye un valioso aporte para los programas de monitoreo de enfermedades realizados en la zona productora de Las Lajitas. También se detectó, con menor incidencia, la podredumbre carbonosa de la soja causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (PCS). Finalmente y sólo en la última campaña de soja, se detectó a *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) (TSR), agente causal del tizón por *Sclerotium* o también llamada la podredumbre de la soja. En el cultivo de maíz (última campaña) se registró la podredumbre carbonosa (PC) y la podredumbre de raíz causada por especies de *Fusarium*, entre las cuales se pudo identificar a *Fusarium verticillioides* (PFS).

Varios autores reportaron la presencia de estos patógenos en el cultivo de soja en el noroeste argentino, por lo que su presencia en los lotes con soja de la zona está

ampliamente difundida (Pérez Brandan *et al.*, 2012; Vargas Gil *et al.*, 2011). En el presente trabajo, los manejos bajo monocultivo de soja presentaron los mayores niveles de incidencia de enfermedades, mientras que los valores más bajos fueron registrados en los manejos conservacionistas. Estos resultados muestran la magnitud del impacto que puede producir el cultivo de una misma especie agrícola y la importancia que puede tener la permanencia de un sistema agrícola en la regulación de la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo.

La PCS fue reportada como una enfermedad de difícil manejo, incrementando progresivamente su incidencia en nuestra región productora bajo condiciones ambientales secas y altas temperaturas (Pérez Brandan, C., 2009). Almeida *et al.* (2001) estudiaron la reacción de *M. phaseolina* en distintos cultivares de soja en SD. La investigación reveló que este patógeno sufrió un aumento de su incidencia en aquellos cultivares sembrados continuamente. Por otro lado, Franco *et al.* (2008) también registraron una menor incidencia de la PCS en SD bajo rotación con maíz, debido principalmente a las condiciones de baja humedad y temperatura que proporcionan los residuos del cultivo anterior dejados en la superficie del suelo. Sin embargo, ninguno de estos trabajos especificó la duración de los sistemas de manejo, ni relacionó sus resultados con parámetros biológicos del suelo. En nuestro estudio, la permanencia de monocultivo permitió el establecimiento del patógeno en las raíces de soja, en concordancia con las disminuciones de diversidad microbiana y de los parámetros químicos y físicos asociados. Se sabe que *M. phaseolina* es un patógeno cosmopolita, saprófito y plurívoro, que afecta a una amplia gama de hospedantes (algodón, maíz, sorgo, maní, girasol, etc.), e infecta a las plantas expuestas a condiciones de estrés (Tesso *et al.*, 2005 y Pérez Brandan *et al.*, 2012). Además tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en los residuos de cultivos, siendo clave la selección del cultivo a incluir en la rotación con soja (Almeida *et al.*, 2003). *M. phaseolina* también es considerado un patógeno débil, debido a su sensibilidad frente a la competencia con otros microorganismos del suelo (Canaday y Schmitthenner, 1982). Esta característica particular de *M. phaseolina* proporciona las bases para el diseño de nuevas alternativas de manejo.

Por su parte, el SMS es una enfermedad ampliamente difundida en el noroeste argentino (Rupe *et al.*, 1999; Popler, 2010). Recientes análisis filogenéticos, moleculares y

morfológicos han mostrado tres especies estrechamente relacionadas dentro del clado 2 del complejo de especies de *Fusarium solani* que pueden inducir, en soja, el SMS (constituido por *F. virguliforme*, *F. tucumaniae*, y *F. brasiliense*). Otros descubrimientos mostraron la presencia de otra especie patogénica novedosa clasificada como *Fusarium crassistipitatum*, según los análisis fenotípicos de macro y micro caracteres, además de análisis moleculares de secuencias multilocus de ADN (Aoki *et al.*, 2012). En este trabajo fue posible aislar e identificar al patógeno *Fusarium crassistipitatum* de las muestras de suelo y de plantas con síntomas de la enfermedad (Scandiani, M., com. pers., 2013). Estos resultados ponen de manifiesto la ubicuidad de este patógeno y la importancia fitosanitaria de su detección para futuras investigaciones epidemiológicas. Hasta el momento son pocos los resultados obtenidos que contribuyan al mejoramiento genético en busca de cultivares resistentes a SMS (Aoki *et al.*, 2012). Investigaciones anteriores han demostrado cómo el empleo de la rotación trigo-maíz-soja, puede reducir las pérdidas de rendimiento en comparación con lo observado en el monocultivo de soja (Covert *et al.*, 2007). Igualmente, Rupe *et al.* (1997) encontraron que la rotación de soja con sorgo y trigo reduce los patógenos del suelo vinculados al SMS en relación al monocultivo, debido principalmente a la interrupción del ciclo de vida de estos patógenos y a los cambios producidos en el ambiente microbiano rizosférico. Sin embargo, Li *et al.* (2000) afirmaron que algunos cultivos (maíz, trigo, raiigrás, amaranto y quinoa) son susceptibles de infección por *F. virguliforme*, pero no desarrollan síntomas de necrosis radicular. Estas plantas parecían ser asintomáticas a la enfermedad, sin embargo, las cantidades de ADN del patógeno detectado en raíces inoculadas fueron similares a las detectadas en plantas de soja inoculadas con el mismo patógeno. En consecuencia, la especie de cultivo a incorporar en la rotación con soja debería ser tomada en cuenta a la hora de implementar acciones tendientes al control de esta enfermedad (Pérez Brandan *et al.*, 2014a, Xing y Westphal, 2009 y Stone y Putman, 2004).

La podredumbre radicular producida por *Rhizoctonia solani* (Khun) es una de las enfermedades de soja más comúnmente reportadas en la región del NOA Argentino. *Rhizoctonia solani* es un patógeno saprofito que sobrevive en el suelo y en los restos vegetales bajo la forma de esclerocios y micelio (Sharon *et al.*, 2008). De esta manera, la calidad de los residuos del suelo pueden afectar su actividad parasítica y su inóculo potencial. En la actualidad, no existen cultivares resistentes a *R. solani*, por lo que algunos

autores proponen el uso de buenas prácticas agrícolas en el control de este agente etiológico (Baird *et al.*, 1991 y Chen *et al.*, 1995).

Por último, *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) aparece en soja como una enfermedad de menor importancia. De hecho, en este trabajo se presentó con baja incidencia en la última campaña de soja, pero no se lo registró en el cultivo de maíz ya que este cultivo no es hospedante del patógeno. Por otro lado, la utilización de variedades resistentes a *S. rolfsii* no es comercialmente favorable. Generalmente, su presencia está asociada a la persistencia del monocultivo y rotaciones cortas en cultivos susceptibles (Akem y Dashiell, 1991), de allí la presencia de este patógeno en los manejos bajo monocultivo de soja del presente trabajo.

