



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMÍA

**ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LOS MÉTODOS DE FINALIZACIÓN
DE UN CULTIVO DE COBERTURA (*Avena sativa* L.) SOBRE
COMUNIDADES MICROBIANAS RIZOSFÉRICAS**

MARIANELA ESTEFANÍA MORALES

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 17 de octubre de 2017 y el 22 de agosto de 2022, bajo la dirección de la Dra. María Celina Zabaloy y la Dra. María Bonita Villamil, Department of Crop Sciences, University of Illinois.

Marianela E. Morales



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mercedo la calificación de(.....)

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a quienes han permitido que esta tesis se lleve a cabo:

A mi familia que siempre estuvo a mi lado y me permitió continuar con mis estudios. Especialmente a mi mamá, que sin ella no hubiera sido posible emprenderme en este proyecto, gracias infinitas por cuidar al amor de mi vida. A mi hija Clara, mi compañera, mi todo, gracias princesa por ser parte de mi vida. A mi pareja Julián por su amor, apoyo y contención. A mi hermana Andrea por confiar en mí y por alentarme a no bajar los brazos. A mi papá y hermano por estar siempre cuando los necesite.

A mi directora Celina por haber confiado en mí, su paciencia, el tiempo dedicado, los conocimientos brindados y por ser sin duda la mejor directora.

A mi codirectora María Bonita Villamil por su aporte valioso en las correcciones de la tesis, en el diseño experimental, análisis estadístico y en la secuenciación.

A Jessica Basualdo, Gastón Iocoli y Ana Zamponi por la colaboración en los ensayos, por su predisposición y grata compañía.

A Marco Allegrini por su importante ayuda y paciencia en el procesamiento bioinformático.

A mis compañeros de trabajo, Celi, Jessi, Gastón, Emi y Ani por los mates y charlas compartidas que hacían más amenas las jornadas laborales.

A Martín De Lucía por la ayuda brindada en el campo Napostá.

A la empresa Guasch Semillas S.A. por donarnos las semillas de avena y girasol.

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur por haberme facilitado las instalaciones utilizadas para llevar a cabo los ensayos.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber otorgado las becas de posgrado que posibilitaron la realización de esta tesis.

RESUMEN

La siembra directa (SD) con rotación de cultivos surgió como respuesta a los problemas de degradación de suelos ocasionados por la intensificación agrícola. En este sistema los cultivos de cobertura invernales (CCI) se utilizan para complementar los efectos de la SD durante la época de barbecho, por los múltiples servicios ecosistémicos que proveen al agroecosistema. Si bien se han demostrado efectos positivos de los CCI sobre las propiedades físico-químicas del suelo, se conoce relativamente poco sobre las respuestas del microbioma de suelo y plantas ante la introducción de CCI y manejos asociados. En particular, el crecimiento de los CCI se finaliza con aplicación de herbicidas o labores mecánicas antes de la siembra del cultivo de cosecha. Estas prácticas producen un efecto sobre el metabolismo de las plantas que se refleja en la exudación radical e incide sobre las interacciones entre planta y microorganismos. Los CCI pueden actuar como “puentes verdes”, es decir como hospedadores de microorganismos benéficos o patógenos que colonizarán al cultivo de cosecha sucesor. Por lo tanto, la hipótesis planteada en la tesis fue que los métodos utilizados para finalizar los CCI afectan el microbioma rizosférico al modificar el tipo y la cantidad de exudados radicales, lo que podría incidir a su vez sobre el microbioma rizosférico del cultivo sucesor y el desarrollo del mismo. Los objetivos específicos fueron: 1) evaluar el efecto combinado de la fertilización con nitrógeno (N) y el método de finalización de avena (*Avena sativa* L.) como CCI, sobre la composición de los exudados radicales de avena, la estructura de la microbiota en general y la abundancia de las poblaciones responsables del ciclo del N y degradadoras de fosfonatos, en un ensayo en invernáculo; 2) analizar el impacto de la introducción del CCI y el método de finalización del mismo, previo a la siembra de girasol (*Helianthus annuus* L.) en la rotación, sobre los indicadores mencionados anteriormente; 3) como así también la *performance* de girasol y la estructura de la comunidad bacteriana de su rizosfera en un ensayo a campo durante dos campañas agrícolas.

Se observó que los métodos de finalización modificaron el perfil de exudación de la avena, no así la fertilización con N. Las bacterias oxidantes del amoníaco no respondieron a la fertilización con N en el tratamiento con glifosato (DQ) mientras que las arqueas oxidantes del amoníaco fueron más abundantes en la rizosfera de plantas cortadas (CM), independientemente del tratamiento de fertilización. El tratamiento DQ redujo la abundancia de *Curvibacter* en la rizosfera del CCI mientras que favoreció a miembros de la familia Verrucomicrobiaceae tanto en invernáculo como en campo. Ambos métodos de finalización utilizados sobre el CCI a campo (DQ y rolado, R) redujeron la abundancia de *Novosphingobium* en la rizosfera de avena y así como en la de girasol, mientras que R afectó negativamente los parámetros de crecimiento del girasol. Esta información podría contribuir a generar estrategias de manejo más sustentable para los CCI.

ABSTRACT

Crop rotations deploying no-till (NT) systems emerged in response to soil degradation problems caused by agricultural intensification. Winter cover crops (WCC) are introduced to complement the effects of NT during the fallow season due to the multiple ecosystem services they can provide. Although WCCs have demonstrated positive effects on soil properties, relatively little is known about the responses of the soil and plant microbiomes to the introduction of WCC and their associated management. The termination of the WCC growth is required to allow planting of the cash crop and includes both mechanical (e.g., rolling or cut) and chemical methods. These termination methods affect the plant metabolism, resulting in variations in root exudation amount and composition, modifying interactions between plants and microorganisms. These rhizospheric microorganisms affect plant growth, development, nutrient uptake, and pathogen resistance. Furthermore, WCC can act as "green bridges" for beneficial or pathogenic microorganisms that may carry over to the next crop in the rotation. Therefore, I hypothesized that due to their described effects on rhizodeposition, WCC termination methods alter the rhizospheric microbiome of the WCC, potentially influencing the growth and development of the next crop and its rhizospheric microbiome as well. The specific objectives were to evaluate the combined effect of fertilization with nitrogen (N) and termination method of a WCC of oats (*Avena sativa* L.), on 1) the composition of root exudates of oat, the structure of the microbiota in general, and the abundance of the microbial populations responsible for the N cycle and phosphonate degraders; 2) the impact on the microbiota before planting the next crop in the rotation, sunflower (*Helianthus annuus* L.), as well as 3) the performance of sunflower and the structure of the rhizospheric bacterial community. Objective 1 was conducted in the greenhouse, while objectives 2 and 3 had a field setting over two successive growing seasons (2018 and 2019).

The study showed that termination methods (DQ, chemical suppression; CM, mechanical cut; R mechanical rolled) changed the root exudation profile of oat, but N fertilization did not. Ammonia-oxidizing bacteria did not respond to N fertilization in the glyphosate (DQ) treatment, while ammonia-oxidizing archaea were more abundant in the rhizosphere of cut plants (CM), regardless of the fertilization treatment. The abundance of *Curvibacter* was reduced in the rhizosphere of DQ plants, while members of the *Verrucomicrobiaceae* family increased in the greenhouse and field assay under the same treatment. Termination with DQ or R reduced the abundance of *Novosphingobium* in the rhizosphere of both oat and sunflower. In addition, the suppression of oats' growth with R, negatively affected the growth parameters of sunflower. This information could contribute to generating more sustainable management strategies for WCC.

ÍNDICE GENERAL

PREFACIO	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ABREVIATURAS	xx
CAPÍTULO 1. EFECTO DE LOS CULTIVOS DE COBERTURA INVERNALES SOBRE EL MICROBIOMA DEL SUELO: REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA.....	1
1. Introducción.....	1
2. Métodos.....	6
2.1. Criterios de selección	6
3. Resultados	12
3.1. Cultivos de cobertura de invierno multiespecies.....	12
3.2. Cultivos de cobertura de invierno monoespecíficos	14
4. Discusión.....	17
5. Conclusiones	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LA EXUDACIÓN RADICAL DE <i>Avena sativa</i> L. EN RELACIÓN CON LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y LOS MÉTODOS DE FINALIZACIÓN DEL CULTIVO	23
1. Introducción.....	23
2. Materiales y métodos.....	26
2.1. Diseño del ensayo	26
2.2. Obtención de exudados radicales.....	28
2.2.1. Determinación de fósforo y fenoles totales en los exudados radicales.....	28
2.2.2. Análisis cualitativo de los exudados radicales.....	29
2.3. Análisis molecular de la comunidad microbiana	30
2.3.1. Extracción de ADN de suelo rizosférico y cuantificación.....	30

2.3.2.	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de <i>phnJ</i>	30
2.4.	Análisis estadísticos	30
3.	Resultados	31
3.1.	Fósforo y fenoles totales en los exudados radicales	31
3.2.	Análisis cualitativo de los exudados radicales	32
3.3.	PCR cuantitativa del gen <i>phnJ</i>	37
4.	Discusión.....	39
5.	Conclusiones	41

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE *Avena sativa* L. EN RELACIÓN CON LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y LOS MÉTODOS DE FINALIZACIÓN DEL CULTIVO

1.	Introducción.....	42
2.	Materiales y métodos	45
2.1.	Diseño del ensayo	45
2.2.	Determinación de parámetros químicos del suelo.....	45
2.3.	Determinación de la actividad de nitrificación	46
2.4.	Análisis molecular de la comunidad microbiana	46
2.4.1.	Extracción de ADN de suelo rizosférico y cuantificación.....	46
2.4.2.	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de diferentes grupos microbianos	46
2.4.3.	Análisis metagenómico de la comunidad microbiana	49
2.5.	Análisis bioinformático.....	49
2.5.1.	Análisis estadísticos.....	50
3.	Resultados	52
3.1.	Parámetros químicos del suelo	52
3.2.	Actividad potencial nitrificante	54
3.3.	PCR cuantitativa de genes indicadores.....	56
3.4.	Análisis metagenómico de la comunidad microbiana.....	61
3.4.1.	Diversidad α	63
3.4.2.	Diversidad β	65
3.4.3.	Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de avena	66
4.	Discusión.....	74
4.1.	Abundancia de grupos microbianos mediante qPCR.....	74
4.2.	Análisis metagenómico de la comunidad microbiana.....	76

5. Conclusiones	80
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE AVENA COMO CCI EN RELACIÓN A LOS MÉTODOS DE FINALIZACIÓN DEL CULTIVO.....	81
1. Introducción.....	81
2. Materiales y métodos.....	83
2.1. Sitio de estudio.....	83
2.2. Diseño experimental.....	84
2.3. Muestreo de suelo rizosférico.....	86
2.4. Enumeración de bacterias heterotróficas aerobias.....	86
2.5. Análisis fisicoquímicos del suelo	87
2.6. Determinación de la actividad de nitrificación	87
2.7. Análisis molecular de la comunidad microbiana	87
2.7.1. Extracción de ADN del suelo rizosférico y cuantificación.....	87
2.7.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de diferentes grupos microbianos	88
2.7.3. Análisis metagenómico y bioinformático de la comunidad microbiana	88
2.8. Análisis estadísticos	89
3. Resultados	91
3.1. Enumeración de bacterias heterótrofas aerobias (BHA).....	91
3.2. Parámetros químicos del suelo	93
3.3. Actividad potencial nitrificante	93
3.4. PCR cuantitativa de genes indicadores.....	94
3.5. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana.....	97
3.5.1. Diversidad α	100
3.5.2. Diversidad β	100
3.5.3. Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de avena	102
4. Discusión.....	107
4.1. Cuantificación de bacterias heterótrofas aerobias y abundancia de grupos microbianos mediante qPCR	107
4.2. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana.....	109
5. Conclusiones	112
CAPÍTULO 5. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE <i>Helianthus annuus</i> L. Y LA PERFORMANCE DEL CULTIVO EN RELACIÓN AL MANEJO DEL CCI ANTECESOR.....	113

1. Introducción.....	113
2. Materiales y métodos.....	115
2.1. Diseño experimental.....	115
2.2. Muestreo del suelo.....	117
2.3. Determinación de parámetros vegetativos y reproductivos de planta	120
2.4. Extracción de ADN de suelo rizosférico y cuantificación	120
2.5. Análisis metagenómico y bioinformático de la comunidad microbiana	120
2.6. Análisis estadísticos	121
3. Resultados	123
3.1. Contenido de fósforo	123
3.2. Parámetros de crecimiento de girasol.....	123
3.3. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana.....	126
3.3.1. Diversidad α	129
3.3.2. Diversidad β	129
3.3.3. Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de girasol	131
4. Discusión.....	138
4.1. Parámetros de crecimiento de girasol.....	138
4.2. Análisis metagenómico de la comunidad bacteriana de girasol.....	139
5. Conclusiones	143
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES GENERALES	144
ANEXO	146
BIBLIOGRAFÍA.....	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diagrama PRISMA.	7
Figura 1.2. Los gráficos de torta representan el porcentaje de trabajos científicos en la revisión sistemática que reportaron un aumento en indicadores de actividad (celeste), abundancia (violeta) o diversidad (naranja) microbiana y los que no observaron un efecto sobre esos indicadores (amarillo). N indica la cantidad de trabajos en los cuales se reportaron resultados para el indicador.	17
Figura 2.1. Curva de calibración de contenido de fenoles totales.	29
Figura 2.2. Espectros IR de cada combinación entre los niveles de fertilización y de los métodos de finalización. Corte mecánico con N (CMN) y sin N (CM); desecación química con N (DQN) y sin N (DQ); sin supresión con N (SSN) y sin N (SS).	34
Figura 2.3. Espectros IR para cada método de finalización: corte mecánico (CM), desecación química (DQ) y sin supresión (SS).	35
Figura 2.4. Espectros IR de los métodos de finalización (CM, DQ y SS) en el rango 3000-2800 cm^{-1}	36
Figura 2.5. Espectros IR de los métodos de finalización (CM, DQ y SS) en el rango 1500-1300 cm^{-1}	36
Figura 2.6. Espectros IR de los métodos de finalización (CM, DQ y SS) en el rango 1200-950 cm^{-1}	37
Figura 3.1. Curvas de rarefacción para las distintas muestras analizadas mediante <i>barcoded amplicon-sequencing</i> . Se indica el número de ASVs (“Species”) esperables para un número creciente de secuencias en cada muestra (“Sample size” o esfuerzo de muestreo). Las letras DQ indican desecación química, las letras CM corte mecánico y las letras SS sin supresión. La letra N indica fertilización con urea y el número identifica las réplicas de cada tratamiento.	62
Figura 3.2. Análisis multivariado del conjunto de datos metagenómicos en la rizosfera de <i>Avena sativa</i> L. Las letras DQ indican desecación química, las letras CM corte mecánico y las letras SS sin supresión. La letra N indica fertilización con urea y el número identifica las réplicas de cada tratamiento. Los centroides se encuentran indicados con recuadros. El error estándar de CM, DQ y SS se indica con elipses de color negro, rojo y verde, respectivamente. El ordenamiento se llevó a cabo mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y métrica de distancia UniFrac generalizada. <i>Stress-value</i> = 0,113.	66
Figura 3.3. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (<i>loadings</i> > 0,5) según la Tabla 3.11 para la CP2. A) Valores medios de los scores de la CP2 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al	

valor medio de la CP2 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; CM: corte mecánico y SS: sin supresión)..... 71

Figura 3.4. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,5|) según la Tabla 3.11 para la CP3. A) Valores medios de los *scores* de la CP3 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP3 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; CM: corte mecánico y SS: sin supresión)..... 72

Figura 3.5. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,5|) según la Tabla 3.11 para la CP6. A) Valores medios de los *scores* de la CP6 para cada método de finalización dentro de cada nivel de fertilización con sus errores estándar (como barras de error). Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre niveles de fertilización dentro de un mismo método de finalización ($P < 0,05$) y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización dentro de cada nivel de fertilización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP6 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; CM: corte mecánico y SS: sin supresión) dentro de cada nivel de fertilización (sin N y con N). 73

Figura 4.1. Ubicación del sitio de estudio. Colonia Napostá, provincia de Buenos Aires, partido de Bahía Blanca, Argentina..... 84

Figura 4.2. Esquema representativo del diseño en bloques. Tratamientos: rolado (R), desecación química (DQ), barbecho (B). 84

Figura 4.3. A) Rolo utilizado para la supresión mecánica del CCI; B) CCI rolado. 85

Figura 4.4. CCI a los 13 días del secado con glifosato. 85

Figura 4.5. Curvas de rarefacción para las distintas muestras analizadas mediante *barcoded amplicon-sequencing*. Se indica el número de ASVs (“Species”) esperables para un número creciente de secuencias en cada muestra (“Sample size” o esfuerzo de muestreo). Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolado y las letras SS sin supresión. Los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento y en naranja se indican las muestras de 2018 y en azul las de 2019.... 99

Figura 4.6. Análisis multivariado del conjunto de datos metagenómicos en la rizosfera de *Avena sativa* L. Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolado y las letras SS sin supresión. Los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada método de finalización y el número 1 indica las muestras de 2018 y el número 2 las de 2019. Los centroides se encuentran indicados con recuadros. El error estándar de DQ, R y SS se indica con elipses de color negro, rojo y verde, respectivamente. El

ordenamiento se llevó a cabo mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y métrica de distancia UniFrac generalizada. *Stress-value*= 0,08..... 101

Figura 4.7. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,45|) según la Tabla 4.11 para la CP1. A) Valores medios de los scores de la CP1 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP1 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; R: rolado y SS: sin supresión)..... 105

Figura 4.8. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,45|) según la Tabla 4.11 para la CP3. A) Valores medios de los scores de la CP3 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP3 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; R: rolado y SS: sin supresión)..... 106

Figura 5.1. Esquema representativo del diseño en bloques. Tratamientos: rolado (R), rolado con P (RP), desecación química (DQ), desecación química con fósforo (DQP) y barbecho con fósforo (BP). 116

Figura 5.2. Precipitaciones (mm de agua). Datos cedidos por la Estación Meteorológica EMA NAPOSTÁ (38°25'49"S; 62°17'10.30"O). 117

Figura 5.3. A) Vista general del experimento de campo; B) Extracción de suelo rizosférico de una raíz de girasol. 118

Figura 5.4. Curvas de rarefacción para las distintas muestras analizadas mediante *barcoded amplicon-sequencing*. Se indica el número de ASVs ("Species") esperables para un número creciente de secuencias en cada muestra ("Sample size" o esfuerzo de muestreo). Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolado y la letra B barbecho. La letra P indica fertilización con fosfato diamónico y los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento. En naranja se indican las muestras de 2018 y en azul las de 2019. 128

Figura 5.5. Análisis multivariado del conjunto de datos metagenómicos en la rizosfera de girasol. Las letras indican los tratamientos BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P. Los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento y el número 1 indica las muestras de 2018 y el número 2 las de 2019. Los centroides se encuentran indicados con recuadros. El error estándar de BP, RP, R, DQP y DQ se indica con elipses de color negro, celeste, azul, verde y rojo, respectivamente. El ordenamiento se llevó a

cabo mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y métrica de distancia UniFrac generalizada. *Stress-value*= 0,16..... 131

Figura 5.6. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,45|) según la Tabla 5.10 para la CP1. A) Valores medios de los scores de la CP1 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP1 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P). 134

Figura 5.7. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,45|) según la Tabla 5.10 para la CP2. A) Valores medios de los scores de la CP2 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP2 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P). 135

Figura 5.8. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,45|) según la Tabla 5.10 para la CP3. A) Valores medios de los scores de la CP3 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP3 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P). 136

Figura 5.9. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,45|) según la Tabla 5.10 para la CP5. A) Valores medios de los scores de la CP5 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP5 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P). 137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características principales de los ensayos seleccionados para revisión.	8
Tabla 1.2. Parámetros microbianos medidos en los trabajos revisados.	11
Tabla 1.3. Lista de las especies de cultivos de cobertura invernales utilizadas en los trabajos revisados.	12
Tabla 1.4. Porcentaje de trabajos científicos analizados en la revisión sistemática que reportan cambios en indicadores de actividad, abundancia o diversidad microbiana.	21
Tabla 2.1. Tratamientos y designación de cada una de las muestras analizadas.	27
Tabla 2.2. Cebadores utilizados para qPCR.	30
Tabla 2.3. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para fósforo y fenoles totales en los exudados radicales. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	32
Tabla 2.4. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para el número de copias del gen <i>phnJ</i> (transformada a log ₁₀). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	38
Tabla 3.1. Cebadores utilizados para qPCR.	48
Tabla 3.2. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para fósforo total (Pt), fósforo extractable (Pe), nitrógeno total (Nt), amonio (N-NH ₄) y nitrato (N-NO ₃). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	53
Tabla 3.3. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para la actividad potencial nitrificante (APN). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	55

Tabla 3.4. Ecuaciones de las curvas estándar y eficiencias de las qPCR de cada gen indicador.	56
Tabla 3.5. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para el número de copias de los genes indicadores (transformada a \log_{10}). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	58
Tabla 3.6. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para la abundancia relativa (AR) de los genes indicadores. Relación entre el número de copias del gen indicador (BOA y AOA) y el gen ARNr 16S de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i> , respectivamente; relación entre el gen <i>amoA</i> de AOA y BOA; relación entre el gen <i>nirS</i> y <i>nirK</i> . Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	60
Tabla 3.7. Procesamiento de secuencias con QIIME 2. En la tabla se reporta el número de secuencias (sec.) obtenidas en los diferentes pasos del procesamiento.	61
Tabla 3.8. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los índices de diversidad α : Chao-1: índice de Chao-1 (riqueza estimada); S': riqueza observada (ASVs observados); $1/\lambda$: recíproco de Simpson; H': índice de Shannon; $E_{H'}$: índice de equitatividad de Shannon. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	64
Tabla 3.9. Análisis multivariado de la varianza no paramétrico (PERMANOVA) con 1000 permutaciones. <i>gl</i> : grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.	65
Tabla 3.10. Comparación de datos metagenómicos entre métodos de finalización utilizando la corrección de Benjamini & Hochberg ("fdr")	65
Tabla 3.11 Análisis de componentes principales usando la transformación de los datos <i>centered log ratio</i> (<i>clr</i>), con autovalor y proporción acumulada de la variabilidad del conjunto de datos explicada por las siete componentes principales (CP) (autovalor >1). Los autovectores con <i>loadings</i> > 0,5 están en negrita. En la parte de abajo de la tabla se detallan los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y los grados de libertad (<i>gl</i>) del análisis de la varianza (ANOVA) para los efectos de la fertilización (F), métodos de	

finalización (M) y su interacción (F×M). Valores de $P < 0,05$ que indican significancia estadística se muestran en negrita.	67
Tabla 3.12. Resultados del procedimiento de separación de medias para las componentes principales (CP) que mostraron una respuesta estadísticamente significativa del método de finalización (CP2 y CP3) y de la interacción (F×M) (CP6). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha ⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.	69
Tabla 4.1. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los métodos de finalización para la abundancia de bacterias heterotróficas aerobias cultivables e índices de biodiversidad (CD, índice de desarrollo de colonias y EP, índice eco-fisiológico). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).	92
Tabla 4.2. Valores de medias y errores estándares(ES) de las medias de los métodos de finalización para fósforo extractable(Pe), amonio(N-NH ₄) y nitrato (N-NO ₃). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).	93
Tabla 4.3. Valores de medias y errores estándares(ES) de las medias de los métodos de finalización para actividad potencial nitrificante (APN). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).	94
Tabla 4.4. Ecuaciones de las curvas estándar y eficiencias de las qPCR de cada gen indicador para muestras procesadas en 2018.	94
Tabla 4.5. Ecuaciones de las curvas estándar y eficiencias de las qPCR de cada gen indicador para muestras procesadas en 2019.	95
Tabla 4.6. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los métodos de finalización para el número de copias de los genes indicadores (transformada a log ₁₀). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).	96
Tabla 4.7. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los métodos de finalización para la abundancia relativa (AR) de distintos grupos microbianos. Relación entre el número de copias del gen indicador (BOA y AOA) y el gen ARNr 16S de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i> , respectivamente; relación entre el gen <i>amoA</i> de arqueas oxidantes del amoníaco (AOA) y bacterias oxidantes del amoníaco (BOA); relación entre el gen <i>nirS</i> y <i>nirK</i> . Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).	97

Tabla 4.8. Procesamiento de secuencias con QIIME 2. En la tabla se reporta el número de secuencias (sec.) obtenidas en los diferentes pasos del procesamiento.	98
Tabla 4.9. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los índices de diversidad alfa: Chao-1: índice de Chao-1 (riqueza estimada); S': riqueza observada (ASVs observados); $1/\lambda$: recíproco de Simpson; H': índice de Shannon; E_H : índice de equitatividad de Shannon. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).....	100
Tabla 4.10. Análisis multivariado de la varianza no paramétrico (PERMANOVA) con 1000 permutaciones. gl : grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.	101
Tabla 4.11. Análisis de componentes principales usando la transformación de los datos <i>centered log ratio</i> (clr), con autovalor y proporción acumulada de la variabilidad del conjunto de datos explicada por las siete componentes principales (CP) (autovalor > 1). Los autovectores con <i>loadings</i> $> 0,45 $ están en negrita. En la parte de abajo de la tabla se detallan los valores de probabilidad (P -valor) y los grados de libertad (gl) del análisis de la varianza (ANOVA) para los tratamientos. Valores de $P < 0,05$ que indican significancia estadística se muestran en negrita.	103
Tabla 4.12. Resultados del procedimiento de separación de medias para las componentes principales (CPs) que mostraron una respuesta estadísticamente significativa del método de finalización (CP1 y CP3). Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).....	104
Tabla 5.1. Riego suplementario.	116
Tabla 5.2. Tratamientos y designación de cada una de las muestras analizadas.	119
Tabla 5.3. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para P_e (fósforo extractable). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).....	123
Tabla 5.4. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los caracteres morfológicos medidos en estado vegetativo de girasol: N ^o h.V (número de hojas en vegetativo), Alt.V (altura en vegetativo) y PsTyH (peso seco de tallos y hojas). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).....	124
Tabla 5.5. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los caracteres morfológicos medidos en estado reproductivo de girasol: Alt.R6 (altura en R6), N ^o h.R6 (número de hojas en R6), DT (diámetro de tallo), DC (diámetro de capítulo), PsC (peso seco de capítulo). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl)	

asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).	125
Tabla 5.6. Procesamiento de secuencias con QIIME 2. En la tabla se reporta el número de secuencias (sec.) obtenidas en los diferentes pasos del procesamiento.	127
Tabla 5.7. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los índices de diversidad alfa: Chao-1: índice de Chao-1 (riqueza estimada); S': riqueza observada (ASVs observados); $1/\lambda$: recíproco de Simpson; H': índice de Shannon; E_H : índice de equitatividad de Shannon. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y grados de libertad (<i>gl</i>) asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).....	129
Tabla 5.8. Análisis multivariado de la varianza no paramétrico (PERMANOVA) con 1000 permutaciones. <i>gl</i> : grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.	130
Tabla 5.9. Comparación de datos metagenómicos entre métodos de finalización utilizando la corrección de Benjamini y Hochberg ("fdr")	130
Tabla 5.10. Análisis de componentes principales usando la transformación de los datos centered log ratio (clr), con autovalor y proporción acumulada de la variabilidad del conjunto de datos explicada por las ocho componentes principales (CP) (autovalor >1). Los autovectores con <i>loadings</i> > 0,45 están en negrita. En la parte de abajo de la tabla se detallan los valores de probabilidad (<i>P</i> -valor) y los grados de libertad (<i>gl</i>) del análisis de la varianza (ANOVA) para los tratamientos. Valores de $P < 0,05$ que indican significancia estadística se muestran en negrita.	132
Tabla 5.11. Resultados del procedimiento de separación de medias para las componentes principales (CP) que mostraron una respuesta estadísticamente significativa del tratamiento (CP 1, 2, 3 y 5). Tratamientos: BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P).	133

ABREVIATURAS

ACP: análisis de componentes principales

AIA: ácido indolacético

Alt.R6: altura de planta en reproductivo

Alt.V: altura de planta en vegetativo

*amoA*_{AOA}: gen codificante para la subunidad α de arqueas oxidantes del amoníaco

*amoA*_{BOA}: gen codificante para la subunidad α de bacterias oxidantes del amoníaco

AMPA: ácido aminometilfosfónico

ANOVA: análisis de la variancia

AOA: arqueas oxidantes del amoníaco

AR: abundancia relativa

ASVs: variantes de secuencia de amplicones

BHA: bacterias heterótrofas aerobias

BOA: bacterias oxidantes del amoníaco

C: carbono

CCI: cultivos de cobertura invernales

CD: índice de desarrollo de colonias

CP: componente principal

Ct. threshold cycle (ciclo umbral) de las curvas de amplificación de PCR en tiempo real

DC: diámetro de capítulo

DT: diámetro de tallo

EP: índice eco-fisiológico

FT: fenoles totales

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

GR: resistente a glifosato

HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

IA: ingrediente activo

LC: labranza convencional

MO: materia orgánica

N: nitrógeno

NMDS: escalamiento no métrico multidimensional

N-NH₄: nitrógeno de amonio

N-NO₃: nitrógeno de nitratos

N^oh.R6: número de hojas en reproductivo

N^oh.V: número de hojas en vegetativo

NPMANOVA: análisis multivariado de la variancia no paramétrico

Nt: nitrógeno total

P: fósforo

PAL: fenilalanina amonio liasa

Pe: fósforo extractable

PGPR: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Pi: fosfato inorgánico

PsC: peso seco de capítulo

PsTyH: peso seco de tallos y hojas

Pt: fósforo total

PT: fósforo total en los exudados

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o PCR en tiempo real

SD: siembra directa

SOB: sudoeste de la provincia de Buenos Aires

CAPÍTULO 1

EFFECTO DE LOS CULTIVOS DE COBERTURA INVERNALES SOBRE EL MICROBIOMA DEL SUELO: REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA

Publicado en: Revista Argentina de Microbiología (2021).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.008>

1. Introducción

Históricamente, los cultivos de cobertura invernales (CCI) han sido una parte integral de los sistemas de producción agrícola (Scholberg *et al.*, 2010). Sin embargo, debido a las innovaciones tecnológicas, se han dejado de usar muchas técnicas tradicionales utilizadas para mantener la fertilidad del suelo, incluido el uso CCI. A pesar de que las nuevas tecnologías hayan mejorado la productividad agrícola durante los últimos 60 años, esto trajo consigo problemáticas tales como la sobreexplotación o contaminación de los recursos hídricos, la erosión del suelo, la pérdida de la fertilidad, el aumento de malezas y plagas y la disminución de la biodiversidad (Scholberg *et al.*, 2010). En este contexto, la agricultura de conservación, en particular el uso de la labranza cero o siembra directa (SD), surgió como respuesta a los problemas de degradación de suelos ocasionados por la expansión e intensificación agrícola (Hobbs *et al.*, 2008). La SD combinada con rotación de cultivos se presenta como un sistema de manejo agrícola muy promisorio y sustentable (Pittelkow *et al.*, 2015). Los CCI son recomendados para complementar los efectos de la SD durante la época de barbecho, entre dos cultivos comerciales (usualmente cultivos de verano).

El término CCI no sólo hace referencia a proteger los suelos contra la erosión, sino que también hay beneficios específicos de los CCI asociados con las especies utilizadas. Por ejemplo, las leguminosas aportan nitrógeno (N) extra al suelo por fijación biológica, favorecen el control de malezas y mejoran la estructura del suelo (Hartwig y Ammon, 2002; Reddy y Koger, 2004; Rochester y Peoples, 2005; Campiglia *et al.*, 2010), en tanto que las gramíneas producen una gran cantidad de biomasa, absorben nitratos residuales y los devuelven al suelo en forma N orgánico, reducen la erosión del suelo y compiten con las malezas invernales (Baraibar *et al.*, 2018; Krueger *et al.*, 2011; Restovich *et al.*, 2012; Zotarelli *et al.*, 2009). Las crucíferas son también muy utilizadas por su potencial para reducir la compactación de suelos (Chen *et al.*, 2014) y controlar patógenos y malezas (Haramoto y Gallandt, 2004; Hossain *et al.*, 2015). Frecuentemente, una mezcla de CCI se compone de especies de diferentes familias (generalmente leguminosas, gramíneas y crucíferas) con características funcionales diferentes. Los CCI multiespecies pueden aportar más beneficios que los CCI monoespecíficos (Blanco-Canqui *et al.*, 2015). Por ejemplo, las mezclas de especies aumentan la producción de

compuestos con efecto fungicida (Couëdel *et al.*, 2018), la supresión de malezas (Smith *et al.*, 2020) y pueden producir más o igual cantidad de biomasa y contenido de N que un cultivo monoespecífico (Thapa *et al.*, 2018).

En el sistema de SD, el crecimiento vegetativo de los CCI se suprime con herbicidas, con labores mecánicas (por ejemplo, corte o rolado) o con una combinación de los dos métodos (por ejemplo, glifosato + rolado) previo a la siembra del cultivo comercial, no son pastoreados, cosechados, ni incorporados al suelo por labranza (Alvarez *et al.*, 2017; Baigorria *et al.*, 2019; Rimski-Korsakov *et al.*, 2015; Shackelford *et al.*, 2019). El método de supresión que más se utiliza es el control químico, a través del empleo de distintos principios activos según la especie en cuestión y los cultivos que siguen en la rotación. El glifosato [N-(fosfonometil)glicina] es el herbicida más utilizado con esta finalidad.

A nivel mundial, el consumo anual de glifosato se estima en 8,6 millones de toneladas, liderado por Estados Unidos, Argentina y Brasil (Benbrook, 2016). Es un herbicida sistémico, no selectivo, de amplio espectro que se aplica durante el barbecho y/o el crecimiento del cultivo comercial resistente (GR o RR), pero más recientemente se está empleando para suprimir el crecimiento vegetativo de los CCI (Cuhra *et al.*, 2016; Ortega y Salamone, 2017). El uso de glifosato en Argentina ha aumentado significativamente desde 1996 a 2014, llegando a aplicarse 3-4 kg del ingrediente activo (IA) por hectárea (Bøhn y Millstone, 2019). Estas dosis representan el doble de las recomendadas en la mayoría de los ensayos a campo, es decir, 1,72 kg ha⁻¹ de IA (Duke *et al.*, 2018).

Los CCI también pueden ser finalizados por métodos que no emplean agentes químicos como el corte o el rolado. El corte ha sido uno de los métodos más comunes utilizados por los agricultores para finalizar mecánicamente los CCI. Éste consiste en cortar el CCI en su base para formar un manto superficial de residuos (*mulch*) (Creamer y Dabney, 2002). El rolado se realiza con un rolo que consiste de un cilindro hueco, el cual puede ser lastrado con agua para conseguir una mayor eficiencia de trabajo, de 30 a 60 cm de diámetro y lleva abulonado helicoidalmente o en forma recta cuchillas de 8 a 10 cm de alto y sin filo, daña el tejido vascular de las plantas y provoca el secado sin cortar ni arrancar los tallos, sino mellándolos y minimizando los riesgos de rebrote (Creamer y Dabney, 2002). A diferencia del corte, el rolado permite que el residuo del CCI se deposite uniformemente sobre la superficie del suelo y se descomponga más lentamente, mejorando así la supresión de malezas (Creamer *et al.*, 1995; Dorn *et al.*, 2013). El rolado se ha utilizado durante muchos años en el sur de Brasil y Paraguay para la finalización de los CCI en sistemas de labranza conservacionista (Ashford y Reeves, 2003). Sin embargo, en Argentina es una alternativa poco utilizada por los productores agrícolas.

Diferentes especies de CCI pueden ser suprimidas mecánicamente, pero la susceptibilidad a esta técnica depende de su estado fenológico. Por ejemplo, en centeno (*Secale cereale* L.) el período más recomendado para el secado es durante la antesis (Z6.1) ya que en esta etapa se minimizan los riesgos

de rebrote, mejora la infiltración de agua y la supresión de malezas (Mirsky *et al.*, 2009). El empleo de los CCI junto con el secado mecánico de los mismos permite disminuir la utilización de herbicidas y, por consiguiente, reducir el impacto ambiental comparado a un manejo tradicional (Baigorria *et al.*, 2019).

Dada la importancia de los CCI como práctica de manejo sustentable tanto para la conservación y mejora de la calidad del suelo como para la retención de nutrientes, es importante dilucidar los efectos de la introducción de los cultivos en la rotación sobre la salud del suelo. La “calidad” del suelo ha sido definida como la “capacidad del suelo de funcionar en forma continuada como un sistema vital viviente de acuerdo con los límites de los ecosistemas y de manejo de la tierra, de sustentar la productividad biológica, promover la calidad del aire y del agua, y mantener la salud animal, humana y de las plantas” (Doran y Zeiss, 2000). Más recientemente, se ha introducido también el concepto de suelo saludable como parte del concepto de calidad del suelo, definiéndose al mismo como un sistema estable con altos niveles de diversidad biológica, actividad, ciclado de nutrientes y resiliencia ante distintos disturbios (Van Bruggen *et al.*, 2006). La calidad del suelo puede ser estimada y cuantificada a través de la evaluación de parámetros físicos, químicos, bioquímicos y biológicos (Bünemann *et al.*, 2018). Los parámetros físicos y químicos de suelo han sido ampliamente evaluados como indicadores de calidad (Arshad y Coen, 1992; Schoenholtz *et al.*, 2000), mostrando sensibilidad a los cambios, pero al ser más estables, las modificaciones como resultado de los disturbios son detectados en el mediano a largo plazo. Dentro de las propiedades físicas del suelo se destacan: capacidad de almacenamiento del agua, estructura, densidad aparente, estabilidad de agregados, infiltración, profundidad del suelo, conductividad hidráulica y porosidad. Entre los indicadores químicos, los de uso más frecuente son: materia orgánica (MO)/ carbono (C), pH, disponibilidad de macro y micronutrientes, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio de catiónico, sodicidad y salinidad. Entre los parámetros biológicos, los microorganismos del suelo y sus funciones han sido reconocidos como componentes integrales de calidad del suelo dado que están involucrados en procesos claves que permiten mantener las funciones del suelo, como la formación de la estructura, la descomposición de la MO, el ciclado de nutrientes y la degradación de contaminantes (Barrios, 2007; Zabaloy *et al.*, 2008; Cuhra, 2018; Wang *et al.*, 2019; Lehmann *et al.*, 2020). Además, son capaces de responder rápidamente a perturbaciones externas dado que por su alta relación superficie: volumen establecen una íntima relación con el entorno (Bastida *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2010; Zabaloy *et al.*, 2011). Por lo tanto, los indicadores microbianos se utilizan para monitorear la calidad del suelo por ser sensibles a factores ambientales, prácticas de manejo, tipo de suelo y especies vegetales (García-Orenes *et al.*, 2010; Gonzalez-Quñones *et al.*, 2011; Marinari *et al.*, 2015; Allegrini *et al.*, 2019; de Graaff *et al.*, 2019). Los indicadores microbiológicos pueden ser clasificados en tres grupos de acuerdo a la información que ellos proveen: 1) abundancia microbiana, definida como el componente vivo de la MO del suelo: incluye medidas de C y N de la

biomasa microbiana (BM), unidades formadoras de colonias (UFC), ácidos grasos fosfolipídicos (PLFA), abundancia de grupos filogenéticos específicos (PCR-cuantitativa); 2) actividad microbiana: indicadores de respiración microbiana, actividad enzimática, nitrificación potencial; 3) diversidad y composición microbiana, definida como el número de diferentes taxones (riqueza) y la abundancia relativa de los diferentes grupos (equitatividad o *evenness*) (Kennedy y Smith, 1995): análisis de perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP) para estudiar la diversidad funcional microbiana, índices de diversidad α [índice de Shannon (H'), el recíproco del índice de Simpson ($1/\lambda$), índice de equitatividad de Shannon (E_H), número de unidades taxonómicas operativas (OTUs) observados e índice de Chao-1] y diversidad β de hongos y bacterias.

Numerosos estudios han analizado los efectos de los CCI sobre el microbioma del suelo, reportando aumentos en la biomasa microbiana (Balota *et al.*, 2014), actividad enzimática (Hontoria *et al.*, 2019) y diversidad fisiológica (Chavarría *et al.*, 2016a). En tanto, un reciente metanálisis publicado por Alvarez *et al.*, (2017) reporta interesantes resultados para la región pampeana en cuanto a la introducción de CCI en rotación con soja o maíz. En ese estudio observaron que tanto las propiedades físicas y químicas de los suelos mejoraban en general, mientras que el rinde de maíz también aumentó significativamente con el uso de CCI leguminosas. Sin embargo, este estudio no evaluó los efectos de los CCI sobre las propiedades microbianas del suelo, por lo cual resulta necesaria una revisión sobre este tema.

Hay varios metanálisis sobre temas similares, pero algunos de estos estudios no son específicos de CCI, se limitan a un grupo taxonómico en particular o evalúan sólo algunos parámetros microbianos (McDaniel *et al.*, 2014; Venter *et al.*, 2016; Bowles *et al.*, 2016; Daryanto *et al.*, 2018; Hallama *et al.*, 2019). En el metanálisis realizado por Bowles *et al.*, (2016) informaron efectos positivos de los cultivos de cobertura (CC) sobre la colonización microbiana de las raíces de cultivos de verano, pero estudiaron sólo los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). McDaniel *et al.*, (2014) en su metanálisis analizó el efecto de la rotación de cultivos y el manejo sobre la dinámica de la MO del suelo y encontraron que la rotación de cultivos, especialmente aquellas que incluyeron CC, mantuvieron la calidad y productividad del suelo aumentando el C y N total y la biomasa microbiana (CBM y NBM). Otro metanálisis reportó que la diversidad de cultivos en rotación aumentó la riqueza y diversidad microbiana del suelo (Venter *et al.*, 2016). Sin embargo, ninguno de estos dos trabajos citados investigó específicamente sobre CC.

El reciente metanálisis realizado por Kim *et al.*, (2020) fue el primero en estudiar el impacto de los CC sobre el microbioma edáfico. Los autores reportaron que los CC tienen efectos significativos en comparación con los barbechos desnudos, incrementando en promedio los parámetros de abundancia, actividad y diversidad microbiana (Kim *et al.*, 2020). Sin embargo, este metanálisis incluyó trabajos sobre abonos verdes (es decir, cultivos que se incorporan al suelo por labranza) y no son considerados como CCI en la presente revisión.