El uso de coberturas vegetales, la rotación de cultivos, el empleo de compost y sistemas de labranza reducida han sido promovidas como opciones de manejo tendientes a la reducción de la incidencia de enfermedades fúngicas. Además, estas prácticas pueden contribuir a la mejora de la calidad biológica del suelo (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

El presente trabajo mostró correlaciones significativas entre la incidencia de enfermedades y algunos parámetros biológicos, químicos y físicos. Algunos trabajos han demostrado la estrecha relación existente entre las enfermedades radiculares y la diversidad biológica del suelo (Vargas Gil, *et al.*, 2009 y Meriles *et al.*, 2009). El empleo de prácticas conservacionistas puede favorecer el desarrollo de microorganismos antagonistas de patógenos, además de contribuir en la mejora de las condiciones edáficas (Danon *et al.*, 2010 y Sennoi *et al.*, 2013). Reforzando estas afirmaciones, Pérez Brandan *et al.* (2012) mostraron que el análisis de las secuencias de ADN registró la presencia de hongos frecuentemente asociados con agentes eficaces de control biológico. De la misma manera, cada una de las variables estudiadas correlacionó significativa y positivamente con cada variable relacionada a la diversidad microbiana. De hecho, estos mismos autores reportaron que una menor incidencia de enfermedad se correlaciona con altos niveles de CBM, actividad enzimática general y densidades de propágulos de microorganismos de biocontrol. La presencia de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. en el suelo puede

contribuir a la destrucción de las estructuras de supervivencia de organismos patógenos (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006; Partridge y Gems, 2006; Rabeendran *et al.*, 2006).

En el caso del SMS, sabemos que el maíz es también huésped de otras especies de *Fusarium*. En este estudio los residuos de maíz, favorecieron las poblaciones de HT, BT y potenciales biocontroladores, ya que sus residuos constituyen una fuente de energía y nutrientes para los microorganismos edáficos. Además, se sabe que los patógenos que conforman el SMS son semi biotróficos (parásitos no obligados) y viven la mayor parte de su ciclo de vida como un parásito, pero bajo ciertas condiciones pueden crecer saprofiticamente en materiales orgánicos no vivos. Al tener habilidades saprofiticas su población puede aumentar después de la adición de enmiendas orgánicas. Sin embargo, suponemos que ante la competencia por los sustratos orgánicos previamente colonizados por otros organismos patógenos, los *Fusarium* del SMS, se comportaron como competidores relativamente pobres. Por esta razón, creemos que una de las principales causas para la reducción de la presión de esta enfermedad, podría ser la mejora de la salud de las raíces por la inclusión de maíz en la secuencia de cultivos, a pesar de ser un huésped alternativo de las especies de *Fusarium*, un beneficio que, obviamente, se puede obtener sólo a través de la rotación de cultivos como lo observado por otros autores (Chen *et al.*, 2001; Marzano *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2009; Aziz *et al.*, 2013 y Yu *et al.*, 2012).

Al cumplir los microorganismos en el hábitat del suelo varias funciones esenciales para el desarrollo de un cultivo sano, las prácticas de manejo agronómico deberían considerar estas características para favorecer la productividad de los cultivos de manera sustentable, incrementando la riqueza microbiana nativa del suelo. Por eso sugerimos que bajo estas condiciones, las plantas pueden evitar la infección por parte de los patógenos que habitan en el suelo, ya que este sistema se vuelve más resistente a las perturbaciones en relación a los sistemas de manejo convencional, donde la estabilidad biológica se ve comprometida, por el alto grado de estrés a los que están sometidos estos sistemas.

La mayoría de los trabajos publicados describen el efecto de las prácticas de manejo de cultivos sobre las poblaciones microbianas del suelo. Sin embargo, según nuestro conocimiento, existen pocas investigaciones que permitan vincular el estudio de las

comunidades microbianas del suelo con el impacto de la microbiota edáfica sobre la salud de los cultivos.

CONCLUSIONES

La metodología ajustada para el desarrollo de esta tesis permitió cuantificar eficientemente las variables microbianas del suelo en respuesta al manejo. Entre estas técnicas, se destaca una de las más complejas como la evaluación de perfiles de fosfolipídicos en suelo (PLFA) y técnicas moleculares relacionadas a la cuantificación de genes del ciclo del N.

Este estudio demostró que la deforestación y las actividades agrícolas modificaron la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo.

Los manejos bajo rotación de cultivos, en general, presentaron mayor abundancia microbiana (HT, BT y potenciales biocontroladores), y mayor contenido de CBM y GRSP en relación al monocultivo de soja.

Los manejos bajo rotación de cultivos presentaron mayor diversidad microbiana (PLFA) y actividad microbiana (RM, FDA, DH y FA), en relación al monocultivo de soja.

Las funciones microbianas se vieron afectadas en primera instancia, en comparación a lo ocurrido con la estructura de la comunidad microbiana. Los manejos bajo rotación de cultivos, presentaron mayor número de copias del gen *nosZ*, lo que se puede atribuir a mayores emisiones de óxido nitroso, lo que contribuye al calentamiento global y al cambio climático. Su detección constituye un importante aporte al manejo de los sistemas agrícolas convencionales. La detección de mayor número de copias del gen *nosZ* en el monocultivo de soja, permitió demostrar como los monocultivos afectan al balance de las distintas etapas del ciclo del N, alterando las etapas finales de denitrificación e incrementando las emisiones de óxido nitroso.

Los manejos bajo rotación de cultivos presentaron igual contenido de nutrientes (MO, Nt, NO-3, NH4 y Pe) pero mejor condición física (EA y DA) en relación a la rotación de cultivos.

Los manejos bajo monocultivo de soja presentaron los mayores niveles de incidencia para todas las enfermedades causadas por hongos de suelo, registradas en este trabajo.

Se pudo aislar e identificar una especie patogénica novedosa de *Fusarium*, *Fusarium crassistipitatum*, lo que permitió mostrar su ubicuidad y permanencia en distintos sistemas agrícolas, incluso los del noroeste argentino. Esto constituye un valioso aporte para los programas de monitoreo de enfermedades que se realizan en la zona productora de Las Lajitas.

La diversidad microbiana del suelo es una herramienta valiosa para reducir la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo. La rotación de cultivos incrementa la diversidad microbiana del suelo, favoreciendo la presencia de algunos biocontroladores y disminuyendo la presencia de algunos patógenos. Sin embargo, para SMS las opciones de manejo deben ser analizadas cuidadosamente.

En base a lo expuesto, fue posible validar la hipótesis planteada en este trabajo y confirmar que el monocultivo de soja disminuyen la diversidad microbiológica del suelo, alterando el equilibrio entre comunidades microbianas, deteriorando su condición física, y la sanidad del cultivo de soja.

BIBLIOGRAFÍA

Aapresid. 2012. Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. Argentina. Disponible en <http://www.aapresid.org.ar/>.

Aboim M.C.R., Coutinho H.L.C., Peixoto R.S., Barbosa J.C. and Rosado A.S., 2008. Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil. *Applied Soil Ecology* 38: 100-108.

Abril, A., Barttfeld, P., Bucher and E.H. 2005. The effect of fire and overgrazing disturbs on soil carbon balance in the Dry Chaco forest. *Forest Ecology and Management* 206: (1-3), 399-405.

Abril, A., Villagra, P. and Noe, L. 2009. Spatiotemporal heterogeneity of soil fertility in the Central Monte desert (Argentina). *Journal of Arid Environments* 73: (10), 901-906.

Acosta-Martínez, V., Acosta-Mercado, D., Sotomayor-Ramírez and D., Cruz-Rodríguez, L. 2008. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. *Applied Soil Ecology* 38: (3), 249-260.

Adam, G. and 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.

Akem, C.N. and Dashiell, K.E. 1991. Detached shoot technique to evaluate the reaction of soybean cultivars to *Sclerotium rolfsii*. *Crop Protection* 10: (4), 325-327.

Albertsen A., Ravnskov S., Green H., Jensen D.F. and Larsen J., 2006. Interactions between the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and other soil microorganisms as affected by organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 38: 1008-1014.

Aldaya, M.M., Allan, J.A. and Hoekstra, A. 2010. Strategic importance of green water in international crop trade. *Ecol. Economics* 69: 887-894.

Alef, K. 1995. Soil respiration. En: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Alef, K., Nanninieri P (eds). Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, London, pp 214–219.

Alekseeva, T. V., Sokolowska, Z., Hajnos, M and A. O. Alekseev. 2009. Water stability of aggregates in subtropical and tropical soils (Georgia and China) and its relationships with the mineralogy and chemical properties. Eurasian Soil Science 42: (4), 415-425.

Alguacil M.M., Lozano, Z., Campoy, M.J. and Roldán, A. 2010. Phosphorus fertilisation management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. Soil Biology and Biochemistry 42: (7), 1114-1122.

Almeida, A.M.R., Ferreira Saraiva, O., Bouças Farias, J.R., Almeida Gaudêncio, C. and Torres, E. 2001. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 36: (10), 1231-1238.

Almeida, A.M.R., Amorim, L., Bergamin, A., Torres, E., Farias, J.R.B., Benato, L.C., Pinto, M.C. and Valentim, N. 2003. Progress of soybean charcoal rot under tillage and no-tillage systems in Brazil. Fitopatología Brasileira 28: 131-135.

Alvarez, R., Díaz, R.A., Barbero, N., Santanatoglia, O.J. and Blotta, L. 1995. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from three tillage systems. Soil and Tillage Research 33: (1), 17-28.

Aoki, T., Scandiani, M.M. and O'Donn, K. 2012. Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. Mycoscience 53: (3), 167-186.

Aziz, I., Mahmood, T. and Islam, K.R. 2013. Effect of long term no-till and conventional tillage practices on soil quality. Soil and Tillage Research 131: 28-35.

Babujia, L.C., Hungria, M., Franchini, J.C. and Brookes, P.C. 2010. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. Soil Biology and Biochemistry 42: (12), 2174-2181.

Bach, C.E., Warnock, D.D., Van Horn, D.J, Weintraub, M.N., Sinsabaugh, R.L., Allison, S.D., Donovan, P. and Bach, G. 2013. Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, 1-DOPA, and ABTS: Effect of assay conditions and soil type. Soil Biology and Biochemistry 67: 183-191.

Badiane, N.N.Y., Chotte, J.L, Pate, E., Masse, D. and Rouland, C. 2001. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Applied Soil Ecology* 18: (3), 229-238.

Bailey, V.L, Peacock, A.D, Smith, J.L and Bolton Jr, H. 2002. Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation–extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 34: (9), 1385-1389.

Bailey, K.L and Lazarovits, G. 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research* 72: (2), 169-180.

Bailey, B.A.; Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Vinyard, B.T. and Holmes, K.A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46: (1), 24-35.

Baird, R.E., Brenneman, T.B., Bell, D.K. and Murphy, A.P. 1991. The effects of the fungicide propiconazole (Tilt®) on the groundnut shell mycobiota. *Mycological Research* 95: (5), 571-576.

Bastida, E., Kandeler, J., Moreno, L., Ros, M., García, C. and Hernández, T. 2008. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology* 40: (2), 318-329.

Beelem P.V. and Doelman P. 1997. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34: 455-499.

Bedini, S., Avio, L., Argese, E. and Giovannetti, M. 2007. Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agriculture Ecosystems & Environment* 120: (2–4), 463-466.

Bending, G, Turner, D.M.K. and Jones, J.E. 2002. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 34: (8), 1073-1082.

Bennett, L., Pauline, M.M., Shayne, A. and Sabine, K. 2010. Examining links between soil management, soil health, and public benefits in agricultural landscapes: An Australian perspective. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 139: (1–2), 1-12.

Benintende, S.M., Benintende, M.C., Sterren, M. A., and De Battista, J.J. 2008. Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems. *Ecological Indicators* 8: (5), 704-708.

Bernard, E., Larkin, R.P., Tavantzis, S., Erich, M.S., Alyokhin, A., Sewell, G., Lannan, A. and Gross, S.D. 2012. Compost, rapeseed rotation, and biocontrol agents significantly impact soil microbial communities in organic and conventional potato production systems. *Applied Soil Ecology* 52: 29-41.

Bezdicsek, D., Beaver, T. and Granatstein, D. 2003. Subsoil ridge tillage and lime effects on soil microbial activity, soil pH, erosion, and wheat and pea yield in the Pacific Northwest, USA. *Soil and Tillage Research* 74: (1) 55-63.

Black, J. 1965. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* American Society of Agronomy, Inc., Publisher (Ed.), Madison, Wisconsin, pp 4-770.

Blake, G.R. and Hartge K.H. 1986. Bulk density. En: Klute A (ed) *Methods of soil analysis. Part 1.* Agron. Monog 9. Am. Soc. Agron, Madison, Wisconsin, E.E.U.U., pp 363–375.

Blog Agromercado. 2013. Publicado en internet, disponible en <http://www.agromercado.com.ar/>.

Blume, E., Bischoff, M., Reichert, J.M., Moorman, T., Konopka, A. and Turco, R.F. 2002. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Applied Soil Ecology* 20: (3), 171-181.

Bohme L and Bohme F. 2006. Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long-term fertilization. *European Journal of Soil Biology* 42: 1–12.

Bolsa de Comercio de Rosario. 2012. Publicado en internet, disponible en <http://www.bcr.com.ar/>.

Bolsa de Comercio de Rosario. 2013. Publicado en internet, disponible en <http://www.bcr.com.ar/>.

Borie, G., Peirano, P., Zunino, H. and Aguilera, S.M. 2002. N-pool in volcanic ash-derived soils in Chile and its changes in deforested sites. *Soil Biology and Biochemistry* 34: (8), 1201-1206.

Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N. and Graham K.J. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb. Ecol.* 36: 1-12.

Bossio D.A., Girvan M.S., Verchot L., Bullimore J., Borelli T., Albrecht A., Scow K.M., Ball A.S., Pretty J.N. and Osborn A.M. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of western Kenya. *Microb. Ecol.* 49: 50-62.

Bossuyt, H., Deneff, K., Six, J., Frey, S.D., Merckx, R. and Paustian, K. 2001. Influence of microbial populations and residue quality on aggregate stability. *Applied Soil Ecology* 16: (3), 195-208.

Botta, G.F.; Tolón-Becerra, A., Lastra-Bravo, X., Tourn, M., Balbuena, R. and Rivero, D. 2013. Continuous application of direct sowing: Traffic effect on subsoil compaction and maize (*Zea mays* L.) yields in Argentinean Pampas. *Soil and Tillage Research* 134: 111-120.

Boyle-Yarwood, S.A., Bottomley, P.J. and Myrold, D.D. 2008. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environ. Microbiol.* 10, 2956–2965.

Bowles, T.M., Acosta-Martínez, V., Calderón, F. and Jackson, L.E. 2014. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 252-262.

Brackin, R., Robinson, N., Lakshmanan, P. and Schmidt, S. 2013. Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 68-77.

Brito I., Carvalho M. and Goss M.J. 2013. Soil and weed management for enhancing arbuscular mycorrhiza colonization of wheat. *Soil Use Manage* 29: 540-546.