Entender la relación entre los CCI y la comunidad microbiana del suelo es fundamental debido a la influencia que tienen sobre la productividad del cultivo comercial y el beneficio para el agroecosistema. Los CCI pueden afectar su microbioma rizosférico y del cultivo sucesor al cambiar las características del suelo (por ejemplo, pH, temperatura y humedad), además ofrecen sustratos orgánicos adicionales a través de la entrada de residuos vegetales y la rizodeposición (Castellano-Hinojosa y Strauss, 2020). Algunos autores han reportado que los CCI mejoran ciertos parámetros micorrícicos indicativos de abundancia en la rizosfera del cultivo sucesor (García-González *et al.*, 2016, 2018; Hontoria *et al.*, 2019). Sin embargo, estos trabajos se limitaron a estudiar sólo a un grupo taxonómico en particular (HMA). Por lo que, se necesita más información primaria del efecto de los CCI sobre otros grupos rizosféricos.

La rizosfera es un área del suelo de particular relevancia para el estudio de los efectos de las prácticas de manejo aplicadas a los CCI debido a que es un lugar clave para la vida de muchos microorganismos y los procesos que ellos desempeñan, y se caracteriza por ser el hábitat de un elevado número de organismos con altas tasas de actividad ("hotspots") (Kuzyakov y Blagodatskaya, 2015). La elevada actividad microbiana es consecuencia de la exudación de compuestos carbonados como azúcares solubles, aminoácidos o metabolitos secundarios. Se estima que alrededor del 11% del C fijado fotosintéticamente o el 27% del C asignado a las raíces se exuda a la rizosfera como azúcares solubles, aminoácidos o metabolitos secundarios, aunque este porcentaje puede variar según la especie vegetal, la edad y el estado nutricional de la planta (Vives-Peris *et al.*, 2020). Estos exudados y otros rizodepositos proveen nutrientes y modulan la actividad y composición microbiana en la rizosfera (Bais *et al.*, 2006; Badri y Vivanco, 2009). Ésta es muy compleja tanto cualitativa como cuantitativamente, ya que puede contener más de 10^{11} células microbianas por gramo de raíz y 30.000 especies de procariontas (Avis *et al.*, 2008; Berendsen *et al.*, 2012). Se ha reportado a los filos bacterianos Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria y Bacteroidetes, y de hongos Ascomycota y Basidiomycota como los más abundantes en la rizosfera (Trivedi *et al.*, 2020; Bano y Zhang, 2021). El término "microbioma de la rizosfera" alude al conjunto de comunidades microbianas en estrecha relación con las raíces de la planta (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). Por lo tanto, la diversidad de microorganismos presentes en la rizosfera cumpliría un rol importante en mejorar el crecimiento, desarrollo, nutrición y control de enfermedades en plantas, así como en su resistencia a estreses bióticos y abióticos (Kumar y Dubey, 2020; Ray *et al.*, 2020).

La rizodeposición se ve afectada cualitativa y cuantitativamente por una serie de factores bióticos y abióticos asociados con la planta y el suelo (Prashar *et al.*, 2014). Es decir, el pH del suelo, salinidad, textura, humedad, contenido de MO, de nutrientes y prácticas de manejo como riego, labranza, cultivo, aplicación de fertilizantes y pesticidas, incorporación de residuos, etc., han sido reportados como los principales factores que afectan la composición microbiana en la rizosfera (Dey *et al.*, 2012; Philippot

et al., 2013; Chaparro *et al.*, 2014; Prashar *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2021). Por ejemplo, Newman *et al.*, (2016) observaron, mediante un estudio de secuenciación de amplicones del ARNr 16S, que la aplicación de glifosato aumentó la abundancia relativa del filo Proteobacteria (particularmente Gammaproteobacteria) en la rizosfera tanto de cultivos de soja como de maíz GR, mientras que disminuyó la abundancia relativa del filo Acidobacteria. Dado que los miembros de este grupo desempeñan funciones importantes en los procesos biogeoquímicos, se concluyó que dicha disminución podría conducir a cambios significativos en el estado nutricional de la rizosfera (Newman *et al.*, 2016). Por otro lado, en un ensayo bajo condiciones controladas, evaluando la rizosfera de plantas sensibles a glifosato (*Avena sativa* L.) Allegrini *et al.*, (2019) observaron una mayor abundancia del filo Betaproteobacteria y el género *Mesorhizobium* en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato, mientras que el corte mecánico favoreció al filo Verrucomicrobia y al género *Gaiella*. Los efectos del glifosato sobre los microorganismos rizosféricos podrían ser directos, ya que el glifosato puede liberarse a la rizosfera o indirectos a través de cambios fisiológicos que experimentan las plantas durante el proceso de senescencia después de su aplicación (Neumann *et al.*, 2006; Tesfamariam *et al.*, 2009; Duke *et al.*, 2012).

Por tanto, esta revisión sistemática tiene como objetivo analizar el efecto que tiene la inclusión de CCI en suelos bajo un sistema de SD en rotación con cultivos de verano sobre la abundancia, actividad y diversidad microbiana del suelo vs. el barbecho desnudo, y a la vez, identificar aspectos del conocimiento que deberían explorarse para contribuir a un entendimiento más completo del tema.

2. Métodos

2.1. Criterios de selección

En marzo de 2020, se realizó una revisión sistemática de literatura en las bases de datos disponibles online. Las palabras clave que se utilizaron para realizar esta búsqueda fueron una combinación de “cover crop*” y “microbial” o “microb*”. La búsqueda inicial se llevó a cabo en SCOPUS y arrojó un total de 464 artículos que fueron seleccionados por título y resumen. También se examinó la literatura citada en los estudios que cumplieron con nuestros criterios, y se expandió la búsqueda aún más con Google Scholar, ScienceDirect, AGRICOLA y Wiley Online Library. Los criterios que se adoptaron para incluir un artículo en este trabajo de revisión fueron: 1) ensayo de campo bajo SD, 2) presencia de tratamiento control (barbecho desnudo) y de al menos un tratamiento identificado como CCI, 3) nombre científico de las especies empleadas, 4) CCI no cosechados, incorporados ni pastoreados, 5) diseño experimental claramente descrito, 6) fecha de muestreo del suelo, 7) cultivo anual de verano como sucesor del CCI.

Además, no se extrajeron datos de trabajos: a) que no informaran explícitamente la supresión de los CCI; b) parcelas que fueron inoculadas con patógenos, plagas o malezas; c) comparaciones en la

que una enmienda orgánica se agregó sólo a parcelas con CCI y no a parcelas con barbecho o viceversa. En los trabajos que compararon CCI con labranza convencional (LC) y SD sólo se consideró la comparación con SD. A su vez, en los trabajos en los que compararon un tratamiento control sin CCI con varios CCI (multiespecie o monoespecífico), se analizó cada tratamiento CCI por separado versus el control. Después de aplicar estos criterios se retuvieron 22 trabajos (Tabla 1.1), que reportaron 36 parámetros microbianos (Tabla 1.2). Este proceso de búsqueda se describe en la Figura 1.1 mediante el diagrama PRISMA (Moher *et al.*, 2009).

En la Tabla 1.3 se muestran las especies de CCI que se utilizaron en los distintos trabajos. Entre los cultivos comerciales sucesores de los CCI se incluyeron: soja (*Glycine max* L. Merr), maíz (*Zea mays* L.), sorgo forrajero (*Sorghum bicolor* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.).

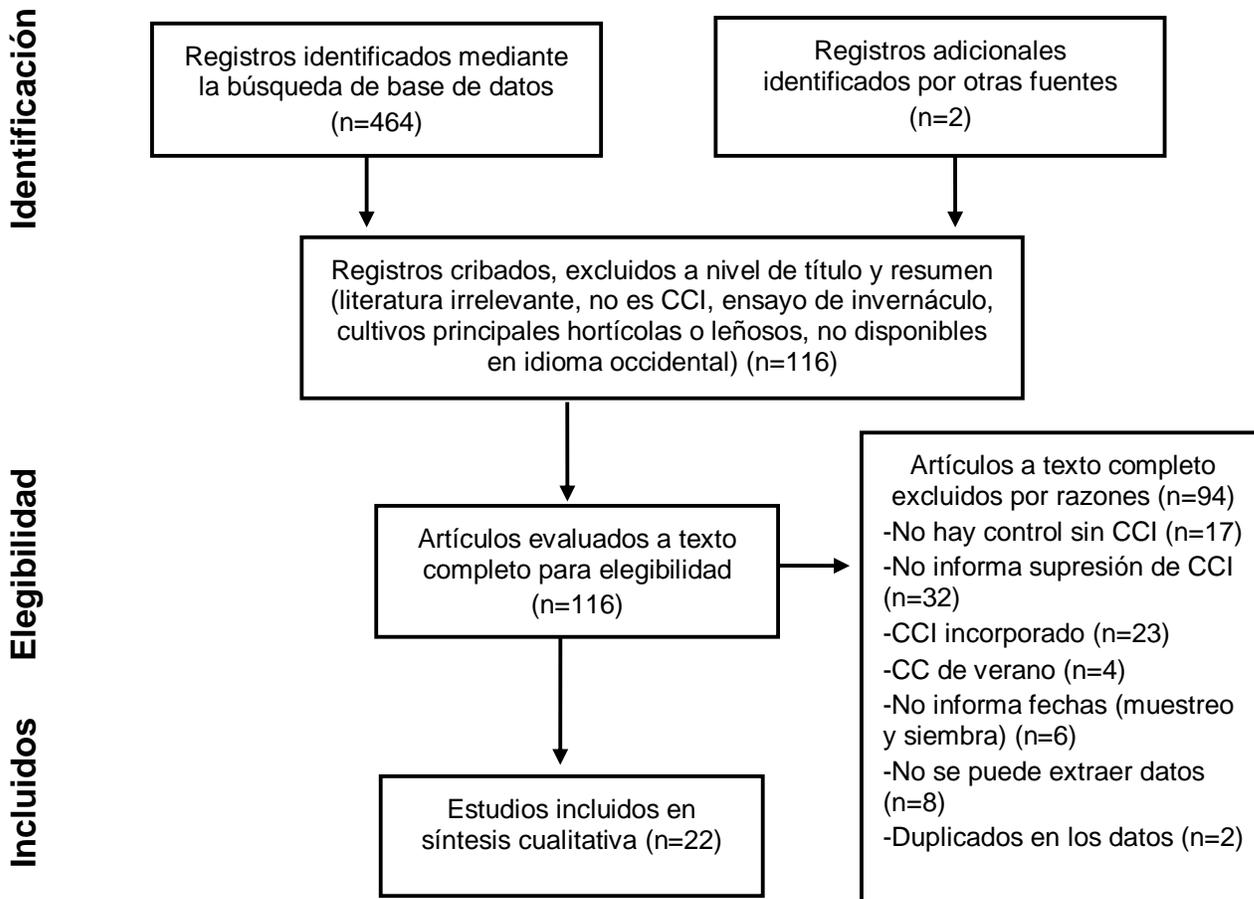


Figura 1.1. Diagrama PRISMA.

Tabla 1.1. Características principales de los ensayos seleccionados para revisión.

Referencias	País	Cultivo de cobertura invernal (CCI)	Tipo de supresión	Cultivo de verano (CV)	Duración (años)	Momento de muestreo	Parámetros microbianos
Wagner <i>et al.</i> , (1995)	EE. UU.	Ra, C, Vv	Química	Girasol, Soja	1	0,14, 35, 56 DDS algodón y 0, 21, 42, 77 DDS soja	UFC, NBM, FDA, arilsulfatasa, aril-acilamidasa, fosfatasa alcalina
Reddy <i>et al.</i> , (2003)	EE. UU.	Te, C	Química	Soja	4	30 DDS CV	UFC de bacterias y hongos cultivables, FDA
Zablotowicz <i>et al.</i> , (2007)	EE. UU.	Ra	Química	Algodón	2	Post-supresión (30 días)	UFC, FDA y aril-acilamidasa
White y Weil, (2010)	EE. UU.	N, C	Química	Maíz	2	Durante CV	PCM de HMA
Acosta-Martínez <i>et al.</i> , (2010)	EE. UU.	C	Química	Sorgo, Algodón	5	Cosecha CV	CBM, NBM, FAME, β -glucosidasa, α -galactosidasa y β -glucosaminidasa, fosfatasa alcalina, PDE, arilsulfatasa Chao-1 (pirosecuenciación del gen del ARNr 16S)
Zhou <i>et al.</i> , (2012)	Australia	C, T, An, Vv, Ar, Mc, (C+Vv)	Mecánica		<1	Supresión CCI	CBM, NBM, SIR, índice de Shannon e índice de equitatividad
Tiecher <i>et al.</i> , (2012)	Brasil	An, T, N, La, Vv	Mecánica + química	Soja, Maíz	23	Floración CCI	PBM y AP
Locke <i>et al.</i> , (2013)	EE. UU.	Tb, C	Química	Algodón	6	Post-supresión (14-20 días)	FAME, infección micorrízica y FDA
Liang <i>et al.</i> , (2014)	EE. UU.	Ar, Vv, Te	Mecánica, química	Maíz	1	Durante CV	CBM, nitrificación potencial, β -glucosidasa y β -glucosaminidasa

Balota <i>et al.</i> , (2014)	Brasil	An, T, N, La, Vv	Mecánica+ química	Soja, Maíz	23	Floración CCI	CBM, NBM, qCO ₂ , arilsulfatasa, AP, PT, PL, EE- GRSP, T-GRSP
Varela <i>et al.</i> , (2014)	Argentina	A, C, Ra	Química	Soja	6	Durante CCI (otoño, invierno, primavera)	SIR y FDA
Mbuthia <i>et al.</i> , (2015)	EE. UU.	T, Vv	Química	Algodón	31	25 DDS CV	CBM, NBM, FAME, RM, β- glucosaminidasa
Chavarría <i>et al.</i> , (2016a)	Argentina	(A+N), (A+N+Vc)	Química	Soja, Maíz	3	Durante CV y Supresión CCI	CLPP, FDA, DHA y RM
Chavarría <i>et al.</i> , (2016b)	Argentina	(A+N), (A+N+Vc)	Química	Soja, Maíz	3	Durante CV	CBM, FDA, DHA y FAME
Frasier <i>et al.</i> , (2016)	Argentina	C, Vv, (C+Vv)	Química	Sorgo	3	Durante CV	CBM, NBM, FAME, abundancia de hongos (ARNr 18S) y bacterias (ARNr 16S)
Zhou <i>et al.</i> , (2016)	Australia	C, T, An, Vv, Ar, Mc, (C+Vv)	Mecánica		1	Post- supresión CCI	CBM y NBM
García-González <i>et al.</i> , (2016)	España	Cb, Vv	Química	Girasol, Maíz	7	95 DDS girasol, 54 y 69 DDS maíz	LH, número de esporas de HMA, β-glucosaminidasa y la EE-GRSP
Mukumbareza <i>et al.</i> , (2016)	Sudáfrica	A, V, (A+V)	Química	Maíz	2	Post- supresión (14 días)	CBM, β-glucosidasa, ureasa, DHA, arilsulfatasa, fosfatasa ácida y alcalina
Chavarria <i>et al.</i> , (2018)	Argentina	A+N+Vc	Química	Soja, Maíz	11	Cosecha CV	CBM, RM, FDA, AP, abundancia genes de hongos (ARNr 18S) y bacterias (ARNr 16S)
Nevins <i>et al.</i> , (2018)	EE. UU.	Vv, C, (Vv+C)	Química	Maíz	1	41 DDS CV	β-glucosidasa, secuenciación del gen del ARNr 16S, índice de equitatividad de Simpson y Chao-1
García-González <i>et al.</i> , (2018)	España	Cb, Vv	Química	Maíz	8	21, 36, 52 y 67 DDS CV	LH, número de esporas, PCM de HMA y EE-GRSP

Hontoria <i>et al.</i> , (2019)	España	Cb, Vc	Química	Maíz	10	28 DDS CV	PCM, LH, CBM, β -glucosidasa, ureasa, secuenciación del gen del ARNr 18S, riqueza (S') y diversidad (H') de HMA
---------------------------------	--------	--------	---------	------	----	-----------	---

Cultivos de cobertura invernales= Avena (A), Centeno (C), Cebada (Cb), Trigo (T), Avena negra (An), Raigrás anual (Ra), Trébol encarnado (Te), Vicia común (Vc), *Vicia villosa* (Vv), Vicia (V), Lupino azul (La), Arveja (Ar), Trébol balansa (Tb), Nabo (N), Mostaza castaña (Mc).

Parámetros microbianos= carbono de la biomasa microbiana (CBM), nitrógeno de la biomasa microbiana (NBM), fósforo de la biomasa microbiana (PBM), metil ésteres de ácidos grasos fosfolipídicos (FAME), unidades formadoras de colonias (UFC), porcentaje de colonización micorrícica (PCM), longitud de hifas (LH), número de esporas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), fracción fácilmente extraíble-proteína del suelo relacionada con glomalina (EE-GRSP), proteínas del suelo relacionadas con glomalina total (T-GRSP), polisacáridos lábiles (PL), polisacáridos totales (PT), deshidrogenasa (DHA), diacetato de fluoresceína (FDA), actividad fosfatasa ácida (AP), actividad de la fosfodiesterasa (PDE), respiración microbiana (RM), cociente metabólico (qCO_2), actividad potencial nitrificante (APN), respiración inducida por el sustrato (SIR), perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP), riqueza [número de OTUs observados (S')], índice de diversidad de Shannon (H'), riqueza de especies (Chao-1).

DDS= días después de la siembra

Tabla 1.2. Parámetros microbianos medidos en los trabajos revisados.

Parámetros microbianos de abundancia

Carbono de la biomasa microbiana (CBM)
 Nitrógeno de la biomasa microbiana (NBM)
 Fósforo de la biomasa microbiana (PBM)
 Copias del gen ARNr 16S (bacterias totales)
 Copias del gen ARNr 18S (hongos totales)
 Metil ésteres de ácidos grasos fosfolipídicos (FAME)
 Unidades formadoras de colonias (UFC)
 Porcentaje de colonización micorrícica (PCM)
 Longitud de hifas (LH)
 Número de esporas de HMA

Parámetros microbianos de actividad

Fracción fácilmente extraíble-proteína del suelo relacionada con glomalina (EE-GRSP)
 Proteínas del suelo relacionadas con glomalina total (T-GRSP)
 Polisacáridos lábiles (PL)
 Polisacáridos totales (PT)
 Diacetato de fluoresceína (FDA)
 Deshidrogenasa (DHA)
 Actividad fosfatasa alcalina
 Actividad fosfatasa ácida (AP)
 β -glucosidasa
 β -glucosaminidasa
 Arilsulfatasa
 Ureasa
 Aril-acilamidasa
 α -galactosidasa
 Actividad de la fosfodiesterasa (PDE)
 Respiración microbiana (RM)
 Cociente metabólico (qCO_2)
 Actividad potencial nitrificante (APN)
 Respiración inducida por el sustrato (SIR)

Parámetros microbianos de diversidad

Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP)
 Secuenciación del gen del ARNr 16S
 Secuenciación del gen del ARNr 18S
 Índice de equitatividad de Simpson
 Recíproco de Simpson ($1/\lambda$)
 Riqueza de especies (Chao-1)
 Riqueza [número de OTUs observados (S')]
 Índice de Shannon (H')

Tabla 1.3. Lista de las especies de cultivos de cobertura invernales utilizadas en los trabajos revisados.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Poaceae	<i>Avena sativa</i> L.	Avena
	<i>Secale cereale</i> L.	Centeno
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Cebada
	<i>Triticum aestivum</i> L.	Trigo
	<i>Avena strigosa</i> Schreb	Avena negra
	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Raigrás anual
	Fabaceae	<i>Trifolium incarnatum</i> L.
<i>Vicia sativa</i> L.		Vicia común
<i>Vicia villosa</i> Roth.		Vicia villosa
<i>Vicia dasycarpa</i> L.		Vicia
<i>Lupinus angustifolius</i> L.		Lupino azul
<i>Pisum sativum</i> L.		Arveja
<i>Trifolium michelianum</i> Savi		Trébol balansa
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i> L.	Nabo
	<i>Brassica juncea</i> L.	Mostaza castaña

3. Resultados

3.1. Cultivos de cobertura de invierno multiespecies

Las mezclas de gramíneas y leguminosas fueron las más utilizadas y estudiadas, tanto por su importancia ecológica como por razones prácticas. Para el productor agropecuario una mayor diversidad de CCI implica un aumento en los costos de las semillas y la dificultad para establecer y manejar mezclas complejas, particularmente si las especies de cultivo tienen tamaños de semillas, tasas de crecimiento y requerimientos de terminación muy diferentes (Wortman *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014).

Chavarría *et al.*, (2016a) en un ensayo de corto plazo analizaron las funciones de las comunidades de microorganismos del suelo en dos momentos diferentes de muestreo (a cosecha de los cultivos comerciales y desecación de los CCI) en relación a la introducción de diferentes especies de cultivos de cobertura, sembrados en mezclas (CC1: avena, vicia común y nabo; CC2: avena y nabo), en rotación con soja/maíz y soja en monocultivo. Los autores observaron diferencias significativas en la respiración de sustratos carbonados específicos indicando un mejoramiento de la diversidad catabólica en tratamientos con CCI (CC1 y CC2) en comparación con el tratamiento sin CCI. Este efecto

estuvo, además, asociado a un aumento en la actividad microbiana (FDA, DHA y RM) en los dos momentos de muestreo. Asimismo, los autores observaron un incremento en la biomasa microbiana (CBM) y un aumento en la abundancia de bacterias (particularmente en FAME de las poblaciones de bacterias gram positivas) en muestras tomadas a cosecha del cultivo sucesor (Chavarría *et al.*, 2016b). Sin embargo, un estudio posterior realizado con las mismas especies de CCI en la rotación con soja/maíz, no encontró diferencias significativas en la abundancia de hongos ni de bacterias totales (copias de genes ribosomales ARNr 18S y ARNr 16S, respectivamente), ni en el CBM y sólo la actividad enzimática (FDA y AP) se incrementó con la inclusión de CCI con respecto al control (Chavarría *et al.*, 2018).

Por otro lado, numerosos estudios (Zhou *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2016; Frasier *et al.*, 2016; Mukumbareza *et al.*, 2016; Nevins *et al.*, 2018) analizaron el efecto de diferentes especies de CCI (leguminosas y gramíneas) sembradas en mezclas sobre los microorganismos del suelo. La mezcla de *V. villosa* y centeno como CCI antecesores de sorgo forrajero (cultivo principal) produjo un aumento en algunos parámetros indicativos de biomasa microbiana (CBM, NBM y abundancia de bacterias totales) pero una menor abundancia de hongos (copias del gen ARNr 18S) en la mezcla de CCI con respecto al control sin CCI, el primer año de la rotación en un experimento de tres años de duración (Frasier *et al.*, 2016). Al término del ensayo, después de 3 años de rotación, los autores encontraron un aumento en la abundancia de bacterias (específicamente, FAME de bacterias gram positivas), en muestras de suelo tomadas durante el crecimiento del cultivo principal (Frasier *et al.*, 2016). Esta misma mezcla de CCI en rotación con maíz produjo un aumento en la actividad de la enzima β -glucosidasa en comparación con el control, en muestras de suelos tomadas durante el crecimiento del cultivo sucesor (Nevins *et al.*, 2018). La secuenciación profunda del gen del ARNr 16S en esas muestras mostró disímiles resultados en los índices de diversidad alfa: el índice de equitatividad de Simpson resultó mayor en *V. villosa* + centeno con respecto al control, reflejando una distribución más uniforme entre taxones bacterianos, mientras que la riqueza de especies (Chao-1) no fue afectada (Nevins *et al.*, 2018). En un ensayo de similar composición florística, se evaluaron distintos porcentajes de mezcla de avena y vicia como CCI en rotación con maíz (Mukumbareza *et al.*, 2016). A pesar de la proximidad temporal entre el disturbio propio de la supresión del CCI y el muestreo, realizado dos semanas después, se detectó un aumento en el CBM y una mayor actividad enzimática (β -glucosidasa, ureasa, DHA, arilsulfatasa, fosfatasa ácida y alcalina) en las distintas mezclas de CCI (90%/10%, 70%/30%, 50%/50% de avena/vicia, respectivamente) con respecto al control sin CCI (Mukumbareza *et al.*, 2016). Asimismo, Zhou *et al.*, (2012) evaluaron la mezcla de *V. villosa* y centeno en un estudio de corto plazo, en el cual el CCI fue finalizado por labores mecánicas y las muestras de suelo tomadas en el momento en que se suprimió el CCI. Los autores de este trabajo reportaron que la actividad (SIR medido en sistema MicroResp®) y la diversidad catabólica (índice de diversidad metabólica de Shannon, H' e

índice de equitatividad) fueron mayores con la mezcla de CCI con respecto al control, mientras que no observaron diferencias en la biomasa microbiana (CBM y NBM) (Zhou *et al.*, 2012). En contraste, después de ocho meses de descomposición de los residuos de los CCI Zhou *et al.*, (2016) encontraron una mayor biomasa microbiana (CBM y NBM) con *V. villosa* + centeno con respecto al control sin CCI.

3.2. Cultivos de cobertura de invierno mono-específicos

Generalmente, en los trabajos revisados se ha elegido una sola especie de CCI para ser incluida en la rotación con cultivos de verano. En un ensayo de larga duración (7 años) la cebada como CCI antecesor de girasol incrementó un 80% la longitud de las hifas de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y la actividad microbiana (β -glucosaminidasa y EE-GRSP) y un 30% el número de esporas con respecto al suelo desnudo, en muestras de raíces y suelo tomadas 95 días después de la siembra (DDS) de girasol. En tanto, en rotación con maíz estos incrementos fueron de un 60-70% en la longitud de las hifas y en el número de esporas y del 100% para la actividad enzimática con respecto al control, en muestras tomadas 54 y 69 DDS de maíz (García-González *et al.*, 2016). En contraste, al utilizar la *V. villosa* como CCI antecesor de girasol o maíz no observaron mejoras en la mayoría de los parámetros micorrícicos, con excepción de una mayor actividad enzimática con respecto al control sin CCI (García-González *et al.*, 2016). Después de 8 años de rotación, la cebada como CCI antecesor de maíz mantuvo el efecto positivo sobre los indicadores de abundancia (LH, número de esporas y PCM) y actividad microbiana (EE-GRSP) con respecto al barbecho, mientras que el tratamiento con *V. villosa* como CCI no incidió positivamente sobre los parámetros evaluados para HMA y tendieron a ser similares al tratamiento control (García-González *et al.*, 2018). Recientemente, Hontoria *et al.*, (2019) obtuvieron efectos promotores similares con la cebada como CCI sobre la población de HMA en maíz (PCM y LH) y la biomasa microbiana (CBM), en muestras de raíces y suelo tomadas 28 DDS de maíz. Asimismo, los autores reportaron que tanto la cebada como la vicia común como CCI estimularon la actividad microbiana del suelo (β -glucosidasa, ureasa) con respecto al control sin CCI. Llamativamente, los CCI no afectaron la riqueza [número de OTUs observados (S')] ni la diversidad [índice de Shannon (H')] de los HMA en el cultivo de maíz, aún después de 10 años de rotación con CCI (Hontoria *et al.*, 2019).

Por otra parte, Mbutia *et al.*, (2015) reportaron incrementos en parámetros indicadores de abundancia (NBM, FAME de bacterias gram positivas y concentración de FAME total) y de actividad microbiana (RM y β -glucosaminidasa) en suelos con *V. villosa* como CCI con respecto al control, mientras que el trigo como CCI no tuvo efectos significativos, en un ensayo de 31 años de rotación de algodón con CCI, en muestras de suelo tomadas durante la senescencia de los CCI (25 DDS de algodón). Sin embargo, los FAME marcadores de hongos micorrícicos (FAME 16:1 ω 5c) fueron negativamente afectados por la inclusión de *V. villosa* como CCI (Mbutia *et al.*, 2015).

White y Weil (2010) por su parte, en un ensayo de dos años de rotación de maíz y CCI demostraron que el uso de centeno como CCI aumentó la colonización de las raíces de maíz por HMA con respecto al control, mientras que el nabo como CCI no mostró efectos significativos. Por otro lado, Frasier *et al.*, (2016) demostraron que el centeno como CCI antecesor de sorgo forrajero incrementó el contenido de FAME de bacterias gram positivas y la abundancia de hongos, pero redujo la de bacterias totales (copias de los genes de ARNr 18S y ARNr 16S, respectivamente) en el suelo luego de tres años de rotación. En el mismo ensayo se observó que el CCI a base de *V. villosa* produjo efectos opuestos a los del centeno sobre la abundancia de los genes ribosomales con respecto al control. Además, registraron un incremento significativo en los parámetros indicativos de biomasa microbiana (NBM y CBM) en suelos con ambos CCI con respecto al control (Frasier *et al.*, 2016). Nevins *et al.*, (2018) encontraron, en un ensayo de un año de duración, que el centeno en rotación con maíz también estimuló la actividad microbiana (β -glucosidasa) con respecto al control, mientras que la diversidad bacteriana (índice de equitatividad de Simpson y Chao-1) no fue significativamente afectada por la inclusión de *V. villosa* o centeno, en muestras de suelo tomadas durante la senescencia de los CCI (41 DDS de maíz) (Nevins *et al.*, 2018). Reddy *et al.*, (2003) reportaron, asimismo, que la inclusión de centeno y trébol encarnado como CCI en rotación con soja estimuló los parámetros indicativos de biomasa (UFC de bacterias y hongos cultivables) y actividad microbiana (FDA) respecto al control, en muestras de suelo obtenidas 30 DDS de soja.

En dos ensayos simultáneos realizados en el mismo suelo con rotaciones de raigrás anual/ algodón y *V. villosa* o centeno/ soja Wagner *et al.*, (1995) observaron aumentos significativos en los parámetros de biomasa (UFC de bacterias y hongos cultivables, bacterias gram negativas y NBM) y actividad microbiana (FDA, arilsulfatasa, aril-acilamidasa, fosfatasa alcalina) con respecto al control, atribuibles al efecto de los CCI luego de un mes desde la desecación de los mismos. Zablutowicz *et al.*, (2007) reportaron resultados similares para los indicadores de biomasa microbiana (UFC de bacterias y bacterias gram negativas) y actividad enzimática (FDA y aril-acilamidasa) en muestras de suelo tomadas 30 días post-supresión de raigrás anual, tras dos años de rotación con algodón.

La inclusión del centeno como CCI en rotación con sorgo forrajero/ algodón en el estudio de Acosta-Martínez *et al.*, (2010) no tuvo los efectos positivos frecuentemente observados en otros estudios, después de cinco años de rotación en una región semiárida, pese a que se evaluaron distintos parámetros indicativos de biomasa (CBM y NBM) y abundancia de distintos grupos microbianos (FAME de bacterias gram positivas y gram negativas, actinomicetos y hongos), diversidad por pirosecuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S (ACE y Chao-1) y actividad de enzimas del ciclo del C (β -glucosidasa, α -galactosidasa y β -glucosaminidasa). Sin embargo, las enzimas involucradas en el ciclo del P y S (fosfatasa alcalina, fosfodiesterasa y arilsulfatasa) aumentaron con

centeno como CCI con respecto al control, en muestras de suelo tomadas después de la cosecha de los cultivos de verano (Acosta-Martínez *et al.*, 2010).

En un ensayo de largo plazo (23 años) de rotación de distintos CCI (avena negra, trigo, nabo, lupino azul y *V. villosa*) con soja o maíz, Tiecher *et al.*, (2012) reportaron mayor actividad enzimática (AP) en la *V. villosa*, el lupino azul y el trigo con respecto al barbecho, mientras que la biomasa microbiana (PBM) sólo resultó mayor en el lupino azul en comparación con el control, en muestras de suelo obtenidas en estadio de floración de los CCI (Tiecher *et al.*, 2012). Asimismo, en un trabajo publicado años más tarde por Balota *et al.*, (2014), observaron efectos positivos de los CCI sobre la biomasa microbiana (mayor CBM en todos los CCI y NBM, sólo en *V. villosa* con respecto al control). Con respecto a los parámetros indicativos de actividad microbiana, los autores encontraron incrementos significativos en la actividad arilsulfatasa y una disminución en el cociente metabólico (qCO_2) en los CCI con respecto al control. El qCO_2 disminuye en sistemas más estables, indicando un uso más eficiente del C por parte de la comunidad microbiana del suelo. Otros parámetros evaluados, indicativos de actividad microbiana (PT, PL, EE-GRSP, T-GRSP) también mostraron mayores valores en los suelos bajo CCI, aunque los efectos fueron diferentes según la especie de que se tratara (Balota *et al.*, 2014). En otro ensayo de rotación de CCI (avena, centeno y raigrás) con soja, Varela *et al.*, (2014) mostraron que la biomasa determinada por SIR y la actividad microbiana (FDA) fue mayor en los CCI con respecto al control, en tres momentos de muestreo a lo largo del crecimiento de los CCI (otoño, invierno y primavera) (Varela *et al.*, 2014). Locke *et al.*, (2013) informaron resultados similares en un estudio de seis años de rotación de CCI (centeno o trébol balansa) con algodón, en el que tanto la actividad microbiana (FDA) como la biomasa estimada de micorrizas a partir de su marcador de ácidos grasos (FAME 16:1 ω 5c) resultaron mayores en el suelo con CCI post-supresión (luego de 14 días) que en el control. Los efectos positivos de la rotación con CCI se extendieron hasta inicios de floración del algodón, momento en que la infección micorrízica fue un 40% mayor en parcelas con centeno o trébol balansa como CCI antecesor, con respecto al barbecho (Locke *et al.*, 2013). Asimismo, Mukumbareza *et al.*, (2016) mostraron que la rotación de CCI (avena o vicia) con maíz también promovió un aumento del CBM y una mayor actividad enzimática (β -glucosidasa, ureasa, DHA, arilsulfatasa, fosfatasa ácida y alcalina) en los dos CCI post-supresión (14 días) con respecto al control, en un ensayo de dos años de duración (Mukumbareza *et al.*, 2016). Otras leguminosas (arveja, *V. villosa* y trébol encarnado) también tuvieron efectos positivos sobre la actividad microbiana (nitrificación potencial, β -glucosidasa y β -glucosaminidasa) pero no modificaron la biomasa (CBM) con respecto al control, en un ensayo de rotación de maíz con CCI de corto plazo, en muestras de suelo tomadas durante el crecimiento del cultivo sucesor (Liang *et al.*, 2014). Por el contrario, Zhou *et al.*, (2012) evaluaron los efectos de centeno, avena negra, trigo, *V. villosa*, arveja y mostaza castaña sobre la comunidad microbiana, en un estudio de corto plazo en una región árida, en muestras de suelo tomadas

al suprimir los CCI mecánicamente. En ese trabajo reportaron menor actividad microbiana (SIR) sin cambios en la abundancia (CBM, NBM), aunque hubo un aumento en los indicadores de diversidad catabólica (índice de Shannon e índice de equitatividad, basados en CLPP) en el suelo bajo CCI en comparación con el control (Zhou *et al.*, 2012). Sin embargo, después de ocho meses de descomposición de los residuos de los CCI, los parámetros de biomasa microbiana (CBM, NBM) resultaron mayores en suelos con CCI respecto al suelo sin CCI (Zhou *et al.*, 2016).

4. Discusión

Los trabajos científicos incluidos en esta revisión sistemática evaluaron el efecto de los CCI sobre los indicadores de actividad, abundancia y diversidad microbiana en experimentos de corto (< 5 años) y largo (> 5 años) plazo (Figura 1.2). En el 90-100% de los trabajos relevados, los CCI aumentaron la actividad biológica en ensayos de corto y largo plazo, y en el 80% de ellos se consignó aumento de la biomasa microbiana. Estos resultados indican que los efectos de los CCI sobre los microorganismos del suelo son independientes de la duración de los ensayos.

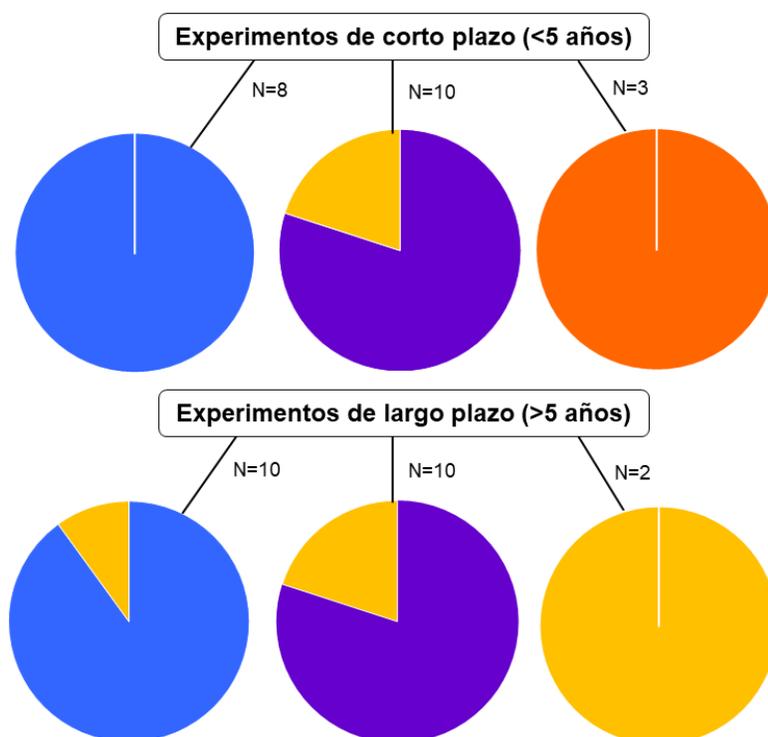


Figura 1.2. Los gráficos de torta representan el porcentaje de trabajos científicos en la revisión sistemática que reportaron un aumento en indicadores de actividad (celeste), abundancia (violeta) o diversidad (naranja) microbiana y los que no observaron un efecto sobre esos indicadores (amarillo). N indica la cantidad de trabajos en los cuales se reportaron resultados para el indicador.

Si bien 3 trabajos reportaron aumento de la diversidad microbiana como resultado de la inclusión de CCI en el corto plazo, esta tendencia no se observó en los trabajos de largo plazo (N=2, N indica la cantidad de trabajos en los cuales se reportaron resultados para el indicador). Esta aparente discrepancia bien podría atribuirse a la escasa cantidad de trabajos analizados en cada categoría, que al mismo tiempo reportan disímiles parámetros para la evaluación de la diversidad.

La especie vegetal, la etapa de desarrollo y la diversidad de plantas pueden influir en la composición y actividad de la comunidad microbiana edáfica (Berendsen *et al.*, 2012; Rascovan *et al.*, 2016), probablemente por los exudados radicales que alteran las propiedades químicas del suelo y son usados como fuente de nutrientes por los microorganismos (Yang y Crowley, 2000). Entre los múltiples CCI que se han estudiado en los trabajos analizados, los cultivos predominantes fueron centeno y *V. villosa*. El efecto del centeno y la *V. villosa* como CCI sobre el microbioma del suelo se analizó en el 53 y 58% de los trabajos revisados, respectivamente. El 100% (N=5) de los estudios revisados coincidieron en que la actividad microbiana aumentó con la introducción de CCI multiespecies con respecto al suelo desnudo (Zhou *et al.*, 2012; Chavarría *et al.*, 2016a; Mukumbareza *et al.*, 2016; Chavarría *et al.*, 2018; Nevins *et al.*, 2018) (Tabla 1.4). A su vez, el 100% (N=10) de los trabajos que analizaron el efecto de los CCI de leguminosas reportaron una mayor actividad microbiana con respecto al control sin CCI (Wagner *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2003; Tiecher *et al.*, 2012; Locke *et al.*, 2013; Balota *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2014; Mbuthia *et al.*, 2015; García-González *et al.*, 2016; Mukumbareza *et al.*, 2016; Hontoria *et al.*, 2019) (Tabla 1.4). Además, se observó en el 81% (N=16) de los estudios que las gramíneas como CCI aumentaron la actividad microbiana en comparación con el barbecho desnudo (Wagner *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2003; Zablotowicz *et al.*, 2007; Tiecher *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012; Locke *et al.*, 2013; Balota *et al.*, 2014; Varela *et al.*, 2014; García-González *et al.*, 2016; Mukumbareza *et al.*, 2016; Nevins *et al.*, 2018; García-González *et al.*, 2018; Hontoria *et al.*, 2019) (Tabla 1.4).

Sin embargo, en un trabajo se reportó una disminución en la actividad microbiana (SIR) con gramíneas como CCI (Zhou *et al.*, 2012), posiblemente por la duración del ensayo (5 meses) y el ambiente árido donde se realizó el estudio. Calderón *et al.*, (2016) sugieren que en una región semiárida son necesarios períodos de tiempo mayores a un año para ver los efectos de los CC sobre la comunidad microbiana del suelo. Las crucíferas como CCI han sido poco estudiadas y el 40% (N=5) de los estudios encontraron una mayor actividad microbiana con respecto al control (Balota *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016) (Tabla 1.4). En particular, se observó un aumento en la actividad microbiana en el 71 (N=7) y 78% (N=9) de los trabajos que introdujeron centeno y *V. villosa*, respectivamente, con respecto al barbecho. Estos resultados demuestran que la inclusión de CCI en la rotación aumenta la actividad microbiana edáfica. Resultados similares fueron observados en un metanálisis realizado por Kim *et al.*, (2020) sobre el impacto de CC sobre el microbioma edáfico, en el cual se reportó que la actividad microbiana (β -glucosidasa, actividad fosfatasa y RM) aumentó un 22% con CC en comparación con el

barbecho desnudo. Otro metanálisis reciente también encontró que la actividad fosfatasa extracelular aumentó un 20% con CC con respecto al control (Hallama *et al.*, 2019).

En esta revisión, el 67% (N=6) de los trabajos reportaron un aumento en los indicadores de biomasa microbiana con CCI multiespecies (Chavarría *et al.*, 2016b; Frasier *et al.*, 2016; Mukumbareza *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016) (Tabla 1.4). Además, el 57% (N=14) de los estudios reportaron una mayor abundancia microbiana con CCI de leguminosas con respecto al control (Wagner *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2003; Tiecher *et al.*, 2012; Balota *et al.*, 2014; Mbuthia *et al.*, 2015; Frasier *et al.*, 2016; Mukumbareza *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016) (Tabla 1.4). Entre ellos, dos autores encontraron que la *V. villosa* como CCI afectó negativamente la abundancia de hongos (Mbuthia *et al.*, 2015; Frasier *et al.*, 2016). Ciertas prácticas de manejo como las rotaciones de cultivo y la aplicación de pesticidas o fertilizantes pueden afectar negativamente a la comunidad de hongos del suelo. Sin embargo, estos efectos son dependientes de las condiciones ambientales donde se llevan a cabo los ensayos (tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, clima, comunidad microbiana, etc.) (Jansa *et al.*, 2006). En el estudio de Frasier *et al.*, (2016) la menor abundancia de hongos fue temporal o transitoria, dado que se observó sólo en el primer año de la rotación en un ensayo de tres años de duración. Respecto de los resultados reportados por Mbuthia *et al.*, (2015) una posible explicación es que las plantas tienden a derivar menos C a los HMA cuando aumenta el nivel de N disponible en el suelo como resultado de la descomposición de los residuos de las leguminosas con baja relación C/N (Treseder, 2004). Sin embargo, es necesario contar con más trabajos que evalúen la abundancia fúngica bajo condiciones ambientales similares, para concluir acerca de un posible efecto negativo de las leguminosas sobre este grupo microbiano. De los diecisiete trabajos que evaluaron los efectos de los CCI de gramíneas sobre la biomasa microbiana, el 76% reportó una mayor abundancia con respecto al control sin CCI (Wagner *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2003; Zablotowicz *et al.*, 2007; White y Weil 2010; Locke *et al.*, 2013; Balota *et al.*, 2014; Varela *et al.*, 2014; García-González *et al.*, 2016; Frasier *et al.*, 2016; Mukumbareza *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016; García-González *et al.*, 2018; Hontoria *et al.*, 2019) (Tabla 1.4). Además, se encontró en el 40% (N=5) de los estudios que las crucíferas como CCI aumentaron la biomasa microbiana (Balota *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016) (Tabla 1.4). En particular, se reportó una mayor biomasa microbiana en el 78 (N=9) y 50% (N=10) de los estudios que incluyeron centeno y *V. villosa* como CCI, respectivamente, con respecto al control. En general, se observó que los CCI aumentaron los parámetros de abundancia microbiana. Estos resultados coinciden con un metanálisis realizado por Daryanto *et al.*, (2018) donde se reportó un incremento en indicadores de abundancia microbiana (CBM, NBM, PBM y colonización HMA) con CC en comparación con el suelo desnudo. Además, otro metanálisis reportó que los CC tuvieron efectos significativos en comparación con los barbechos desnudos, incrementando en promedio los parámetros de abundancia (UFC, CBM, NBM y PLFA), si bien los efectos variaron en relación a los moderadores considerados (labranza, manejo del CC, clima, entre otros). Los efectos de

los CC fueron menores en climas continentales, en manejos con supresión química y bajo labranzas conservacionistas (Kim *et al.*, 2020).

El 66% (N=3) y 75% (N=4) de los trabajos que introdujeron CCI de leguminosas y gramíneas, respectivamente, no observaron diferencias en la diversidad microbiana en suelo bajo CCI con respecto al control (Tabla 1.4). Sólo un estudio reportó una mayor diversidad con gramíneas y leguminosas como CCI (Zhou *et al.*, 2012). En contraste, el 100% (N=3) de los trabajos incluidos en esta revisión reportaron que la diversidad catabólica o taxonómica se vio favorecida con la inclusión de mezclas de CCI con respecto al control (Zhou *et al.*, 2012; Chavarría *et al.*, 2016a; Nevins *et al.*, 2018) (Tabla 1.4). Vukicevich *et al.*, (2016), en una revisión sobre el tema, también informaron que el incremento en la diversidad de especies vegetales de los CC aumentaba la diversidad microbiana, especialmente de grupos beneficiosos para las plantas.

Los efectos del centeno y *V. villosa* sobre los parámetros de diversidad microbiana han sido menos estudiados, en relación a los parámetros de actividad y abundancia, en consonancia con el menor número de estudios del efecto de CCI sobre la diversidad microbiana. Debido a que son muy pocos los trabajos que analizaron el efecto de los CCI sobre los parámetros de diversidad microbiana no es posible llegar a una conclusión definitiva y resultan necesarias más investigaciones sobre el tema. En este mismo sentido, Kim *et al.*, (2020) el primer metanálisis que analizó los efectos de los CC sobre los parámetros de diversidad microbiana, encontraron un incremento de 2,5% con CC en comparación con el control.

Tabla 1.4. Porcentaje de trabajos científicos analizados en la revisión sistemática que reportan cambios en indicadores de actividad, abundancia o diversidad microbiana.

Indicadores Familia botánica	Actividad [§]	Abundancia o Biomasa	Diversidad fisiológica o taxonómica
Leguminosas	↑100% (N=10)	↑57% ↓14% (N=14)	↑33% (N=3)
Gramíneas	↑81% ↓6% (N= 16)	↑76% (N=17)	↑25% (N=4)
Crucíferas	↑40% (N=5)	↑40% (N=5)	-- (N=0)
Mezcla CCI	↑100% (N=5)	↑67% (N=6)	↑100% (N=3)

[§]Flechas ascendentes y descendentes, indican aumento y disminución en el indicador, respectivamente. N indica la cantidad de trabajos en los cuales se reportaron resultados para el indicador.

5. Conclusiones

Esta revisión sistemática de la literatura permite concluir que la inclusión de CCI (principalmente leguminosas y gramíneas y/o sus mezclas) en rotación con cultivos de verano en sistemas bajo SD promueve la actividad biológica y la biomasa microbiana edáfica en comparación con los barbechos desnudos, y que estos efectos son independientes de la duración de los ensayos. Asimismo, muestra que los CCI mono-específicos más utilizados son centeno y *V. villosa*, y que la mezcla de ambos es el CCI multiespecie más estudiado. Es notoria la escasez de estudios en los que se evaluaron parámetros de diversidad microbiana del suelo en presencia de CCI, por lo que se destaca la necesidad de realizar más investigaciones primarias sobre el tema. Por último, resulta llamativo que solo un artículo de 22 seleccionados reporte resultados sobre el efecto de diferentes métodos de supresión de los CCI sobre la actividad biológica y la biomasa microbiana del suelo. Sería importante que futuros estudios abordaran este aspecto del manejo de los CCI, ya que, sin duda, merece mayor atención por la influencia directa e indirecta que podría tener sobre el microbioma del suelo y la rizosfera.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a la revisión sistemática de la literatura realizada se identificaron los vacíos de conocimiento y los aspectos que aún requieren mayor experimentación para mejorar la comprensión del efecto de las prácticas agrícolas aplicadas a los CCI sobre el microbioma rizosférico. Por lo tanto, se planteó como hipótesis de trabajo que los métodos utilizados para finalizar los CCI afectan el microbioma rizosférico al modificar el tipo y la cantidad de exudados radicales, lo que podría incidir a su vez sobre el microbioma rizosférico del cultivo sucesor y el desarrollo del mismo. A partir de esta hipótesis, se establecieron los siguientes objetivos específicos: 1) evaluar el efecto combinado de la fertilización con N y el método de finalización de avena (*Avena sativa* L.) como CCI, sobre la composición de los exudados radicales de avena y la abundancia de bacterias degradadoras de fosfonatos (capítulo 2); 2) evaluar la estructura de la comunidad microbiana en general y la abundancia de las poblaciones específicas responsables del ciclo del N (capítulo 3) estableciendo para ello un ensayo en condiciones controladas en invernáculo; 3) analizar el impacto de la introducción del CCI y el método de finalización del mismo, previo a la siembra de girasol (*Helianthus annuus* L.) en la rotación, sobre los indicadores mencionados anteriormente (capítulo 4); 4) evaluar la *performance* de girasol y la estructura de la comunidad bacteriana de su rizosfera en respuesta al método de finalización del CCI antecesor y a la fertilización fosforada (capítulo 5), estableciendo para ello un ensayo a campo durante dos campañas agrícolas.

CAPÍTULO 2

ANÁLISIS DE LA EXUDACIÓN RADICAL DE *Avena sativa* L. EN RELACIÓN CON LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y LOS MÉTODOS DE FINALIZACIÓN DEL CULTIVO

1. Introducción

Los exudados radicales, también llamados rizodepósitos constituyen una importante fuente de C orgánico liberado al suelo rizosférico. La cantidad y calidad de los exudados radicales están determinados por la especie vegetal, variedad, edad de la planta y factores externos estresantes bióticos y abióticos (Badri y Vivanco, 2009). Las raíces de las plantas exudan compuestos de bajo (aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, fenólicos, entre otros metabolitos secundarios) y alto peso molecular (mucílagos y proteínas) en el suelo rizosférico (Bais *et al.*, 2006). Se ha reportado que algunos de estos compuestos, principalmente los fenólicos, pueden incrementar la abundancia de taxones microbianos con capacidad para degradar compuestos aromáticos (Zhou y Wu, 2012; Liu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018; Zwetsloot *et al.*, 2020). A su vez, el aumento de compuestos fenólicos también puede estimular la proliferación de microorganismos patógenos (Lanoue *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2019) y, algunos de ellos, como ciertos fenilpropanoides, pueden actuar como inhibidores de la nitrificación afectando a los microorganismos implicados en el ciclo del N, razón por la cual se conocen como inhibidores biológicos de la nitrificación (Subbarao *et al.*, 2015).

Ciertas prácticas agrícolas como la aplicación de glifosato y el corte para desecar los CCI previo a la siembra del cultivo de cosecha pueden afectar la síntesis de compuestos secundarios en la planta. Por ejemplo, la reducción de la capacidad de síntesis de aminoácidos aromáticos como consecuencia del glifosato resulta en una estimulación del flujo metabólico a través de la vía del shikimato, conduciendo a un incremento en la síntesis de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos, así como también a un aumento en la síntesis de flavonoides como una posible reacción protectora al estrés oxidativo (Duke y Hoagland, 1978; Daniel *et al.*, 1999). En este sentido, se ha propuesto que uno de los efectos tóxicos del glifosato podría deberse a una estimulación de la biosíntesis de compuestos fenólicos inhibitorios (Duke y Hoagland, 1978). Allegrini *et al.*, (2019) plantearon que la exudación incrementada de compuestos fenólicos inhibitorios en plantas tratadas con glifosato respecto del método de supresión por corte podría explicar la menor abundancia observada para microorganismos sensibles a estos compuestos como bacterias y arqueas oxidantes del amoníaco (BOA y AOA, respectivamente). Por otra parte, varios estudios han reportado que la exudación radical, biomasa y respiración microbiana en la rizosfera aumentan en respuesta a la defoliación o corte de las plantas, sin embargo, la magnitud de estos cambios depende de la especie vegetal, la intensidad de defoliación y el momento de muestreo (Guitian y Bardgett, 2000; Paterson y

Sim, 2000; Fu y Cheng, 2004; Xia *et al.*, 2019). Guitian y Bardgett, (2000) reportaron que la defoliación de *Festuca rubra* L., *Cynosurus cristatus* L. y *Anthoxanthum odoratum* L. aumentó la biomasa microbiana del suelo y la eficiencia de uso del C en la zona radical. Esta respuesta fue mayor en las raíces de *Anthoxanthum odoratum* L. y probablemente estuvo asociada a cambios en el perfil de exudación radical después de la defoliación.

Luego de la aplicación en los CCI, el glifosato puede llegar al suelo por lavado desde las partes aéreas de las plantas, y también, por exudación desde las raíces de las plantas expuestas (Coupland y Caseley, 1979; Rodrigues *et al.*, 1982) y por la ulterior descomposición del tejido vegetal ya que las plantas normalmente mueren en un período de 7 a 21 días (Kanissery *et al.*, 2019). Además, la aplicación de glifosato estimula la liberación de compuestos orgánicos en los rizodepósitos tanto a través de una mayor exudación de carbohidratos y aminoácidos (Kremer *et al.*, 2005), así como de recursos derivados de raíces muertas (efecto "green bridge"; Schlatter *et al.*, 2017). Se ha comprobado que el glifosato (y su metabolito, ácido aminometilfosfónico, AMPA) es transportado a las raíces y exudado al suelo después de la aplicación foliar (Kremer *et al.*, 2005; Tesfamariam *et al.*, 2009; Duke *et al.*, 2012), 3 días después de la aplicación foliar en soja resistente a glifosato (Duke *et al.*, 2012; Kremer *et al.*, 2005). Más aún, Neumann *et al.*, (2006) demostraron que el glifosato aplicado en el follaje de las plantas blanco es exudado en la rizosfera tras una rápida traslocación desde los tallos a las raíces. Por otro lado, Laitinen *et al.*, (2007) encontraron que 3 semanas después de aplicar glifosato a plantas sensibles (*Chenopodium quinoa*), las raíces exudaron 8-12% del compuesto hacia la rizosfera. Estos resultados junto con los expuestos por Kremer *et al.*, (2005) y Laitinen *et al.*, (2007) indican que la rápida translocación y la exudación del glifosato por parte de la planta pueden depositar una cantidad significativa de este compuesto en el suelo rizosférico.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica cualitativa no destructiva para caracterizar los principales grupos funcionales químicos, la cual tiene distintas aplicaciones como: identificar variedades de trigo (Amir *et al.*, 2013), analizar la actividad antioxidante en plantas medicinales (Bunaciu *et al.*, 2012), caracterizar efluentes agroindustriales (Iocoli *et al.*, 2017), detectar la presencia de glifosato en suelo (Schnurer *et al.*, 2006), entre otras. Esta técnica también ha sido utilizada para caracterizar los exudados radicales de *Casuarina cunninghamiana* (Beauchemin *et al.*, 2011), girasol (Yang y Pan, 2013) y *Brassica oleracea* L. (Pongrac *et al.*, 2020).

La degradación del glifosato en suelos ocurre principalmente como resultado de la actividad enzimática de microorganismos (bacterias, hongos, micromicetos y actinomicetos) que lo utilizan como fuente de fósforo (P), C y N (Zhan *et al.*, 2018). Entre ellos, las bacterias de géneros como *Achromobacter*, *Commamonas*, *Ochrobactrum*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Geobacillus*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium* y *Enterobacter* cumplen un rol importante (Zhan *et al.*, 2018; Stosiek *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2020). La degradación de fosfonatos es catalizada por enzimas

que están bajo el control del regulón *Pho* en bacterias, lo que les permite utilizar fosfonatos como única fuente de P (Stosiek *et al.*, 2019). La síntesis de las enzimas se produce solo a bajas concentraciones de fosfato y su expresión es reprimida por el nivel de fosfato inorgánico (Pi) (Martinez *et al.*, 2010; Jochimsen *et al.*, 2011). Los microorganismos degradan glifosato a través de dos vías. Una de ellas conduce a la formación de sarcosina como intermediario, y la otra conduce a la formación de AMPA y glioxilato. En la vía de AMPA, el primer paso es la ruptura del enlace C–N por la enzima glifosato oxidorreductasa (GOX). La enzima C–P liasa es responsable de la conversión de AMPA a Pi y metilamina. En la vía de sarcosina, el paso inicial es la ruptura del enlace C–P por la enzima C–P liasa, produciendo Pi y sarcosina, que luego es degradada a glicina y formaldehído por la enzima sarcosina oxidasa (Sviridov *et al.*, 2014). El sistema enzimático de la vía C–P liasa está ampliamente distribuido entre las bacterias, las que en general contienen un único operón *phn* de localización cromosómica (Hove-Jensen *et al.*, 2014) y se sospecha que ha estado sujeto a transferencia horizontal de genes (Huang *et al.*, 2005). La vía de la C–P liasa involucra numerosas enzimas, que actúan para transformar fosfonatos en Pi. En *E. coli* el complejo C–P liasa para la utilización de fosfonatos requiere la expresión de 14 polipéptidos (codificados por el operón *phnCDEFGHIJKLMNOP*). Entre las muchas proteínas involucradas, el complejo proteico *phnGHIJK* es esencial para la ruptura del enlace C–P (Jochimsen *et al.*, 2011). La actividad C–P liasa está codificada por *phnJ*, la cual es considerada la enzima clave en esta vía, como lo revela la notable conservación evolutiva en la secuencia de aminoácidos de PhnJ comparada con otros polipéptidos de la vía (Hove-Jensen *et al.*, 2014).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es una técnica que surge como una modificación a la PCR tradicional para poder estimar la abundancia inicial de un gen en el ADN templado. Se la denomina PCR en tiempo real debido a que la detección de la fluorescencia se produce en cada ciclo de amplificación, lo cual permite registrar la formación de los productos en “tiempo real”. Una característica que distingue a la qPCR respecto de otros métodos de análisis de comunidades microbianas es su capacidad de evaluar de manera rápida y con una alta sensibilidad la abundancia de grupos filogenéticos específicos (Fierer *et al.*, 2005). Morales *et al.*, (2020a) desarrollaron un ensayo para cuantificar el número de copias del gen que codifica para C–P liasas (*phnJ*), lo que permitiría evaluar el potencial génico para la degradación de glifosato y otros fosfonatos en las bacterias que colonizan el suelo rizosférico (Morales *et al.*, 2020a). En este estudio, los autores encontraron que la aplicación de glifosato a plantas de avena aumentó la abundancia del gen *phnJ* en el suelo rizosférico respecto del tratamiento de supresión por corte (Morales *et al.*, 2020a).

Por lo tanto, en base a los antecedentes existentes en la bibliografía y resultados preliminares del grupo de trabajo, descritos anteriormente, se hipotetiza que los métodos de finalización del CCI influyen sobre la composición de los exudados radicales en las plantas de avena, independientemente del nivel de fertilización, así como la fertilización nitrogenada modifica el perfil químico de los exudados,

independientemente del método de finalización. Por otra parte, debido a la probable exudación de glifosato por las raíces, se hipotetiza que habrá una mayor abundancia de bacterias que poseen genes de C-P liasas de la vía de degradación de fosfonatos en la comunidad microbiana rizosférica, independientemente de la fertilización. Para la comprobación de estas hipótesis, se establecieron los siguientes objetivos particulares: 1) analizar el efecto de la fertilización con N y el método de finalización del CCI sobre la composición de los exudados de plantas de avena; 2) analizar el potencial génico para la degradación de glifosato en la comunidad de bacterias rizosféricas.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño del ensayo

Se realizó un ensayo con plantas de avena (*Avena sativa* L.) como modelo experimental en invernáculo con riego automatizado (por aspersores, dos veces al día, 5 minutos) para evaluar el efecto del manejo del CCI sobre la microbiota rizosférica. Para la preparación de las macetas, se obtuvo una muestra compuesta de suelo (0-20 cm de profundidad) en un lote correspondiente al campus de la Universidad Nacional del Sur en la localidad de Bahía Blanca (38°41.64' S, 62°14.46' W). El suelo es un Paleustol petrocálcico (Ap-AC-C-Ck-2Ckm) de textura franco-arenosa, bien drenado y con una historia de 15 años de avena como cultivo (Aldana y Carioni, 2001). El horizonte Ap presenta las siguientes características: pH (1:2,5 suelo: agua) 7,6; densidad aparente 1,28 g cm⁻³; MO 2,46%; P (Bray) extractable 7,1 mg kg⁻¹; N total 0,129%; N-NH₄ 13,3 mg kg⁻¹; N-NO₃ 9,1 mg kg⁻¹.

Las semillas de avena (*Avena sativa* L. var. Cristal INTA) fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (10 ml de hipoclorito de sodio en 1 l de agua destilada estéril) por 3 minutos, se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril y se dejaron secar en un papel de filtro previo a la siembra.

El suelo previamente homogeneizado se utilizó para la preparación de macetas de 5,5 litros de capacidad con 5,6 kg de una mezcla de suelo: perlita (80:20), en las que se sembraron doce semillas de avena por maceta. Se implementó un diseño completamente aleatorizado con dos factores de estudio: fertilización (dos niveles: con y sin N) y método de finalización (tres niveles), con 4 réplicas por tratamiento (Tabla 2.1). La fertilización consistió en una aplicación de urea 46%N repartida en dos momentos: a la siembra del CCI (60 kg N ha⁻¹) y a los 76 días postsiembra (40 kg N ha⁻¹). El fertilizante nitrogenado se aplicó diluido en 10 ml de agua destilada. A los 92 días desde la fecha de siembra (estadio Z3.1, Zadoks *et al.*, 1974), se finalizó el CCI, determinando 3 niveles del factor:

- 1) **Sin supresión** (SS), muestreo de plantas vivas.
- 2) **Corte mecánico** (CM) de plantas con tijeras a 1 cm desde la superficie del suelo.
- 3) Secado de plantas con **aplicación de glifosato** (DQ, formulado comercial ESKOBA FULL II, Red Surcos, 662 g IA l⁻¹, sal monopotásica, 1,5%). Para ello, se preparó una solución al 1,5% (15 ml

del herbicida en 1 l de agua destilada) siguiendo las recomendaciones del marbete para aplicaciones con equipos de mochila. Se utilizó una mochila pulverizadora (GIBER, 5 litros) con una boquilla con pastilla en ábanico plano. La pulverización se realizó a una altura de 70 cm sobre el suelo y sobre un área de 1,6 m².

El muestreo de raíces y suelo rizosférico fue destructivo con cuatro réplicas por tratamiento, antes de la fecha de aplicación de los métodos de finalización (SS) y a los 12 días postsupresión (CM y DQ, 24 muestras en total). Se agitaron las raíces moderadamente, para desprender el suelo no rizosférico (*bulk soil*) mientras que el suelo rizosférico se obtuvo removiéndolo de la raíz mediante desprendimiento manual con un pincel estéril de acuerdo con lo sugerido por Yanai *et al.*, (2003). El suelo así colectado se conservó en bolsas de polietileno estériles con cierre hermético (Hixwer®, Argentina) en freezer a – 80°C hasta la extracción de ADN y a 4°C para los análisis fisiológicos.

Tabla 2.1. Tratamientos y designación de cada una de las muestras analizadas.

Muestras	Método de finalización (M)	Fertilización (F)	Tratamiento (M×F)
SS1	Sin supresión	Sin N	SS
SS2	Sin supresión	Sin N	SS
SS3	Sin supresión	Sin N	SS
SS4	Sin supresión	Sin N	SS
SSN1	Sin supresión	Con N	SSN
SSN2	Sin supresión	Con N	SSN
SSN3	Sin supresión	Con N	SSN
SSN4	Sin supresión	Con N	SSN
CM1	Corte mecánico	Sin N	CM
CM2	Corte mecánico	Sin N	CM
CM3	Corte mecánico	Sin N	CM
CM4	Corte mecánico	Sin N	CM
CMN1	Corte mecánico	Con N	CMN
CMN2	Corte mecánico	Con N	CMN
CMN3	Corte mecánico	Con N	CMN
CMN4	Corte mecánico	Con N	CMN
DQ1	Desecación química	Sin N	DQ
DQ2	Desecación química	Sin N	DQ
DQ3	Desecación química	Sin N	DQ
DQ4	Desecación química	Sin N	DQ
DQN1	Desecación química	Con N	DQN
DQN2	Desecación química	Con N	DQN
DQN3	Desecación química	Con N	DQN
DQN4	Desecación química	Con N	DQN

2.2. Obtención de exudados radicales

Las raíces que se utilizaron para la obtención de los exudados fueron las mismas a las que previamente se le extrajo el suelo rizosférico adherido. Para la preparación de los exudados radicales se siguió el procedimiento descrito por Egle *et al.*, (2003). En primer lugar, todo el sistema de raíces se lavó completa y cuidadosamente bajo el flujo de agua de la canilla de manera de remover todo el suelo. Luego el sistema de raíces se sumergió completamente en un recipiente conteniendo 100 ml de una solución 0,05 mM de CaCl_2 (pH 5,5) durante 1 h de manera tal de desprender células dañadas durante la remoción del suelo rizosférico y el posterior lavado, como así también para permitir la adaptación de las raíces antes de recoger los exudados. La solución fue descartada y se colocaron las raíces pre-tratadas nuevamente en 50 ml de solución de CaCl_2 de igual pH y concentración. Se dejó exudar las raíces aproximadamente 16 h en el invernáculo en las mismas condiciones donde habían crecido las plantas. El exudado obtenido en cada caso fue centrifugado (10000 rpm, 10 minutos), esterilizado por filtración (0,22 μm , polietersulfona Hixwer®, Argentina) en tubo de centrífuga estéril (50 ml, Corning®, Estados Unidos) y conservado a -20°C hasta el momento del análisis.

2.2.1. Determinación de fósforo y fenoles totales en los exudados radicales

Se analizó el contenido total de P en la solución acuosa de los exudados por medio de Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES, Shimadzu 9000 Simultáneo de Alta Resolución) en el laboratorio de servicios LANAQUI (CERZOS-CONICET).

Asimismo, se cuantificó la concentración de fenoles totales mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu a partir de una curva estándar (Figura 2.1), preparada con concentraciones entre 0-15 mg l^{-1} de ácido *p*-cumárico ($\geq 98.0\%$ pureza, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), adoptando la metodología descrita por Gutiérrez Avella *et al.*, (2008).

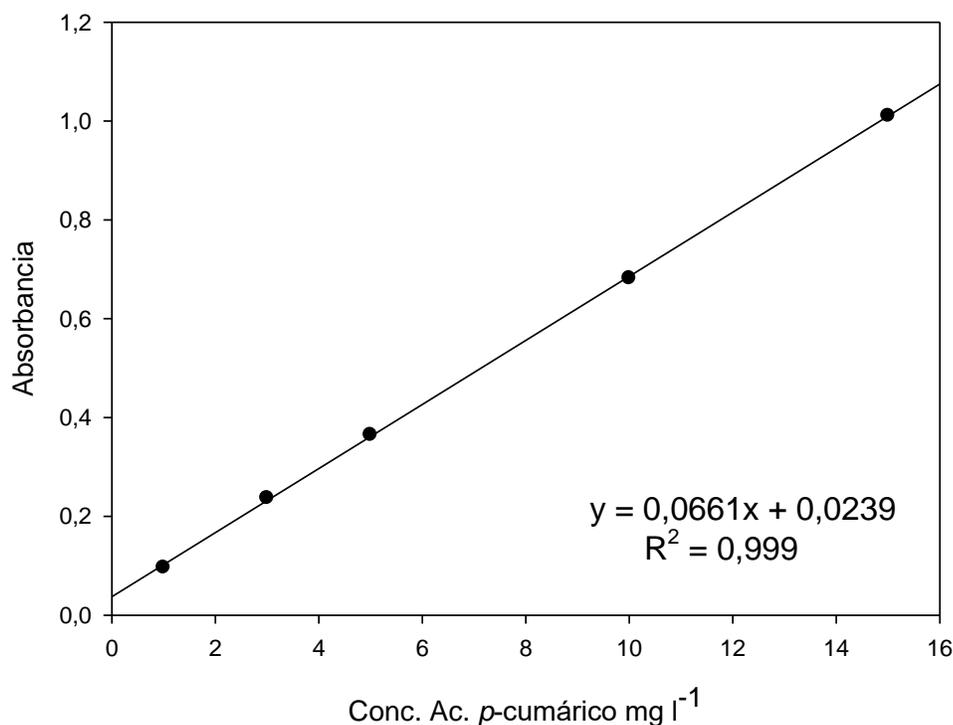


Figura 2.1. Curva de calibración de contenido de fenoles totales.

La solución acuosa de los exudados radicales fue liofilizada (Heto, FD 1.0 CT 60) y el pellet liofilizado se diluyó con 1,5 ml de agua bidestilada. Luego, una alícuota de 0,5 ml de cada una de estas diluciones se mezcló con 0,75 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (Tetrahedron®, Argentina), dejando reaccionar a temperatura ambiente por 5 min, después de lo cual se agregaron 0,75 ml de carbonato de sodio al 20% (Anedra®, Argentina). Los tubos se agitaron vigorosamente y se los dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se midió la absorbancia a 620 nm en fotómetro UV-visible (Metrolab 1600 DR, Wiener Lab., Argentina).

El contenido de fenoles de cada muestra se expresó en miligramos equivalentes de ácido *p*-cumárico por gramo de peso seco de los exudados liofilizados.

2.2.2. Análisis cualitativo de los exudados radicales

Se realizó la caracterización de los exudados radicales mediante FTIR. Los espectros infrarrojos se obtuvieron dentro del rango medio (4000–400 cm⁻¹) con 64 escanes de barrido y 8 cm⁻¹ de resolución con un espectrómetro Nicolet iS50 FT-IR Thermo Scientific (Estados Unidos). Las muestras se prepararon como pastillas de bromuro de potasio (Uvasol®, Merck, Alemania) las cuales se obtuvieron incorporando 0,5 ml en 180 mg de KBr (Iocoli *et al.*, 2017). Se realizó un espectro por réplica y luego

se obtuvo el espectro promedio por tratamiento. Para el procesamiento de los espectros se utilizó el software OMNIC 9 (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos).

2.3. Análisis molecular de la comunidad microbiana

2.3.1. Extracción de ADN de suelo rizosférico y cuantificación

Se utilizó el kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen GmbH, Alemania) para la extracción de ADN a partir de 250 mg de suelo rizosférico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado usando el kit QuantiFluor® ds DNA System (Promega®, Estados Unidos) en un fluorómetro Quantus (Promega®, Estados Unidos). La calidad del ADN fue analizada en un gel de agarosa al 1% y en un espectrofotómetro de la serie DS-11 FX (DeNovix®, Estados Unidos), usando como indicador las relaciones de absorbancias (A260/A230 y A260/280A).

2.3.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de *phnJ*

Se cuantificó el número de copias del gen que codifica para C–P liasas (*phnJ*), con cebadores diseñados en nuestro laboratorio (Tabla 2.2, Morales *et al.*, 2020a). La composición de la mezcla de reacción, el programa de amplificación del gen *phnJ* y el estándar se prepararon según Morales *et al.*, (2020a) (Tabla 1, Anexo I).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de tiempo real ABI 7500 y su software asociado 7500 Software v.2.0.3 (Applied Biosystems®, Estados Unidos).

Tabla 2.2. Cebadores utilizados para qPCR.

Grupo	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>phnJ</i>	phnJ F1	CSTATCTSGACGARCAGACSA	198	Morales <i>et al.</i> , (2020a)
	phnJ R2	TCGTCGGMGCCCTGRTCGA		

2.4. Análisis estadísticos

Los modelos lineales mixtos se ajustaron a P total en los exudados (PT), fenoles totales (FT) y qPCR (\log_{10} del número de copias μg^{-1} ADN) utilizando PROC GLIMMIX del software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). La fertilización y los métodos de finalización se consideraron efectos fijos y la maceta como efecto aleatorio. Se consideró un $P < 0,2$ como evidencia de interacción (Littell *et al.*, 2002). Cuando fue apropiado, las medias de mínimos cuadrados (*lsmeans*) se separaron usando la opción *lines* del comando *lsmeans*, estableciendo la probabilidad de error de Tipo I (α) en 0,05. Los coeficientes de correlación de Pearson ($\alpha=0,05$) obtenidos con el procedimiento CORR de SAS, se utilizaron para evaluar la relación entre la abundancia del gen *phnJ* y PT.

3. Resultados

3.1. Fósforo y fenoles totales en los exudados radicales

Los resultados del análisis de la varianza del contenido de PT presente en los exudados de plantas de avena se indican en la Tabla 2.3. El análisis mostró un efecto principal estadísticamente significativo del método de finalización ($P=0,0001$; Tabla 2.3), en tanto la fertilización y la interacción entre los factores en estudio no resultaron significativos. Los tres métodos de finalización se diferenciaron entre sí en el orden de $CM > DQ > SS$ (Tabla 2.3).

Se encontró una correlación positiva y significativa entre PT y el número de copias del gen *phnJ* ($r=0,55$, $P=0,017$).

En la Tabla 2.3 se indican los resultados del análisis de la varianza del contenido de fenoles presentes en los exudados de plantas de avena. Se consideró la interacción entre ambos factores en estudio ($P=0,095$; Tabla 2.3). Las comparaciones de a pares entre los distintos niveles de fertilización bajo un mismo método de finalización indicaron que el contenido de FT fue mayor en DQ sin N con respecto a DQ con N ($P<0,05$; letras minúsculas, Tabla 2.3). Para los otros métodos no se observaron diferencias significativas ($P>0,05$; Tabla 2.3). Se realizaron comparaciones múltiples entre los métodos de finalización dentro del mismo nivel de fertilización y sólo se observaron diferencias significativas ($P<0,05$; letras mayúsculas, Tabla 2.3) sin N: el contenido de FT en CM fue menor respecto del contenido en los métodos DQ y SS.

Tabla 2.3. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para fósforo y fenoles totales en los exudados radicales. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

	<i>n</i>	Fósforo total (mg l ⁻¹)		Fenoles totales (mg g ⁻¹)	
		Media	ES	Media	ES
Fertilización (F)					
con N	12	2,03	0,12	3,37	0,38
sin N	12	1,73		3,89	
Método de finalización (M)					
DQ	8	1,88 b	0,15	4,21	0,47
CM	8	2,49 a		2,61	
SS	8	1,27 c		4,08	
F×M					
DQN	4	2,12	0,22	3,21 bc	0,62
CMN	4	2,73		3,05 bc	
SSN	4	1,24		3,85 abc	
DQ	4	1,64	0,22	5,21 a	0,62
CM	4	2,25		2,17 c	
SS	4	1,30		4,29 ab	
	<i>gl</i>			<i>P</i> -valor	
F	1	0,103		0,33	
M	2	0,0001		0,037	
F×M	2	0,362		0,095	

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) y la ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.2. Análisis cualitativo de los exudados radicales

Los espectros IR de los distintos tratamientos presentaron iguales zonas de absorción (Figura 2.2). En la primera región del espectro, se observó una banda intensa y ancha entre 3600-3200 cm⁻¹

correspondiente al estiramiento de los enlaces O-H del grupo hidroxilo (fenoles, alcoholes y ácidos carboxílicos) y N-H del grupo amino (aminas primarias y secundarias, aminoácidos y proteínas). Además, se identificaron tres bandas entre 2980 y 2800 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del enlace C-H de grupos metilo y metileno (2957 cm^{-1} : vibración asimétrica del enlace C-H en $-\text{CH}_3$; 2920 cm^{-1} : vibración asimétrica en $-\text{CH}_2$; 2852 cm^{-1} : vibración simétrica en $-\text{CH}_2$ y CH_3) las que pueden ser asignadas a estructuras hidrocarbonadas alifáticas y grupos sustituyentes alquilo (presentes en carbohidratos, aminoácidos y derivados, ácidos orgánicos y terpenos). En la región comprendida entre 1800 y 1500 cm^{-1} se produjo una banda importante en la que se observa: un pico principal en 1609 cm^{-1} correspondiente a la deformación en el plano del enlace N-H (de aminas y/o amidas); y dos inflexiones: una en 1630 cm^{-1} (atribuible a la vibración de tensión de grupo carbonilo en amidas y carboxilatos) y otra en 1730 cm^{-1} (asignable a la vibración de tensión de grupo carbonilo en aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres). Dado que en 1630 cm^{-1} también tiene lugar la vibración de tensión del enlace C=C de compuestos aromáticos y dobles enlaces, el significativo ensanchamiento de toda la banda podría ser evidencia de la presencia de las funciones mencionadas. La pronunciada banda centrada en 1420 cm^{-1} puede atribuirse principalmente a las vibraciones de deformación del enlace O-H (en alcoholes y ácidos). Las vibraciones de deformación del enlace C-H de grupos metileno (en cadenas alquílicas estructurales, terpenos, carbohidratos) que también tienen lugar en esta región, quedarían solapadas bajo su forma ensanchada. La banda en 1380 cm^{-1} , al igual que la inflexión en 1315 cm^{-1} , correspondería a la vibración de tensión del enlace C-O en fenoles y a la deformación en el plano de grupos metilo. La región entre 1250 y 950 cm^{-1} muestra varias absorciones con distintas intensidades, las cuales pueden corresponder tanto a las vibraciones de tensión de los enlaces C-O (en polisacáridos, ácidos, ésteres, alcoholes) como a los enlaces C-O-P en fosfodiésteres, y posiblemente, al estiramiento del enlace C-N en aminas. La banda en 870 cm^{-1} corresponde a la deformación fuera del plano del enlace C-O de carbonatos. Las bandas de menor intensidad, entre 925 y 875 cm^{-1} , pueden corresponder a vibraciones de deformación fuera del plano de enlaces =CH (en compuestos aromáticos sustituidos), y de enlaces -CH en anillos saturados e insaturados (carbohidratos, terpenos).

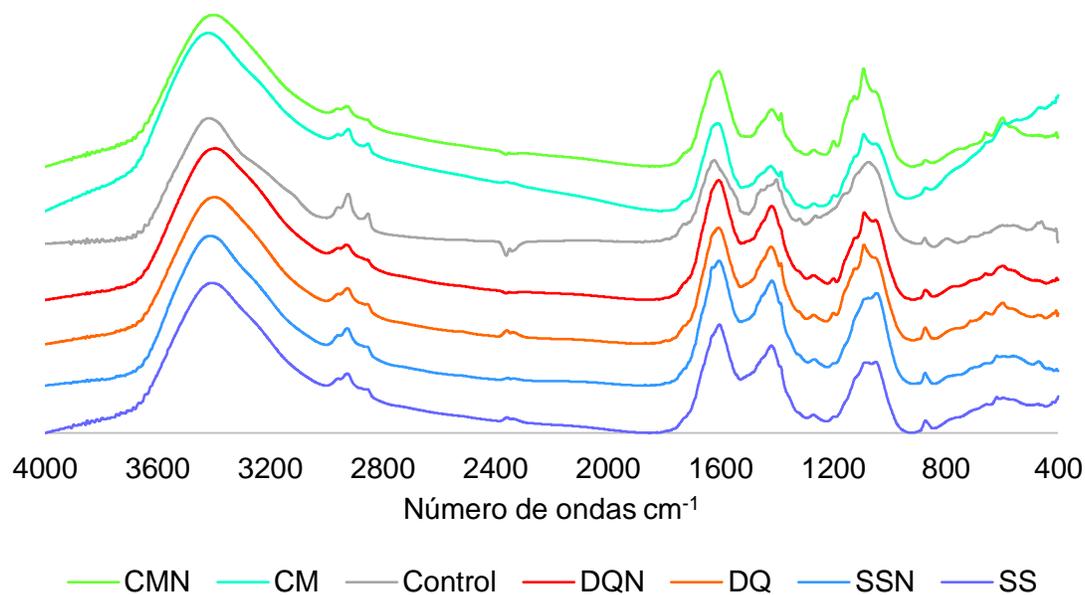


Figura 2.2. Espectros IR de cada combinación entre los niveles de fertilización y de los métodos de finalización. Corte mecánico con N (CMN) y sin N (CM); desecación química con N (DQN) y sin N (DQ); sin supresión con N (SSN) y sin N (SS).

Los espectros dentro de los tratamientos SS, SSN, DQ, DQN, CM y CMN presentaron una gran similitud, por lo que para el análisis se promediaron las réplicas de los espectros obteniendo un nuevo espectro. De la comparación entre los niveles de fertilización para cada método de finalización solo se observaron ligeros cambios en la región $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ que no justifican un análisis particular, por ello se obtuvieron los espectros promedio para cada método de finalización, independientemente del nivel de fertilización (Figura 2.3).

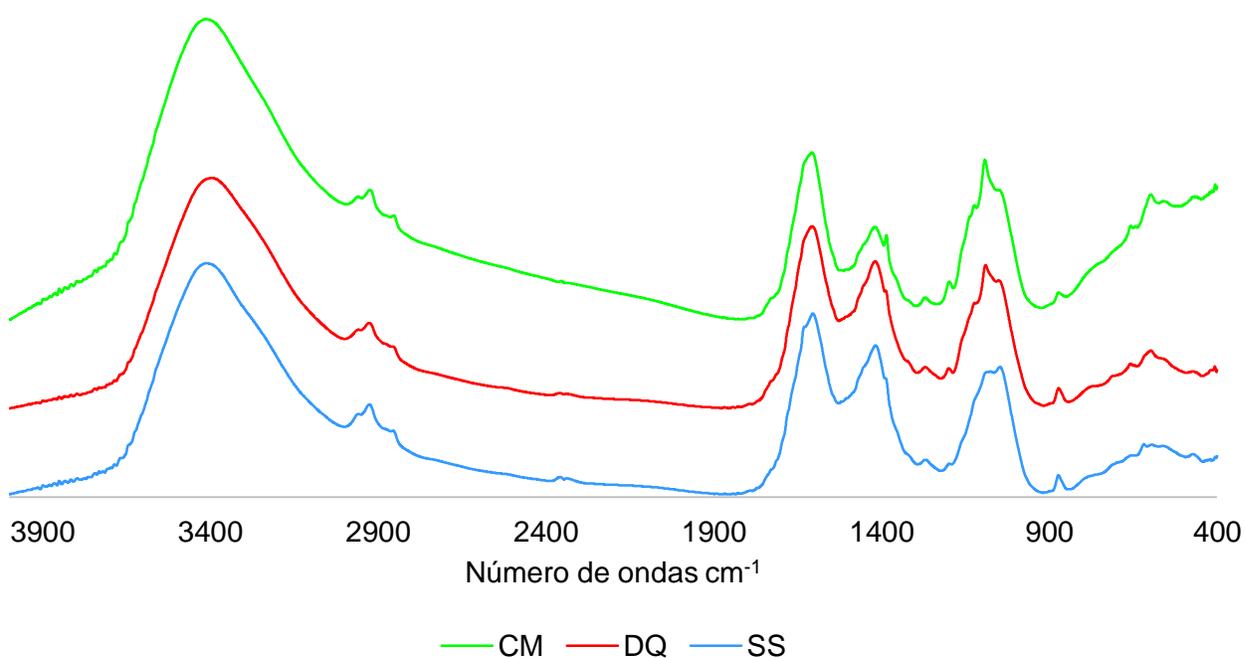


Figura 2.3. Espectros IR para cada método de finalización: corte mecánico (CM), desecación química (DQ) y sin supresión (SS).