Brussaard, L., de Ruiter, P.C. and Brown, G.G. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121: (3), 233-244.

Buschiazzo, D. E., Panigatti, J.L. and Unger, P.W. 1998. Tillage effects on soil properties and crop production in the subhumid and semiarid Argentinean Pampas. *Soil and Tillage Research* 49: (1–2), 105-116.

Buschiazzo, D.E., Hevia, G.G., Hepper, E.N., Urioste, A., Bono, A.A. and Babinec, F. 2001. Organic C, N and P in size fractions of virgin and cultivated soils of the semi-arid pampa of Argentina. *Journal of Arid Environments* 48: (4), 501-508.

Buschiazzo, D., Zobeck, E.T.M. and Abascal, S.A. 2007. Wind erosion quantity and quality of an Entic Haplustoll of the semi-arid pampas of Argentina. *Journal of Arid Environments* 69: (1) 29-39.

Bray, R.H. and Kurtz, L.T. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39–45.

Bremner, J.M. 1996. Nitrogen total. En: *Methods of soil analysis: chemical methods part 3*. Sparks DK (ed). American Society of Agronomy, Madison, USA. pp 1085–1122.

Canaday, C.H. and Schmitthenner, A.F. 1982. Isolating *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* from soil with a baiting method that minimizes *Pythium* contamination. *Soil Biology and Biochemistry* 14: (1), 67-68.

Cavagnaro, T.R., Jackson, L.E., Hristova, K. and Scow, K.M. 2008. Short-term population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 40: (1), 13-18.

Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguez, R. and Kloepp, J.W. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control* 5: (1), 83-91.

Chen, S., Porter, P.M., Reese, C.D. and Steinstra, W.C. 2001. Crop sequence effects on soybean cyst nematode and soybean and corn yields. *Crop Sci.* 41: 1843–1849.

Chen, H., Hou, R., Gong, Y., Li, H., Fan, M. and Kuzyakov, Y. 2009. Effects of 11 years of conservation tillage on soil organic matter fractions in wheat monoculture in Loess Plateau of China. *Soil and Tillage Research* 106: (1), 85-94.

Chen, F., Zheng, H., Zhang, K., Ouyang, Z., Huailin, L. and Qian, S. 2013. Changes in soil microbial community structure and metabolic activity following conversion from native *Pinus massoniana* plantations to exotic *Eucalyptus* plantations. *Forest Ecology and Management* 291: 65-72.

Chung, Y.R., Hoitink, H.A.H. and Lipps, P.E. 1988. Interactions between organic-matter decomposition level and soil borne disease severity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 24: (1–3), 183-193.

Coelho, M.R.R., Marriel, I.E., Jenkins, S.N., Lanyon, C.V., Seldin, L. and O'Donnell, A.G. 2009. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology* 42: (1), 48-53.

Corvalán, E.R., Franzoni, A., Huidobro, J.D. y Arzeno, J.L., 2000. Método de microtamices para la determinación de la estabilidad de agregados del suelo, 1-2 mm. En: *Actas del XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Mar del Plata. Comisión I y Panel 25.

Cosentino, D., Chenu, C. and Bissonais, Y.L. 2006. Aggregate stability and microbial community dynamics under drying–wetting cycles in a silt loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38: (8), 2053-2062.

Costantini A., De-Polli, H., Galarza, C., Pereyra Rossiello, R. and Romaniuk. R. 2006. Total and mineralizable soil carbon as affected by tillage in the Argentinean Pampas. *Soil and Tillage Research* 88: (1–2), 274-278.

Covert, S.F., Aoki, T., O'Donnell, K., Starkey, D., Holliday, A., Geiser, D.M., Cheung, F., Town, C., Strom, A., Juba, J., Scandiani, M. and Yang, X.B. 2007. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. *Fungal Genetics and Biology* 44: (8), 799-807.

Crecchio, C., Curci, M., Pellegrino, A., Ricciuti, P., Tursi, N. and Ruggiero, P. 2007. Soil microbial dynamics and genetic diversity in soil under monoculture wheat grown in different long-term management systems. *Soil Biology and Biochemistry* 39: (6), 1391-1400.

Dale, V.H. and Kline, K.L. 2013. Issues in using landscape indicators to assess land changes. *Ecological Indicators* 28: 91-99.

Danon, M., Chen, Y. and Hadar, Y. 2010. Ascomycete communities associated with suppression of *Sclerotium rolfsii* in compost. *Fungal Ecology* 3: (1), 20-30.

Díaz-Zorita, M.; Duarte, G.A and Grove, JH. 2002. A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina. *Soil and Tillage Research* 65: (1) 1-18.

Dighton, J., Jones, H.E., Robinson, Clare, H. and Beckett, J. 1997. The role of abiotic factors, cultivation practices and soil fauna in the dispersal of genetically modified microorganisms in soils. *Applied Soil Ecology* 5: (2), 109-131.

Dijkstra, F.A., Morgan, J.A., Blumenthal, D. and Follett, R.F. 2010. Water limitation and plant inter-specific competition reduce rhizosphere-induced C decomposition and plant N uptake. *Soil Biology and Biochemistry* 42: (7), 1073-1082.

Ding, X.; Bin, Z., Xudong, Z., Xueming, Y. and Xiaoping, Z. 2011. Effects of tillage and crop rotation on soil microbial residues in a rainfed agroecosystem of northeast China. *Soil and Tillage Research* 114: (1), 43-49.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. 2012. InfoStat versión. 2012. Grupo InfoStat, Ed. Brujas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Doran, J.W. 1980. Microbial changes associated with residue management with reduced tillage. *Soil Science of the Society of America Journal* 44: 518–524.

Doran, J.W. and Parkin, T.B. 1996. Defining and assessing soil quality. En: Doran JW, Coleman DC, Bezdiceck DF, Stewart, BA, (ed). *Defining soil quality for a sustainable environment*, vol.35. Madison, WI: Soil Sci. Soc. Amer. Special Publications, pp 3–21.

Doran, J.W. and Zeiss, M.R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15: (1), 3-11.

Doran, J.W., Stamatiadis, S.I. and Haberer, J. 2006. Soil health as an indicator of sustainable management. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 88: (2), 107-110.

Dou, F.G., Hons, F.M., Ocumpaugh, W.R., Read, J.C., Hussey, M.A. and Muir, J.P. 2013. Soil organic carbon pools under switchgrass grown as a bioenergy crop compared to other conventional crops. *Pedosphere* 23: (4), 409-416.

Elmholt, S. and Labouriau, R. 2005. Fungi in Danish soils under organic and conventional farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 107: (1), 65-73.

El-Tarabily, K.A. and Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47: (1), 25-35.

Epelde, L.A.B., Mijangos, I. and Garbisu, C. 2014. Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study. *Applied Soil Ecology* 75: 1-12.

Esperschütz, J., Buegger, F., Winkler, J.B., Munch, J.C., Schloter, M. and Gattinger, A. 2009. Microbial response to exudates in the rhizosphere of young beech trees (*Fagus sylvatica* L.) after dormancy. *Soil Biology and Biochemistry* 41: (9), 1976-1985.

Estevez de Jensen, C., Kurle, J.E. and Percich, J.A. 2004. Integrated management of edaphic and biotic factors limiting yield of irrigated soybean and dry bean in Minnesota. *Field Crops Research* 86: (2-3), 211-224.

Fanin, N., Hättenschwiler, S., Barantal, S., Schimann, H. and Fromin, N. 2011. Does variability in litter quality determine soil microbial respiration in an Amazonian rainforest. *Soil Biology and Biochemistry* 43: (5), 1014-1022.

Fares, A. and Polyakov, V. 2006. Advances in crop water management using capacitive water sensors. *Advances in Agronomy* 90: 43-77.

FAO, 1998. World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources reports, Food and Agricultural Organisation, Rome, 98 pp.

Feinsinger, P. 2003. El diseño de estudios de campo para la conservación de la biodiversidad. Ed. FAN, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. pp 2-50.

Ferreras, L.; Toresani, S.; Bonel, B.; Fernández, E.; Bacigaluppo, S.; Faggioli, V. y Beltrán, C. 2009. Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *Cienc. Suelo* 27: (1), 24-31.

Franchini, J.C., Crispino, C.C., Souza, R.A., Torres, E. and Hungria, M. 2007. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. *Soil and Tillage Research* 92: (1-2), 18-29.

Franco, A.D., Salinas Garcia, J.R., Cano, I.G. and Perez, N.M. 2008. Impact of tillage and arbuscular mycorrhiza inoculation on charcoal rot and yield of maize under semiarid conditions. *Rev. Fitotecnia Mexicana* 31: 257-263.

Frey, S.D. 2007. Spatial distribution of soil organisms. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Third Edition), pp 283-300.

Galantini, J. and Rosell, R. 2006. Long-term fertilization effects on soil organic matter quality and dynamics under different production systems in semiarid Pampean soils. *Soil and Tillage Research* 87: (1), 72-79.

Gallardo, B. and Aldridge, D.C. 2013. Evaluating the combined threat of climate change and biological invasions on endangered species. *Biological Conservation* 160: 225-233.

García, C., Hernández, M.T. and 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 Medina, S. 2002. El cultivo de poroto en la Argentina. Ed. Desimone y Calvo. Gofica, Salta, Argentina, pp 308.

Ghisalberti, E.L and Sivasithamparam, K.1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 23: (11), 1011-1020.

Gillian, A. and Duncan, H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: (7-8), 943-951.

Gnankambary, Z., Ilstedt, U., Nyberg, G., Hien, V. and Malmer, A. 2008. Nitrogen and phosphorus limitation of soil microbial respiration in two tropical agroforestry parklands in the south-Sudanese zone of Burkina Faso: The effects of tree canopy and fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 40: (2), 350-359.

Grenz, J., Manschadi, M., Uygur F.N and Sauerborn J. 2007. Effects of environment and sowing date on the competition between faba bean (*Vicia faba*) and the parasitic weed *Orobanche crenata*. *Field Crops Res.* 93: 300-313.

Green, V.S., Stott, D.E. and Diack, M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 38: (4), 693-701.

Haddad, F., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G. and Teixeira, H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49: (2), 114-119.

Hernández-Hernández, R.M. and López-Hernández, D. 2002. Microbial biomass, mineral nitrogen and carbon content in savanna soil aggregates under conventional and no-tillage. *Soil Biology and Biochemistry* 34: (11), 1563-1570.

Hoitink, H.A.J. and Boehm, M.J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbiol communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 427-446.

Holt, J.A. 1997. Grazing pressure and soil carbon, microbial biomass and enzyme activities in semi-arid northeastern Australia. *Applied Soil Ecology* 5: (2), 143-149.

Hubbard, R.K., Strickland, T.C. and Phatak, S. 2013. Effects of cover crop systems on soil physical properties and carbon/nitrogen relationships in the coastal plain of southeastern USA. *Soil and Tillage Research* 126: 276-283.

Hungría, M. and Vargas, M.A.T. 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65: (2-3), 151-164.

Hungría, M., Franchini, J.C., Brandão-Junior, O., Kaschuk, G. and Souza, R.A. 2009. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. *Applied Soil Ecology* 42: (3), 288-296.

Hurst, C. 1997. Methodology: Cultivation of Bacteria and Fungi. En: *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology Press. Hurst, C. (ed.). Washington DC. pp 4-893.

Iglesias, M.T. 2008. Estudio del carbono de la biomasa microbiana en suelos alterados. *AZAROA* 29: 117-123.

Jackson, L.E., Calderon, F.J., Steenwerth, K.L., Scow, K.M. and Rolston, D.E. 2003. Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. *Geoderma* 114: (3-4), 305-317.

Janssen, B.H., Guiking, F.C.T., van der Eijk, D., Smaling, E.M.A., Wolf, J. and van Reuler, H. 1990. A system for quantitative evaluation of the fertility of tropical soils (QUEFTS). *Geoderma* 46: (4) 299-318.

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T. and Steinberg, C. 2007. Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators. *Soil Biol Biochem* 39: 1-23.

Jenkinson, D. and Powlson, D. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. Methods for measuring soil biomass. *Soil Biol Biochem* 8: 209–213.

Jung, J.; Jinki Y., Jisun K., Jiwon H., Hyoun S. L., Hyun P. and Seunghun H. 2011. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Research in Microbiology* 162: (10), 1018-1026.

Kabir, Z. and Koide, R.T. 2000. The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential, soil aggregation and yield of maize. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 78: (2), 167-174.

Kandeler, E., Stemmer, M. and Klimanek, E.M. 1999. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry* 31: (2), 261-273.

Karasawa, T., Kasahara, Y. and Takebe, M. 2002. Differences in growth responses of maize to preceding cropping caused by fluctuation in the population of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 34: (6), 851-857.

Karr, J.R. 2012. Ecological Health Indicators. En: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. *Encyclopedia of Ecology*. Karr, J.R. (Ed.). Washigton, pp 1037-1041.

Kaur B., Gupta S.R. and Singh, G. 2000. Soil carbon, microbial activity and nitrogen availability in agroforestry systems on moderately alkaline soils in northern India. *Applied Soil Ecology* 15: (3), 283–294.

Kladivko, E.J. 2001. Tillage systems and soil ecology. *Soil and Tillage Research* 61: (1–2), 61-76.

Kelley, K.W., Long Jr, J.H. and Todd, T.C. 2003. Long-term crop rotations affect soybean yield, seed weight, and soil chemical properties. *Field Crops Research* 83: (1), 41-50.

King, E.O., Ward, M.K. and Raney, J.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyiocianin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301–307.

Kloos, K., Fesefeldt, A., Gliesche, C.G. and Bothe, H. 2005. DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of *Hyphomicrobium* in a sewage treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* 18: (3), 205-213.

Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Hans, G., Heilig, J., Stephen, J.R. and Woldendorp, J.W. 2000. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiology Ecology* 31: (3), 207-215.

Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123: (1-2), 1-22.

Larkin, R.P. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biol Biochem* 35: 1451-1466.

Larkin, R.P. 2008. Relative effects of biological amendments and crop rotations on soil microbial communities and soilborne diseases of potato. *Soil Biology and Biochemistry* 40: (6), 1341-1351.

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J. and Nicol, G.W. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806-809.

Lemenih, M. and Fisseha, I. 2004. Soil carbon stocks and turnovers in various vegetation types and arable lands along an elevation gradient in southern Ethiopia. *Geoderma* 123: (1-2), 177-188.

Li, S., Hartman, G.L., Lee, B.S. and Widholm, J.W. 2000. Identification of a stress-induced protein in stem exudates of soybean seedlings root-infected with *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: (10), 803-809.