Al comparar los espectros de los métodos de finalización (Figura 2.3) se puede mencionar que se observó un incremento en la banda 2850 cm^{-1} para CM pudiendo indicar una mayor saturación (mayor contenido de grupos $-\text{CH}_2-$) (Figura 2.4). En la región $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (Figura 2.5) los espectros de DQ y SS son muy similares mientras que CM presenta una menor intensidad y un ensanchamiento de la banda centrada en 1421 cm^{-1} y una mayor intensidad y definición de la banda centrada en 1380 cm^{-1} . Esta banda podría atribuirse a grupos metilo de alcanos o compuestos con grupo carbonilo (RO-CO-CH_3), a un incremento de enlaces C-H de compuestos del tipo polisacáridos, y/o a la deformación del enlace O-H en fenoles. En la región $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ (Figura 2.6) los tres espectros presentan diferencias, se observaron valores levemente superiores y mayor definición en DQ respecto a SS, mientras que CM presentó mayores valores, mayor definición y diferenciación de las bandas en esta región.

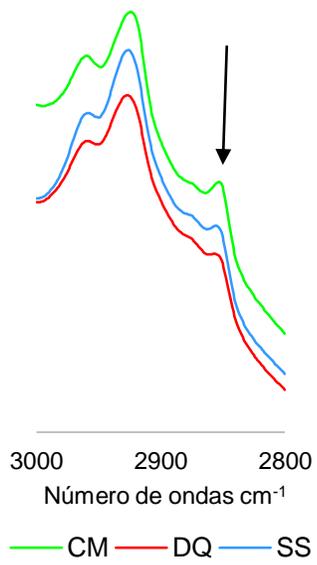


Figura 2.4. Espectros IR de los métodos de finalización (CM, DQ y SS) en el rango 3000-2800 cm⁻¹.

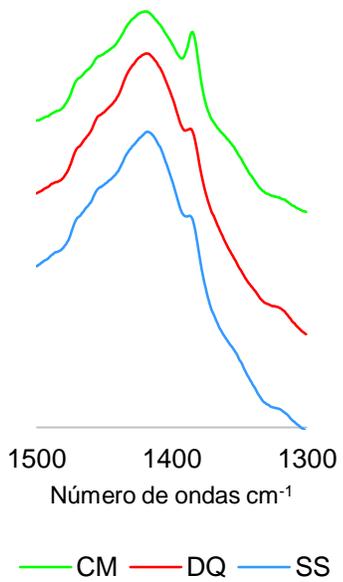


Figura 2.5. Espectros IR de los métodos de finalización (CM, DQ y SS) en el rango 1500-1300 cm⁻¹.

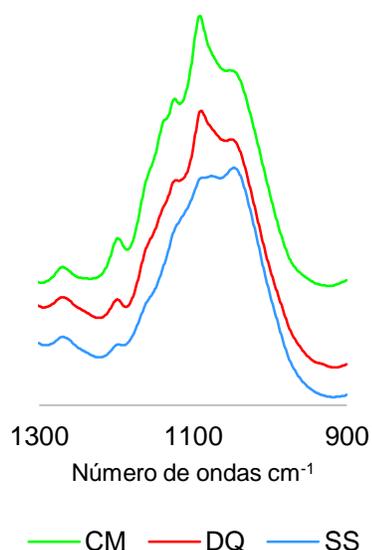


Figura 2.6. Espectros IR de los métodos de finalización (CM, DQ y SS) en el rango 1200-950 cm^{-1} .

3.3. PCR cuantitativa del gen *phnJ*

La abundancia del gen *phnJ* fue evaluada mediante qPCR. La ecuación obtenida del ajuste lineal de las curvas estándar, que describen la relación entre los valores C_t y el número de copias del gen indicador, fue la siguiente: $C_t = 36,04 - 3,47 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$ ($R^2 = 1$). La eficiencia de la qPCR fue de 94,31%.

En la Tabla 2.4 se indican los resultados del análisis de la varianza para el número de copias del gen *phnJ*. No se observó una interacción significativa entre los factores en estudio (fertilización y método de finalización) y, en consecuencia, se consideraron los efectos principales de ambos factores. Según los resultados, la abundancia del gen *phnJ* fue similar entre plantas fertilizadas y no fertilizadas o entre métodos de finalización ($P > 0,05$, Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para el número de copias del gen *phnJ* (transformada a \log_{10}). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

		<i>phnJ</i>		
		<i>n</i>	Media	ES
Fertilización (F)				
	con N	9	7,72	0,04
	sin N	9	7,66	
Método de finalización (M)				
	DQ	6	7,69	0,06
	CM	6	7,77	
	SS	6	7,61	
F×M				
	DQN	3	7,64	0,08
	CMN	3	7,79	
	SSN	3	7,64	
	DQ	3	7,75	0,08
	CM	3	7,76	
	SS	3	7,57	
		<i>gl</i>	<i>P</i> -valor	
F		1	0,884	
M		2	0,158	
F×M		2	0,589	

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

4. Discusión

En el presente trabajo se analizó el efecto de la fertilización con N y el método de finalización del CCI para explicar cómo la composición de los exudados de plantas de avena y la abundancia de bacterias que poseen genes de C–P liasas de la vía de degradación de fosfonatos responden a ambas estrategias de manejo.

Para la determinación de los FT presentes en los exudados radicales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu debido a que es uno de los más empleados y simples (Min *et al.*, 2015). En la primera hipótesis se postuló que los métodos de finalización del CCI modifican la composición de los exudados radicales de avena, independientemente del nivel de fertilización. Esta hipótesis se rechaza parcialmente, dado que hubo interacción significativa entre el factor fertilización y el método de finalización (Tabla 2.3). Se observó un menor contenido de FT en los exudados de plantas CM respecto del contenido en las plantas secadas (DQ) o SS, en la condición sin fertilizar, además, el contenido de FT en los exudados de las plantas sin fertilizar fue mayor en aquéllas que se suprimieron por el método DQ. El mayor contenido de FT en plantas DQ sin N podría deberse a que en condiciones subóptimas de nutrientes las plantas exudan más compuestos fenólicos que en condiciones óptimas (Stowe y Osborn, 1980; Nguyen y Niemeyer, 2008). Las limitaciones en la disponibilidad de nutrientes esenciales como el N generan una mayor rizodeposición de metabolitos secundarios que pueden ayudar en el almacenamiento y defensa de la planta (Nguyen y Niemeyer, 2008).

Una posible explicación es que el glifosato tiene la capacidad de estimular la actividad PAL en plantas con la consecuente acumulación de compuestos fenólicos derivados de esta enzima (Duke y Hoagland, 1978; Duke *et al.*, 1980). Se ha demostrado que el glifosato aumenta la actividad PAL tanto en plántulas de soja (Duke *et al.*, 1980; Hoagland *et al.*, 1979) como de maíz (Duke y Hoagland, 1978). Marchiosi *et al.*, (2009) también observaron un aumento en la actividad PAL y en la producción de derivados del ácido benzoico (*p*-hidroxibenzoico y ácido vinílico) en raíces de soja sensibles a glifosato como consecuencia del tratamiento con este herbicida.

A su vez, la falta de efecto en CM y SS podría deberse a la presencia de un efecto sinérgico sólo en la combinación CCI y DQ. Teasdale *et al.*, (2005) observaron un efecto sinérgico en la combinación CCI y herbicida para suprimir malezas, y concluyeron que este efecto tóxico podría atribuirse a los aleloquímicos producidos por el CCI en sí o por compuestos químicos liberados por microorganismos asociados con la descomposición de los residuos del cultivo de cobertura. Sin embargo, los autores resaltaron que aún falta información para entender el efecto que podría tener esta combinación sobre la abundancia de grupos específicos de microorganismos sensibles a glifosato presente en los exudados (Teasdale *et al.*, 2005).

El análisis de los espectros IR, mostró que los exudados de plantas suprimidas por CM presentaron mayores valores de absorbancia, mayor definición y diferenciación de las bandas en la

región 1200-950 cm^{-1} respecto de DQ y SS probablemente como consecuencia de un incremento en la exudación de polisacáridos, compuestos oxigenados y fosforados del tipo fosfodiéster (Figura 2.6). Esta última asignación se ve reforzada por el mayor contenido de PT detectado en los exudados radicales de plantas CM (Tabla 2.3). Este aumento podría estar relacionado, por un lado, con la removilización del P de los tejidos senescentes, como rastrojo, corona y raíces. Oyarzabal y Oesterheld, (2009) observaron que uno de los mecanismos de tolerancia a la defoliación de *Sporobolus indicus* L. es la removilización de P. A su vez, Hokka *et al.*, (2004) reportaron que la defoliación aumentó la colonización por HMA de las raíces de una gramínea perenne (*Phleum pratense* L.) con respecto al control sin defoliar en un ensayo en invernáculo, y atribuyeron el aumento a un mayor contenido de C en las raíces. Por lo tanto, el corte de la avena podría estimular la germinación y el crecimiento de HMA, los cuales son conocidos por su capacidad para mejorar la adquisición de P (Kobae, 2019). Por el contrario, el menor contenido de PT en exudados de plantas finalizadas por DQ con respecto a CM podría deberse a que el glifosato afecta la colonización de HMA (Druille *et al.*, 2013; Zaller *et al.*, 2014).

Por otra parte, se observó un incremento en la banda 2850 cm^{-1} para CM la cual podría indicar un mayor contenido de grupos $-\text{CH}_2-$ (Figura 2.4). Se registró, además, una menor intensidad y un ensanchamiento de la banda centrada en 1421 cm^{-1} y una mayor intensidad y definición de la banda centrada en 1380 cm^{-1} en el método CM. Sravan Kumar *et al.*, (2015) atribuyeron esa banda a la deformación del enlace O-H en fenoles, en un análisis de hojas de plantas herbáceas. Sin embargo, el análisis conjunto de la banda en 2850 cm^{-1} y de FT, sugeriría que esa banda se debe principalmente a grupos metilo, lo cual podría implicar un incremento en la cantidad de compuestos del tipo polisacáridos y/o un mayor grado de ramificación. Por otro lado, no se puede descartar la posible asociación entre compuestos fenólicos y polisacáridos (glucosilación y/u otras asociaciones) como se da en los ácidos ferúlicos, siríngico y cafeico, entre otros (Šamec *et al.*, 2021). El incremento de hidratos de carbono y grupos metilo indicaría un incremento relativo de ácidos ferúlicos. El ácido ferúlico, junto con otros ácidos fenólicos, ha sido encontrado en extractos acuosos de residuos de plantas de avena (Chon y Kim, 2004). Stoklosa *et al.*, (2008), reportaron que los residuos de avena tienen efecto alelopático sobre malezas y que este efecto estuvo asociado a la presencia de ácido cafeico, ácido hidroxicinámico, ácido ferúlico, ácido *m*-cumárico, ácido *p*-cumárico y cumarina. Sin embargo, debido a que en CM se observó un menor contenido de FT, la exudación de estos compuestos con potencial aleloquímico no se consideraría fitotóxica ya que no supera las 100 ppm (Otte *et al.*, 2020). Por lo tanto, estos cambios podrían atribuirse a una respuesta metabólica frente a la situación de estrés producida por el corte (Siqueira *et al.*, 1991).

En la segunda hipótesis se postuló que la DQ incrementa la abundancia de bacterias que poseen genes de C-P liasas de la vía de degradación de fosfonatos en la comunidad microbiana rizosférica. Dado que la PCR cuantitativa mostró similar abundancia del gen *phnJ* en los métodos de finalización,

se rechaza la hipótesis planteada (Tabla 2.4). Kulikova *et al.*, (2020) reportaron resultados similares para tres tipos de suelos (sódico-podzólico, suelo forestal gris y chernozem lixiviados) incubados 14 días con glifosato, donde no observaron diferencias en la abundancia de los genes *phnJ* que codifican para C–P liasas de α - y γ -proteobacteria respecto del control sin herbicida. La amplia presencia de fosfonatos naturales en el suelo (McGrath *et al.*, 2013; Chin *et al.*, 2016) y el aumento de P, fosfatasa y ácidos grasos microbianos reportado por el uso de CCl (Hallama *et al.*, 2021) podrían enmascarar los cambios en la abundancia de genes bajo la influencia temporal de glifosato exudado en la rizosfera.

Se encontró que el contenido de PT en los exudados radicales se correlacionó significativa y positivamente con el número de copias del gen *phnJ*. Esta correlación es muy interesante ya que estaría indicando que las bacterias que degradan fosfonatos juegan un rol importante en el ciclo global de P. Como se mencionó anteriormente, el método CM presentó mayor contenido de PT y en los espectros se observaron compuestos fosforados del tipo fosfodiésteres. La proliferación de hongos micorrícicos y bacterias que degradan fosfonatos (portadoras de *phnJ*) podrían aportar mayores niveles de P_i a la planta, explicando a su vez la mayor liberación de P medido en sus exudados. En el caso de las plantas finalizadas por DQ, las diferencias en el contenido de PT en los exudados con respecto a los exudados de plantas CM y SS, respectivamente, podría deberse a que sólo las bacterias que degradan fosfonatos estarían suministrando P a la planta, metabolizando tanto glifosato como otros fosfonatos presentes en el suelo rizosférico.

Pese a los cambios observados en los exudados de plantas sometidas a los distintos métodos de finalización, no hubo cambios concomitantes en la abundancia de bacterias que degradan fosfonatos. Probablemente, estudios de expresión dirigidos al ARNm de *phnJ* arrojarían más información sobre este tema.

5. Conclusiones

Los resultados de este capítulo indican que la respuesta de los métodos de finalización a la exudación de compuestos fenólicos fue dependiente de la fertilización, ya que el método DQ presentó un mayor contenido de FT en relación con CM, sólo en la condición sin N. A su vez, los métodos de finalización tuvieron un efecto diferencial sobre el perfil químico de exudación de avena, no así la fertilización nitrogenada. Si bien la exudación fue distinta en plantas finalizadas por CM respecto a SS y DQ, no se produjeron cambios en la abundancia del gen *phnJ* en la rizosfera de las plantas independientemente de los métodos de finalización.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DEL MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE *Avena sativa* L. EN RELACIÓN CON LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA Y LOS MÉTODOS DE FINALIZACIÓN DEL CULTIVO

Parte de este capítulo fue publicado: Ammonia oxidizing prokaryotes respond differently to fertilization and termination methods in common oat's rhizosphere. Frontiers in Microbiology. 12:746524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746524>.

1. Introducción

Entre los beneficios que brinda el uso de los CCI de gramíneas, se destaca la capacidad para absorber nitratos residuales, evitando las pérdidas por lixiviación. Sin embargo, los CCI generalmente son fertilizados con N a la siembra o en macollaje para maximizar la producción de biomasa y, por ende, mejorar sus beneficios, ya que luego retorna al suelo por los procesos de amonificación y nitrificación, contribuyendo a la nutrición del cultivo sucesor (Fernández *et al.*, 2012; Balkcom *et al.*, 2018). Reiter *et al.*, (2008) reportaron que la dosis más alta de nitrato de amonio (67 kg ha⁻¹) aplicada en macollaje maximizó la producción de biomasa de centeno en relación con el tratamiento con bajos niveles de N (34 kg ha⁻¹). Por el contrario, Ridley (2012) encuentra que el uso de bajos niveles de fertilización nitrogenada (23 kg ha⁻¹) aplicados en macollaje fue suficiente para generar diferencias significativas en el nivel de producción de materia seca y cobertura de avena a partir de fines de macollaje y hasta el secado químico. Tanto los métodos de finalización como la fertilización aplicada a los CCI implican un cambio en la bioquímica de las plantas, que necesariamente se refleja en el metabolismo de la zona radical.

Diversos estudios han mostrado que los CCI influyen sobre, por ejemplo, las pérdidas de N como de N₂O (óxido nitroso) o nitrato del suelo (Basche *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2020), pero pocos reportan efectos de los métodos de supresión de CCI sobre los microorganismos implicados en el ciclo biogeoquímico del N edáfico. Damin *et al.*, (2008, 2010) observaron un aumento del N edáfico luego del tratamiento con glifosato y glufosinato de amonio en el CC de *Brachiaria decumbens*, indicando que ambos herbicidas promueven la exudación de amonio (NH₄⁺). Asimismo, Mijangos *et al.*, (2009) reportaron niveles aumentados de amonio en suelo rizosférico de plantas de triticale tratadas con glifosato. En tanto, Tenuta y Beauchamp, (1996) observaron que la aplicación de glifosato y consecuente senescencia de plantas de *Bromus inermis* y *Poa pratensis* L., resultaron en significativos aumentos en la tasa de desnitrificación potencial 14 y 49 días post-aplicación, en comparación con suelos no tratados o bajo barbecho. El corte o defoliación de las plantas también podría impactar sobre la comunidad microbiana del suelo por alterar la cantidad y composición de los exudados radicales, así

como por reducir la demanda de agua y nutrientes por parte de la planta (Paterson y Sim, 1999; Thornton *et al.*, 2004; Paterson *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2008). Se ha reportado que el corte o la defoliación de *Lolium perenne* L. pueden aumentar la rizodeposición de C estimulando la mineralización del suelo para liberar nitrato que es adquirido por las raíces sin lixiviarse del suelo (Capstaff *et al.*, 2021). Estas investigaciones, aunque sugieren que podría haber efectos sobre los microorganismos involucrados en el ciclo del N, no analizaron esos cambios. La nitrificación y la desnitrificación son las dos principales transformaciones del N en el suelo. La nitrificación es principalmente la oxidación autotrófica del amoníaco (NH_3) a nitrito (NO_2^-) y luego a nitrato (NO_3^-). El paso limitante en la nitrificación es la oxidación de NH_3 a NO_2^- , por la enzima de membrana amonio-monooxigenasa (AMO) (Myrold y Posavatz, 2007), codificada por el gen *amoA* en BOA y AOA. La desnitrificación, en tanto, es la reducción secuencial de NO_3^- , pasando por NO_2^- y NO (óxido nítrico), a las formas gaseosas N_2O y eventualmente, N_2 molecular. El proceso de reducción de nitrito a óxido nítrico es el segundo paso de la vía de desnitrificación, y los genes *nirK* y *nirS* codifican para reductasas de nitrito de similar funcionalidad, pero distinta estructura. La rizosfera es un sitio con alta actividad desnitrificadora, por la provisión de C en los exudados y el bajo tenor de O_2 (Achouak *et al.*, 2019).

Los genes *amoA* de BOA/AOA y *nirK/nirS* han sido utilizados extensamente como marcadores moleculares de los grupos microbianos responsables de dichos procesos (Rotthauwe *et al.*, 1997; Kandeler *et al.*, 2006; Leininger *et al.*, 2006). Hart *et al.*, (2009) analizaron los efectos de glifosato sobre las bacterias desnitrificadoras en la rizosfera de maíz, no encontrando cambios apreciables en la abundancia y diversidad de este grupo. Sin embargo, este trabajo fue llevado a cabo en un ensayo de campo de un año, bajo condiciones de sequía, lo que aporta limitada información al respecto. En tanto, Guo *et al.*, (2018) reportaron que el corte o defoliación anual de plantas C3 (*Ambrosia trifida*, *Solanum carolinense* y *Euphorbia dentate*) y C4 (*Tridens flavus*, *Sporobolus compositus* y *Sorghum halepense*) aumentó la abundancia de genes implicados en la desnitrificación (*norB*, *nirK*, *nirS* y *narG*) respecto de las plantas sin defoliar, con la consecuente disminución del contenido de nitrato del suelo. Resultados recientes obtenidos por Allegrini *et al.*, (2019) demuestran que comunidades microbianas de la rizosfera de plantas de avena de 60 días son influenciadas diferencialmente por el método de finalización aplicado al CCI. El gen *amoA*_{AOA} mostró una abundancia significativamente menor en el método de finalización con glifosato respecto del método de corte a los 26 días, mientras que para BOA la abundancia promediada para todas las fechas de muestreo también resultó significativamente menor en el método con glifosato. La exudación de la molécula de glifosato hacia la rizosfera en plantas sensibles junto con la modificación inducida por glifosato en la cantidad y calidad de los exudados podrían explicar esta reducción en la abundancia de microorganismos oxidantes del amoníaco.

Estudios realizados por Kremer *et al.*, (2005) sobre soja resistente a glifosato indican que el herbicida exudado en la rizosfera impone diversos efectos sobre la biología y ecología del microbioma

rizosférico, sobre sus interacciones y con la planta. En diversas investigaciones en cultivos resistentes a glifosato se ha observado un impacto negativo de formulados comerciales de herbicida sobre grupos específicos de microorganismos de la rizosfera (Zobiolo *et al.*, 2011). Entre los grupos de bacterias rizosféricas, se ha reportado que especies del género *Pseudomonas*, bacterias reductoras de Mn, bacterias productoras de AIA y *Bradyrhizobium japonicum* son afectadas por el tratamiento de soja con glifosato (Zablotowicz y Reddy, 2004; Zobiolo *et al.*, 2011; Aristilde *et al.*, 2017). Asimismo, Lorch *et al.*, (2021) encontraron que en pastizales naturales de la Pampa Deprimida desecados con glifosato a fines del verano, hubo una reducción en la abundancia y un cambio en la estructura de la comunidad de *Pseudomonas* cultivables del suelo. Las alteraciones bioquímicas de las plantas tratadas con glifosato también pueden modificar la habilidad competitiva de bacterias sobre hongos (Ratcliff *et al.*, 2006) o aumentar la incidencia de enfermedades (Hammerschmidt, 2017). En una revisión donde analizaron el efecto del glifosato sobre la resistencia a enfermedades y la salud de los cultivos, Martínez *et al.*, (2018) reportaron que la población y/o la virulencia de ciertas especies fitopatógenas (como *Fusarium* y *Rhizoctonia*) puede aumentar después de la aplicación de glifosato a plantas resistentes y susceptibles al herbicida.

No obstante, un número considerablemente menor de estudios se ha focalizado en la comparación de comunidades microbianas de la rizosfera de cultivos sensibles (Mijangos *et al.*, 2009; Imparato *et al.*, 2016; Allegrini *et al.*, 2019) como resultado de distintos tratamientos de finalización. Allegrini *et al.*, (2019) en un experimento con avena, como CCI, en condiciones controladas, observaron que el método de supresión de la planta influye sobre la abundancia relativa de algunos taxones (*Betaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Mesorhizobium*, *Gaiella*) en la rizosfera. Por otra parte, Schafer *et al.*, (2014) reportaron que la exposición a glifosato en variedades sensibles o resistentes al herbicida de la maleza *Ambrosia trifida* resultaba en diferencias en la abundancia relativa de algunos patógenos (*Verticillium* y *Xanthomonas*) y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, *Burkholderia*). A su vez, si bien algunos trabajos han evaluado la respuesta de la comunidad microbiana al corte o defoliación de las plantas, los resultados reportados son contradictorios. Guo *et al.*, (2018) encontraron que las abundancias relativas de algunas bacterias del suelo como Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi y Planctomycetes se vieron afectadas por el corte o defoliación en un pastizal dominado por plantas C3 y C4. En tanto, Xia *et al.*, (2019) reportaron que la defoliación intensiva de *Cynodon dactylon* x *C. transvaalensis* y *Agrostis stolonifera* favoreció a bacterias oligótroficas (Acidobacteria y Alphaproteobacteria) sobre las copiótrofas (Betaproteobacteria y Bacteroidetes) en suelo. Sin embargo, mediante un estudio de secuenciación de amplicones del ARNr 16S, Carey *et al.*, (2015) observaron que el tratamiento corte no afectó la estructura y abundancia relativa de la comunidad microbiana del suelo.

Por lo tanto, en base a los antecedentes existentes en la literatura y a resultados previos del grupo de trabajo, se plantea como hipótesis que los métodos de finalización de CCI afectan la abundancia y actividad BOA y AOA, de bacterias desnitrificantes y la estructura de la comunidad de procariotas en la rizosfera de avena, debido a los efectos sobre la rizodeposición y el *turnover* radical, e independientemente de la fertilización. Asimismo, se espera que la fertilización con N inorgánico favorezca a BOA sobre AOA en la rizosfera de la avena, independientemente del método de finalización. Para contrastar estas hipótesis, se plantean los siguientes objetivos: 1) evaluar el efecto combinado de la fertilización nitrogenada y los métodos de finalización de avena sobre la actividad potencial nitrificante, la abundancia de procariotas nitrificantes (BOA y AOA) y desnitrificantes utilizando la qPCR de los genes marcadores (*amoA*, *nirS* y *nirK*) como *proxies* de la abundancia de esos grupos, y 2) analizar la diversidad (estructura y composición) de la comunidad de *Bacteria* mediante la secuenciación masiva de amplicones de la región V4 del gen ARNr 16S, en un ensayo en invernáculo bajo condiciones controladas.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño del ensayo

El diseño del ensayo se detalla en profundidad en la sección 2.1 del capítulo 2. Brevemente, se realizó un ensayo con plantas de avena como modelo experimental en invernáculo con dos factores de estudio: fertilización con dos niveles: con y sin N (100 kg N ha^{-1} , urea) y método de finalización (tres niveles), con 4 réplicas por tratamiento. A los 92 días desde la fecha de siembra (estadio Z3.1, Zadoks *et al.*, 1974), se finalizó el CCI, determinando 3 niveles del factor:

- 1) **Sin supresión** (SS), muestreo de plantas vivas.
- 2) **Corte mecánico** (CM) de plantas con tijeras a 1 cm desde la superficie del suelo.
- 3) Secado de plantas con **aplicación de glifosato** (DQ) a una dosis equivalente a 3 litros ha^{-1} .

El muestreo de raíces y suelo rizosférico fue destructivo con cuatro réplicas por tratamiento, antes de la fecha de aplicación de los métodos de finalización (SS) y a los 12 días postsupresión (CM y DQ, 24 muestras en total).

2.2. Determinación de parámetros químicos del suelo

Se determinó el contenido total de P (Pt) en el suelo rizosférico por medio de Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES, Shimadzu 9000 Simultáneo de Alta Resolución) en el laboratorio de servicios LANAQUI (CERZOS-CONICET).

Se tomaron muestras de suelo no rizosférico de las macetas en el momento de aplicación de los métodos de finalización del CCI y a los 12 días postsupresión. Las muestras fueron secadas al aire, tamizadas ($<2 \text{ mm}$) y remitidas al Laboratorio de Servicios Analíticos de Suelos, Plantas y Ambiente

(LABSPA, CERZOS-CONICET-UNS) para determinar el contenido de nitrógeno total (Nt), nitrógeno de amonio (N-NH₄), nitrógeno de nitratos (N-NO₃) (semimicro Kjeldahl) y fósforo extractable (Pe) (Bray y Kurtz, 1945).

2.3. Determinación de la actividad de nitrificación

Para la determinación de la actividad de nitrificación se siguió el procedimiento descrito por Hart *et al.*, (1994), con modificaciones (1,5 g en 10 ml de buffer de reacción). El buffer de reacción [0,3 mM KH₂PO₄, 0,7 mM K₂HPO₄, 0,05 mM (NH₄)₂SO₄ y 10 mM KClO₃] se preparó el mismo día en el que se inició la incubación de la suspensión de suelo. La suspensión de suelo se preparó en Erlenmeyer estériles (125 ml) y se preincubó por 1 h en un agitador orbital (25°C, 180 rpm en oscuridad) hasta obtener una suspensión homogénea; a continuación, se tomaron muestras de 1 ml a las 0, 2, 4, 20 y 22 h de acuerdo con lo sugerido por Hart *et al.*, (1994). Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm y 4°C en una microcentrífuga (Hermle Z32-HK), el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se conservó a -20°C hasta su uso. El análisis cuantitativo de la concentración de nitrito se realizó en microplacas de polipropileno de fondo plano de 96 pocillos según el método de diazotación (reacción de Griess) con ácido sulfanílico (0,8 % p/v en ácido acético; Britania®, Argentina) y N-(1-Naftil) etilendiamina 2HCl (0,1% p/v en ácido acético; Carbosynth®, Reino Unido). La absorbancia se midió a 540 nm y 25°C en un lector de microplacas (BMG Labtech FLUOstar Optima, Alemania). La tasa de producción de nitrito se calculó por regresión lineal de la concentración de la solución sobre hora. Después de la corrección por contenido de humedad del suelo y la conversión en base a peso del suelo seco (pss), se calculó la actividad potencial nitrificante (APN) utilizando la fórmula descrita por Drury *et al.*, (2006) y reportado en µg N-NO₂⁻ g⁻¹ pss h⁻¹.

2.4. Análisis molecular de la comunidad microbiana

2.4.1. Extracción de ADN de suelo rizosférico y cuantificación

La extracción de ADN a partir de 250 mg de suelo rizosférico se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen GmbH, Alemania). La cuantificación usando el kit QuantiFluor® ds DNA System (Promega®, Estados Unidos) en un fluorómetro Quantus (Promega®, Estados Unidos) y la calidad del ADN fue analizada en un gel de agarosa al 1% y en un espectrofotómetro de la serie DS-11 FX (DeNovix®, Estados Unidos), usando como indicador las relaciones de absorbancias (A260/A230 y A260/280A).

2.4.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de diferentes grupos microbianos

La abundancia de procariontes se estimó por cuantificación del número de copias del gen ARNr 16S por qPCR, utilizando cebadores universales para *Bacteria* (338F/518R, Fierer *et al.*, 2005) y para

Archaea (Arch346aF/Arch934b, Hoshino *et al.*, 2011). Los cebadores se detallan en la Tabla 3.1. Para *Bacteria* el número de copias fue calculado a partir de una curva estándar construida con diluciones decimales de un plásmido con inserto clonado de dicho gen obtenido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* (196 pb). Para *Archaea* el número de copias fue calculado a partir de una curva estándar construida con diluciones decimales de un plásmido con inserto (570 pb) del gen clonado a partir de ADN metagenómico obtenido de un digestor anaeróbico. La composición de la mezcla de reacción, el programa de amplificación del gen ARNr 16S de *Bacteria* y *Archaea* y los rangos de las curvas estándar empleados se detallan en la Tabla 2 del Anexo I.

Para estimar la abundancia de BOA y AOA se cuantificó el número de copias del gen *amoA* de BOA y AOA con los cebadores descritos en la Tabla 3.1. La composición de las mezclas de reacción, los programas de amplificación del gen *amoA* de BOA y AOA y los estándares se prepararon según Zabaloy *et al.*, (2015) y Zabaloy *et al.*, (2017), respectivamente (Tabla 2, Anexo I). Se calcularon las abundancias relativas (AR) de los genes indicadores de BOA y AOA, es decir, en relación con el número de copias del gen del ARNr 16S de *Bacteria* (BOA: *Bacteria*) y *Archaea* (AOA: *Archaea*). Asimismo, se calculó la abundancia del gen *amoA*_{AOA} con relación al gen *amoA*_{BOA} (AOA: BOA).

La abundancia de bacterias desnitrificantes se estimó por cuantificación del número de copias de los genes *nirK* y *nirS* (Kandeler *et al.*, 2006), con los cebadores detallados en la Tabla 3.1. El número de copias de *nirK* fue calculado a partir de una curva estándar construida con diluciones decimales de un plásmido con inserto clonado de dicho gen (425 pb) obtenido a partir de *Pseudomonas aeruginosa*. Para *nirS* el número de copias fue calculado a partir de una curva estándar construida con diluciones decimales de un plásmido con inserto clonado de dicho gen obtenido a partir de *Alcaligenes faecalis* (160 pb). La composición de la mezcla de reacción, el programa de amplificación de los genes de nitrito reductasas y los rangos de las curvas estándar empleados se detallan en la Tabla 2 del Anexo I.

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador de tiempo real ABI 7500 y su software asociado 7500 Software v.2.0.3 (Applied Biosystems®, Estados Unidos).

Tabla 3.1. Cebadores utilizados para qPCR.

Grupo	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Bacteria</i>	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	196	Fierer <i>et al.</i> , (2005)
	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
<i>Archaea</i>	Arch346aF	CGGGGYGCASCAGGCGCGAA	570	Hoshino <i>et al.</i> , (2011)
	Arch934b	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT		
BOA	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	Rotthauwe <i>et al.</i> , (1997)
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
AOA	amoA19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	624	Leininger <i>et al.</i> , (2006)
	CrenamoA616r48x	GCCATCCABCKRTANGTCCA		
<i>nirK</i>	nirK876	ATYGGCGG VAYGGCGA	160	Henry <i>et al.</i> , (2004)
	nirK1040	GCCTCGAT CAGRTRRTGGT		
<i>nirS</i>	nirSCd3aF	AACGYSAAGGARACSGG	425	Kandeler <i>et al.</i> , (2006)
	nirSR3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA		

2.4.3. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana

El análisis metagenómico descrito a continuación se llevó a cabo a partir de tres de las cuatro réplicas de los métodos de finalización (SS1, SS2, SS3; SSN1, SSN2, SSN3; CM1, CM2, CM3; CMN1, CMN2, CMN3; DQ1, DQ2, DQ3; DQN1, DQN2, DQN3).

El proceso de secuenciación de amplicones del gen codificante para el ARNr 16S (“barcoded amplicon sequencing”, en inglés), se llevó a cabo con la tecnología Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) con un largo de lecturas de 2x300 pb y un mínimo de profundidad de secuenciación de 15000 *paired-end-reads* por corrida. La librería de genes fue preparada con los cebadores 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') dirigidos a la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S, usando el protocolo Fluidigm® (Anexo II) del laboratorio de servicios de ADN, Roy J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois (Urbana-Champaign, Estados Unidos). Los archivos FASTQ fueron generados y demultiplexados por el servicio de secuenciación con el Software de Conversión bcl2fastq v2.20 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos).

2.5. Análisis bioinformático

El archivo FASTQ fue procesado en QIIME2 2019.7 (Bolyen *et al.*, 2019) usando los *pipelines* recomendados para pares de lecturas basadas en el algoritmo *denoising dada2*. DADA2 es el algoritmo desarrollado recientemente que genera variantes de secuencia de amplicones (ASVs) como secuencias representativas (Callahan *et al.*, 2016). El método de ASV infiere las secuencias biológicas en la muestra antes de la introducción de errores de secuenciación y amplificación, y distingue las variantes de secuencia que difieren en tan solo un nucleótido. Los métodos ASV han demostrado una sensibilidad y especificidad tan buenas o mejores que los métodos OTU y discriminan mejor los patrones ecológicos (Callahan *et al.*, 2017).

Los cebadores fueron removidos usando el argumento *p-trim-left* dentro del comando “*dada2 denoised-paired*”. El argumento de corte dentro del comando “*dada2 denoised-paired*” fue de 283 pb para las lecturas *forward* y 251 pb para las lecturas *reverse* (valores de Q media >27 informados por Interactive Quality Plot tool de QIIME2), mientras que se estableció un valor por *default* de 2 para el número esperado de errores (*E*). Después de las etapas de procesamiento, eliminación de cebadores, corte, filtrado, *denoising* y remoción de quimeras se obtuvo la tabla de ASVs. Finalmente, los ASVs fueron clasificados taxonómicamente utilizando el clasificador bayesiano Ribosomal Database Project (RDP) Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Las secuencias fueron asignadas taxonómicamente a nivel de género, familia, orden, clase y filo.

La tabla de ASVs fue rarefaccionada (función *rarefy*) según la muestra con el menor número de secuencias (38934 secuencias) y se obtuvieron las curvas de rarefacción (función *rarecurve*). La tabla rarefaccionada fue utilizada en el paquete *vegan* v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2020) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1335) para el cálculo de las siguientes métricas de diversidad α : los índices de heterogeneidad de Shannon (H') y el recíproco del índice de Simpson ($1/\lambda$), la riqueza [número de ASVs observados (S') e índice de Chao-1] y la equitatividad de cada muestra (Anexo III).

Las secuencias fueron alineadas con el programa de múltiples alineamientos MAFFT v. 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html>) para calcular la distancia UniFrac. Con las secuencias alineadas se construyó un árbol filogenético basado en el método de Neighbor-joining usando el paquete *ape* v5.4-1 (Paradis y Schliep, 2018) y el paquete *phangorn* v2.5.5 (Schliep, 2011) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355). El árbol filogenético y la tabla de ASVs rarefaccionada fueron usados en el paquete *GUniFrac* v1.1 (Chen, 2021) del software estadístico R v3.6.1 para calcular la distancia UniFrac generalizada.

2.5.1. Análisis estadísticos

Los modelos lineales mixtos se ajustaron a los parámetros químicos del suelo (Pt, Pe, N-NH₄ y N-NO₃), APN, qPCR (\log_{10} del número de copias μg^{-1} ADN y abundancia relativa) e índices de diversidad α (riqueza, equitatividad e índices de heterogeneidad) utilizando PROC GLIMMIX del software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). La fertilización y los métodos de finalización se consideraron efectos fijos y la maceta como efecto aleatorio. Se consideró un $P < 0,2$ como evidencia de interacción (Littell *et al.*, 2002). Cuando fue apropiado, las medias de mínimos cuadrados (*lsmeans*) se separaron usando la opción *lines* de la declaración *lsmeans*, estableciendo la probabilidad de error de Tipo I (α) en 0,05. Los coeficientes de correlación de Pearson ($\alpha=0,05$) obtenidos con el procedimiento CORR de SAS, se utilizaron para evaluar la relación entre la abundancia de los genes de nitrificación (BOA y AOA) y la función (FT y APN).

Los datos de secuenciación de amplicones se analizaron utilizando un enfoque tradicional y de composición (Gloor y Reid, 2016; Gloor *et al.*, 2017). En el primer caso, la distancia UniFrac fue usada como entrada en el paquete *vegan* v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2020) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355) para el análisis multivariado de la diversidad β a través del escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) utilizando la función *metaMDS*. En el segundo caso partiendo de la tabla de ASVs inicial resultante de la plataforma de clasificación RDP, que contenía 12320 ASVs, se procedió a realizar una serie de pasos de filtrado y selección de ASVs. Primero, se agruparon las *reads* de los ASVs pertenecientes a un mismo género, lo que resultó en un total de 924 géneros. Este conjunto se redujo aún más ya que sólo se mantuvieron los géneros con una abundancia relativa promedio $>0,1\%$ (Gloor y Reid, 2016), resultando 183 géneros. Estos géneros con las *reads* de

los ASVs se ingresaron luego en la plataforma de detección de predictores JMP® para proporcionar una identificación inicial de los géneros que responden a los efectos del tratamiento utilizando un método de remuestreo *bootstrap* (SAS Institute Inc, 2018; Villamil *et al.*, 2021). Como resultado se obtuvo una tabla de 51 ASVs clasificadas a nivel de género que contribuyeron al menos en un uno por ciento a la variabilidad de los algoritmos del modelo. Los datos de esta tabla fueron transformados a *centered log-ratio* (clr) (Aitchison, 1986), previo reemplazo de los valores ceros mediante el procedimiento “*cmultRep1*” del paquete *zCompositions* (Palarea-Albaladejo y Martín-Fernández, 2015). Luego, los datos transformados fueron usados como entradas para el análisis de componentes principales (ACP).

El ACP se realizó utilizando el procedimiento FACTOR en el software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) con *priors*=1, los *reads* de los ASVs transformados a *centered log-ratio* se resumieron en un conjunto de variables compuestas no correlacionadas o componentes principales (CPs). Las CP con autovalor ≥ 1 que explicaban al menos el 5% de la variabilidad en el conjunto de datos se utilizaron como variables independientes para análisis posteriores. Los géneros con correlación significativa con cada CP ($>|0,5|$) fueron considerados sensibles y se utilizaron en la descripción de las CP. Los modelos lineales se ajustaron a cada CP utilizando el procedimiento GLIMMIX para evaluar el efecto de la fertilización, del método de finalización y su interacción sobre la comunidad bacteriana de la rizosfera de avena. La fertilización y los métodos de finalización fueron considerados efectos fijos en los análisis de la varianza. Cuando fue apropiado, las medias de mínimos cuadrados (*lsmeans*) se separaron usando la opción de *lines* del comando *lsmeans*, estableciendo la probabilidad de error de Tipo I (α) en 0,05.

Se realizó un análisis multivariado de la varianza no paramétrico permutacional (PERMANOVA con la función *adonis* en el paquete *vegan*; Anderson, 2001) usando matrices de distancia (distancia UniFrac generalizada) y 1000 permutaciones para estudiar la existencia de efectos estadísticamente significativos ($P < 0,05$) de la fertilización, del método de finalización, como así también para evaluar la interacción (Ramette, 2007). En el caso particular del efecto de interacción, se realizó la misma consideración que la mencionada anteriormente respecto del *P*-valor. Las comparaciones de a pares fueron examinadas usando el paquete *RVAIDeMemoire* v0.9-80 (Hervé, 2021) (función *pairwise.perm.manova* sin correcciones, 1000 permutaciones) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355).

Se utilizó el Software SigmaPlot versión 10.0 para graficar las relaciones estadísticamente significativa entre las CPs y los tratamientos, sobre los géneros cuyo *loading* fue $>|0,5|$. Las Figuras 3.3-3.5 se componen de dos gráficos: el primer gráfico (A) muestra el *score* medio de la CP para cada método de finalización y sus errores estándar (como barras de error), y el segundo (B) señala la contribución de cada género indicador al valor medio de la CP para cada método de finalización. Esta

contribución se calcula como el valor medio de la CP para un determinado método de finalización (Tabla 3.11) multiplicado por el *loading* de los géneros específicos dentro de la CP (Tabla 3.12), denominados MxL en cada gráfico.

3. Resultados

3.1. Parámetros químicos del suelo

En la Tabla 3.2 se indican los resultados del análisis de los parámetros químicos del suelo: Pt, Pe, Nt, N-NH₄ y N-NO₃. Los resultados muestran que la interacción entre los factores de estudio (fertilización x método de finalización) no fue estadísticamente significativa para ningún parámetro químico del suelo (Tabla 3.2). Al analizar los efectos principales, se observó un efecto altamente significativo del método de finalización para el contenido de Pt presente en el suelo rizosférico ($P=0,0002$; Tabla 3.2). Los métodos de finalización CM y DQ presentaron un mayor contenido de Pt con respecto a SS (Tabla 3.2).