Limpiyakorn, T., Puntipar, S., Chaiwat, R. and Chongrak, P. 2011. Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 102: (4), 3694-3701.

Liu, BR; Guo-Mei J, Jian C. and Gang W. 2006. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere* 16:(1), 18-24.

Liu, S.; Shuqin L., Kai P., Lili W. and Fengzhi W. 2011. Effects of different Preceding crops on soil micro-ecological environment and yield of cucumber. *Journal of Northeast Agricultural University (English edition)* 18: (4), 6-14.

Lovelock, C.E., Wright, S.F. and Nichols, K.A. 2004. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36: (6), 1009-1012.

March, G.J. and Marinelli, A.D. 2005. Diseases and productive systems. En: *Peanut diseases in Argentina*. March GJ, Marinelli AD. (Eds). Biglia Imp., Argentina, pp 142.

Martir-Torres, M.C. and Bruns, M.A. 2013. Comparative diversity and abundance of ammonia monooxygenase genes in mulched and vegetated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 758-768.

Maron, P.A., Mougel, C. and Ranjard, L. 2011. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies* 334: (5-6), 403-411.

Marzano, M., Gallo, A. and Altomare, C. 2013. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biological Control* 67: (3), 397-408.

Mayer, J., Buegger, F., Jensen, E.S., Schloter, M., and Heß, J. 2003. Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a ¹⁵N in situ stem labelling method. *Soil Biol. Biochem* 35: 21-28.

Mazzola, M. 1999. Transformation of soil microbial community and structure and Rhizoctonia - suppressive potential in response to apple roots. *Phytopathology* 89, 920-927.

Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Ann. Rev. Phytopathology* 42: 35-59.

Meriles, J.M, Vargas Gil, S., Haro, R., March, G.J. and Guzman, C.A. 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut-corn-soybean rotations. *Journal of Phytopathology* 154: 309-316.

Meriles, J.M, Vargas Gil, S., Conforto, C., Figoni, G., Lovera, E. and March, G.J., Guzman, C.A. 2009. Soil microbial communities under different soybean cropping systems: Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil Tillage Research* 103: (2), 271-281.

Michotey, V., Mejean, V. and Bonin, P. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1564-1571.

Micucci, F.G. and Taboada, M.A. 2006. Soil physical properties and soybean (*Glycine max*, Merrill) root abundance in conventionally- and zero-tilled soils in the humid Pampas of Argentina. *Soil and Tillage Research* 86: (2):152-162.

Miller, R.M. and Jastrow, J.D. 2000. Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biology and Biochemistry* 22: (5), 579-584p.

Montecchia M.S., Correa O.S., Soria M.A., Frey S.D., García A.F. and Garland J.L. 2011. Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 47: 176-183.

Motavalli, P.P, Anderson, S.H. and Pengthamkeerati, P. 2003. Use of soil cone penetrometers to detect the effects of compaction and organic amendments in claypan soils. *Soil and Tillage Research* 74: (2), 103–114.

Mtambanengwe, F., Mapfumo, P. and Vanlauwe, B. 2006. Comparative short-term effects of different quality organic resources on maize productivity under two different environments in Zimbabwe. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 76: 271–284.

Muñoz, A., López-Piñeiro, A. and Ramírez, M. 2007. Soil quality attributes of conservation management regimes in a semi-arid region of south western Spain. *Soil and Tillage Research* 95: (1–2), 255-265.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietra- Mellara, G. and Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54: 655–70.

Noé, L. y Abril, A. 2010. Interacción entre calidad de restos vegetales, descomposición y fertilidad del suelo en el desierto del Monte de Argentina. *Ecología Austral* 18: 181-193.

Nogueira M.A., Albino U.B., Brandão-Junior O., Braun G., Cruz M.F., Dias B.A., Duarte R.T.D., Gioppo N.M.R., Menna P., Orlandi J.M., Raimam M.P., Rampazo L.G.L., Santos M.A., Silva M.E.Z., Vieira F.P., Torezan J.M.D., Hungria M. and Andrade G. 2006. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 115: 237-247.

Nyamadzawo, G., Nyamangara, J., Nyamugafata, P. and Muzulu, A. 2009. Soil microbial biomass and mineralization of aggregate protected carbon in fallow-maize systems under conventional and no-tillage in Central Zimbabwe. *Soil and Tillage Research*, 102: (1), 151-157.

Oldeman, L.R. 1992. Architectural models, fractals and agroforestry design. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 41: (2), 179-188.

Oldeman, L.R. and van Engelen, V.W.P. 1993. A world soils and terrain digital database (SOTER). An improved assessment of land resources. *Geoderma* 60: (1-4), 309-325.

Pankhurst, C.E. and Lynch, J.M. 1995. The role of soil microbiology in sustainable intensive agriculture. *Advances in Plant Pathology* 11: 229-247.

Pankhurst, C.E., Magarey, R.C., Stirling, G.R., Blair, B.L., Bell, M.J. and Garside, A.L. 2003. Management practices to improve soil health and reduce the effects of detrimental soil biota associated with yield decline of sugarcane in Queensland, Australia. *Soil Tillage Res.* 72: 125-137.

Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54.

Partridge, L. and Gems, D. 2006. Beyond the evolutionary theory of ageing, from functional genomics to evo-gero. *Trends in Ecology & Evolution* 21: (6), 334-340.

Sa Pereira. 2012. Con el monocultivo, el suelo pierde un 30% de carbono. Publicado en internet, disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/>.

Pérez Brandán, C. 2009. Caracterización y aspectos biológicos y epidemiológicos de la podredumbre carbonosa de la soja (*Macrophomina phaseolina*) para contribuir a su manejo. Tesis de Magister Scientiae. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, 191 pp.

Perez-Brandán, C., Arzeno J.L., Huidobro, J., Grümberg, B., Conforto, C., Hilton, S., Bending, G.D., Meriles, J.M. and Vargas-Gil, S. 2012. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Protection* 40: 73-82.

Pérez Brandán, C.; Huidobro, J.; Scandiani, M.; Luque, A.; Meriles and S. Vargas Gil. 2014a. Soybean fungal soilborne diseases: a parameter for measuring the effect of agricultural intensification on soil health in northern Argentina. *Canadian Journal of Microbiology* 60: (2), 73-84.

Pérez Brandán, C., Huidobro, J., Grumberg, B., Scandiani, M.M., Luque, A.G., Meriles, J.M. and Vargas-Gil, S. 2014b. The effect of crop sequences on soil microbial, chemical and physical indicators and its relationship with soybean sudden death syndrome (complex of *Fusarium* species). *Spanish Journal of Agricultural Research* 12: (1), 252-264.

Popler, D. 2010. A la soja la atacan principalmente agentes bióticos. En: *La Gaceta*, Tucumán, Argentina, Noviembre de 2010, p. 15.

Preger, A.C., Rillig, M.C., Johns, A.R., Du Preez, C.C., Lobe, I. and 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 Biology and Biochemistry* 39: (2), 445-453.

Prosser, J.I. and Graeme, N.W. 2012. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology* 20: (11), 523-531.

Punja, Z.K. and Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* 21: (9), 400-407.

Quilchano, C., Haneklaus, S., Gallardo, J.F., Schnug, E., Moreno and Marañón, G. 2002. Sulphur balance in a broadleaf, non-polluted, forest ecosystem (central-western Spain). *Forest Ecology and Management* 161: (1-3), 15, 205-214.