Para Pe el efecto del método de finalización no resultó significativo ($P>0,05$; Tabla 3.2) pero sí lo fue el efecto correspondiente a la fertilización ($P=0,019$; Tabla 3.2). El contenido de Pe resultó mayor en el suelo sin fertilizar (sin N) con respecto al suelo fertilizado (con N) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para fósforo total (Pt), fósforo extractable (Pe), nitrógeno total (Nt), amonio (N-NH₄) y nitrato (N-NO₃). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

	<i>n</i>	Pt		Pe		Nt		N-NH ₄		N-NO ₃	
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Fertilización (F)											
con N	12	382	9,73	6,35 b	0,21	0,13	0,002	20,29	1,97	7,73	0,98
sin N	12	370		7,11 a		0,13		15,27		6,47	
Método de finalización (M)											
DQ	8	404,0 a	11,92	6,80	0,25	0,14	0,002	16,91	2,41	5,50	1,21
CM	8	407,2 a		6,50		0,13		17,54		8,10	
SS	8	316,3 b		6,90		0,13		18,89		7,73	
F×M											
DQN	4	405,33	16,86	6,50	0,36	0,14	0,003	20,48	3,41	6,23	1,71
CMN	4	412,33		6,20		0,13		19,43		9,08	
SSN	4	327,33		6,35		0,13		20,98		7,88	
DQ	4	402,67	16,86	7,13	0,36	0,14	0,03	13,35	3,41	4,78	1,71
CM	4	402,00		6,80		0,14		15,65		7,05	
SS	4	305,33		6,35		0,13		16,80		7,58	
		<i>gl</i>					<i>P</i> -valor				
F	1	0,4130		0,019		1,000		0,088		0,378	
M	2	0,0002		0,548		0,461		0,841		0,289	
F×M	2	0,8480		0,784		0,712		0,867		0,877	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) y la ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.2. Actividad potencial nitrificante

Los resultados del análisis de la varianza de la APN se indican en la Tabla 3.3. La interacción no resultó significativa, por lo que se consideraron los efectos principales (fertilización y método de finalización). Sólo el efecto de la fertilización resultó significativo ($P < 0,0001$; Tabla 3.3). La APN resultó mayor en el suelo fertilizado (con N) con respecto al suelo sin fertilizar (sin N).

Se analizó la correlación entre la abundancia y la actividad microbiana, y se observó una fuerte correlación positiva entre la APN y el número de copias del gen *amoA_{BOA}* ($r = 0,74$, $P = 0,0004$), mientras que la correlación entre la APN y el gen *amoA_{AOA}*, fue negativa y débil ($r = -0,22$, $P = 0,39$), no significativa.

Tabla 3.3. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para la actividad potencial nitrificante (APN). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

		APN ($\mu\text{g N-NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{ pss h}^{-1}$)		
		<i>n</i>	Media	ES
Fertilización (F)				
	con N	12	3,56 a	0,18
	sin N	12	2,02 b	
Método de finalización (M)				
	DQ	8	2,88	2,23
	CM	8	2,71	
	SS	8	2,78	
F×M				
	DQN	4	3,66	0,32
	CMN	4	3,61	
	SSN	4	3,41	
	DQ	4	2,10	0,32
	CM	4	1,81	
	SS	4	2,15	
		<i>gl</i>	<i>P</i> -valor	
F		1	<0,0001	
M		2	0,8660	
F×M		2	0,7030	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) y la ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

Pss: peso seco del suelo.

3.3. PCR cuantitativa de genes indicadores

La abundancia de *Bacteria*, *Archaea*, AOA, BOA, *nirK* y *nirS* fue evaluada mediante qPCR de los genes indicadores correspondientes. La eficiencia y las ecuaciones obtenidas del ajuste lineal de las curvas estándar, que describen la relación entre los valores *Ct* y el número de copias de cada gen indicador, se detallan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Ecuaciones de las curvas estándar y eficiencias de las qPCR de cada gen indicador.

Gen	Grupo	Ecuación	R ²	Eficiencia (%)
ARNr 16S	<i>Bacteria</i>	$Ct = 38,41 - 3,55 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	91,28
ARNr 16S	<i>Archaea</i>	$Ct = 34,54 - 3,77 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,998	84,19
<i>amoA</i>	AOA	$Ct = 33,55 - 3,76 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,996	84,47
<i>amoA</i>	BOA	$Ct = 39,08 - 3,88 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,993	80,99
<i>nirK</i>	<i>nirK</i>	$Ct = 36,56 - 3,36 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	98,57
<i>nirS</i>	<i>nirS</i>	$Ct = 39,58 - 3,68 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	87,07

En la Tabla 3.5 se indican los resultados del análisis de la varianza para los distintos grupos microbianos al comparar el número de copias de los diferentes genes indicadores utilizados en cada caso.

El análisis de los datos correspondiente a *Bacteria* y *Archaea* indicó una interacción no significativa entre los dos factores involucrados: fertilización y método de finalización (Tabla 3.5). En base a ello, se evaluaron los efectos principales. En el primer caso, ninguno de los efectos principales resultó significativo ($P > 0,05$; Tabla 3.5). Para *Archaea*, sólo se observó un efecto principal marginalmente significativo del método de finalización ($P = 0,068$; Tabla 3.5). El número de copias del gen ARNr 16S fue mayor en la rizosfera de plantas SS con respecto a las plantas sometidas a DQ y CM (Tabla 3.5).

Para AOA, se observó un efecto principal estadísticamente significativo del método de finalización ($P < 0,001$; Tabla 3.5). El número de copias del gen *amoA*_{AOA} resultó mayor en la rizosfera de plantas CM en comparación con las plantas SS (aumento de 1,49 veces) y DQ (aumento de 1,76 veces), mientras que no se observaron diferencias significativas entre DQ y SS ($P > 0,05$; Tabla 3.5). Se observó un efecto principal marginalmente significativo del factor fertilización ($P = 0,063$). El número de copias del gen *amoA* fue menor en la rizosfera de plantas fertilizadas con respecto a las plantas sin fertilizar (Tabla 3.5).

Al analizar la correlación entre la abundancia y actividad microbiana, se encontró una correlación negativa y significativa entre fenoles totales (FT) y el número de copias del gen *amoA*_{AOA}

($r=-0,54$, $P=0,0195$), mientras que no se observó una correlación significativa entre FT y la abundancia del gen *amoA*_{BOA} ($r=-0,37$, $P=0,13$).

Al realizar el análisis de BOA, se observó una respuesta diferencial a la adición del fertilizante en la rizosfera de las plantas DQ en relación con la respuesta observada en las plantas sometidas a CM o SS ($P=0,053$; Tabla 3.5). Si bien no se observó estimulación de BOA inducida por N en las plantas DQ, se obtuvo un número de copias del gen *amoA* significativamente mayor después de la fertilización con N en la rizosfera de las plantas CM (2,5 veces) y SS (3,6 veces) en relación con las respectivas plantas no fertilizadas ($P<0,05$; Tabla 3.5). Al comparar entre los métodos de finalización, se encontró una abundancia significativamente menor de *amoA*_{BOA} para DQ con respecto a CM y SS dentro de la condición fertilizada (Tabla 3.5), un resultado que no se observó dentro del grupo no fertilizado.

El análisis de los datos correspondientes al número de copias de los genes de reductasas de nitritos, indicó una interacción significativa entre la fertilización y los métodos de finalización para el gen *nirS* ($P=0,042$; Tabla 3.5), pero no así para el gen *nirK* ($P=0,316$; Tabla 3.5), en el cual tampoco se reportaron diferencias significativas para los factores principales ($P>0,05$; Tabla 3.5). Para el gen *nirS*, al realizar la comparación entre los niveles de fertilización bajo un mismo método de finalización, sólo se encontró un número de copias del gen significativamente mayor después de la fertilización con N en la rizosfera de plantas CM (aumentó 2,7 veces) con respecto a las no fertilizadas ($P<0,05$; Tabla 3.5). Al realizar la comparación entre los métodos de finalización no se observaron diferencias significativas ($P>0,05$; Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para el número de copias de los genes indicadores (transformada a \log_{10}). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

	<i>n</i>	Bacteria		Archaea		AOA		BOA		nirS		nirK	
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Fertilización (F)													
con N	9	8,60	0,04	6,75	0,02	5,91 b	0,02	6,12	0,05	6,97	0,05	7,75	0,04
sin N	9	8,57		6,72		5,98 a		5,79		6,89		7,70	
Método de finalización (M)													
DQ	6	8,53	0,05	6,73 b	0,03	5,84 b	0,03	5,86	0,06	6,90	0,06	7,66	0,05
CM	6	8,68		6,73 b		6,08 a		6,07		6,91		7,77	
SS	6	8,55		6,74 a		5,91 b		5,94		6,99		7,75	
F×M													
DQN	3	8,53	0,07	6,67		5,77	0,04	5,89 b	0,09	6,83 ab	0,09	7,66	0,06
CMN	3	8,68		6,76		6,06		6,26 a		7,09 a		7,86	
SSN	3	8,59		6,81		5,90		6,21 a		7,00 ab		7,75	
DQ	3	8,54	0,07	6,69		5,90	0,04	5,83 b	0,09	6,97 ab	0,09	7,67	0,06
CM	3	8,65		6,77		6,11		5,88 b		6,72 b		7,68	
SS	3	8,52		6,71		5,92		5,67 b		6,98 ab		7,74	
	<i>gl</i>								<i>P</i> -valor				
F	1	0,651		0,473		0,0630		0,0006		0,276		0,292	
M	2	0,196		0,068		0,0001		0,0910		0,568		0,256	
F×M	2	0,886		0,191		0,3600		0,0530		0,042		0,316	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0,05$) y la ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P>0,05$).

En la Tabla 3.6 se presentan los resultados del análisis de la varianza para los valores de abundancia relativa de los diferentes grupos microbianos analizados.

Los resultados de AR para BOA y AOA indicaron ausencia de interacción entre los factores en estudio ($P>0,05$; Tabla 3.6). Para BOA, sólo fue significativo el efecto de la fertilización ($P<0,05$; Tabla 3.6). La AR se incrementó 2 veces en los tratamientos fertilizados respecto a los sin N (Tabla 3.6). En el caso de AOA, tanto la fertilización como los métodos de finalización resultaron significativos ($P<0,05$; Tabla 6). La AR resultó 1,2 veces mayor en la rizosfera de plantas no fertilizadas respecto a las fertilizadas (Tabla 3.6). En cuanto a los métodos de finalización la AR de AOA fue 1,4 y 1,5 veces mayor en CM en comparación con DQ y SS, respectivamente (Tabla 3.6).

En cuanto a la abundancia de AOA relativa a BOA, se observó un efecto significativo de la interacción ($P=0,13$, Tabla 3.6). La AR fue menor en la rizosfera de plantas CM y SS sometidas a fertilización en relación con las respectivas plantas no fertilizadas ($P<0,05$; Tabla 3.6). Se observó una disminución de 2,4 y 3,5 veces después de la fertilización en las plantas CM y SS, respectivamente. Al comparar entre los métodos de finalización, no se observaron diferencias significativas (Tabla 3.6).

El análisis estadístico de las AR de los genes de la vía desnitrificadora (*nirS*: *nirK*), indicó un efecto significativo de la interacción ($P=0,02$; Tabla 3.6). Se observó una diferencia marginalmente significativa en la AR después de la fertilización con N en la rizosfera de las plantas desecadas químicamente (DQN), fue menor con respecto a las plantas no fertilizadas (DQ) ($P=0,07$; Tabla 3.6). La AR para las plantas CM tuvo el efecto contrario, se observó un aumento de 1,6 veces con la fertilización (CMN) en relación con las respectivas plantas no fertilizadas (CM) ($P<0,05$; Tabla 3.6). Al comparar entre los métodos de finalización, se encontró una menor AR en CM en relación con DQ y SS dentro de la condición no fertilizada (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para la abundancia relativa (AR) de los genes indicadores. Relación entre el número de copias del gen indicador (BOA y AOA) y el gen ARNr 16S de *Bacteria* y *Archaea*, respectivamente; relación entre el gen amoA de AOA y BOA; relación entre el gen *nirS* y *nirK*. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

		<i>n</i>	BOA/ <i>Bacteria</i>		AOA/ <i>Archaea</i>		AOA/ BOA		<i>nirS/ nirK</i>	
			Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Fertilización (F)										
	con N	9	3,67.10 ⁻³ a	4,16.10 ⁻⁴	1,52.10 ⁻¹ b	8,22.10 ⁻³	0,67	0,11	0,17	0,01
	sin N	9	1,78.10 ⁻³ b		1,81.10 ⁻¹ a		1,57		0,16	
Método de finalización (M)										
	DQ	6	2,33.10 ⁻³		1,47.10 ⁻¹ b	1,01.10 ⁻²	0,99	0,14	0,18	0,01
	CM	6	2,83.10 ⁻³		2,10.10 ⁻¹ a		1,22		0,15	
	SS	6	3,00.10 ⁻³		1,43.10 ⁻¹ b		1,16		0,18	
F×M										
	DQN	3	2,67.10 ⁻³	7,2.10 ⁻⁴	1,31.10 ⁻¹	1,42.10 ⁻²	0,77 ab	0,2	0,15 ab	0,02
	CMN	3	4,00.10 ⁻³		2,00.10 ⁻¹		0,71 a		0,18 a	
	SSN	3	4,33.10 ⁻³		1,24.10 ⁻¹		0,52 a		0,18 a	
	DQ	3	2,00.10 ⁻³	7,2.10 ⁻⁴	1,63.10 ⁻¹	1,42.10 ⁻²	1,20 bc	0,2	0,20 a	0,02
	CM	3	1,67.10 ⁻³		2,19.10 ⁻¹		1,72 bc		0,11 b	
	SS	3	1,67.10 ⁻³		1,62.10 ⁻¹		1,80 c		0,17 a	
		<i>gl</i>				<i>P</i> -valor				
F		1	0,008		0,0260		0,0001		0,606	
M		2	0,639		0,0008		0,5050		0,212	
F×M		2	0,362		0,8030		0,1300		0,020	

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) y la ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.4. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana

El número total de secuencias de ARNr 16S de *Bacteria* en cada muestra después de cada etapa de procesamiento (filtrado, *denoising* y eliminación de quimeras) se muestra en la Tabla 3.7. Como se observa en esta tabla, luego de realizar las distintas etapas no se removieron un número significativo de lecturas (*reads*), lo que refleja la alta calidad del conjunto de datos. Se obtuvieron un total de 883911 secuencias con una extensión promedio de 264 nucleótidos, incluyendo las correspondientes a *Bacteria* y *Archaea*. El número de ASVs definidas luego del procesamiento y limpieza del conjunto total de datos (18 muestras) fue de 12469 para *Bacteria+Archaea*, de los cuales 12350 fueron clasificados como pertenecientes a *Bacteria* (99% de los ASVs), 88 a *Archaea* (0,71%) y 25 ASVs (0,2%) no pudieron ser asignados a ninguno de ellos. Los análisis posteriores se centraron sólo en el dominio *Bacteria*. De las 12350 secuencias de *Bacteria* se retuvieron 12320 secuencias; un total de 30 (0,24%) secuencias se eliminaron debido a que su tamaño estaba fuera del valor promedio esperado para el amplicón, si bien previamente se chequeó si su identidad correspondía a secuencias bacterianas de la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S mediante la búsqueda en la base de datos BLASTn.

Tabla 3.7. Procesamiento de secuencias con QIIME 2. En la tabla se reporta el número de secuencias (sec.) obtenidas en los diferentes pasos del procesamiento. Las letras DQ indican desecación química, CM corte mecánico y SS sin supresión. La letra N indica fertilización con urea y el número identifica las réplicas de cada tratamiento.

Muestras	Número de sec. de entrada	Número de sec. filtradas	Número de sec. <i>denoised</i>	Número de sec. <i>merged</i>	Número de sec. sin quimeras	Número de sec. <i>Bacteria</i>
SSN1	69398	64698	61755	54896	50630	50145
SSN2	70390	66535	62430	53541	49001	48256
CMN1	106942	99428	96654	92166	79369	78588
DQ1	62126	58468	55513	47614	43727	42848
SS1	68449	63468	60264	53129	49254	48280
CM1	59053	55378	51763	43542	39688	38934
SS2	67282	62583	59432	51260	47535	46954
SSN3	61525	57504	54035	45941	42559	41918
SS3	60000	55733	52615	45612	42349	41671
DQ2	68814	64165	60505	51952	48110	47399
DQ3	68932	64019	60772	52964	48574	47997
CM2	68068	63711	60022	50987	46818	45871
CM3	71673	66933	63534	55067	50350	49186
DQN1	74467	69267	65531	56375	51535	50742
DQN2	73118	68247	64567	56482	51272	50615
CMN2	79010	73516	69754	60787	55487	54412
DQN3	66617	62764	59495	51987	47287	46887
CMN3	58150	54507	50914	44169	40366	39846

Los datos rarefaccionados correspondientes a *Bacteria* fueron los que se emplearon posteriormente para los análisis de diversidad α y β . La rarefacción se llevó a cabo en base a la muestra con el menor número de secuencias, en este caso CM1 (38934 secuencias) (Figura 3.1).

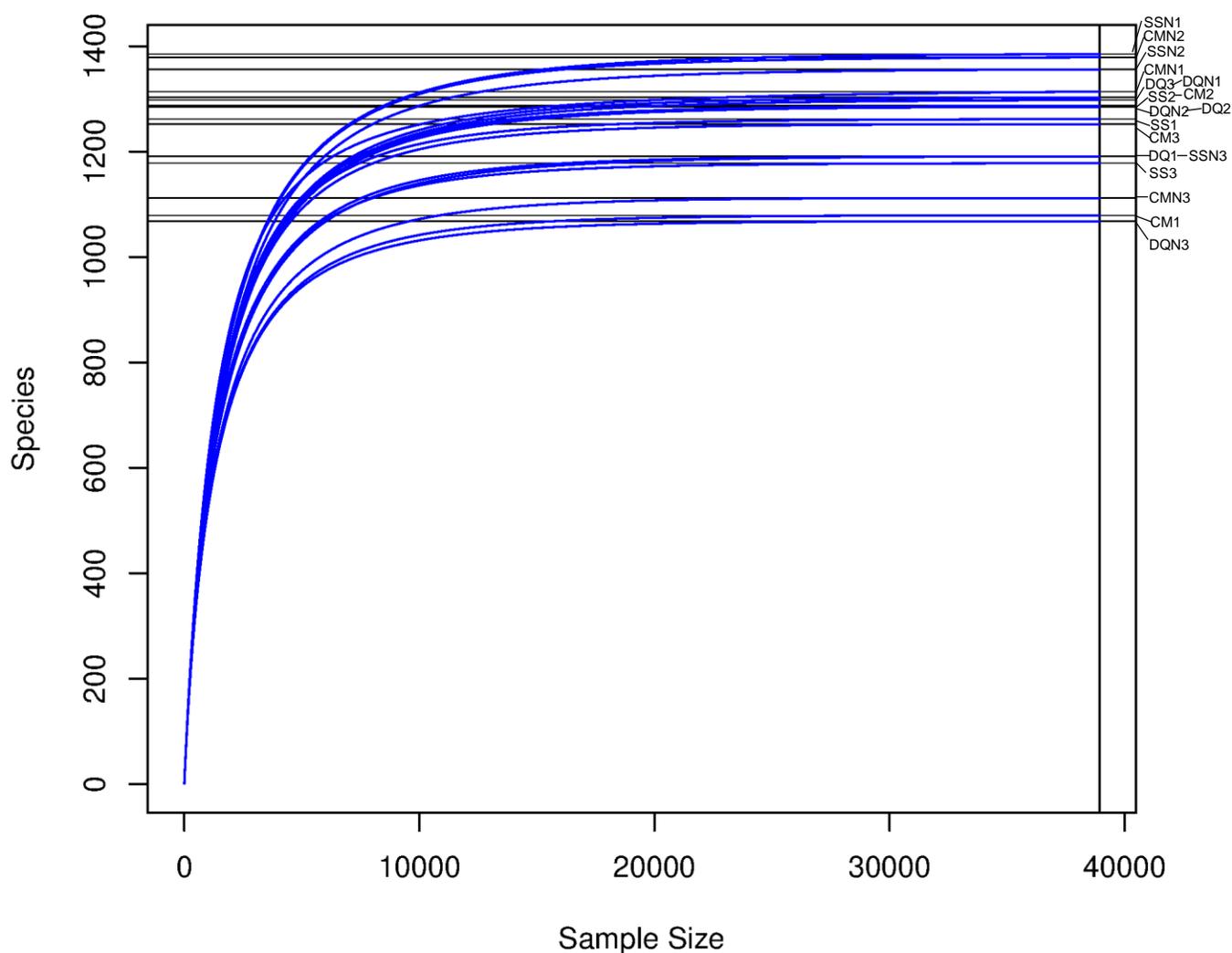


Figura 3.1. Curvas de rarefacción para las distintas muestras analizadas mediante *barcoded amplicon-sequencing*. Se indica el número de ASVs (“Species”) esperables para un número creciente de secuencias en cada muestra (“Sample size” o esfuerzo de muestreo). Las letras DQ indican desecación química, las letras CM corte mecánico y las letras SS sin supresión. La letra N indica fertilización con urea y el número identifica las réplicas de cada tratamiento.

3.4.1. Diversidad α

Los resultados del análisis de la varianza para los índices de diversidad α : riqueza de especies (S' e índice de Chao-1), índice de Shannon, recíproco de Simpson e índice de equitatividad de Shannon se muestran en la Tabla 3.8. No se observó una interacción significativa entre los factores en estudio (fertilización y método de finalización) y, en consecuencia, se consideraron los efectos principales de ambos factores. Según los resultados, las comunidades microbianas en la rizosfera de plantas SS, CM y DQ mostraron índices de diversidad α similares, sin un efecto significativo entre plantas fertilizadas y no fertilizadas o entre métodos de finalización ($P > 0,05$, Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los índices de diversidad α : Chao-1: índice de Chao-1 (riqueza estimada); S': riqueza observada (ASVs observados); $1/\lambda$: recíproco de Simpson; H': índice de Shannon; E_H : índice de equitatividad de Shannon. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los efectos principales (F=fertilización y M=método de finalización) y a su interacción (F×M). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

	<i>n</i>	Chao-1		S'		1/ λ		H'		E_H	
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Fertilización (F)											
con N	9	1266,58	35,2	1266,11	35,12	585,83	25,13	6,74	0,03	0,95	0,002
sin N	9	1235,38		1235,22		539,50		6,72		0,94	
Método de finalización (M)											
DQ	6	1238,21	43,11	1238,00	43,01	585,50	30,77	6,71	0,04	0,95	0,002
CM	6	1237,83		1237,50		570,26		6,72		0,94	
SS	6	1276,90		1276,50		532,23		6,76		0,94	
F×M											
DQN	3	1218,39	60,97	1218,33	60,83	624,74	43,52	6,69	0,06	0,95	0,003
CMN	3	1269,61		1269,00		590,95		6,76		0,95	
SSN	3	1311,73		1311,00		541,81		6,75		0,94	
DQ	3	1258,02	60,97	1257,67	60,83	546,26	43,52	6,72	0,06	0,94	0,003
CM	3	1206,05		1206,00		549,58		6,68		0,94	
SS	3	1242,08		1242,00		522,65		6,77		0,94	
	<i>gl</i>						<i>P</i> -valor				
F	1	0,543		0,546		0,217		0,770		0,175	
M	2	0,767		0,768		0,474		0,680		0,373	
F×M	2	0,614		0,618		0,793		0,590		0,418	

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.4.2. Diversidad β

El análisis multivariado a través de PERMANOVA para estudiar la diversidad β indicó una interacción no significativa entre los factores de estudio ($P > 0,2$; Tabla 3.9). Los métodos de finalización del CCI mostraron un efecto marginalmente significativo sobre la estructura de la comunidad de *Bacteria* para la distancia filogenética ($P = 0,066$; Tabla 3.9). Las comparaciones de a pares (PERMANOVA) utilizando la corrección de Benjamini y Hochberg (“fdr”) no arrojaron diferencias significativas para los métodos de finalización ($P > 0,05$; Tabla 3.10). No se observó un efecto significativo de la fertilización sobre la estructura de las comunidades de *Bacteria* (PERMANOVA, $P > 0,05$; Tabla 3.9). Estos resultados se visualizaron en el ordenamiento mediante NMDS con distancia UniFrac generalizada donde no se observó una separación entre las comunidades bacterianas de la rizosfera de plantas sometidas a los distintos métodos de finalización, independientemente de la fertilización (Figura 3.2).

Tabla 3.9. Análisis multivariado de la varianza no paramétrico (PERMANOVA) con 1000 permutaciones. *gl*: grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

PERMANOVA (distancia UniFrac generalizada)			
	<i>gl</i>	F. modelo	<i>P</i> -valor
Fertilización (F)	1	1,27	0,161
Método de finalización (M)	2	1,39	0,066
F×M	2	0,90	0,667
<i>gl</i> error	12		

Tabla 3.10. Comparación de datos metagenómicos entre métodos de finalización utilizando la corrección de Benjamini & Hochberg (“fdr”)

Comparación	PERMANOVA (distancia UniFrac generalizada)
	<i>P</i> valor con correcciones
CM vs DQ	0,25
CM vs SS	0,16
DQ vs SS	0,11

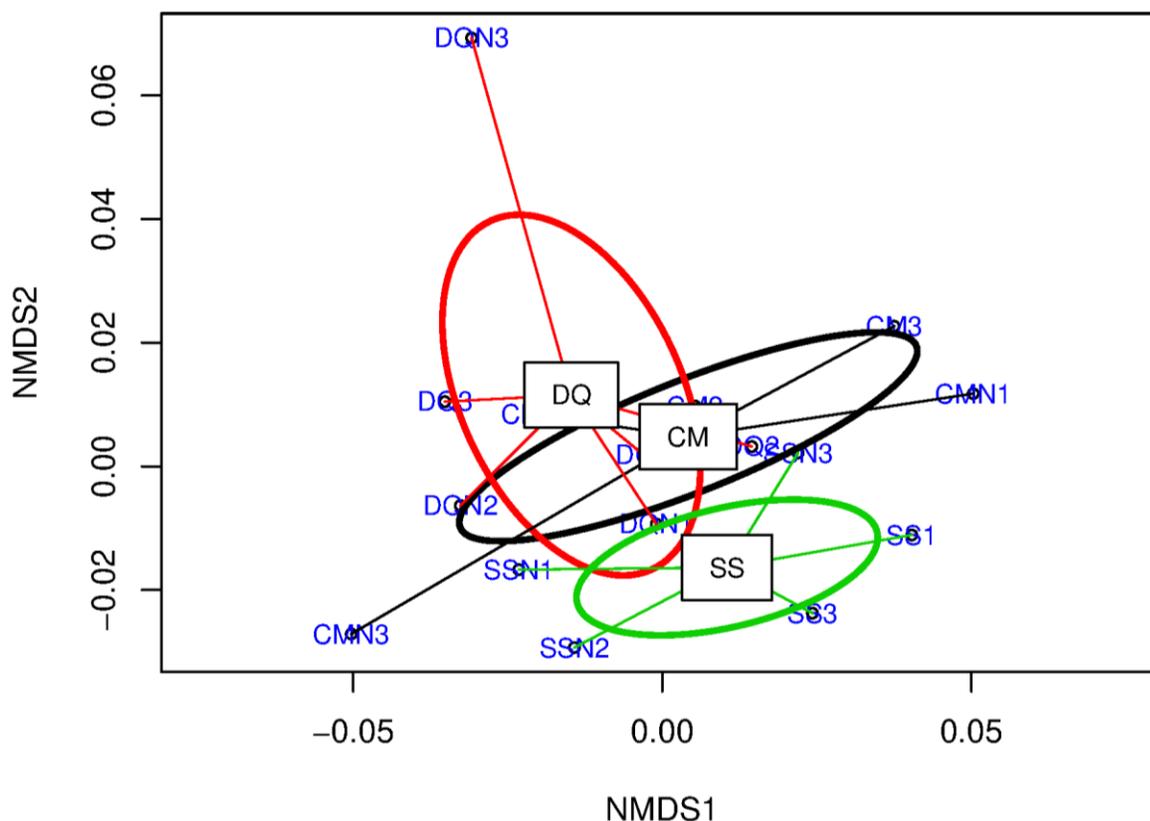


Figura 3.2. Análisis multivariado del conjunto de datos metagenómicos en la rizosfera de *Avena sativa* L. Las letras DQ indican desecación química, las letras CM corte mecánico y las letras SS sin supresión. La letra N indica fertilización con urea y el número identifica las réplicas de cada tratamiento. Los centroides se encuentran indicados con recuadros. El error estándar de CM, DQ y SS se indica con elipses de color negro, rojo y verde, respectivamente. El ordenamiento se llevó a cabo mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y métrica de distancia UniFrac generalizada. *Stress-value*= 0,113.

3.4.3. Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de avena

El ACP de los datos transformados a *clr* generaron un conjunto de siete CPs no correlacionados con autovalor >1 que en conjunto explicaron el 73% de la variabilidad entre las muestras de rizosfera en base a los 51 géneros de mayor contribución seleccionados (Tabla 3.11). La CP1 presentó *loadings* positivos (>|0,5|) para *Aciditerrimonas*, *Aeromicrobium*, *Aggregicoccus*, *Agromyces*, *Aridibacter*, *Andersenella*, *Blastocatella*, *Blastococcus*, *Bradyrhizobium*, *Chitinophaga*, *Flavitalea*, *Formivibrio*, *Nitrosospira*, *Nitrolancea*, así como *loadings* negativos (<-|0,5|) para *Flavobacterium*, *Polaromonas* y *Tahibacter*. La CP2 mostró *loadings* positivos para *Blastococcus*, *Curvibacter*, *Lysinibacillus*, *Nitrolancea* y *loadings* negativos para *Armatimonadetes_gp5*, *Asinibacterium*, *Inquilinus*, *Lacibacter*, *Lentzea*, *Luteimonas*, *Lysinimonas* y *Paludibacter*. La CP3 tuvo *loadings* positivos para

Allonocardiopsis, *Anaerotruncus*, *Armatimonadetes_gp5*, *Bellilinea* y *Blastocatella* y *loadings* negativos para *Bradyrhizobium*, *Cellvibrio* y *Chitinophaga*. Los autovectores de la CP4 incluyeron *loadings* positivos para *Arenimonas*, *Aridibacter*, *Luteolibacter* y *Methyloversatilis* y *loadings* negativos para *Bellilinea*. La CP5 mostró *loadings* positivos para *Aeromicrobium* y *loadings* negativos para *Lysinibacillus* y *Nitrobacter*. El autovector de la CP6 y CP7 incluyó *loadings* negativos para *Luteolibacter* y *Caulobacter*, respectivamente.

Tabla 3.11 Análisis de componentes principales usando la transformación de los datos *centered log ratio (clr)*, con autovalor y proporción acumulada de la variabilidad del conjunto de datos explicada por las siete componentes principales (CP) (autovalor >1). Los autovectores con *loadings* >|0,5| están en negrita. En la parte de abajo de la tabla se detallan los valores de probabilidad (*P*-valor) y los grados de libertad (*gl*) del análisis de la varianza (ANOVA) para los efectos de la fertilización (F), métodos de finalización (M) y su interacción (F×M). Valores de *P*<0,05 que indican significancia estadística se muestran en negrita.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
Autovalor	9,68	8,00	6,02	3,98	3,60	3,28	2,75
Proporción	0,19	0,16	0,12	0,08	0,07	0,06	0,05
Proporción acumulada	0,19	0,35	0,46	0,54	0,61	0,68	0,73
	Correlación con las variables originales						
<i>Aciditerrimonas</i>	0,62	0,49	0,32	0,12	-0,05	0,19	0,22
<i>Acidovorax</i>	-0,40	-0,06	0,35	-0,01	0,11	-0,34	-0,09
<i>Actinoplanes</i>	0,37	0,25	-0,16	-0,22	-0,26	0,03	0,00
<i>Aeromicrobium</i>	0,52	0,08	-0,05	-0,36	0,60	0,04	-0,09
<i>Aggregicoccus</i>	0,57	0,18	-0,09	0,40	0,06	0,30	0,09
<i>Agromyces</i>	0,60	-0,13	-0,30	0,10	-0,22	-0,28	0,21
<i>Allonocardiopsis</i>	0,37	0,17	0,73	-0,18	-0,09	0,13	0,14
<i>Anaeromyxobacter</i>	-0,18	0,06	-0,15	0,25	-0,21	0,27	-0,27
<i>Anaerotruncus</i>	-0,42	0,47	0,53	0,25	0,01	-0,13	0,13
<i>Anderseniella</i>	0,69	0,28	-0,13	-0,10	0,15	0,15	-0,10
<i>Angiococcus</i>	0,50	0,23	0,26	-0,44	0,31	-0,24	0,10
<i>Aquabacterium</i>	0,02	-0,01	0,01	-0,05	-0,31	-0,29	-0,38
<i>Arenimonas</i>	-0,41	-0,11	0,15	0,68	0,03	0,44	0,07
<i>Aridibacter</i>	0,61	0,13	0,33	0,52	-0,15	0,05	-0,15
<i>Armatimonadetes_gp5</i>	-0,18	-0,60	0,54	-0,14	0,02	0,32	0,19
<i>Arthrobacter</i>	0,50	0,41	0,08	-0,34	0,04	-0,44	0,43
<i>Asinibacterium</i>	-0,41	-0,67	0,21	-0,31	-0,18	0,24	0,22
<i>Basilea</i>	0,00	0,47	0,50	-0,25	0,39	-0,14	0,07
<i>Bellilinea</i>	0,07	0,33	0,61	-0,54	-0,20	-0,08	-0,13
<i>Blastocatella</i>	0,66	-0,29	0,59	0,17	-0,02	0,02	-0,08
<i>Blastococcus</i>	0,69	0,53	0,03	-0,03	-0,24	0,22	0,13
<i>Blastomonas</i>	-0,39	0,39	0,16	0,07	0,26	0,48	-0,50

<i>Bosea</i>	-0,05	-0,21	-0,28	0,24	0,15	-0,23	0,48	
<i>Bradyrhizobium</i>	0,61	0,18	-0,63	-0,04	-0,09	0,16	-0,04	
<i>Caulobacter</i>	0,06	-0,14	-0,45	-0,26	0,44	0,26	-0,54	
<i>Cellvibrio</i>	-0,28	0,03	-0,70	0,20	-0,08	0,15	0,21	
<i>Chitinophaga</i>	0,54	-0,43	-0,61	-0,06	-0,09	0,14	0,20	
<i>Curvibacter</i>	-0,29	0,55	-0,09	-0,36	0,31	-0,05	0,08	
<i>Denitratisoma</i>	0,27	-0,27	0,23	0,35	0,39	-0,23	-0,22	
<i>Devosia</i>	0,43	0,49	-0,50	-0,07	0,35	-0,06	0,08	
<i>Dyadobacter</i>	0,30	-0,20	-0,45	0,10	0,20	-0,28	-0,08	
<i>Filimonas</i>	0,48	-0,32	-0,32	-0,39	-0,02	0,41	-0,13	
<i>Flavitalea</i>	0,62	-0,27	0,16	0,12	0,25	0,07	-0,15	
<i>Flavobacterium</i>	-0,59	0,38	-0,18	0,22	0,12	-0,09	0,44	
<i>Formivibrio</i>	0,58	-0,37	0,16	0,27	0,14	-0,19	0,32	
<i>Inquilinus</i>	0,41	-0,70	-0,24	-0,08	-0,21	-0,22	-0,16	
<i>Lacibacter</i>	-0,17	-0,87	0,16	0,24	0,19	-0,12	0,16	
<i>Lentzea</i>	0,37	-0,61	0,07	-0,28	0,02	0,41	0,25	
<i>Luteimonas</i>	-0,01	-0,55	0,15	-0,05	-0,44	-0,46	-0,18	
<i>Luteolibacter</i>	0,26	-0,14	-0,04	0,52	0,13	-0,66	-0,11	
<i>Lysinibacillus</i>	-0,18	0,52	0,36	-0,14	-0,51	-0,10	-0,05	
<i>Lysinimonas</i>	-0,31	-0,60	-0,18	-0,01	0,14	-0,10	-0,36	
<i>Marmoricola</i>	-0,19	0,21	0,35	0,27	0,42	-0,17	-0,34	
<i>Methyloversatilis</i>	-0,19	0,38	0,08	0,55	-0,01	0,33	0,03	
<i>Nitrobacter</i>	0,26	0,21	0,02	0,09	-0,72	-0,03	-0,39	
<i>Nitrolancea</i>	0,59	0,59	0,01	0,16	-0,02	0,10	-0,21	
<i>Nitrosospira</i>	0,55	-0,13	0,41	0,40	0,11	0,35	0,27	
<i>Paludibacter</i>	-0,36	-0,62	0,37	-0,39	-0,10	0,33	0,15	
<i>Polaromonas</i>	-0,64	0,42	-0,34	-0,14	-0,03	-0,04	0,09	
<i>Pseudorhodofera</i>	-0,36	0,50	-0,42	0,08	-0,46	0,00	0,20	
<i>Tahibacter</i>	-0,65	0,19	-0,19	-0,02	0,46	0,07	0,11	
	<i>gl</i>				<i>P</i> -valor			
Fertilización (F)	1	0,903	0,697	0,154	0,302	0,507	0,006	0,736
Métodos de finalización (M)	2	0,326	0,042	0,001	0,312	0,795	0,534	0,560
FxM	2	0,150	0,209	0,677	0,964	0,891	0,059	0,803

Tabla 3.12. Resultados del procedimiento de separación de medias para las componentes principales (CP) que mostraron una respuesta estadísticamente significativa del método de finalización (CP2 y CP3) y de la interacción (F×M) (CP6). Fertilización 0 (sin N) y 100 kg N ha⁻¹ (con N). Métodos de finalización: desecación química (DQ), corte mecánico (CM) y sin supresión (SS). Las letras DQ, CM y SS seguidas de la letra N indican fertilización con urea.

		CP2	CP3	CP6
Fertilización (F)				
	Con N	-0,08	-0,22	-0,58
	Sin N	0,08	0,22	0,58
Método de finalización (M)				
	DQ	-0,66 b	-0,51 b	0,22
	CM	0,74 a	-0,62 b	-0,26
	SS	-0,08 ab	1,12 a	0,04
F×M				
	DQN	-1,22	-0,80	-0,57 b
	CMN	1,09	-0,59	-1,01 b
	SSN	-0,10	0,74	-0,15 b
	DQ	-0,09	-0,43	0,05 b
	CM	0,39	-0,43	1,45 a
	SS	-0,06	1,51	0,24 ab

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Las siete CPs fueron utilizadas como variables independientes en los análisis de la varianza (ANOVA) posteriores para evaluar los efectos de la fertilización, método de finalización y su interacción sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera de avena. En la parte inferior de la Tabla 3.11 se informan los valores de probabilidad y grados de libertad asociados con estos análisis para cada CP. Los resultados mostraron un efecto estadísticamente significativo de la interacción sólo para la CP6 ($P=0,059$; Tabla 3.11). Evaluando los efectos principales para aquellas CP en los que no hubo efecto de la interacción, se encontró que sólo las CPs 2 y 3 mostraron un efecto estadísticamente significativo ($P < 0,05$) del método de finalización, pero no se observó un efecto significativo de la fertilización ($P > 0,05$; Tabla 3.11). En la Figura 3.3A se muestran las medias de la CP2 para cada método de finalización con sus respectivos errores estándar y los resultados de separación de medias (Tabla 3.12). La contribución de cada género a estos resultados se indica en la Figura 3.3B. El grupo de bacterias con *loading* positivo disminuyó significativamente cuando se finalizó la avena con DQ, mientras que el

comportamiento opuesto fue observado para los géneros bacterianos con *loading* negativo, con respecto a CM (Figura 3.3B). No se observaron diferencias significativas entre DQ y CM con respecto a SS. En la Figura 3.4A se muestran las medias de la CP3 para cada método de finalización con sus respectivos errores estándar y los resultados de separación de medias (Tabla 3.12). La contribución de cada género a estos resultados se indica en la Figura 3.4B. El grupo de bacterias con *loading* positivo disminuyó significativamente en la rizosfera de avena finalizada química y mecánicamente (DQ y CM), mientras que lo opuesto ocurrió para los géneros con *loading* negativo, con respecto a SS (Figura 3.4A). En la Figura 3.5A se muestran las medias de la CP6 para cada nivel de fertilización y método de finalización con sus respectivos errores estándar y los resultados de separación de medias (Tabla 3.12). La contribución de cada género a estos resultados se indica en la Figura 3.5B. Un solo género se vio favorecido en la rizosfera de avena finalizada químicamente (DQ) respecto de CM, en la condición no fertilizada. A su vez, este género aumentó después de la fertilización nitrogenada en la rizosfera de plantas finalizadas mecánicamente (CMN) en relación con las plantas sin fertilizar (CM).

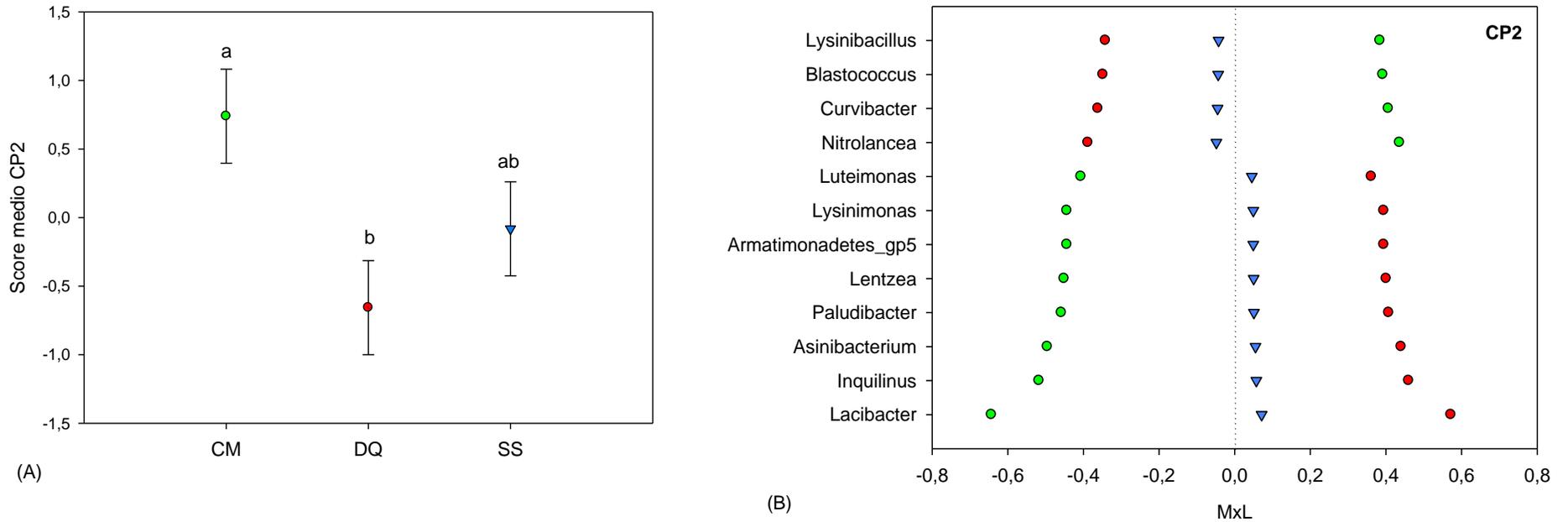


Figura 3.3. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución ($loadings > |0,5|$) según la Tabla 3.11 para la CP2. A) Valores medios de los scores de la CP2 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP2 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; CM: corte mecánico y SS: sin supresión).

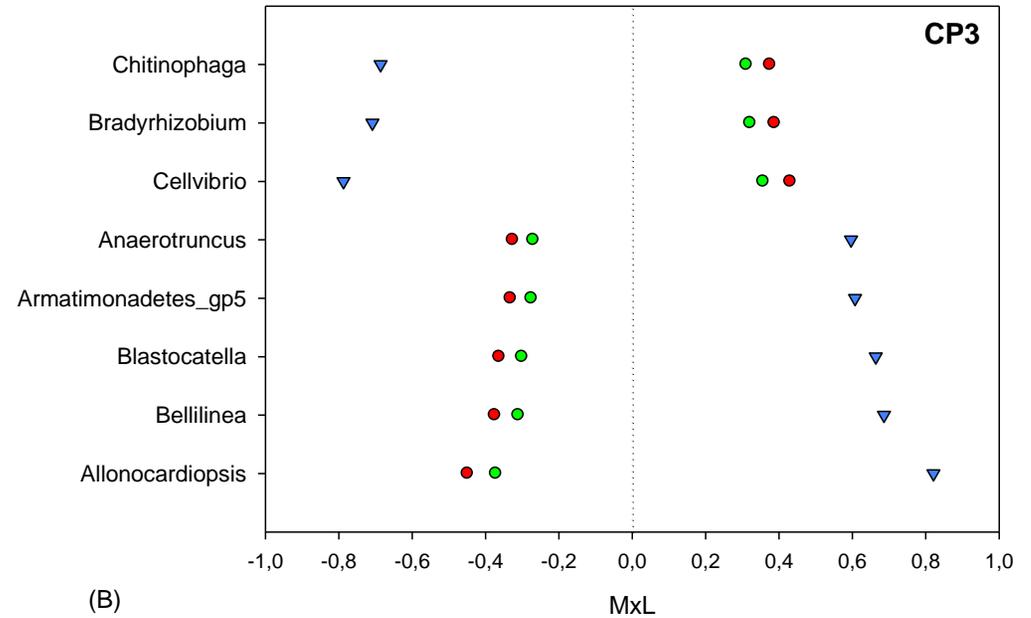
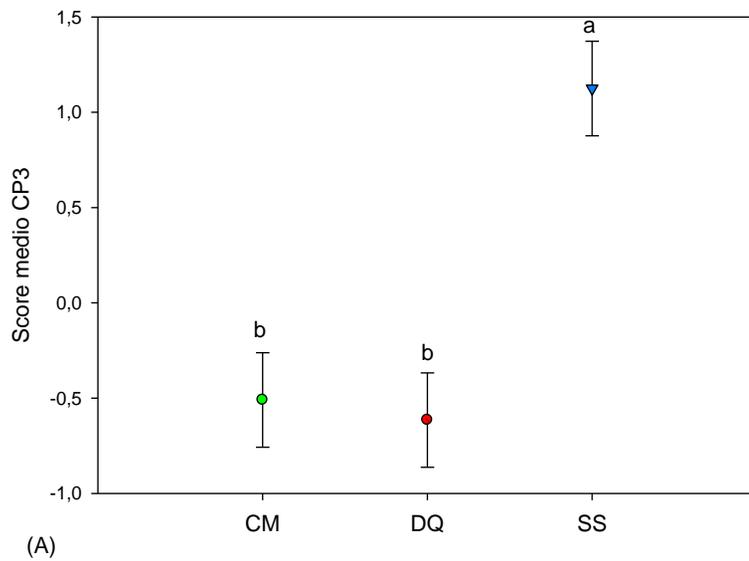


Figura 3.4. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,5|) según la Tabla 3.11 para la CP3. A) Valores medios de los *scores* de la CP3 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP3 (*MxL*) para cada método de finalización (DQ: desecación química; CM: corte mecánico y SS: sin supresión).

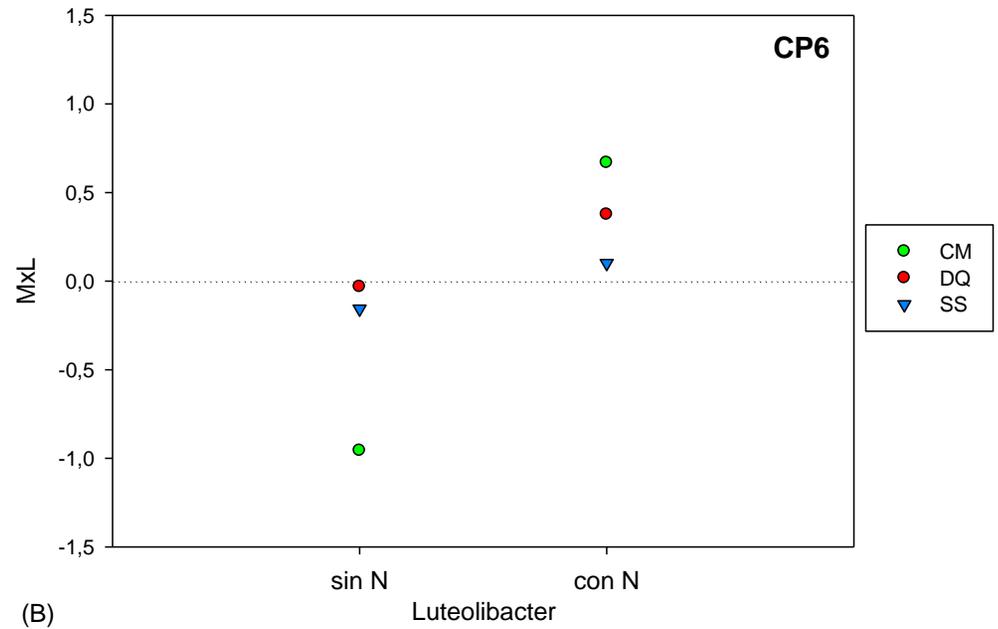
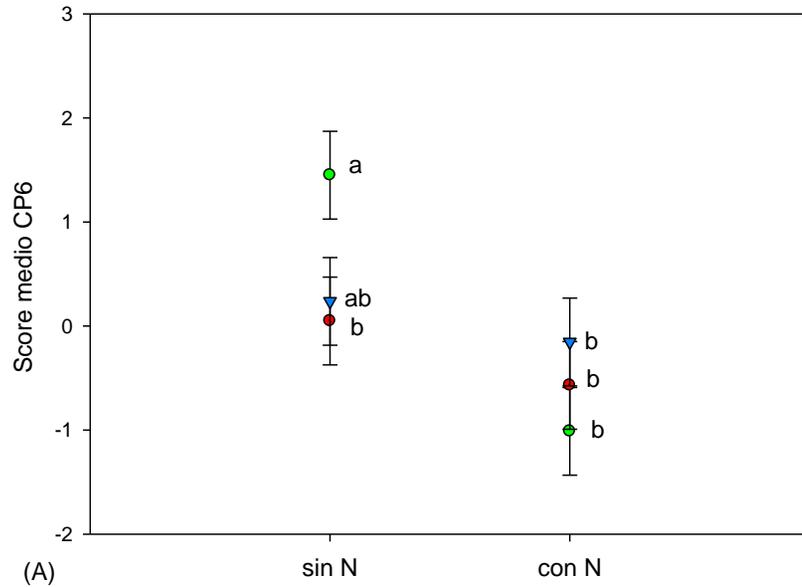


Figura 3.5. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,5|) según la Tabla 3.11 para la CP6. A) Valores medios de los scores de la CP6 para cada método de finalización dentro de cada nivel de fertilización con sus errores estándar (como barras de error). Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP6 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; CM: corte mecánico y SS: sin supresión) dentro de cada nivel de fertilización (sin N y con N).

4. Discusión

4.1. Abundancia de grupos microbianos mediante qPCR

La qPCR del gen ARNr 16S de *Bacteria* y *Archaea* indicó ausencia de diferencias significativas para los factores principales fertilización y método de finalización (Tabla 3.5). En un ensayo en invernáculo, Allegrini *et al.*, (2019) reportaron que el número de copias de *Bacteria* y *Archaea* en la rizosfera de avena no se vio afectado por los métodos de finalización (glifosato y corte). Wang *et al.*, (2018), en un estudio de fertilización de largo plazo, tampoco encontraron modificaciones en la abundancia de *Bacteria* en el suelo rizosférico de maíz luego de aplicar 150 kg de N ha⁻¹ (urea), respecto al control sin fertilizar.

En la abundancia del gen *amoA*_{AOA}, se observó una respuesta del método de finalización. El número de copias del gen *amoA*_{AOA} fue mayor en la rizosfera de plantas CM que en la rizosfera de DQ y SS (Tabla 3.5). Se ha reportado que la defoliación de raigrás (*Lolium perenne* L.) y festuca roja (*Festuca rubra* L.) aumenta la liberación de compuestos orgánicos en los rizodepósitos probablemente como un mecanismo de tolerancia al estrés por defoliación (Paterson y Sim, 1999, 2000). Esto sugiere que las plantas CM podrían sustentar el crecimiento mixotrófico de AOA (Wessén *et al.*, 2010; Mußmann *et al.*, 2011; Tourna *et al.*, 2011; Ai *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2014). Por el contrario, el crecimiento de AOA podría verse impedido después de la DQ en relación con el método SS por los metabolitos liberados por las plantas después de los cambios bioquímicos inducidos por el glifosato. En este estudio, se encontró que la abundancia del gen *amoA*_{AOA} fue significativa y negativamente correlacionada con el contenido de FT. Esto sugiere que la menor abundancia de AOA en la rizosfera de plantas DQ se explicaría parcialmente por la exudación incrementada de compuestos fenólicos inhibitorios.

Se encontró un efecto marginalmente significativo de la fertilización en la abundancia de AOA, ya que las plantas fertilizadas mostraron una menor abundancia de AOA en relación con las no fertilizadas (Tabla 3.5). Este resultado está respaldado por diferentes estudios que muestran que las AOA prefieren condiciones en las que el amonio se libera a tasas continuas pero bajas a través de la mineralización de la MO (Stopnišek *et al.*, 2010; Levičnik-Höfferle *et al.*, 2012; Hink *et al.*, 2018).

Se observó una abundancia significativamente menor del gen *amoA*_{BOA} para DQ en relación con CM y SS, en la condición fertilizada, en tanto que la abundancia de BOA fue mayor en plantas fertilizadas que recibieron CM o SS en comparación con las no fertilizadas (Tabla 3.5). Este resultado es relevante porque sugiere que la finalización de avena con DQ contrarresta el aumento de las poblaciones de BOA que normalmente serían inducidas por la fertilización nitrogenada en la rizosfera o el suelo (Chu *et al.*, 2008; Di *et al.*, 2009; Glaser *et al.*, 2010; Strauss *et al.*, 2014). Se necesita más investigación para dilucidar la base de tal efecto "represivo" del glifosato sobre el aumento esperado

en la abundancia de BOA después de la fertilización, incluida la posible liberación de inhibidores de nitrificación. Estos inhibidores podrían tener un efecto más intenso en condiciones de fertilización, ya que las células activas son más sensibles a factores ambientales y externos (Zhang *et al.*, 2014; Zabaloy *et al.*, 2017). Entre ellos, no podemos excluir al glifosato por sí mismo, considerando la exudación de este compuesto a través de las raíces (Kremer *et al.*, 2005) y los efectos reportados (inhibición) sobre la abundancia de *amoA* (Zhang M. *et al.*, 2018).

En este estudio, se observó una correlación significativa y positiva entre la APN y la abundancia de *amoA*_{BOA}. Sin embargo, en las plantas DQ, el aumento de la APN tras la fertilización (Tabla 3.3) no fue seguido por un aumento en la abundancia de *amoA*_{BOA} (Tabla 3.5), a diferencia de la respuesta observada en las plantas CM y SS, lo que sugiere que otros microorganismos importantes en la oxidación del amoníaco podrían estar involucrados en la rizosfera de plantas DQ para explicar la estimulación de la APN (Tabla 3.3). El rol de los microorganismos heterótrofos en la absorción y oxidación del amoníaco sin duda merece más investigación en la rizosfera de CCI fertilizados y suprimidos con DQ, donde la disponibilidad de nutrientes podría ser mayor por una descomposición más rápida de las raíces (Imparato *et al.*, 2016).

La abundancia del gen *nirK* en la rizosfera de avena no se vio afectada por la fertilización ni por los métodos de finalización (Tabla 3.5). Se ha informado que el gen *nirK* tiene baja sensibilidad a los cambios en las condiciones ambientales, tales como el aporte de N (Huang *et al.*, 2019). Hart *et al.*, (2009) analizaron los efectos del glifosato sobre las bacterias desnitrificantes en la rizosfera de maíz y tampoco encontraron cambios apreciables en la abundancia y diversidad de este grupo. Por el contrario, Romdhane *et al.*, (2019) reportaron que la abundancia del gen *nirK* fue menor en CC finalizados químicamente (glifosato + 2,4-D, 3 días postsupresión) que en los tratamientos rolados y secado naturalmente por heladas.

En lo que respecta al gen *nirS*, el análisis indicó que la abundancia en la rizosfera de plantas fertilizadas fue mayor en aquéllas que se suprimieron por el método CM (Tabla 3.5). Ouyang *et al.*, (2018) realizaron un metaanálisis en el que reportaron que el gen *nirS* aumenta con la adición de N. La ausencia de este efecto en las plantas DQ y SS podría deberse, en el caso de las plantas vivas (SS) a una mayor absorción de humedad y nitrato por las raíces en activo crecimiento que podrían inhibir la desnitrificación en el suelo rizosférico, mientras que en el caso de las plantas DQ podría atribuirse a la liberación de inhibidores biológicos de la desnitrificación. Bardon *et al.*, (2014) encontraron que los metabolitos secundarios producidos por *Fallopia* spp. inhibieron la desnitrificación en el suelo. A su vez, en las raíces senescentes disminuye el consumo de oxígeno, inhibidor de la desnitrificación, por lo que podría generarse un microambiente no propicio para la desnitrificación en la proximidad de esas raíces.

Se ha reportado que las bacterias que poseen los genes *nirS* tienden a tener la vía de desnitrificación más completa que aquellas que portan los genes *nirK*, y por lo tanto, contribuirían

menos a las emisiones de N_2O en condiciones favorables (Jones *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 2014). La relación *nirS/nirK* ha sido propuesta como un indicador de la capacidad de un suelo de generar emisión de N_2O (Graf *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014). Jones *et al.*, (2014) encontraron una correlación negativa significativa entre las emisiones de N_2O y los genes *nir*, observaron una mayor transformación en N_2 cuando se incrementó la relación *nirS/nirK*. En este estudio, se encontró que el número de copias del gen *nirK* fue aproximadamente de un orden de magnitud mayor respecto del gen *nirS* en todos los tratamientos. Sin embargo, esta relación no es uniforme en suelos agrícolas, ya que en algunos suelos se reportó que la abundancia de *nirK* supera al de *nirS* (Chen *et al.*, 2010; Bannert *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2014; Linton *et al.*, 2020) y en otros ocurrió lo contrario (Yang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021).

En la rizosfera de plantas CM la relación *nirS/nirK* fue menor que en DQ y SS, dentro de la condición no fertilizada. Además, se observó una mayor relación *nirS/nirK* después de la fertilización con N en la rizosfera de plantas CM (CMN) con respecto a las no fertilizadas (CM) (Tabla 3.6). El corte de las plantas afecta la fotosíntesis por lo que se reduce la cantidad de C derivado a las raíces y disponible en el suelo rizosférico, lo que podría afectar principalmente la abundancia de bacterias desnitrificantes que poseen el gen *nirS* (Hamonts *et al.*, 2013).

Por otro lado, se encontró una menor relación *nirS/nirK* después de la fertilización nitrogenada en la rizosfera de plantas DQ (DQN) en comparación con las sin fertilizar (DQ) (Tabla 3.6), lo que sugiere que la DQ con N podría favorecer las emisiones de N_2O .

4.2. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana

Para las métricas de diversidad α y diversidad β (distancia UniFrac generalizada) no se observaron diferencias significativas para los factores principales fertilización y método de finalización (Tabla 3.8 y 3.9). Estos resultados son consistentes con los reportados por Allegrini *et al.*, (2019) en un estudio de secuenciación del gen ARNr 16S en la rizosfera de avena luego de aplicar los métodos de supresión (glifosato y corte). No obstante, los análisis de la composición de la comunidad bacteriana a nivel de género arrojaron diferencias significativas para el factor método de finalización y para la interacción (F×M) (Tabla 3.11).

Para la CP2, la respuesta de las bacterias al método de finalización fue significativa ($P < 0,05$; Tabla 3.11). Dos grupos, cada uno compuesto por 4 y 8 géneros, respondieron de manera opuesta a los métodos de finalización, independientemente del nivel de fertilización (Figura 3.3B).

El grupo de 4 géneros indicadores desfavorecidos por la DQ fueron: *Lysinibacillus* (Firmicutes), *Blastococcus* (Actinobacteria), *Curvibacter* (Proteobacteria) y *Nitrolancea* (Chloroflexi). *Lysinibacillus* es una bacteria aerobia estricta, Gram-positiva, formadora de endosporas, que ha sido aislada de la rizosfera de pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Burkett-Cadena *et al.*, 2019) y maíz (Abiala *et al.*, 2015).

Varios estudios han demostrado que las bacterias que pertenecen al género *Lysinibacillus* tienen el potencial de actuar como PGPR, produciendo AIA, solubilizando P, fijando N, controlando patógenos y biorremediadores (Vendan *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2014; Di Benedetto *et al.*, 2019; Ahsan y Shimizu, 2021). *Blastococcus* fue identificado en un suelo cultivado 13 años con CC de *Dactylis glomerata* L. y *Trifolium repens* L., con la capacidad de degradar material orgánico a través de la producción de actividad proteolítica (Wang *et al.*, 2020). El género *Curvibacter* pertenece a la familia Comamonadaceae, es aerobio y quimiorganótrofo (Willems, 2014). La familia Comamonadaceae fue identificada en la rizosfera de *Phragmites australis* (Su *et al.*, 2021) y algodón (Li Xiaogang *et al.*, 2015). Esta familia está compuesta por miembros fisiológicamente heterogéneos que pueden consumir un amplio espectro de compuestos de C orgánico que van desde azúcares simples hasta compuestos aromáticos complejos (Kerstens *et al.*, 2006). *Nitrolancea* es una bacteria aerobia, quimiolitótrofa y tiene la capacidad de oxidar nitrito (Sorokin *et al.*, 2018). Este género fue recientemente identificado en la rizosfera de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) como perteneciente a un grupo de microorganismos que se vieron favorecidos por las rotaciones con CCI (Qi *et al.*, 2020). A su vez, Guo *et al.*, (2018) reportaron que el filo Chloroflexi, al cual pertenece este género, se vio favorecido en un suelo de un pastizal sometido a defoliación.

El grupo de 8 géneros indicadores favorecidos en la rizosfera de avena por la DQ fueron: *Inquillinus* y *Luteimonas* (Proteobacteria), *Paludibacter*, *Lacibacter* y *Asinibacterium* (Bacteroidetes), *Lentzea* y *Lysinimonas* (Actinobacteria) y *Armatimonadetes_gp5* (Armatimonadetes). Las dos proteobacterias de este grupo fueron *Inquillinus* (Alfaproteobacteria), aislada del suelo de un campo de ginseng (*Panax ginseng*) (Jung *et al.*, 2011), y *Luteimonas* (Gammaproteobacteria), aislada de la rizosfera de trigo (Zhao *et al.*, 2018). El género *Inquillinus* pertenece a la familia Rhodospirillaceae, la cual ha sido asociada con la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Dai *et al.*, 2020). Por otra parte, Zhang *et al.*, (2017) reportaron que la fertilización nitrogenada en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) favoreció la proliferación de bacterias patógenas del suelo como *Luteimonas* y suprimió a los microorganismos benéficos. Por su parte, Newman *et al.*, (2016) encontraron que la aplicación de glifosato en maíz y soja transgénicos favoreció a la familia Xanthomonadaceae, a la cual pertenece *Luteimonas*, en la rizosfera de esas especies.

Los Bacteroidetes están generalmente asociados a la degradación de materiales orgánicos complejos, como polisacáridos y proteínas, y han sido reportados como indicadores sensibles al uso del suelo agrícola (Wolińska *et al.*, 2017). A su vez, algunos miembros de este filo pueden exhibir un estilo de vida copiótrofo (o estrategias *r*) que proliferan en condiciones de alta disponibilidad de C (Fierer *et al.*, 2012; Shen y Lin, 2021). *Paludibacter* es una bacteria fermentativa anaerobia estricta que produce propionato, y ha sido aislada del suelo de un arrozal (Ueki *et al.*, 2006). Behera *et al.*, (2018) reportaron la presencia de *Paludibacter* en la rizosfera de *Phragmites karka*. Esta bacteria, debido a su

metabolismo fermentativo, juega un rol importante en la descomposición de material vegetal (Qiu *et al.*, 2014). *Lacibacter* y *Asinibacterium* pertenecen a la familia Chitinophagaceae, cuyos miembros han sido asociados con la degradación de MO polimérica tales como quitina y celulosa (Wolińska *et al.*, 2017). Gautam *et al.*, (2020) encontraron una mayor abundancia de Chitinophagaceae y un aumento en la actividad β -glucosidasa, enzima asociada con la degradación de celulosa, en suelo fertilizado con abono orgánico respecto del control sin fertilizar.

Lysinimonas y *Lentzea* pertenecen al filo Actinobacteria, son aerobias, Gram-positivas y han sido aisladas del suelo (Jang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018a). *Lentzea* fue detectada en los perfiles endofíticos de cebada creciendo en áreas de recuperación de arenas petrolíferas (Mitter *et al.*, 2017). Las bacterias endófitas pueden proveer numerosos beneficios a las plantas como: mejorar el crecimiento en condiciones de estrés ambiental y de patógenos, además pueden cumplir un rol importante en remediación de suelos contaminados (Miliute *et al.*, 2015; Singh y Dubey, 2018). *Lysinimonas* ha sido identificada en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo que contienen altas concentraciones de alifáticos, HAP y metales pesados (Yan *et al.*, 2018). En relación a ello cabe considerar la posibilidad de que los formulados que contienen al IA y aditivos o adyuvantes (“ingredientes inertes”) como los metales pesados (arsénico, cromo, plomo y níquel) y los destilados del petróleo, entre los que se destacan las polioxietilenaminas (POEA), puedan ser exudados a la rizosfera (Defarge *et al.*, 2018). Sin embargo, a diferencia del glifosato, cuya exudación ha sido reportada en diversos estudios (Coupland y Caseley, 1975; Rodrigues *et al.*, 1982; Kremer *et al.*, 2005) en el caso de POEA no se han encontrado estudios donde se analice su exudación. Aunque, Tush y Meyer (2016) detectaron la presencia de POEA en muestras de suelo tomadas de campos cultivados con maíz y soja. Por su parte, Mendonca *et al.*, (2019) encontraron que algunas especies de *Pseudomonas* mostraron mayor tolerancia a la adición de POEA en el medio de cultivo, sin embargo, queda por investigar si esto podría debese a su capacidad para degradar POEA. *Armatimonadetes_gp5* es el único género indicador en este estudio que pertenece al filo Armatimonadetes; fue asociado con la degradación de compuestos fenólicos en suelo contaminados por la industria de coquización (Li Yanan *et al.*, 2020).

Para la CP3, se encontraron diferencias significativas sólo para el método de finalización ($P < 0,05$; Tabla 3.11). Los géneros que fueron favorecidos en la rizosfera de avena finalizada por DQ y CM en comparación con SS fueron *Cellvibrio*, *Bradyrhizobium* y *Chitinophaga*, mientras que los géneros que disminuyeron en abundancia fueron *Allonocardiopsis*, *Bellilinea*, *Blastocatella*, *Anaerotruncus* y *Armatimonadetes_gp5*.

Las dos proteobacterias que aumentaron con la DQ y CM fueron *Cellvibrio* (Gammaproteobacteria) y *Bradyrhizobium* (Alphaproteobacteria). *Cellvibrio* es una bacteria aerobia, Gram-negativa, fijadora de N y fue aislada de la rizosfera de *Plantago winteri* y *Hordeum secalinum*

(Suarez *et al.*, 2014). *Cellvibrio* es un género conocido por su potencial enzimático para degradar polisacáridos, particularmente los presentes en la pared celular de las plantas (Gardner, 2016). El género *Bradyrhizobium* incluye bacterias con la habilidad de fijar N en simbiosis con leguminosas (Poole *et al.*, 2018). Sin embargo, varios estudios han reportado la presencia de *Bradyrhizobium* en la rizosfera de plantas no leguminosas (de Alencar Menezes Júnior *et al.*, 2019; Hara *et al.*, 2019; Solanki *et al.*, 2020). *Chitinophaga*, dentro de este grupo indicador, es el único representante del filo Bacteroidetes. Es una bacteria aerobia, Gram-negativa, heterotrófica y fue aislada del suelo rizosférico de una variedad de plantas como arroz (*Oryza sativa* L.) (Chung *et al.*, 2012), *Arabidopsis thaliana* L. (Lin *et al.*, 2014a), ginseng (Lee y Whang, 2014), tomate (Kim *et al.*, 2017) y *Alhagi sparsifolia* (Zou *et al.*, 2019). Bacterias de este género presentan la habilidad de degradar quitina y celulosa, solubilizar P (Chung *et al.*, 2012) y actuar como agentes de biocontrol (Carrión *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020).

Allonocardiopsis representa al filo Actinobacteria identificada como un indicador en el grupo que responde negativamente a los métodos de finalización del cultivo (DQ y CM). *Allonocardiopsis* es una bacteria Gram-positiva, aerobia y endófito (Du *et al.*, 2013). *Bellilinea* pertenece al filo Chloroflexi, es una bacteria Gram-negativa, anaerobia estricta y no forman esporas (Yamada *et al.*, 2007). Esta bacteria fue identificada en un suelo cultivado con arroz y sometido a fertilización a largo plazo (Gu *et al.*, 2017).

Los miembros del filo Acidobacteria son omnipresentes y se distribuyen copiosamente en casi todos los ecosistemas, desempeñando funciones importantes en los ecosistemas suelo-planta como mediadores de los ciclos biogeoquímicos y la promoción del crecimiento de las plantas (Kalam *et al.*, 2020). El único representante de este filo que resultó afectado por los métodos de finalización (DQ y CM) fue *Blastocatella*, un género aerobio, Gram-negativo y quimioorganoheterótrofo, aislado previamente del suelo (Foesel *et al.*, 2013). *Blastocatella* se ha identificado en la rizosfera de arroz (Osman *et al.*, 2017). La presencia de *Anaerotruncus*, perteneciente al filo Firmicutes, se reportó en suelo sometido a CC intercalado en un huerto de *Malus pumila* (Zheng *et al.*, 2018). Otro representante de este grupo que fue desfavorecido por la DQ y CM fue *Armatimonadetes_gp5* que pertenece al filo Armatimonadetes. Las bacterias de este filo son capaces de descomponer material vegetal, polisacáridos y biomasa fotosintética (Lee *et al.*, 2014).

El efecto de la interacción fertilización x método de finalización fue significativo para la CP6 ($P < 0,2$; Tabla 3.11), el género *Luteolibacter* aumentó en la rizosfera de avena DQ respecto a CM, en la condición sin N. *Luteolibacter* pertenece al filo Verrucomicrobia, es una bacteria Gram-negativa, aerobia y fue aislada del suelo (Dahal *et al.*, 2021). Zadel *et al.*, (2020) reportaron la presencia de *Luteolibacter* en la rizosfera de *Miscanthus x giganteus*. Este género ha sido propuesto como candidato para el desarrollo de inoculantes que promuevan el crecimiento vegetal y biorremediación en suelos contaminados con metales pesados (Zadel *et al.*, 2020).

5. Conclusiones

Los resultados de este capítulo muestran que las AOA y BOA respondieron distinto a la fertilización y métodos de finalización. Por un lado, las BOA respondieron a la fertilización nitrogenada debido a su conocida preferencia por altos niveles de amonio, mientras que las AOA fueron más sensibles al método de finalización. Esto se relacionaría con que las AOA responden al efecto rizosférico de las plantas suprimidas mecánica o químicamente. La DQ contrarrestó el aumento de poblaciones de BOA generalmente provocado por fertilizantes nitrogenados, mostrando un efecto “represivo”, sin embargo, esto no se vio reflejado a nivel funcional (APN). En tanto, de los genes de reductasas de nitritos cuantificados, solo el gen *nirS* respondió a la fertilización nitrogenada. Los tratamientos DQ y SS contrarrestaron el aumento en la abundancia del gen *nirS* en la rizosfera de avena generalmente inducida por la fertilización nitrogenada. Además, se encontró una menor relación *nirS/nirK* en la rizosfera de plantas CM respecto a DQ y SS, dentro de la condición no fertilizada. Esto estaría indicando que este método podría generar mayor emisión de N₂O bajo condiciones favorables para la actividad desnitrificante (anoxia, etc.). Algunos de los géneros afectados negativamente en la rizosfera de avena finalizada por DQ se les ha atribuido un rol como PGPR o fueron identificados como nitrificantes, mientras que dentro de las bacterias que aumentaron en abundancia se encuentran patógenos de planta y géneros con capacidad de degradar compuestos orgánicos complejos, fenólicos, HAP y metales pesados. Si bien algunos géneros bacterianos fueron favorecidos en la rizosfera por los dos métodos de finalización (CM y DQ), dentro de los que se encuentran degradadores de quitina y celulosa, agentes de biocontrol y desnitrificantes, ambos métodos afectaron negativamente a otros géneros considerados benéficos para las plantas.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DEL MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE AVENA COMO CCI EN RELACIÓN A LOS MÉTODOS DE FINALIZACIÓN DEL CULTIVO

1. Introducción

En Argentina, la adopción de CCI en reemplazo del barbecho ha crecido durante las últimas cinco campañas, pasando del 4% en 2014/15 al 19% en 2019/20. La Bolsa de Cereales de Buenos Aires, a través de su Relevamiento de Tecnología Agrícola Aplicada (ReTAA, 2021) informó que en la campaña 2019/20 la superficie sembrada con CCI fue de 352.000 hectáreas a nivel país. Esta gran popularidad se debe a que los CCI proveen variados servicios ecosistémicos y contribuyen a la sustentabilidad de la agricultura.

La región semiárida en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires (SOB) cubre aproximadamente 1,6 millones de hectáreas sobre el flanco sur del sistema de Sierras Australes, e incluye los partidos de Púan, Bahía Blanca, Coronel Rosales, y sectores de Adolfo Alsina, Saavedra, Tornquist, Coronel Dorrego y Villarino. Predominan los ambientes frágiles configurados por suelos poco profundos con escasa fertilidad y susceptibles a la erosión (Krüger *et al.*, 2019). Los sistemas productivos tradicionales son de tipo mixto, con dominancia de la ganadería bovina sobre la agricultura y menor actividad ovina. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un importante incremento de la superficie agrícola (Krüger *et al.*, 2019). A pesar que la SD está siendo adoptada en forma creciente, la LC todavía predomina en la parte sur de la región. La frecuente falta de prácticas de manejo sustentables y la variabilidad climática configuran una combinación que favorece la erosión y estimula la degradación de los suelos, tanto química como física, lo cual disminuye el potencial de rendimiento y generan un círculo que puede comprometer la actividad económica y social de la región (Krüger *et al.*, 2019). Pese a que en estos ambientes es limitado el uso de CCI, debido a que compiten con el cultivo de cosecha por el agua, hay algunas investigaciones llevadas a cabo por De Leo *et al.*, (2020), quienes evaluaron tres especies (*Vicia villosa* L., *Secale cereale* L. y *Lolium hybridum*) como CCI, previo a maíz de baja densidad y encontraron diferencias a favor de *Lolium hybridum* como CCI para el ambiente de estudio (disminución en el número de malezas y mayor cobertura vegetal). Los autores destacan la necesidad de continuar con la experimentación por ambientes a fin de mejorar las prácticas agrícolas y la sustentabilidad de los sistemas. Por lo tanto, esto justifica más investigación en la región en los aspectos agronómicos y ecológicos del manejo asociado a los CCI.

Estudios realizados en la región pampeana reportaron que el N proveniente de la mineralización de los residuos de centeno (como CCI) aumentó los niveles de N disponible en el suelo para el cultivo de maíz y sorgo (Fernández *et al.*, 2012), mientras que un ensayo de larga duración demostró que

después de 5 años de inclusión de CCI en la rotación con soja no hubo efecto positivo sobre los contenidos de MO, por lo que los autores concluyeron que se necesita evaluar a más largo plazo su efecto en las fracciones orgánicas (Fernández *et al.*, 2020). Sin embargo, ninguno de estos estudios analizó el efecto de las prácticas asociadas a los CCI, como los métodos aplicados para suprimir su crecimiento, sobre el microbioma del suelo rizosférico.

Existen algunos estudios que han indagado sobre los efectos de estas prácticas de manejo sobre el microbioma de plantas sensibles (Mijangos *et al.*, 2009; Imparato *et al.*, 2016; Schlatter *et al.*, 2017; Allegrini *et al.*, 2019) si bien la mayoría de ellos son estudios realizados en macetas en invernáculo y por cortos períodos de tiempo. Entre ellos, solo el trabajo de Allegrini *et al.*, (2019) evaluó el efecto de estos tratamientos sobre poblaciones del ciclo del N (AOA, BOA), encontrando que la supresión de avena con glifosato disminuyó la abundancia de AOA y BOA. Otros autores llevaron a cabo estudios del microbioma del suelo de cultivos sensibles en ensayos de campo de más largo plazo, pero sólo utilizaron el secado con glifosato como método de supresión del cultivo. Por ejemplo, Lupwayi *et al.*, (2021) reportaron que aplicaciones repetidas de glifosato en un ensayo de campo de 7 años de duración tuvieron poco efecto sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera de trigo candeal (*Triticum turgidum* var. durum Desf.). El herbicida disminuyó la abundancia relativa del filo Alfarproteobacteria y del género *Opitutus* (Verrucomicrobia) (Lupwayi *et al.*, 2021).

Además, hay otros estudios a campo con CC que, si bien han evaluado distintos métodos de finalización del cultivo, tuvieron sólo un año de duración y no estudiaron específicamente el microbioma rizosférico del CC. Por ejemplo, Liang *et al.*, (2014) analizaron métodos de supresión químicos y mecánicos de los CCI, y reportaron que el corte aumentó el CBM y la nitrificación potencial del suelo con respecto al tratamiento con glifosato. En tanto, Romdhane *et al.*, (2019) evaluaron el efecto de las prácticas de manejo de los CC (supresión química vs. mecánica) sobre la diversidad microbiana del suelo, la estructura y la abundancia de *Archaea*, *Bacteria* y poblaciones del ciclo del N (AOA, BOA, *nirK*, *nirS*, *nosZI* y *nosZII*). Los autores encontraron que el manejo del CC afectó la abundancia de genes implicados en el ciclo del N, mientras que no observaron efectos sobre la abundancia de bacterias totales. Por lo tanto, resulta primordial avanzar en los estudios a campo de mediano y largo plazo para generar información que permita entender cómo afectan los métodos de supresión del CCI a las comunidades rizosféricas en condiciones reales de campo.

De acuerdo a la revisión de la literatura, no existen reportes previos de la evaluación de la comunidad microbiana rizosférica de CCI finalizados química o mecánicamente considerando simultáneamente múltiples aspectos de la comunidad, como la diversidad α y β , la abundancia de bacterias heterótrofas aerobias (BHA) cultivables y de grupos específicos y ecológicamente relevantes de microorganismos. Por lo tanto, en base a estos antecedentes, se planteó como hipótesis que la introducción de CCI en rotación con un cultivo estival (girasol) y la supresión del mismo previo a la

siembra de girasol, afecta el ensamblado de la microbiota rizosférica de las plantas senescentes. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del método de finalización (mecánico vs. químico) del CCI sobre el microbioma rizosférico de avena, con particular foco en: la estructura y función de comunidades de BOA, AOA y bacterias desnitrificantes, el potencial génico para la degradación de glifosato en bacterias y la estructura de la comunidad de *Bacteria* y *Archaea*. Para ello, se abordará el estudio del impacto de los métodos de finalización de avena como CCI sobre el microbioma rizosférico en un ensayo a campo durante dos campañas agrícolas, en la localidad de Napostá al SOB.

2. Materiales y métodos

2.1. Sitio de estudio

Se estableció un ensayo en el Campo Experimental Napostá, convenio UNS y MDA-PBA (38°25'39.67"S, 62°17'7.41"O), partido de Bahía Blanca, Argentina (Figura 4.1). El suelo es un Paleustol petrocálcico (Ap-A2-AC-2Ck-3Ckm). El horizonte Ap presenta las siguientes características: MO 4,24%; pH (1:2,5 suelo: agua) 6,7; P (Bray) extractable 8 mg kg⁻¹ y N total 0,246%. El edafoclima es ústico-térmico (Amiotti *et al.*, 2010). La precipitación promedio anual en la zona es de 637,7 mm (media 1959-2010), concentrándose dos terceras partes en otoño y primavera. Se registra una estación seca a fines del invierno y una semiseca a mediados de verano (enero y febrero).

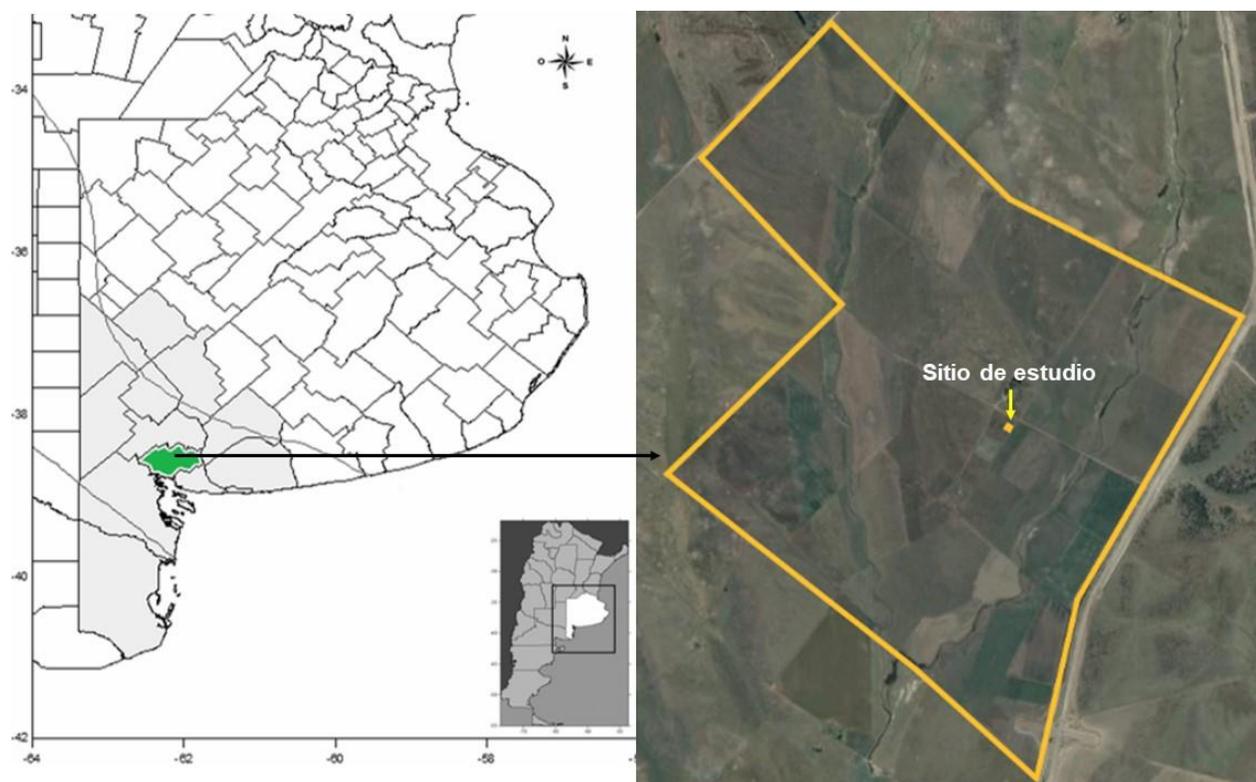


Figura 4.1. Ubicación del sitio de estudio. Colonia Napostá, provincia de Buenos Aires, partido de Bahía Blanca, Argentina.

2.2. Diseño experimental

Un área de 15×15 m fue delimitada en un pastizal natural que nunca había sido cultivado. La preparación del terreno previo a la siembra consistió en la remoción de la vegetación natural, rastreo del suelo y emparejamiento del terreno. Veinte parcelas (2,25×1,56 m) fueron delimitadas y arregladas en un diseño en bloques completos aleatorizados (según la pendiente) con cuatro réplicas (Figura 4.2), dejando 1 m entre parcelas y los bloques adyacentes, repetido en dos campañas agrícolas (2018/19 y 2019/20). Dieciséis parcelas se sembraron en forma directa, a chorrillo, en hileras separadas a 15,6 cm con avena (*Avena sativa* L., variedad Cristal INTA), con densidad de siembra de 250 plantas m⁻² el 3 de junio de 2018 y el 13 de mayo de 2019. Todas las parcelas se fertilizaron al voleo con 40 kg N ha⁻¹ (urea 46%N). El resto de las parcelas se destinaron a barbecho (sin siembra de CCI). No se controlaron las malezas durante la estación de crecimiento de los CCI.