Rabeendran, N., Jones, E.E., Moot, D.J. and Stewart, A. 2006. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum* *Biological Control* 39: (3), 352-362.

Rahman, M.H., Okubo, A., Sugiyama, S. and Mayland, H.F. 2008. Physical, chemical and microbiological properties of an Andisol as related to land use and tillage practice. *Soil and Tillage Research* 101: (1-2), 10-19.

Redel, Y.D., Rubio, R., Rouanet, J.L. and Borie, F. 2007. Phosphorus bioavailability affected by tillage and crop rotation on a Chilean volcanic derived Ultisol. *Geoderma* 139: (3-4), 388-396.

Rillig, M.C., Wright, S.F. and Eviner, V.T. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* 238: 325-333.

Rillig, M.C., Maestre, F.T. and Lamit, L.J. 2003. Microsite differences in fungal hyphal length, glomalin, and soil aggregate stability in semiarid Mediterranean steppes. *Soil Biology and Biochemistry* 35: (9), 1257-1260.

Rillig, M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil quality. *Can. J. Soil Sci.* 84: 355–363.

Rillig, M.C., Lutgen, E.R., Ramsey, P.W., Klironomos, J.N. and Gannon, J.E. 2005. Microbiota accompanying different arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation. *Pedobiología* 49: (3), 251-259.

Rillig, M.C. 2005. A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency. *Pedobiologia* 49: (5), 395-399.

Rillig, M.C., Hoye, A.T. and Carran, A. 2006. Minimal direct contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to DOC leaching in grassland through losses of glomalin-related soil protein. *Soil Biology and Biochemistry* 38: (9), 2967-2970.

Rillig, M.C., Mardatin, N.F., Leifheit, E.F. and Antunes, P.M. 2010. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi increases soil water repellency and is sufficient to maintain water-stable soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry* 42: (7), 1189-1191.

Roldán, A., Carrasco, L. and Caravaca, F. 2006. Stability of desiccated rhizosphere soil aggregates of mycorrhizal *Juniperus oxycedrus* grown in a desertified soil amended with a composted organic residue. *Soil Biology and Biochemistry* 38: (9), 2722-2730.

Rösch, C. and Bothe, H. 2005. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2026–2035.

Ross, D.J. 1971. Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. *Soil Biology and Biochemistry*, 3: (2), 97-110.

Rupe, J.C., Robbins, R.T. and Gbur Jr, E.E. 1997. Effect of crop rotation on soil population densities of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* and on the development of sudden death syndrome of soybean. *Crop Protection* 16: (6), 575-580.

Rupe, J.C., Robbins, R.T., Becton, C.M., Sabbe, W.A. and Gbur Jr, E.E. 1999. Vertical and temporal distribution of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* in fields with sudden death syndrome of soybean. *Soil Biology and Biochemistry* 31: (2), 245-251.

Rutigliano, F.A., D'Ascoli, R. and Virzo De Santo, A. 2004. Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. *Soil Biology and Biochemistry* 36: (11), 1719-1729.

Ryals, R., Kaiser, M., Torn, M.S., Berhe, A.A. and Silver, W.L. 2014. Impacts of organic matter amendments on carbon and nitrogen dynamics in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 52-61.

SAGPyA. 2010. 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.

SAGPyA. 2012. 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.

Salinas-García, J.R., Velázquez-García, J.J., Gallardo-Valdez, M., Díaz-Mederos, P., Caballero-Hernández, F., Tapia-Vargas, L.M. and Rosales-Robles E. 2002. Tillage effects on microbial biomass and nutrient distribution in soils under rain-fed corn production in central-western Mexico. *Soil and Tillage Research* 66: (2), 143-152.

Schleper, C. and Graeme, W.N. 2010. Ammonia-Oxidising Archaea – Physiology, Ecology and Evolution. *Advances in Microbial Physiology* 57: 1-41.

Sennoi, R., Singkham, N., Jogloy, S., Boonlue, S., Saksirirat, W., Kesmala, T. and Patanothai, A. 2013. Biological control of southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* using *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *Crop Protection* 54: 148-153.

Sharon, M., Sneh, B., Kuninaga, S., Hyakumachi, M. and Nait, S. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49: (2), 93-114.

Shen, J.P., Zhang, L.M., Guo, J.F., Ray, J.L. and He, J.Z. 2008. Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China. *Applied Soil Ecology* 46: (1), 119-124.

Shen, J.P., Peng C., Hang-Wei H. and Ji-Zheng H. 2013. Differential response of archaeal groups to land use change in an acidic red soil. *Science of The Total Environment* 461–462: 742-749.

Shrestha, Raj K.; Rattan Lal and Basant Rimal. 2013. Soil carbon fluxes and balances and soil properties of organically amended no-till corn production systems. *Geoderma* 197–198: 177-185.

Silgram, M. and Shepherd, M.A. 1999. The Effects of Cultivation on Soil Nitrogen Mineralization. *Advances in Agronomy*, 65: 267-311.

Simon, H.M., Dodsworth, J.A. and Goodman, R. M. 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environ. Microbiol.* 2: 495–505.

Singh, B.K., Millard, P., Whiteley, A.S. and Murrell, J.C. 2004. Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology* 12: (8), 386-393.

Singh, B.K., Dawson, L.A., Macdonald, C.A. and Buckland, S.M. 2009. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology* 41: (3), 239-248.

Singh, S., Ghoshal, N. and Singh, K.P. 2007. Variations in soil microbial biomass and crop roots due to differing resource quality inputs in a tropical dryland agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 39: (1), 76-86.

Singh, K., Singh, B. and Singh, R.R. 2012. Changes in physico-chemical, microbial and enzymatic activities during restoration of degraded sodic land: Ecological suitability of mixed forest over monoculture plantation. *CATENA* 96: 57-67.

Smith, M.D, Hartnett, D.C. and Rice, C.W. 2000. Effects of long-term fungicide applications on microbial properties in tallgrass prairie soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: (7), 935-946.

Souza, R.C., Cantão, M.E., Ribeiro Vasconcelos, A.T., Nogueira, M.A. and Hungria, M. 2013. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. *Applied Soil Ecology* 72: 49-61.

Spargo, J.T., Alley, M.M., Follett, R.F. and Wallace, J.V. 2008. Soil carbon sequestration with continuous no-till management of grain cropping systems in the Virginia coastal plain. *Soil and Tillage Research* 100: (1–2), 133-140.

Spedding, P.L. and Spencer, R.M. 1995. Simulation of packing density and liquid flow in fixed beds. *Computers & Chemical Engineering* 19: (1), 43-73.

Steel, R.G.D., Torrie, J.H. and Dickey, D.A. 1997. Principles and procedures of statistics. En: A Biometrical Approach, (3rd edn). USA, New York, McGraw-Hill, pp 234.

Stone, J.K. and Putnam, M.L. 2004. Pathology: Leaf and Needle Diseases. En: Encyclopedia of Forest Sciences. Burle, J. y Evans, J. (Ed.). Oxford, UK. pp 777-785.

Tabatabai, M.A. y Bremner, J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1: (4), 301-307.