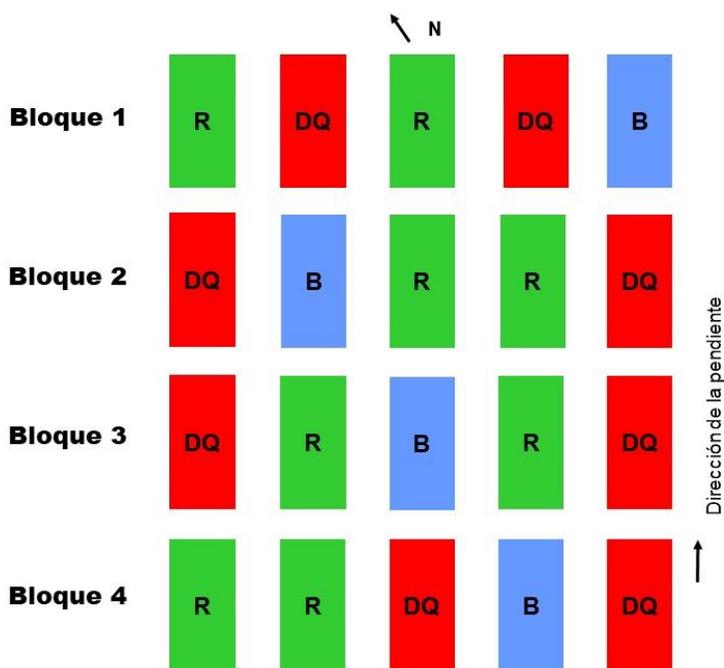


Figura 4.2. Esquema representativo del diseño en bloques. Tratamientos: rolado (R), desecación química (DQ), barbecho (B).

A los 144 y 164 días desde la fecha de siembra (2018 y 2019, respectivamente) (estadio Z5.5, Zadoks *et al.* 1974) se aplicaron dos métodos de finalización del crecimiento:

1) **rolado (R)**. Se utilizó un rolo diseñado por el personal del CERZOS, consiste de un tambor hueco de 50 cm de ancho y 120 kg de peso, al cual se encuentran soldadas helicoidalmente una serie

de cuchillas de acero sin filo de 8 cm de alto. El rolo se pasó por el cultivo en dirección perpendicular al sentido de siembra, mediante tracción manual. En la segunda campaña agrícola (2019), luego del rolado fue necesario cortar las plantas a nivel del suelo para asegurar el secado completo.



Figura 4.3. A) Rolo utilizado para la supresión mecánica del CCI; B) CCI rolado.

2) **desecación química (DQ).** Se utilizó el herbicida glifosato de la marca ESKOBA FULL II en 2018 (Red Surcos S. A., 662 g IA l⁻¹, sal monopotásica) y el formulado CREDIT FULL (Nufarm S. A., 700 g IA l⁻¹, mezcla de sales) en 2019. La aplicación del herbicida se realizó con una mochila pulverizadora (GIBER, 5 litros) con doble boquilla extensible con pastillas de abanico plano. Para esto, se preparó una solución al 1,5% siguiendo las recomendaciones del marbete para aplicaciones con equipos de mochila. Las parcelas a las que se les aplicó glifosato se cercaron con un nylon de 1 metro de ancho para evitar la deriva a las parcelas adyacentes. Las parcelas en barbecho (B) recibieron la misma dosis de glifosato.



Figura 4.4. CCI a los 13 días del secado con glifosato.

2.3. Muestreo de suelo rizosférico

El muestreo se realizó colectando plantas de avena de cada unidad experimental por excavación (40 cm de cada lado), aleatoriamente, para obtener una muestra de rizosfera del CCI vivo (sin supresión, SS) y en los tratamientos DQ y R previo a la siembra del girasol. La extracción de suelo rizosférico se realizó de la siguiente manera: se agitaron las raíces moderadamente, para desprender el suelo no rizosférico (*bulk soil*) mientras que el suelo rizosférico se obtuvo removiéndolo de la raíz mediante desprendimiento manual con un pincel estéril de acuerdo con lo sugerido por Yanai *et al.*, (2003). Las muestras de suelo se preservaron a -80°C hasta la extracción de ADN y a 4°C para los análisis fisiológicos y químicos. En total, se obtuvieron 12 muestras de rizosfera en 2018 [SS= 4, DQ= 4, R= 4] y 16 muestras en 2019 [SS_{DQ}= 4, SS_R=4, DQ= 4, R= 4].

2.4. Enumeración de bacterias heterotróficas aerobias

Las bacterias heterótrofas aerobias (BHA) cultivables fueron cuantificadas por el método del recuento en placa. Se prepararon suspensiones de suelo rizosférico a partir de 1 g de suelo en 9 ml de solución salina estéril (NaCl 0,85%). Las suspensiones de suelo se agitaron en frascos con perlas de vidrio estériles (180 rpm, 30 min) y se realizaron diluciones decimales seriadas con la solución salina estéril. Luego, se sembraron 100 μl de la dilución 10^{-4} , por triplicado, diseminando con espátula estéril en placas de Petri con medio tripteína soja agar 0,1%(TSA, Laboratorios Britania, Argentina). Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C por 6 días.

Se aplicó el concepto de estrategias *r/K* para determinar los cambios en la estructura de la fracción de bacterias cultivables del suelo (De Leij *et al.*, 1993). Para ello, se contaron las colonias visibles a las 24, 48 y 144 h de incubación, en las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias. Las bacterias cultivables se clasificaron como estrategias *r* cuando las colonias fueron visibles dentro de las 48 h, mientras que el resto se clasificaron como estrategias *K*. Los conteos totales de bacterias obtenidos fueron expresados en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo (Bevivino *et al.*, 2014).

Se calcularon los índices de biodiversidad: el índice eco-fisiológico (EP) (De Leij *et al.*, 1993) y el índice de desarrollo de colonias (CD) (Sarathchandra *et al.*, 1997). El índice EP, una modificación del índice de diversidad de Shannon, fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$H = -\sum (p_i \times \log_{10} p_i)$$

Donde p_i representa las UFC de cada día (1, 2 y 6 días de incubación) como una proporción de las UFC totales en la muestra después de 6 días de incubación. El índice EP varía de 0 a 1. Si el valor de este índice es 1, el crecimiento de microorganismos en un ambiente dado es uniforme.

El índice de CD fue calculado de acuerdo a la ecuación:

$$CD = [N_1/1 + N_2/2 + N_3/6] \times 100$$

Donde N1, N2, N3 representan la proporción de UFC en los respectivos días del período de incubación. El índice CD varía de 10 a 100. Un aumento en el índice de CD sugiere que la proporción de microorganismos de crecimiento rápido (estrategas *r*) aumenta, mientras que la de microorganismos de crecimiento lento (estrategas *K*) está disminuyendo (Borowik *et al.*, 2017).

2.5. Análisis fisicoquímicos del suelo

Se tomaron muestras del suelo no rizosférico en el momento de aplicación de los métodos de finalización del CCI (SS) y a los 13 días postsupresión (DQ y R), en la profundidad de 0-10 cm con un barreno manual (24 muestras entre las dos campañas). Las muestras fueron secadas al aire, tamizadas (<2 mm) y remitidas al LABSPA (CERZOS-CONICET-UNS) para determinar el contenido de N-NH₄, N-NO₃ (semimicro Kjeldahl) y Pe (Bray y Kurtz, 1945). Se midió el pH en una suspensión de suelo: agua (1:2,5) con pHmetro (Altronix®, TPX 1) y se determinó el contenido de humedad (%H) en las muestras por el método gravimétrico.

2.6. Determinación de la actividad de nitrificación

La APN se midió utilizando el procedimiento descrito en la sección 2.3 del capítulo 3. Brevemente, se determinó la APN siguiendo el procedimiento descrito por Hart *et al.*, (1994), con modificaciones (1,5 g en 10 ml de buffer de reacción). La medición de la tasa de nitrificación se llevó a cabo utilizando un método colorimétrico en microplacas. Luego del desarrollo de color, se analizaron las microplacas en un lector de microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtech, Alemania) a una longitud de onda de 540 nm. Después de la corrección por contenido de humedad del suelo y la conversión en base a peso del suelo seco (pss), se calculó la actividad de nitrificación potencial utilizando la fórmula descrita por Drury *et al.*, (2006) y reportado en $\mu\text{g N-NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{pss h}^{-1}$.

2.7. Análisis molecular de la comunidad microbiana

2.7.1. Extracción de ADN del suelo rizosférico y cuantificación

La extracción de ADN a partir de 250 mg de suelo rizosférico se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen GmbH, Alemania); la cuantificación usando el kit QuantiFluor® ds DNA System (Promega®, Estados Unidos) en un fluorómetro Quantus (Promega®, Estados Unidos) y la calidad del ADN fue analizada en un gel de agarosa al 1% y en un espectrofotómetro de la serie DS-11 FX (DeNovix®, Estados Unidos), usando como indicador las relaciones de absorbancias (A260/A230 y A260/280A).

2.7.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de diferentes grupos microbianos

La cuantificación de los genes ARNr 16S de *Bacteria* y *Archaea*, *amoA* de AOA y BOA, *nirK*, *nirS* y *phnJ*, se llevó a cabo de la misma manera que la indicada en el capítulo 2 (sección 2.3.2) y 3 (sección 2.4.2). La composición de la mezcla de reacción, el programa de amplificación de los genes y los rangos de las curvas estándar empleados se detallan en la Tabla 2 del Anexo I. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de tiempo real ABI 7500 y su software asociado 7500 Software v.2.0.3 (Applied Biosystems®, Estados Unidos).

2.7.3. Análisis metagenómico y bioinformático de la comunidad microbiana

El proceso de secuenciación de amplicones del gen codificante para el ARNr 16S (“barcoded amplicon sequencing”, en inglés), se llevó a cabo con la tecnología Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) con un largo de lecturas de 2x300 pb y un mínimo de profundidad de secuenciación de 15000 *paired-end-reads* por corrida. La librería de genes fue preparada con los cebadores 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') dirigidos a la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S, usando el protocolo Fluidigm® (Anexo II). Los archivos FASTQ fueron generados y demultiplexados por el servicio de secuenciación con el Software de Conversión bcl2fastq v2.20 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos).

El archivo FASTQ fue procesado en QIIME2 2019.7 (Bolyen *et al.*, 2019) usando los *pipelines* recomendados para pares de lecturas basadas en el algoritmo *denoising dada2*. Los cebadores fueron removidos usando el argumento *p-trim-left* dentro del comando “*dada2 denoised-paired*”. El argumento de corte dentro del comando “*dada2 denoised-paired*” fue de 283 pb para las lecturas *forward* y 251 pb para las lecturas *reverse* (valores de Q media >27 informados por Interactive Quality Plot tool de QIIME2), mientras que se estableció un valor por *default* de 2 para el número esperado de errores (*E*). Después de las etapas de procesamiento, eliminación de cebadores, corte, filtrado, *denoising* y remoción de quimeras se obtuvo la tabla de ASVs. Finalmente, los ASVs fueron clasificados taxonómicamente utilizando el clasificador RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Las secuencias fueron asignadas taxonómicamente a nivel de género, familia, orden, clase y filo.

La tabla de ASVs fue rarefaccionada (función *rarefy*) según la muestra con el menor número de secuencias (22538 secuencias) y se obtuvieron las curvas de rarefacción (función *rarecurve*). La tabla rarefaccionada fue utilizada en el paquete *vegan* v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2020) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1335) para el cálculo de las siguientes métricas de diversidad α : los índices de heterogeneidad de Shannon (H') y el recíproco del índice de Simpson ($1/\lambda$), la riqueza [número de ASVs observados (S') e índice de Chao-1] y la equitatividad de cada muestra (Anexo III).

Las secuencias fueron alineadas con el programa de múltiples alineamientos MAFFT v. 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html>) para calcular la distancia UniFrac. Con las secuencias

alineadas se construyó un árbol filogenético basado en el método de Neighbor-joining usando el paquete *ape* v5.4-1 (Paradis y Schliep, 2018) y el paquete *phangorn* v2.5.5 (Schliep, 2011) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355). El árbol filogenético y la tabla de ASVs rarefaccionada fueron usados en el paquete *GUniFrac* v1.1 (Chen, 2021) del software estadístico R v3.6.1 para calcular la distancia UniFrac generalizada.

2.8. Análisis estadísticos

Los modelos lineales mixtos se ajustaron a los parámetros químicos del suelo (Pe, N-NH₄ y N-NO₃), APN, qPCR (log₁₀ número de copias µg⁻¹ ADN y abundancia relativa) y variables microbiológicas (EP, CD, estrategias *r* y *K*, UFC) con PROC GLIMMIX del software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). El método de finalización fue considerado un efecto fijo, mientras que el año, el bloque y su interacción con el método de finalización como efectos aleatorios en el análisis de la varianza. El contenido de humedad se utilizó como covariable en la mayoría de estos análisis, excepto para Pe, N-NH₄ y N-NO₃, cuya determinación incluye una corrección de humedad. Cuando fue apropiado, las medias de mínimos cuadrados (*lsmeans*) se separaron usando la opción de *lines* del comando *lsmeans*, estableciendo la probabilidad de error de Tipo I (α) en 0,05. Los coeficientes de correlación de Pearson ($\alpha=0,05$) obtenidos con el procedimiento CORR de SAS, se utilizaron para evaluar la relación entre la abundancia de los genes de nitrificación (BOA y AOA) y la función (APN), así como la relación entre los genes de nitrito reductasas y las formas de N disponible (NO₃⁻ y NH₄⁺).

Los datos de secuenciación de amplicones se analizaron utilizando un enfoque tradicional y de composición (Gloor y Reid, 2016; Gloor *et al.*, 2017). En el primer caso, la distancia UniFrac fue usada como entrada en el paquete *vegan* v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2020) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355) para el análisis multivariado de la diversidad beta a través del NMDS utilizando la función *metaMDS*. En el segundo caso partiendo de la tabla de ASVs inicial resultante de la plataforma de clasificación RDP, que contenía 15868 ASVs, se procedió a realizar una serie de pasos de filtrado y selección de ASVs. Primero, se agruparon las *reads* de los ASVs pertenecientes a un mismo género, lo que resultó en un total de 1079 géneros. Este conjunto se redujo aún más ya que sólo se mantuvieron los géneros con una abundancia relativa promedio >0,1% (Gloor y Reid, 2016), resultando 189 géneros. Estos géneros con las *reads* de los ASVs se ingresaron luego en la plataforma de detección de predictores JMP® para proporcionar una identificación inicial de los géneros que responden a los efectos del tratamiento utilizando un método de remuestreo *bootstrap* (SAS Institute Inc, 2018; Villamil *et al.*, 2021). Como resultado se obtuvo una tabla de 27 ASVs clasificadas a nivel de género que contribuyeron al menos en un uno por ciento a la variabilidad de los algoritmos del modelo. Los datos de esta tabla fueron transformados a *centered log-ratio* (clr) (Aitchison, 1986), previo reemplazo de los valores ceros mediante el procedimiento "*cmultRep1*" del paquete

zCompositions (Palarea-Albaladejo y Martín-Fernández, 2015). Luego, los datos transformados fueron usados como entradas para el ACP.

El ACP se realizó utilizando el procedimiento FACTOR en el software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) con *priors*=1, los *reads* de los ASVs transformados a *centered log-ratio* se resumieron en un conjunto de variables compuestas no correlacionadas o componentes principales (CP). Las CP con autovalor ≥ 1 que explicaban al menos el 5% de la variabilidad en el conjunto de datos se utilizaron como variables independientes para análisis posteriores. Los géneros con correlación significativa con cada CP ($>|0,45|$) fueron considerados sensibles y se utilizaron en la descripción de las CP. Los modelos lineales se ajustaron a cada CP utilizando el procedimiento GLIMMIX del software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) para evaluar el efecto del método de finalización sobre la comunidad bacteriana de la rizosfera de avena. El método de finalización fue considerado un efecto fijo, mientras que el año, el bloque y su interacción con el método de finalización como efectos aleatorios en el análisis de la varianza. Cuando fue apropiado, las medias de mínimos cuadrados (*lsmeans*) se separaron usando la opción de *lines* del comando *lsmeans*, estableciendo la probabilidad de error de Tipo I (α) en 0,05.

Se realizó un análisis multivariado de la varianza no paramétrico permutacional (PERMANOVA con la función *adonis* en el paquete *vegan*; Anderson, 2001) usando matrices de distancia (distancia UniFrac generalizada) y 1000 permutaciones para estudiar la existencia de efectos estadísticamente significativos ($P < 0,05$) del método de finalización (Ramette, 2007). Las comparaciones de a pares fueron examinadas usando el paquete *RVAIDeMemoire* v0.9-78 (Hervé, 2020) (función *pairwise.perm.manova* sin correcciones, 1000 permutaciones) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355).

Se utilizó el Software SigmaPlot versión 10.0 para graficar las relaciones estadísticamente significativa entre las CPs y el método de finalización, sobre los géneros cuyo *loading* fue $>|0,45|$. Las Figuras 4.3 y 4.4 se componen de dos gráficos: el primer gráfico (A) muestra los *scores* medios de la CP para cada método de finalización y sus errores estándar (como barras de error), y el segundo (B) señala la contribución de cada género indicador al valor medio de la CP para cada método de finalización. Esta contribución se calcula como el valor medio de la CP para un determinado método de finalización (Tabla 4.12) multiplicado por el *loading* de los géneros específicos dentro de la CP (Tabla 4.11), denominados $M \times L$ en cada gráfico.

3. Resultados

3.1. Enumeración de bacterias heterótrofas aerobias (BHA)

En la Tabla 4.1 se indican los resultados del análisis de la varianza de las variables microbiológicas (UFC, estrategias *r* y *K*, CD y EP). Según los resultados, los métodos de finalización no modificaron significativamente la abundancia de BHA cultivables en la rizosfera de avena ($P > 0,05$; Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los métodos de finalización para la abundancia de bacterias heterotróficas aerobias cultivables e índices de biodiversidad (CD, índice de desarrollo de colonias y EP, índice eco-fisiológico). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).

		Estrategas <i>r</i>		Estrategas <i>K</i>		UFC		r/ <i>K</i>		CD		EP		
		<i>n</i>	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
		Log ₁₀ UFC g ⁻¹ suelo						UFC/UFC						
Método de finalización														
	DQ	8	7,48	0,28	7,11	0,50	7,63	0,36	1,54	1,25	41,80	10,41	0,39	0,03
	R	8	7,29	0,27	7,17	0,50	7,56	0,35	1,88	1,23	45,15	10,27	0,43	0,02
	SS	11	7,52	0,27	7,10	0,49	7,68	0,35	2,72	1,22	52,25	10,15	0,41	0,02
			<i>gl</i>											
Método de finalización		2	0,618		0,974		0,884		0,532		0,598		0,571	

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.2. Parámetros químicos del suelo

En la Tabla 4.2 se indican los resultados del análisis de los parámetros químicos del suelo: Pe, N-NH₄ y N-NO₃. Los resultados muestran que el efecto del método de finalización no fue estadísticamente significativo para ningún parámetro químico del suelo ($P > 0,05$; Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Valores de medias y errores estándares(ES) de las medias de los métodos de finalización para fósforo extractable(Pe), amonio(N-NH₄) y nitrato (N-NO₃). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).

		n	Pe mg kg ⁻¹		N-NH ₄ mg kg ⁻¹		N-NO ₃ mg kg ⁻¹	
			Media	ES	Media	ES	Media	ES
Método de finalización								
	DQ	8	11,89	1,64	29,96	19,15	5,98	1,16
	R	8	9,60	1,64	31,43	19,15	6,01	1,16
	SS	8	12,65	1,80	27,03	19,22	3,33	1,49
		gl			P -valor			
Método de finalización		2	0,218		0,539		0,451	

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.3. Actividad potencial nitrificante

Los resultados del análisis de la varianza de la APN se indica en la Tabla 4.3. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de finalización del CCI para la APN ($P > 0,05$; Tabla 4.3).

Se analizó la correlación entre la abundancia y actividad microbiana, y se observó una correlación positiva entre APN y número de copias del gen *amoA_{BOA}* ($r=0,49$, $P=0,009$), mientras que no se detectó correlación significativa entre APN y el gen *amoA_{AOA}* ($r=0,28$, $P=0,15$).

Tabla 4.3. Valores de medias y errores estándares(ES) de las medias de los métodos de finalización para actividad potencial nitrificante (APN). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).

Método de finalización	APN ($\mu\text{g N-NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{pss h}^{-1}$)		
	<i>n</i>	Media	ES
DQ	8	4,42	0,94
R	8	3,75	0,91
SS	12	3,74	0,89
	<i>gl</i>	<i>P</i> -valor	
Método de finalización	2	0,598	

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

Pss: peso seco del suelo.

3.4. PCR cuantitativa de genes indicadores

La abundancia de *Bacteria*, *Archaea*, AOA, BOA, *nirK*, *nirS* y *phnJ* fue evaluada mediante qPCR de los genes indicadores correspondientes. La eficiencia y las ecuaciones obtenidas del ajuste lineal de las curvas estándar, que describen la relación entre los valores *Ct* y el número de copias de cada gen indicador, se detallan en la Tabla 4.4 y 4.5.

Tabla 4.4. Ecuaciones de las curvas estándar y eficiencias de las qPCR de cada gen indicador para muestras procesadas en 2018.

Gen	Grupo	Ecuación	R ²	Eficiencia (%)
ARNr 16S	<i>Bacteria</i>	$Ct = 40,12 - 3,66 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	87,00
ARNr 16S	<i>Archaea</i>	$Ct = 37,9 - 3,74 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	1,000	85,20
<i>amoA</i>	AOA	$Ct = 35,04 - 3,86 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	81,69
<i>amoA</i>	BOA	$Ct = 43,17 - 3,87 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	81,45
<i>nirK</i>	<i>nirK</i>	$Ct = 35,8 - 3,56 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	90,88
<i>nirS</i>	<i>nirS</i>	$Ct = 36,9 - 3,56 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	90,86
<i>phnJ</i>	<i>phnJ</i>	$Ct = 35,76 - 3,36 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	98,33

Tabla 4.5. Ecuaciones de las curvas estándar y eficiencias de las qPCR de cada gen indicador para muestras procesadas en 2019.

Gen	Grupo	Ecuación	R ²	Eficiencia (%)
ARNr 16S	<i>Bacteria</i>	$Ct = 39,76 - 3,67 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	87,29
ARNr 16S	<i>Archaea</i>	$Ct = 37,25 - 3,7 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,984	86,34
<i>amoA</i>	AOA	$Ct = 36,82 - 3,78 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	1,000	84,05
<i>amoA</i>	BOA	$Ct = 36,99 - 4,03 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	1,000	77,04
<i>nirK</i>	<i>nirK</i>	$Ct = 39,68 - 3,67 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	1,000	86,68
<i>nirS</i>	<i>nirS</i>	$Ct = 42,51 - 3,72 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,996	85,67
<i>phnJ</i>	<i>phnJ</i>	$Ct = 35,76 - 3,36 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$	0,999	98,33

En la Tabla 4.6 se indican los resultados del análisis para los distintos grupos microbianos al comparar el número de copias de los diferentes genes indicadores utilizados en cada caso.

Según los resultados, la abundancia de los genes indicadores (*Bacteria*, *Archaea*, AOA, BOA, *nirK*, *nirS* y *phnJ*) en la rizosfera de plantas SS, R y DQ fueron similares, sin un efecto estadísticamente significativo entre método de finalización ($P > 0,05$; Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los métodos de finalización para el número de copias de los genes indicadores (transformada a \log_{10}). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).

	n	Bacteria		Archaea		AOA		BOA		nirS		nirK		phnJ	
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Método de finalización															
DQ	8	8,58	0,15	6,74	0,05	5,72	0,08	5,71	0,39	6,71	0,61	6,52	0,48	8,65	0,07
R	8	8,58	0,14	6,68	0,05	5,82	0,07	5,64	0,38	6,32	0,60	6,64	0,48	8,66	0,06
SS	12	8,56	0,14	6,75	0,04	5,73	0,06	5,65	0,38	6,64	0,59	6,55	0,48	8,56	0,05
		<i>gl</i>				<i>P</i> -valor									
Método de finalización	2	0,947		0,51		0,627		0,906		0,406		0,665		0,370	

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

En la Tabla 4.7 se presentan los resultados del análisis de la varianza para los valores de AR de los diferentes grupos microbianos analizados. Los resultados de AR (BOA/ *Bacteria*, AOA/ *Archaea*, AOA/ BOA, *nirS/ nirK*) indicaron que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo ($P > 0,05$; Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los métodos de finalización para la abundancia relativa (AR) de distintos grupos microbianos. Relación entre el número de copias del gen indicador (BOA y AOA) y el gen ARNr 16S de *Bacteria* y *Archaea*, respectivamente; relación entre el gen *amoA* de arqueas oxidantes del amoníaco (AOA) y bacterias oxidantes del amoníaco (BOA); relación entre el gen *nirS* y *nirK*. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los tratamientos. Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).

	n	BOA/ <i>Bacteria</i>		AOA/ <i>Archaea</i>		AOA/ BOA		<i>nirS/ nirK</i>	
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Método de finalización									
DQ	8	1,54.10 ⁻³	9,80.10 ⁻⁴	1,11.10 ⁻¹	2,50.10 ⁻²	1,45	1,35	9,03	7,06
R	8	1,54.10 ⁻³	9,43.10 ⁻⁴	1,37.10 ⁻¹	2,22.10 ⁻²	2,40	1,31	5,27	6,96
SS	12	1,61. 10 ⁻³	9,12.10 ⁻⁴	1,01.10 ⁻¹	1,97.10 ⁻²	1,63	1,28	7,37	6,86
	<i>gl</i>			<i>P</i> -valor					
Método de finalización	2	0,987		0,552		0,700		0,448	

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.5. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana

El número total de secuencias de ARNr 16S de *Bacteria* en cada muestra después de cada etapa de procesamiento (filtrado, *denoising* y eliminación de quimeras) se muestra en la Tabla 4.8. Como se observa en esta tabla, luego de realizar las distintas etapas no se removieron un número significativo de lecturas (*reads*), lo que refleja la alta calidad del conjunto de datos. Se obtuvieron un total de 1663735 secuencias con una extensión promedio de 264 nucleótidos, incluyendo las correspondientes a *Bacteria* y *Archaea*. El número de ASVs definidas luego del procesamiento y limpieza del conjunto total de datos (28 muestras) fue de 16024 para *Bacteria+Archaea*, de los cuales 15927 fueron clasificados como pertenecientes a *Bacteria* (99,4% de los ASVs), 83 a *Archaea* (0,52%) y 14 ASVs

(0,09%) no pudieron ser asignados a ninguno de ellos. Los análisis posteriores se centraron sólo en el dominio *Bacteria*. De las 15927 secuencias de *Bacteria* se retuvieron 15868 secuencias; un total de 57 (0,36%) secuencias se eliminaron debido a que su tamaño estaba fuera del valor promedio esperado para el amplicón, si bien previamente se chequeó si su identidad correspondía a secuencias bacterianas de la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S mediante la búsqueda en la base de datos BLASTn.

Tabla 4.8. Procesamiento de secuencias con QIIME 2. En la tabla se reporta el número de secuencias (sec.) obtenidas en los diferentes pasos del procesamiento. Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolando y las letras SS sin supresión. Los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento y en naranja se indican las muestras de 2018 y en azul las de 2019.

Muestras	Número de sec. de entrada	Número de sec. filtradas	Número de sec. <i>denoised</i>	Número de sec. <i>merged</i>	Número de sec. sin quimeras	Número de sec. de <i>Bacteria</i>
IDQ_1	70880	65939	62788	54298	50533	50095
IIDQ_1	61407	57453	54122	45566	42738	42415
IIIDQ_1	61756	57689	54519	45693	43157	42659
IVDQ_1	65157	61057	57446	48352	45823	45174
IR_1	77742	72324	68709	60072	56494	55962
IIR_1	70219	65723	62162	52743	49484	48976
IIIR_1	72658	67898	64391	55305	51977	51414
IVR_1	70146	65576	62094	52523	49189	48379
ISS_1	68949	64836	61311	52792	49903	49067
IISS_1	72580	67373	63348	54040	50436	49532
IIISS_1	71310	66844	62900	53452	50483	49828
IVSS_1	68442	64417	61018	52422	49432	48637
IDQ_2	56768	51169	48403	38613	36944	36534
IIDQ_2	51695	46616	44293	36333	34972	34771
IIIDQ_2	92324	82522	79309	68424	64402	63955
IVDQ_2	104277	93427	89697	77175	71052	70364
IR_2	84109	75739	72691	62412	58407	57575
IIR_2	150072	135119	131250	117750	108130	107325
IIIR_2	112872	102231	98457	86926	81054	79928
IVR_2	56380	50879	48211	38879	37077	36310
ISSDQ_2	47531	42122	39656	31970	29617	29295
IISSDQ_2	106139	95827	93173	83109	76422	75819
IIISSDQ_2	101174	91151	88001	77412	71055	70280
IVSSDQ_2	161715	146349	142264	129365	118302	117016
ISSR_2	96058	86657	83597	73984	68675	67722
IISSR_2	188651	169307	165282	151609	136850	135454
IIISSR_2	84595	75932	73091	62560	58192	57724
IVSSR_2	36603	32812	30399	23862	22935	22538

Los datos rarefaccionados correspondientes a *Bacteria* fueron los que se emplearon posteriormente para los análisis de diversidad α y β . La rarefacción se llevó a cabo en base a la muestra con el menor número de secuencias, en este caso IVSSR_2 (22538 secuencias) (Figura 4.5).

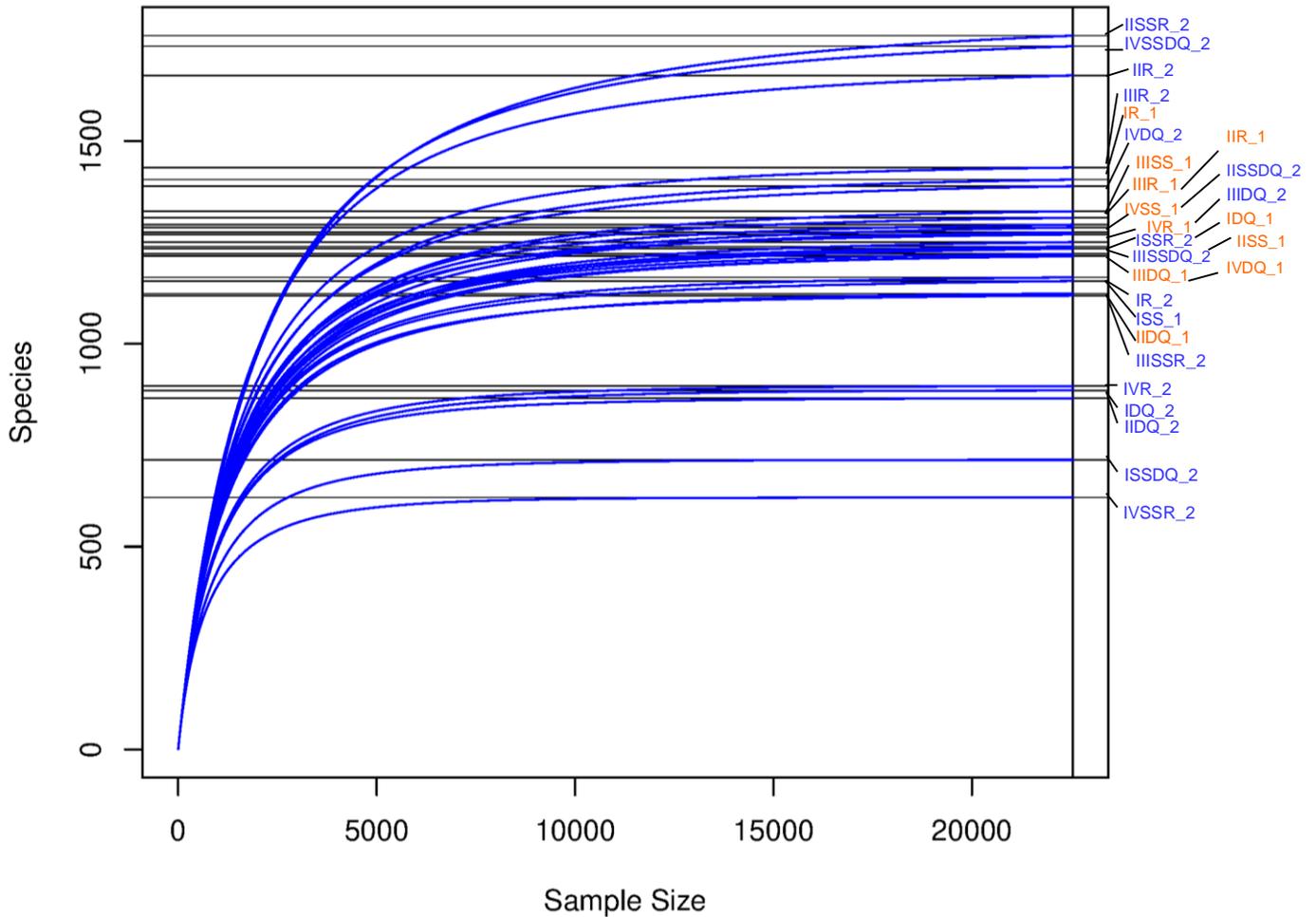


Figura 4.5. Curvas de rarefacción para las distintas muestras analizadas mediante *barcoded amplicon-sequencing*. Se indica el número de ASVs (“Species”) esperables para un número creciente de secuencias en cada muestra (“Sample size” o esfuerzo de muestreo). Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolado y las letras SS sin supresión. Los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento y en naranja se indican las muestras de 2018 y en azul las de 2019.

3.5.1. Diversidad α

Los resultados del análisis de la varianza para los índices de diversidad α se muestran en la Tabla 4.9. Según los resultados, las comunidades microbianas en la rizosfera de plantas SS, R y DQ mostraron los siguientes índices de diversidad α similares: riqueza de especies (S' e índice de Chao-1), índice de Shannon e índice de equitatividad de Shannon ($P>0,05$; Tabla 4.9). Sólo se observaron diferencias marginalmente significativas entre métodos de finalización para el índice recíproco de Simpson ($P<0,1$; Tabla 4.9). En la rizosfera de plantas R se observó un mayor índice respecto del método SS, mientras que no se diferenciaron de DQ.

Tabla 4.9. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los índices de diversidad alfa: Chao-1: índice de Chao-1 (riqueza estimada); S': riqueza observada (ASVs observados); $1/\lambda$: recíproco de Simpson; H': índice de Shannon; E_H : índice de equitatividad de Shannon. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).

	<i>n</i>	Chao-1		S'		$1/\lambda$		H'		E_H		
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	
Método de finalización												
DQ	8	1157	97,23	1152	94,71	594,18	AB	47,17	6,68	0,08	0,950	0,002
R	8	1314	97,23	1304	94,71	663,93	A	47,17	6,81	0,08	0,951	0,002
SS	12	1233	79,39	1223	77,33	549,18	B	43,29	6,68	0,07	0,946	0,002
		<i>gl</i>				<i>P</i> -valor						
Método de finalización	2	0,530		0,535		0,074		0,444			0,224	

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P<0,05$).

3.5.2. Diversidad β

El análisis multivariado a través de PERMANOVA para estudiar la diversidad β indicó un efecto no significativo del método de finalización ($P>0,05$; Tabla 4.10). Estos resultados se visualizaron en el ordenamiento mediante NMDS con distancia UniFrac generalizada donde no se observó una separación entre las comunidades bacterianas de la rizosfera de plantas sometidas a los distintos métodos de finalización (Figura 4.6).

Tabla 4.10. Análisis multivariado de la varianza no paramétrico (PERMANOVA) con 1000 permutaciones. *gl*: grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

PERMANOVA (distancia UniFrac generalizada)			
	<i>gl</i>	F. modelo	<i>P</i> -valor
Método de finalización	2	1,38	0,186
<i>gl</i> error	25		

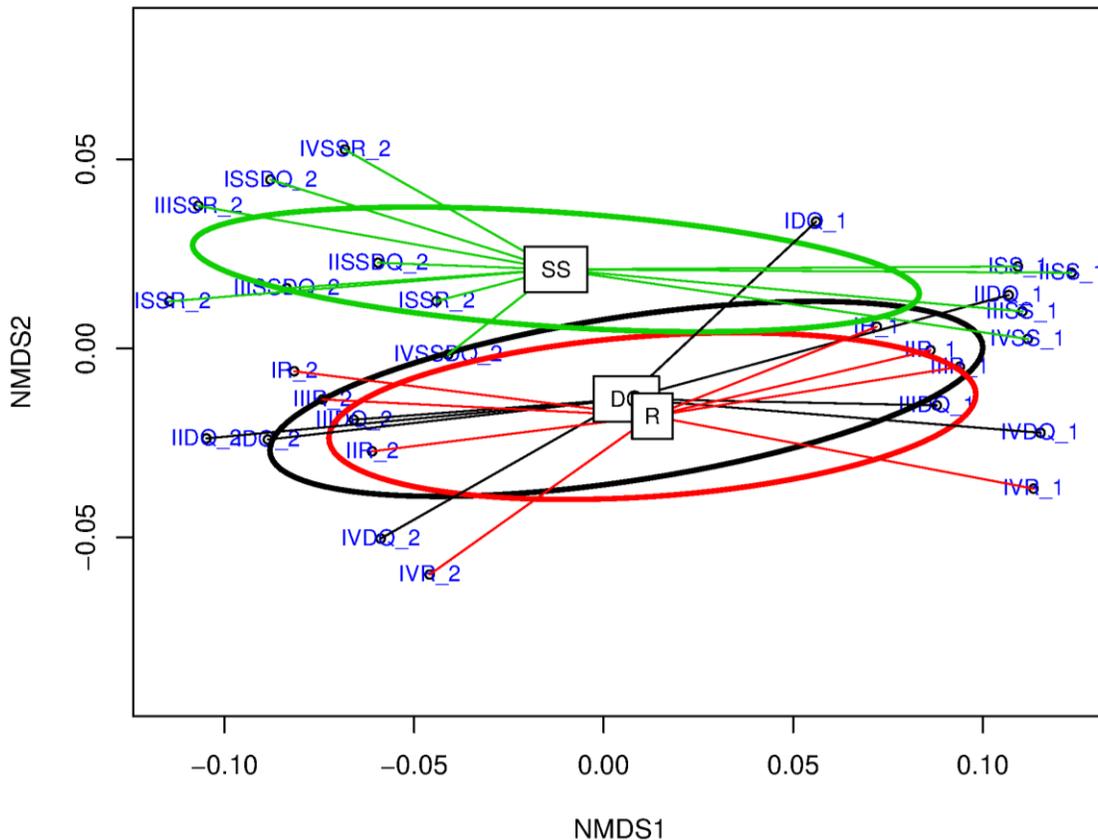


Figura 4.6. Análisis multivariado del conjunto de datos metagenómicos en la rizosfera de *Avena sativa* L. Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolado y las letras SS sin supresión. Los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada método de finalización y el número 1 indica las muestras de 2018 y el número 2 las de 2019. Los centroides se encuentran indicados con recuadros. El error estándar de DQ, R y SS se indica con elipses de color negro, rojo y verde, respectivamente. El ordenamiento se llevó a cabo mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y métrica de distancia UniFrac generalizada. *Stress-value*= 0,08.

3.5.3. Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de avena

El ACP de los datos transformados a *clr* generaron un conjunto de siete CPs no correlacionados con autovalor >1 que en conjunto explicaron el 71% de la variabilidad entre las muestras de rizosfera en base a los 27 géneros de mayor contribución seleccionados (Tabla 4.11). La CP1 presentó *loadings* positivos (>0,45) para *Curvibacter*, *Duganella*, *Erythrobacter*, *Flavilitoribacter*, *Longimicrobium*, *Massilia*, *Novosphingobium*, *Parviterribacter* y *Phenylobacterium*, así como *loadings* negativos (<-0,45) para *Brevifollis*, *Chitinispirillum*, *Lacunisphaera* y *Nocardioides*. La CP2 mostró *loadings* positivos para *Abditibacterium*, *Massilia* y *Sediminibacterium* y *loadings* negativos para *Azoarcus*, *Gp17*, *Litorilinea*, *Parviterribacter* y *Thermanaerothrix*. La CP3 tuvo *loadings* positivos para *Geminisphaera*, *Gemmata* y *Methylobacterium* y *loadings* negativos para *Stella*. Los autovectores de la CP4 incluyeron *loadings* positivos para *Azoarcus* y *loadings* negativos para *Brevifollis*. La CP5 mostró *loadings* positivos para *Longimicrobium* y *loadings* negativos para *Kineosporia* y *Thermanaerothrix*. El autovector de la CP6 incluyó *loading* positivo para *Brevundimonas*. Mientras, que la CP7 no presentó ningún género con *loadings* >|0,45|.