Tang, Y.S., Wang, L., Jia, J.W., Fu, X.H., Le, Y.Q., Chen, X.Z. and Sun, Y. 2011. Response of soil microbial community in Jiuduansha wetland to different successional stages and its implications for soil microbial respiration and carbon turnover. *Soil Biology and Biochemistry* 43: (3), 638-646.

Tesso, T.T., Claflin, L.E., and Tuinstra, M.R. 2005. Analysis of stalk rot resistance and genetic diversity among drought tolerant sorghum genotypes. *Crop Sci.* 45: 645-652.

Thirukkumaran, C.M. and Parkinson, D. 2002. Microbial activity, nutrient dynamics and litter decomposition in a Canadian Rocky Mountain pine forest as affected by N and P fertilizers. *Forest Ecology and Management* 159: (3), 187-201.

Thoughton Islas, A.J; Eyherabide, M; Echeverria, HE; Sainz Rozas, H y Covacevich, F. 2014. Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrízicos nativos de suelos de la Provincia de Buenos Aires con manejo contrastante. *Revista Argentina de Microbiología* 41: 25-31.

Tiessen, H., Salcedo, I.H. and Sampaio, E.V.S.B. 1992. Nutrient and soil organic matter dynamics under shifting cultivation in semi-arid northeastern Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 38: (3), 139-151.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A. and Øvreås, L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments *Journal of Biotechnology* 64: (1), 53-62.

Traoré, S., Thiombiano, L., Millogo, J.R. and Guinko, S. 2007. Carbon and nitrogen enhancement in Cambisols and Vertisols by *Acacia* spp. in eastern Burkina Faso: Relation to soil respiration and microbial biomass. *Applied Soil Ecology* 35: (3), 660–669.

Trassar-Cepeda, Leirós, M.C., Seoane, S. and Gil-Sotres, F. 2008. Biochemical properties of soils under crop rotation. *Applied Soil Ecology* 39: (2), 133-143.

Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P. and Schleper, C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.*, 7: 1985–1995 pp.

USDA. 1992. Publicado en internet, disponible en <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>.

van Bruggen, A.H.C. and Semenov, A.M. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15: (1), 13-24.

Vance, E.D. and Chapin III, F.S. 2001. Substrate limitations to microbial activity in taiga forest floors. *Soil Biology and Biochemistry* 33: (2), 173-188.

van Elsas, J.D., Frois Duarte, G., Keijzer-Wolters, A. and Smit, E. 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43: (2), 133-151.

Vargas-Ayala, R., Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G., McInroy, J.A. and Kloepper, J.W. 2000. Shifts in Soil Microflora Induced by Velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in Cropping Systems to Control Root-Knot Nematodes. *Biological Control* 17: (1), 11-22.

Vargas Gil, S., Haro, R., Oddino, C., Kearney, M., Zuza, M., Marinelli, A. and March, G.J. 2008. Crop management practices in the control of peanut diseases caused by soilborne fungi. *Crop Protection* 27: (1), 1-9.

Vargas Gil, S.; Pastor, S. and March, G.H. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research* 164: (2), 196-205.

Vargas Gil, S., Meriles, J., Conforto, C., Basanta, M., Radl, V., Hagn, A., Schloter, M. and March, G.J. 2011. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology* 47:(1), 2011,55-60.

Velmourougane, K., Venugopalan, M.V., Bhattacharyya, T., Sarkar, D., Pal, D.K., Sahu, A., Ray, S.K., Nair, K.M., Prasad, J. and Singh, R.S. 2013. Soil dehydrogenase activity in agro-ecological sub regions of black soil regions in India. *Geoderma* 197–198: 186-192.

Volante, J.N., Alcaraz-Segura, D., Mosciaro, M.J., Viglizzo, E.F. and Paruelo, J.M. 2012. Ecosystem functional changes associated with land clearing in NW Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 154: (1), 12-22.

Ward, B.B. and O'Mullan, G.D. 2005. Community Level Analysis: Genetic and Biogeochemical Approaches to Investigate Community Composition and Function in Aerobic Ammonia Oxidation. *Methods in Enzymology* 397: 395-413.

Wixom, D.L. and Balsler, T.C. 2013. Toward conceptual clarity: PLFA in warmed soils. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 769-774.

Wardle, D.A. 2002. Impacts of Disturbance on Detritus Food Webs in Agro-Ecosystems of Contrasting Tillage and Weed Management Practices. *Advances in Ecological Research* 26: 105-185.

Wright, S.F. and Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.*, 161: 575-586.

Wright, S.F., Upadhyaya, A. and Buyer, J.S. 1998. Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry* 30: (13), 1853-1857.

Wight, A.L., Hons, F.M. and Matocha, J.E. Jr. 2005. Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. *Applied Soil Ecology* 29 : (1), 85-92.

Wright, S.F., Green, V.S. and Cavigelli, M.A. 2007. Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil and Tillage Research* 94: (2), 546-549.

Wu, H., Zeng, G., Liang, J., Zhang, J., Cai, Q., Huang, L., Li, X., Zhu, H., Hu, C. and Shen, S. 2013a. Changes of soil microbial biomass and bacterial community structure in Dongting Lake: Impacts of 50,000 dams of Yangtze River. *Ecological Engineering* 57: 72-78.

Wu, L., Li, Z., Li, J., Khan, M.A., Huang, W., Zhang, Z. and Lin, W. 2013b. Assessment of shifts in microbial community structure and catabolic diversity in response to *Rehmannia glutinosa* monoculture. *Applied Soil Ecology* 67: 1-9.

Xing, L. and 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 Research* 112: (1), 107-117.

Yoshitake, S., Sasaki, A., Uchida, M., Funatsu, Y. and Nakatsubo, T. 2007. Carbon and nitrogen limitation to microbial respiration and biomass in an acidic solfatara field. *European Journal of Soil Biology* 43: (1), 1–13.

Young, I.M. and Ritz, K. 2000. Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil and Tillage Research* 53: (3–4), 201-213.

Yu, Y., Huang, Y. and Zhang, W. 2012. Modeling soil organic carbon change in croplands of China, 1980–2009. *Global and Planetary Change*, 82–83: 115-128 pp.

Yuan, B.C. and Yue, D.X. 2012. Soil Microbial and Enzymatic Activities Across a Chronosequence of Chinese Pine Plantation Development on the Loess Plateau of China. *Pedosphere* 22: (1), 1-12.

Zhang, H. and Chu, L.M. 1998. Plant community structure, soil properties and microbial characteristics in revegetated quarries. *Ecological Engineering* 37: (8), 1104-1111.

Zhang, N., He, X.D., Gao, Y.B., Li, Y.H., Wang, H.T., Ma, D., Zhang, R. and Yang, S. 2010. Pedogenic Carbonate and Soil Dehydrogenase Activity in Response to Soil Organic Matter in *Artemisia ordosica* Community. *Pedosphere* 20: (2), 229-235.

Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. and Steward, G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539–554.

Zelles, L., 1999. Fatty acid pattern of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29: 111–129.

Zou, Y., Zhang, J., Yang, D., Chen, X., Zhao, J., Xiu, W., Lai, X. and Li, G. 2011. Effects of different land use patterns on *nifH* genetic diversity of soil nitrogen-fixing microbial communities in *Leymus Chinensis* steppe. *Acta Ecologica Sinica* 31: (3), 150-156.

Zumft, W.G., Heinz, K. 2007. Nitrous Oxide Reductases Biology of the Nitrogen Cycle, Chapter 5. pp 67-81.