Tabla 4.11. Análisis de componentes principales usando la transformación de los datos *centered log ratio (clr)*, con autovalor y proporción acumulada de la variabilidad del conjunto de datos explicada por las siete componentes principales (CP) (autovalor >1). Los autovectores con *loadings* >|0,45| están en negrita. En la parte de abajo de la tabla se detallan los valores de probabilidad (*P*-valor) y los grados de libertad (*gl*) del análisis de la varianza (ANOVA) para los tratamientos. Valores de *P*<0,05 que indican significancia estadística se muestran en negrita.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	
Autovalor	5,93	3,70	2,57	2,10	1,73	1,56	1,47	
Proporción	0,22	0,14	0,10	0,08	0,06	0,06	0,05	
Proporción acumulada	0,22	0,36	0,45	0,53	0,59	0,65	0,71	
Correlación con las variables originales								
<i>Abditibacterium</i>	-0,07	0,68	0,19	0,30	-0,05	-0,22	-0,24	
<i>Azoarcus</i>	0,30	-0,46	0,24	0,51	-0,22	-0,24	0,29	
<i>Brevifollis</i>	-0,58	0,12	0,18	-0,52	0,19	-0,20	0,02	
<i>Brevundimonas</i>	0,44	0,13	0,06	0,03	0,21	0,46	-0,30	
<i>Chitinispirillum</i>	-0,53	-0,13	-0,27	-0,15	0,25	0,21	0,28	
<i>Curvibacter</i>	0,65	0,40	0,05	-0,09	0,24	0,27	-0,17	
<i>Duganella</i>	0,70	0,35	-0,18	-0,06	-0,02	-0,17	0,27	
<i>Erythrobacter</i>	0,70	-0,35	-0,12	-0,19	0,06	-0,39	0,19	
<i>Flaviaesturariibacter</i>	0,05	0,39	-0,44	0,36	0,17	-0,11	-0,36	
<i>Flavilitoribacter</i>	0,61	0,07	-0,01	-0,39	-0,35	0,05	-0,11	
<i>Geminisphaera</i>	-0,14	-0,18	0,63	-0,17	0,29	-0,36	-0,11	
<i>Gemmata</i>	0,43	-0,16	0,47	0,38	0,15	0,07	-0,14	
<i>Gp17</i>	0,05	-0,69	-0,26	-0,29	0,00	0,13	-0,44	
<i>Kineosporia</i>	0,30	0,11	0,27	-0,35	-0,59	0,17	0,11	
<i>Lacunisphaera</i>	-0,49	0,22	-0,25	0,13	0,19	0,34	0,35	
<i>Litorilinea</i>	-0,34	-0,60	0,28	0,26	0,19	0,24	-0,04	
<i>Longimicrobium</i>	0,49	-0,24	-0,18	-0,32	0,54	-0,15	0,11	
<i>Marmoricola</i>	0,08	0,21	-0,17	-0,39	-0,04	0,34	0,36	
<i>Massilia</i>	0,77	0,53	-0,05	0,10	0,13	0,11	-0,02	
<i>Methylobacterium</i>	0,01	0,37	0,67	0,17	0,07	0,19	0,37	
<i>Nocardioides</i>	-0,57	0,22	-0,44	0,30	-0,05	0,13	0,16	
<i>Novosphingobium</i>	0,78	0,15	-0,05	-0,14	0,05	0,05	0,04	
<i>Parviterribacter</i>	0,48	-0,58	0,21	0,13	-0,13	0,26	0,28	
<i>Phenylobacterium</i>	0,53	-0,14	-0,07	0,37	-0,08	0,23	-0,06	
<i>Sediminibacterium</i>	-0,40	0,54	0,18	-0,08	-0,45	-0,17	-0,05	
<i>Stella</i>	0,39	-0,07	-0,58	0,31	-0,03	-0,39	0,27	
<i>Thermanaerothrix</i>	-0,13	-0,46	-0,33	0,03	-0,50	0,12	-0,21	
	<i>gl</i>				<i>P</i> -valor			
Método de finalización	2	0,027	0,679	0,019	0,332	0,123	0,240	0,243

Tabla 4.12. Resultados del procedimiento de separación de medias para las componentes principales (CPs) que mostraron una respuesta estadísticamente significativa del método de finalización (CP1 y CP3). Métodos de finalización: desecación química (DQ), rolado (R) y sin supresión (SS).

	CP1	CP3
Método de finalización		
DQ	-0,68 B	-0,53 B
R	-0,70 B	0,69 A
SS	0,90 A	-0,11 B

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$).

Las siete CPs fueron utilizadas como variables independientes en los análisis de la varianza (ANOVA) posteriores para evaluar el efecto del método de finalización sobre las comunidades bacterianas de la rizosfera de avena. En la parte inferior de la Tabla 4.11 se informan los valores de probabilidad y grados de libertad asociados con estos análisis para cada CP. Los resultados mostraron un efecto estadísticamente significativo del método de finalización sólo para las CPs 1 y 3 ($P < 0,05$; Tabla 4.11). En la Figura 4.7A se muestran las medias de la CP1 para cada método de finalización con sus respectivos errores estándar y los resultados de separación de medias (Tabla 4.12). La contribución de cada género a estos resultados se indica en la Figura 4.7B. El grupo de bacterias con *loading* positivo disminuyó significativamente cuando se finalizó la avena con DQ y R, mientras que el comportamiento opuesto fue observado para los géneros bacterianos con *loading* negativo, con respecto a SS (Figura 4.3B). En la Figura 4.8A se muestran las medias de la CP3 para cada método de finalización con sus respectivos errores estándar y los resultados de separación de medias (Tabla 4.12). La contribución de cada género a estos resultados se indica en la Figura 4.8B. El grupo de bacterias con *loading* positivo disminuyó significativamente en la rizosfera de avena finalizada por DQ, mientras que lo opuesto ocurrió para los géneros con *loading* negativo, con respecto a R (Figura 4.8A). No se observaron diferencias significativas entre DQ y SS, pero sí con respecto a R.

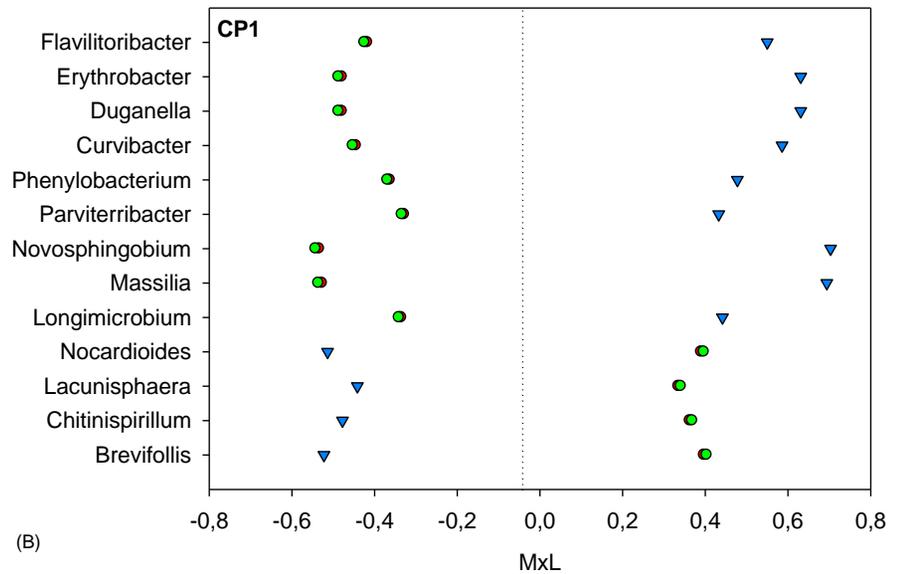
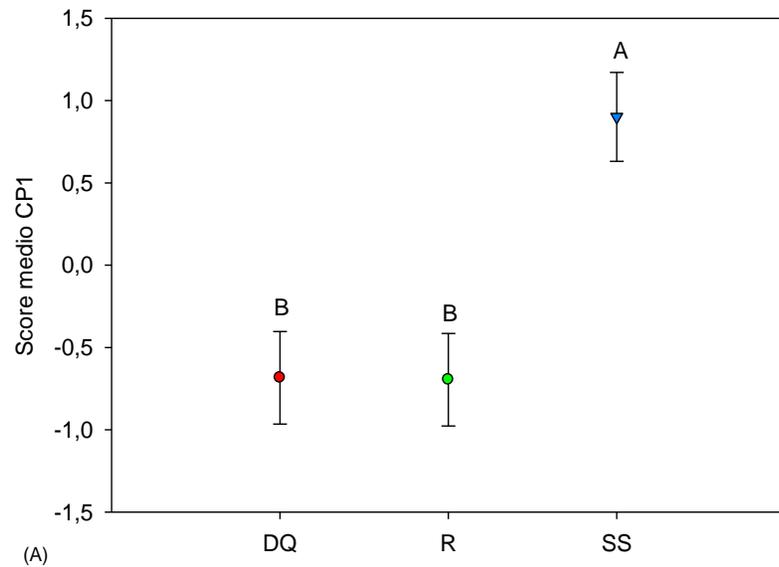


Figura 4.7. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución ($loadings > |0,45|$) según la Tabla 4.11 para la CP1. A) Valores medios de los scores de la CP1 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP1 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; R: rolado y SS: sin supresión).

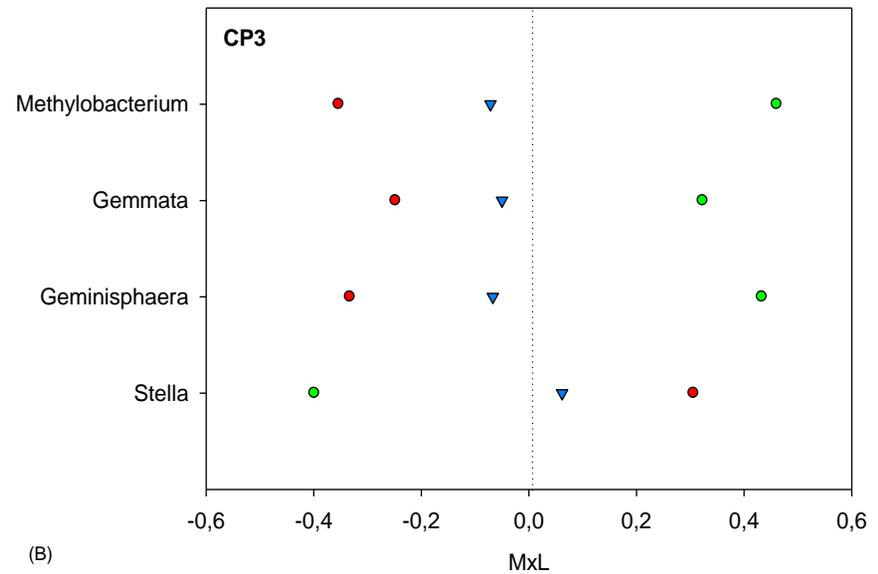
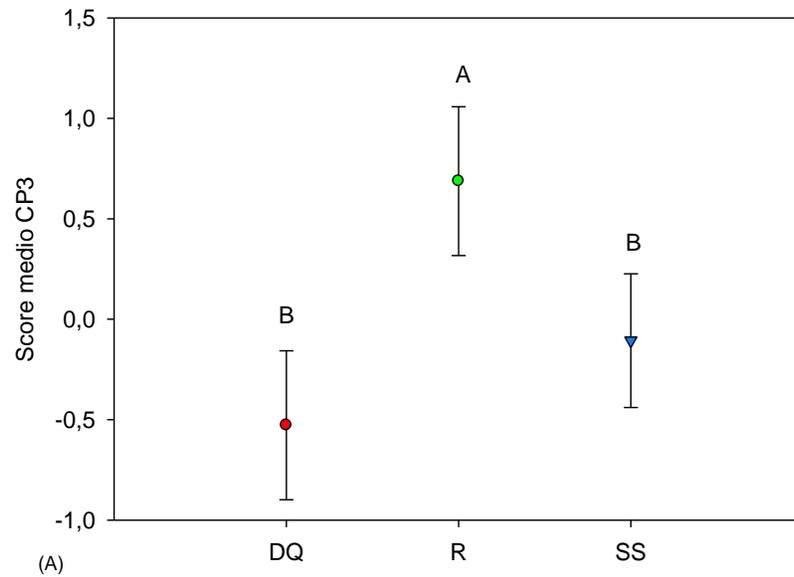


Figura 4.8. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución (*loadings* >|0,45|) según la Tabla 4.11 para la CP3. A) Valores medios de los scores de la CP3 para cada método de finalización con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de finalización ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP3 (MxL) para cada método de finalización (DQ: desecación química; R: rolado y SS: sin supresión).

4. Discusión

4.1. Cuantificación de bacterias heterótrofas aerobias y abundancia de grupos microbianos mediante qPCR

La falta de diferencias significativas entre los métodos de finalización podría deberse a que en condiciones de campo resulta más difícil detectar diferencias debido a la variabilidad climática, y a la heterogeneidad espacial en la disponibilidad de nutrientes, humedad del suelo y comunidad microbiana (Sheng *et al.*, 2012; Zabaloy *et al.*, 2015; Schlatter *et al.*, 2017). En este estudio de corto plazo (2 años de duración), la DQ del CCI con glifosato se realizó con la dosis recomendada de uso para este fin. Ratcliff *et al.*, (2006) encontraron que el glifosato aplicado a dosis recomendadas a campo no produjo efectos sobre el número de bacterias cultivables respecto del suelo control sin herbicida, aunque una dosis 100 veces mayor provocó un incremento en el recuento de BHA del 25%. Zabaloy *et al.*, (2008) también observaron un aumento en los recuentos de BHA en diferentes suelos tratados con glifosato cuando aplicaron una dosis 10 veces mayor a la dosis de uso recomendada.

Las bacterias cultivables representan una fracción ecológicamente importante de la comunidad bacteriana del suelo. Aunque menos del 1% de los microorganismos del suelo pueden ser cultivados usando técnicas estándar de laboratorio, ellos constituyen una gran proporción de la biomasa bacteriana total y cumplen un papel importante en los ciclos de nutrientes (Ellis *et al.*, 2003). Para la caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana cultivable en la rizosfera se utilizó el método desarrollado por De Leij *et al.*, (1993), quienes utilizan el concepto de estrategias r/K . Los estrategias K y r y los índices de biodiversidad (EP y CD) no se vieron afectados por los métodos de finalización en la rizosfera de avena (Tabla 4.1). Por el contrario, Imparato *et al.*, (2016) reportaron que la aplicación de glifosato en cebada aumentó la proporción de estrategias r en el suelo rizosférico respecto del tratamiento de corte o control (sin tratar), donde dominaron los estrategias K . Sin embargo, este experimento fue realizado bajo condiciones ambientales controladas en invernáculo, en plantas de otra especie de gramínea y de 25 días de crecimiento, por lo que sus resultados no son estrictamente comparables con los obtenidos en este estudio. Además, se ha establecido que la especie de planta, cultivar, edad y morfología radical, son determinantes en definir la diversidad bacteriana predominante en la rizosfera debido al papel significativo de los exudados radicales (Rascovan *et al.*, 2016; Saleem *et al.*, 2018). Varios estudios indican que las comunidades microbianas en la rizosfera cambian a medida que una planta crece, florece y muere, lo que implica que la relación entre el microbioma radical y su planta huésped no es estática, sino que cambia con el tiempo (Chaparro *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019). Por ejemplo, la rizosfera de una planta joven está habitada principalmente por organismos de estrategia r , es decir, especies bacterianas que tienen tasas de crecimiento rápidas y

utilizan sustratos simples, mientras que el grupo presente en plantas maduras prefiere sustratos más complejos (estrategas K) (de Araujo *et al.*, 2019).

Los métodos de finalización no afectaron la abundancia del gen ARNr 16S de *Bacteria* y *Archaea* en la rizosfera de avena (Tabla 4.6). En un ensayo a campo, Romdhane *et al.*, (2019) reportaron que no hubo modificaciones en la abundancia de *Bacteria* y *Archaea* en suelo no rizosférico luego de la supresión del CC por distintos métodos, ya sea químico (glifosato + 2,4-D), mecánico (rolado) o por condiciones climáticas desfavorables (heladas invernales).

Las abundancias de los genes de microorganismos implicados en el ciclo del N (*amoA* de AOA, BOA, *nirS*, *nirK*) en la rizosfera de avena no se vieron afectadas por los métodos de finalización (Tabla 4.6). En un ensayo de un año de duración, Romdhane *et al.*, (2019) reportaron que los métodos de supresión de los CC no afectaron la abundancia de AOA y BOA, mientras el número de copias de los genes de reductasas de nitritos (*nirK* y *nirS*) fue menor en CC finalizados químicamente (glifosato + 2,4-D, 3 días postsupresión) que en los tratamientos de rolado y de secado natural por heladas. Jenkins *et al.*, (2017) tampoco observaron respuesta de la abundancia relativa del gen *amoA* de BOA y AOA al tratamiento con glifosato en cultivares híbridos de maíz susceptible (DeKalb DKC65-18) y resistente (DeKalb DKC65-17) al herbicida en un sistema de labranza mínima. En tanto, el corte de una pastura de gramíneas (*Stipa krylovii*, *Agropyron cristatum* y *Cleistogenes squarrosa*) no tuvo efectos observables sobre las abundancias del gen *amoA* de AOA y BOA y los genes de reductasas de nitritos en suelo con respecto al control sin corte (Zhang *et al.*, 2018). Por el contrario, en un ensayo en invernáculo, Allegrini *et al.*, (2019) observaron que la abundancia del gen *amoA*_{BOA} en la rizosfera de plantas de avena cortadas fue más del doble que en plantas tratadas con glifosato, mientras que las AOA disminuyeron en la rizosfera de plantas suprimidas con glifosato recién a los 26 días postsupresión. Las diferencias observadas en los resultados obtenidos en estudios previos y los presentados en este capítulo podrían atribuirse a múltiples factores, como la duración y las condiciones de los ensayos, tipo de suelo, momento de muestreo en los cuales se evaluaron los genes indicadores, entre otros. Por ejemplo, los análisis de los datos del primer año de este ensayo mostraron que en la rizosfera de plantas desecadas con glifosato tienen lugar cambios en las comunidades microbianas como lo indicó la mayor abundancia del gen *nirK* y la mayor relación BOA/ bacterias totales y menor relación AOA/ BOA en relación con los tratamientos de R y SS, posiblemente mediados por metabolitos y/o detritos celulares de la planta senescente, que resultan en una estimulación de la nitrificación autotrófica (APN) (Morales *et al.*, 2020b). Por lo tanto, es necesario contar con estudios a campo de larga duración para evaluar la resistencia y la resiliencia de las comunidades microbianas y el impacto en la sustentabilidad del agroecosistema.

En este estudio se observó una correlación significativa y positiva entre la APN y la abundancia de *amoA*_{BOA}, en coincidencia con lo reportado por otros autores que muestran que las BOA, pero no las AOA, correlacionan positivamente con la APN (Carey *et al.*, 2016, Zabaloy *et al.*, 2017).

La PCR cuantitativa mostró similar abundancia del gen *phnJ* entre los métodos de finalización (Tabla 4.6). Estos resultados coinciden con los resultados presentados en el capítulo 2. El hecho de no encontrar diferencias con este gen sugiere la participación de otra vía metabólica de degradación del glifosato, lo que implicaría cuantificar, por ejemplo, otros genes de la vía del AMPA (*gox*, *thiO*). En un trabajo reciente, Hernández Guijarro *et al.*, (2021) cuantificaron el gen de la glicina oxidasa (*thiO*) de *Bradyrhizobium* a partir de suelos tratados con glifosato en condiciones de campo. En el suelo sin exposición previa al herbicida, encontraron que la abundancia del gen *thiO* aumentó con el tiempo después de la aplicación de glifosato, lo que relacionaron con la presencia de cepas de *Bradyrhizobium* con potencialidades para degradarlo. Por el contrario, en un suelo agrícola con más de 10 años de aplicación continua de glifosato, reportaron que la abundancia de este gen disminuyó, posiblemente como resultado de la susceptibilidad al glifosato de las especies presentes en ese suelo.

4.2. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana

No se observaron diferencias significativas entre métodos de finalización para las métricas de diversidad α y β (distancia UniFrac generalizada) (Tabla 4.9 y 4.10). Estos resultados son consistentes con los reportados en el capítulo 3. En tanto, mediante el análisis de composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de avena sí se detectaron diferencias significativas entre métodos de finalización (Tabla 4.11).

Para la CP1, la respuesta de las bacterias al método de finalización fue significativa ($P < 0,05$; Tabla 4.11). Se generaron dos grupos, cada uno compuesto por 9 y 4 géneros, que respondieron de manera opuesta a los métodos de finalización (Figura 4.3B).

El grupo de 9 géneros indicadores desfavorecidos por los métodos DQ y R fueron: *Duganella*, *Massilia*, *Erythrobacter*, *Novosphingobium*, *Curvibacter* y *Phenylobacterium* (Proteobacteria), *Flavillatoribacter* (Bacteroidetes), *Longimicrobium* (Gemmatimonadetes) y *Parviterribacter* (Actinobacteria). Los géneros *Duganella* y *Massilia* pertenecen a la familia Oxalobacteraceae. Los miembros de esta familia son bacterias Gram-negativas, heterótrofas y no forman esporas, se encuentran en diversos hábitats como agua, suelo y asociados a plantas, a su vez tienen un amplio rango de propiedades fenotípicas y ecológicas (Baldani *et al.*, 2014). *Duganella* ha sido aislada de la rizosfera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), tiene la capacidad de producir polisacáridos extracelulares y el potencial de actuar como PGPR (Anderson y Habiger, 2012; Madhaiyan *et al.*, 2013). Además, esta bacteria es productora del antibiótico violaceína, un conocido inhibidor de virus, hongos y nanoflagelados (Jiang *et al.*, 2010). Yin *et al.*, (2013) identificaron a *Duganella* en la rizosfera de trigo

infestada con *Rhizoctonia solani* AG-8, donde podría actuar como un agente de biocontrol. *Massilia* ha sido identificada en la rizosfera de muchas especies de plantas como caña de azúcar (Pisa *et al.*, 2011), trigo (Yin *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2019; Schlatter *et al.*, 2020), maíz (Li *et al.*, 2014), *Alyssum murale* L. (Abou-Shanab *et al.*, 2010), *Sonchus asper* L. (Dohrmann y Tebbe, 2005), *Salix viminalis* L. (Hrynkiewicz *et al.*, 2010), *Ipomoea batatas* L. (Weinert *et al.*, 2010) y girasol (Oberholster *et al.*, 2018). Ofek *et al.*, (2012) reportaron que la abundancia de *Massilia* se vio afectada por el estado de desarrollo de pepino (*Cucumis sativus* L.) y el medio de crecimiento de la planta (residuos de *Diplotaxis tenuifolia* L. y enmiendas de compost + perlita).

Los géneros *Erythrobacter* y *Novosphingobium* pertenecen a la familia Erythrobacteraceae, cuyos miembros son Gram-negativos, aerobios, quimiorganoheterótrofos, producen pigmentos y no forman esporas. Se conocen distintas propiedades de estas bacterias, como su uso en biorremediación, producción de carotenoides, compuestos citotóxicos, entre otras (Tonon *et al.*, 2014). *Erythrobacter* ha sido aislada de la rizosfera de *Suaeda japonica* (Lee Soon Dong *et al.*, 2019) y *Kandelia candel* (Ye *et al.*, 2020). Tang *et al.*, (2019) reportaron que la cepa YH-07^T, una nueva especie del género *Erythrobacter*, redujo la incidencia de la enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate y promovió el crecimiento de las plantas. A su vez, los autores expusieron que esta bacteria presentó genes con rasgos de PGP (biosíntesis de antibióticos, producción de sideróforos, colonización radical y tolerancia a ambientes hostiles) (Tang *et al.*, 2019). *Novosphingobium* fue aislada del suelo rizosférico de plantas como *Arabidopsis thaliana* L. (Lin *et al.*, 2014b), algodón (Kämpfer *et al.*, 2015a), maíz (Kämpfer *et al.*, 2015b), *Glycyrrhiza uralensis* (Li Yan-Qiong *et al.*, 2015) y arroz (Zhang *et al.*, 2016). Esta bacteria también fue aislada de una variedad de arroz tolerante a la salinidad, mostrando funciones PGPR (como producción de AIA, acetoína y sideróforos) y formación de biofilm (Krishnan *et al.*, 2017).

El género *Curvibacter* pertenece a la familia Comamonadaceae, es aerobio y quimiorganótrofo (Willems, 2014). En la sección 4.2 del capítulo 3 de esta tesis se identificó a esta bacteria en la rizosfera de avena, donde su abundancia se vio afectada negativamente por la finalización química (DQ) del CCI. *Phenylobacterium* (Alfaproteobacteria) es una bacteria Gram-negativa, aerobia o anaerobia facultativa y fue aislada de la rizosfera de ginseng (Farh *et al.*, 2016). Este género también fue identificado en la rizosfera de maíz como PGPR, con la función de fijar N (Yang Yi *et al.*, 2017). *Flavilitoribacter* pertenece al orden Saprospirales, el cual ha sido identificado en la rizosfera de maíz y pasto varilla (*Panicum virgatum* L.) (Hargreaves *et al.*, 2015).

Los miembros del filo Gemmatimonadetes tienen una distribución cosmopolita en los sistemas terrestres, aunque se encuentran generalmente con baja frecuencia en las comunidades microbianas del suelo, con abundancias relativas que oscilan entre el 0,2 y 6,5% (DeBruyn *et al.*, 2011). *Longimicrobium* es el único género de la familia Longimicrobiaceae, es aerobio

quimioorganoheterótrofo, Gram-negativo y no forma esporas. Esta bacteria ha sido clasificada como oligotrófica porque es capaz de crecer a bajas concentraciones de nutrientes (Pascual *et al.*, 2016). *Parviterribacter* es una bacteria aerobia estricta quimioorganoheterótrofa, Gram-positiva, no forma esporas y fue aislada del suelo (Foesel *et al.*, 2016). Liu *et al.*, (2020) reportaron que la abundancia relativa de *Parviterribacter* aumentó con los años de aplicación de atrazina en el cultivo de maíz.

El grupo de 4 géneros indicadores favorecidos por los métodos DQ y R fueron: *Brevifollis* y *Lacunisphaera* (Verrucomicrobia), *Chitinispirillum* (Fibrobacteres) y *Nocardioides* (Actinobacteria). Los miembros del filo Verrucomicrobia son ubicuos en el suelo, representan el 1 al 10% del ARNr 16S bacteriano total en los suelos (Buckley y Schmidt, 2001; Bergmann *et al.*, 2011). La abundancia y estructura de Verrucomicrobia es variable en el suelo y puede ser afectada por su contenido de humedad y fertilidad (Buckley y Schmidt, 2001; Navarrete *et al.*, 2015). *Brevifollis* es una bacteria Gram-negativa, aerobia, quimioorganoheterótrofa y ha sido aislada de un consorcio artificial de alga verde (*Chlorella vulgaris*) y bacterias originarias del suelo (Otsuka *et al.*, 2013). La familia Opiritaceae, a la cual pertenece *Lacunisphaera*, fue identificada en la rizosfera de algodón con acción antagonista frente a patógenos del suelo (Li *et al.*, 2015). *Chitinispirillum* es una bacteria Gram-negativa y utiliza quitina como fuente de C (Sorokin *et al.*, 2016). Esta bacteria pertenece al filo Fibrobacteres, el cual ha sido identificado en la rizosfera de trigo (Kavamura *et al.*, 2019; Dal Cortivo *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020) y se correlacionó positivamente con el contenido de NO_3^- del suelo y el rendimiento de trigo (Ren *et al.*, 2020). *Nocardioides* ha sido aislada de la rizosfera de especies como *Peucedanum japonicum* Thunb. (Lee *et al.*, 2011), *Papaver sp.* (Singh y Yin, 2016), *Tagetes patula* L. (Chhetri *et al.*, 2021) y *Cynanchum wilfordii* L. (Suh *et al.*, 2021). Piutti *et al.*, (2003) reportaron que una cepa del género *Nocardioides* tiene la capacidad de degradar el herbicida atrazina. A su vez, Hou *et al.*, (2015) indicaron que *Nocardioides* puede ser un potencial degradador de hidrocarburos del petróleo.

Para la CP3, la respuesta de las bacterias al método de finalización fue significativa ($P < 0,05$; Tabla 11). Los géneros que fueron favorecidos en la rizosfera de avena finalizada por R en comparación con DQ y SS fueron *Gemmata*, *Geminisphaera* y *Methylobacterium*, mientras que el género que disminuyó en abundancia fue *Stella*.

El filo Planctomycetes se distribuye ubicuamente en el suelo (Ward *et al.*, 2006) y su abundancia y diversidad es sensible a la historia de uso del suelo (Buckley *et al.*, 2006). El único representante de este filo que resultó afectado por los tratamientos fue *Gemmata*, un género aislado previamente del suelo (Wang *et al.*, 2002). Esta bacteria también fue identificada en la rizosfera de maíz (Hünninghaus *et al.*, 2019; Akinola *et al.*, 2021) y tomate (Shang y Yi, 2015). Shang y Yi (2015) reportaron que *Gemmata* es sensible a la fertilización nitrogenada. *Methylobacterium* es una bacteria Gram-negativa, aerobia estricta perteneciente al filo Proteobacteria, familia Methylobacteriaceae que crece en presencia de compuestos de un solo C tales como metanol y metilamina (Dourado *et al.*, 2015). Los

miembros de este género han sido encontrados en una variedad de hábitats como suelo, rizosfera, agua, granos, hojas, nódulos y aire (Green, 2015). *Methylobacterium* fue reportada como endófito en diferentes plantas hospedantes como algodón, maní, cítricos, pino, eucalipto, tabaco, entre otras (Dourado *et al.*, 2015). Las especies de *Methylobacterium* están incluidas en el grupo de PGPR, por su producción de fitohormonas y su capacidad de solubilizar fosfato y producir sideróforos (Jinal *et al.*, 2020).

Stella es un representante del filo Proteobacteria (Alfaproteobacteria) identificada como un indicador en el grupo que responde positivamente a los métodos DQ y SS. Es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia Stellacea, propuesta recientemente por Hördt *et al.*, (2020). *Stella* fue aislada del suelo y asociada con procesos de descomposición de la MO, lo que mejora la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos (Vasilyeva, 1985).

5. Conclusiones

Los resultados de este capítulo muestran que entre los indicadores evaluados solo los análisis de la composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera resultaron sensibles a los métodos de finalización de la avena. La mayoría de los géneros de bacterias que disminuyeron en abundancia en la rizosfera como resultado de la DQ y el R, han sido identificadas como PGPR, mientras que entre las que se vieron favorecidas se encuentran géneros antagonistas de patógenos de planta, degradadores de quitina, herbicidas e hidrocarburos derivados del petróleo. A su vez, el R favoreció a bacterias consideradas PGPR y disminuyó un género asociado con la degradación de la MO. Por lo tanto, es esencial una comprensión más completa de las interacciones a largo plazo entre las prácticas de manejo de los CCI, las propiedades del suelo y la diversidad de las comunidades microbianas rizosféricas para llevar a cabo prácticas agronómicas que permitan mantener la salud de suelo y promover la sustentabilidad ambiental.

CAPÍTULO 5

ANÁLISIS DEL MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE *Helianthus annuus* L. Y LA PERFORMANCE DEL CULTIVO EN RELACIÓN AL MANEJO DEL CCI ANTECESOR

1. Introducción

A nivel mundial, el girasol (*Helianthus annuus* L.) constituye una de las cuatro especies cultivadas más importantes para la obtención de aceite vegetal, después de la soja, la colza y la palma. Argentina es uno de los cuatro principales países productores y exportadores de aceite de girasol del mundo (USDA, 2020). En Argentina, el área potencialmente cultivable con girasol se extiende desde Chaco en el norte, hasta el sur de la región pampeana. Su alto grado de plasticidad, tanto en aspectos vegetativos (tamaño de hojas) como reproductivos (número de flores) hace que pueda adaptarse a este amplio rango de ambientes (Díaz-Zorita *et al.*, 2003). La superficie sembrada en Argentina con girasol durante la campaña 2021/22 fue de 1,65 millones de hectáreas, con una producción anual de tres millones de toneladas (Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 2022).

La producción de girasol en SD se ha expandido en Argentina. Estos sistemas generan un aumento en la utilización de herbicidas para combatir las malezas y, a su vez, la aparición de malezas resistentes (Castaño, 2018). En ese contexto, los CCI se consideran como una alternativa para mejorar estos problemas. Baigorria *et al.*, (2019) reportaron que la inclusión de CCI y el secado mediante el rolado redujo el valor de coeficiente de impacto ambiental más de un 70% respecto del barbecho, sin afectar el rendimiento de soja. Varios estudios han investigado el efecto de los CCI sobre el rendimiento del cultivo sucesor, pero no hay un consenso en los resultados. Por un lado, en un metaanálisis realizado por Miguez y Bollero (2005) con datos mundiales se reportó que los CCI de gramíneas no aumentaron ni disminuyeron el rendimiento de maíz en relación con el barbecho. Sin embargo, un metaanálisis publicado por Alvarez *et al.*, (2017) encontró que el rendimiento de maíz disminuyó con el uso de CCI de gramíneas en la región pampeana. Sá Pereira *et al.*, (2020), empleando avena como antecesor de girasol en el SOB, también reportó que el CCI disminuyó el rendimiento del cultivo sucesor respecto del barbecho.

Por otra parte, se desconoce cómo el manejo del CCI antecesor puede afectar el desarrollo del girasol y su microbioma asociado. En relación a ello, los métodos de finalización empleados sobre el CCI pueden resultar en cambios significativos sobre la composición bacteriana rizosférica del CCI como se demostró en el capítulo anterior.

La información disponible respecto a los efectos de la supresión mecánica de CCI sobre cultivos estivales es escasa (Dorn *et al.*, 2013; Wortman *et al.*, 2013). Wortman *et al.*, (2013) en un ensayo a campo de 2 años de duración, reportaron que el corte de una mezcla de CCI aumentó 16,6 y 22,7% el rendimiento de maíz y soja, respectivamente en relación al control sin CCI. Por el contrario, Dorn *et al.*,

(2013) encontraron que la supresión mecánica (rolado) de distintas especies de CC disminuyó aproximadamente un 23,4% el rendimiento del cultivo sucesor (trigo) en relación con el tratamiento glifosato.

Por otra parte, la supresión química puede generar exudación del glifosato y/o AMPA a través de las raíces hacia el suelo (Duke *et al.*, 2012; Kremer *et al.*, 2015) y residuos remanentes en la biomasa vegetal muerta, que pueden afectar al cultivo sucesor. El glifosato libre en la rizosfera y suelo circundante puede causar efectos tóxicos en cultivos y reducción del crecimiento (Rodrigues *et al.*, 1982; Neumann *et al.*, 2006; Ronco *et al.*, 2008; Clua *et al.*, 2012). En un estudio realizado en invernáculo, se comprobó que los tejidos radiculares de raigrás tratado con glifosato constituyen un reservorio de herbicida biodisponible en el suelo, provocando efectos tóxicos sobre el cultivo sucesor (girasol) (Teschfariam *et al.*, 2009). Asimismo, Jang *et al.*, (2020) reportaron que el daño a los cultivos causado por los residuos de glifosato en malezas blanco estuvo influenciado por el tipo de suelo, el agua disponible, la especie y la densidad de malezas. A su vez, se ha informado que el tiempo transcurrido entre la desecación con glifosato del CCI (*Brachiaria ruziziensis*) y la siembra directa de girasol en un suelo oxisol no debería ser inferior a 7 días, ya que a tiempos menores se observa reducción de los parámetros de desarrollo y productividad evaluados (altura de planta, número de hojas, materia seca de tallos y hojas, diámetro de tallo y producción de aquenios) (Giancotti *et al.*, 2014).

La capacidad del suelo de adsorber el glifosato ha sido ampliamente revisada (Borggaard y Gimsing, 2008; Duke *et al.*, 2012). El glifosato se adsorbe principalmente en superficies de carga variable como óxidos de Fe y Al, silicatos de Al (imogolita) y goetita (oxihidróxido de hierro III) y, en menor medida, en los recubrimientos de óxido de Fe de minerales de carga permanente (illita, esmaltita y vermiculita) y en la MO. La magnitud de la adsorción aumenta con el aumento de la superficie de los minerales y la disminución del pH. Una vez adsorbido, el glifosato no se libera fácilmente. Esto se debe a los altos valores de las constantes de adsorción (K_a) para este herbicida comparado con otros como el 2,4-D (hasta 100 veces mayores) (Farenhorst *et al.*, 2008). Los suelos que contienen mayores cantidades de MO, arcilla y óxidos de Fe y Al pueden adsorber más glifosato y por lo tanto podrían limitar la interacción con las raíces (Gimsing y Borggaard, 2002a; Gimsing y Borggaard, 2002b). Se estima que entre un 5-24% del glifosato inicialmente adsorbido es liberado, dependiendo del tipo de suelo (Al-Rajab *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos estudios demuestran que el glifosato inmovilizado puede desorberse, en particular en suelos agrícolas donde la utilización de fertilizantes fosfatados desplaza al herbicida de los sitios de adsorción de la matriz del suelo (Bott *et al.*, 2011). Como el fosfato y el grupo metilfosfónico del glifosato compiten por los mismos sitios de adsorción (Bott *et al.*, 2011; Clua *et al.*, 2012), la capacidad de los suelos para adsorber fosfato determina la disponibilidad de glifosato en la solución del suelo y un aumento en las concentraciones de fosfato puede resultar en una

mayor disponibilidad de glifosato (Bott *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2015). En suelos de baja capacidad adsorptiva y pH neutro a alcalino, la adición de fosfato puede desorber aún más glifosato resultando en problemas de fitotoxicidad (Hiera Da Cruz *et al.*, 2007). Por lo tanto, la biodisponibilidad del glifosato para las plantas puede verse potencialmente alterada por la aplicación de fertilizantes que conducen a una removilización del glifosato previamente adsorbido a la matriz del suelo.

No obstante, la información referente a los efectos que estos manejos aplicados en el CCI antecesor pueden ocasionar sobre el microbioma rizosférico del cultivo sucesor son aún más escasos. Se conoce que los CCI pueden compartir hongos patógenos con el cultivo principal ya sea como “puentes verdes” o “puentes marrones” (Erreguerena *et al.*, 2020) actuando como hospedadores aún sin desarrollar síntomas visibles. Los CCI pueden promover la supresión de enfermedades favoreciendo grupos microbianos en la rizosfera, entre ellos, bacterias del género *Pseudomonas* spp. (Panth *et al.*, 2020) con notorias capacidades de promoción del crecimiento vegetal y antagonistas de hongos patógenos (Agaras *et al.*, 2015). Sin embargo, la información disponible en la literatura es contradictoria, ya que si bien algunos estudios reportan un efecto controlador de los CCI sobre hongos patógenos del suelo, como es el caso de centeno que reduce la severidad de ataques en el cultivo de soja (Wen *et al.*, 2017), otros estudios mencionan que, en ciertas circunstancias, los CCI incrementan la incidencia de enfermedades, al afectar negativamente a las comunidades microbianas del suelo con actividad inhibitoria de *Rhizoctonia solani* (Sharma-Poudyal *et al.*, 2016).

Por lo tanto, en base a los antecedentes presentados, se hipotetiza que los métodos de finalización del CCI antecesor afectan la *performance* e inciden sobre el ensamblado de la microbiota rizosférica del cultivo de girasol, sucesor en la rotación. Además, se postula que la fertilización fosforada a la siembra del cultivo de girasol tendrá distinto impacto sobre la estructura de la microbiota rizosférica y la *performance* del cultivo de girasol, dependiendo del tratamiento de finalización empleado sobre el CCI que antecedió al girasol en la rotación. En relación a estas hipótesis se establecieron los siguientes objetivos específicos, a saber: 1) evaluar el efecto del método de finalización del CCI antecesor y la fertilización fosforada sobre los parámetros vegetativos y reproductivos del cultivo de girasol en la rotación, en un ensayo a campo en la localidad de Napostá, en el SOB; y 2) analizar la estructura de la comunidad de *Bacteria* en la rizosfera de girasol en respuesta al método de finalización del CCI antecesor y a la fertilización fosforada.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño experimental

A los 13 días posteriores a la supresión del CCI (8 de noviembre de 2018 y 2019), se realizó la siembra de girasol sobre las parcelas que recibieron los distintos manejos. Se trabajó con un híbrido de girasol [*Helianthus annuus* L. var. Macrocarpus (D.C.) (CkII)], KWSol 480 CL (KWS Argentina S.A.),

con una densidad de siembra de 68.000 plantas ha⁻¹. La siembra del cultivo se realizó en forma directa a golpe, a una distancia de 52 cm entre líneas y 45 cm entre plantas. Al momento de la siembra se aplicó 30 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico (18-46-0) en banda subsuperficial a 5 cm de la línea de siembra a las parcelas que se destinaron a barbecho y a la mitad de las parcelas roladas y desecadas químicamente (Figura 5.1 y Tabla 5.2). En estado vegetativo se fertilizaron al voleo todas las parcelas con 40 kg N ha⁻¹ (urea 46%N).

Se aplicó riego suplementario a todas las parcelas a la siembra y en estado reproductivo (R1) (Tabla 5.1).

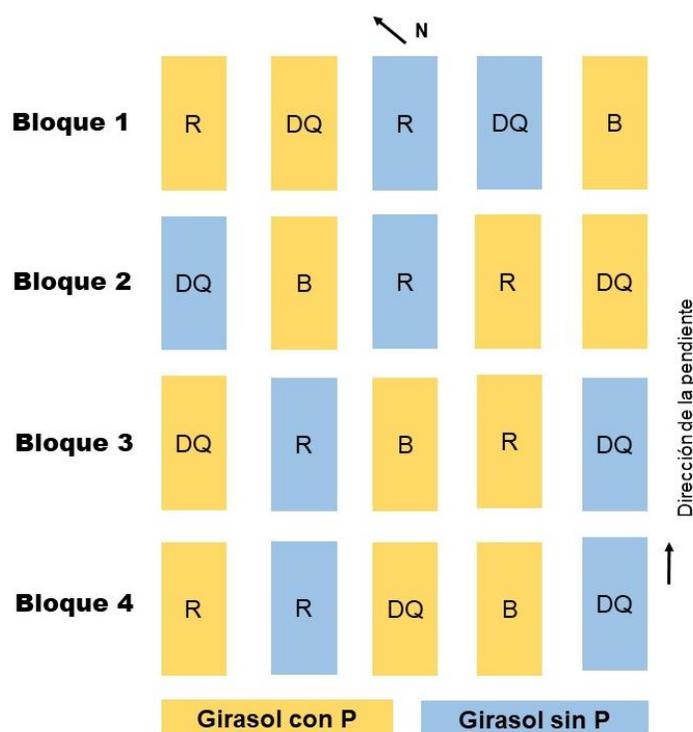


Figura 5.1. Esquema representativo del diseño en bloques. Tratamientos: rolado (R), rolado con P (RP), desecación química (DQ), desecación química con fósforo (DQP) y barbecho con fósforo (BP).

Tabla 5.1. Riego suplementario.

Año	Meses	Agua de riego (mm)
2018	Noviembre	6
2018	Diciembre	6
2019	Noviembre	12
2019	Diciembre	60

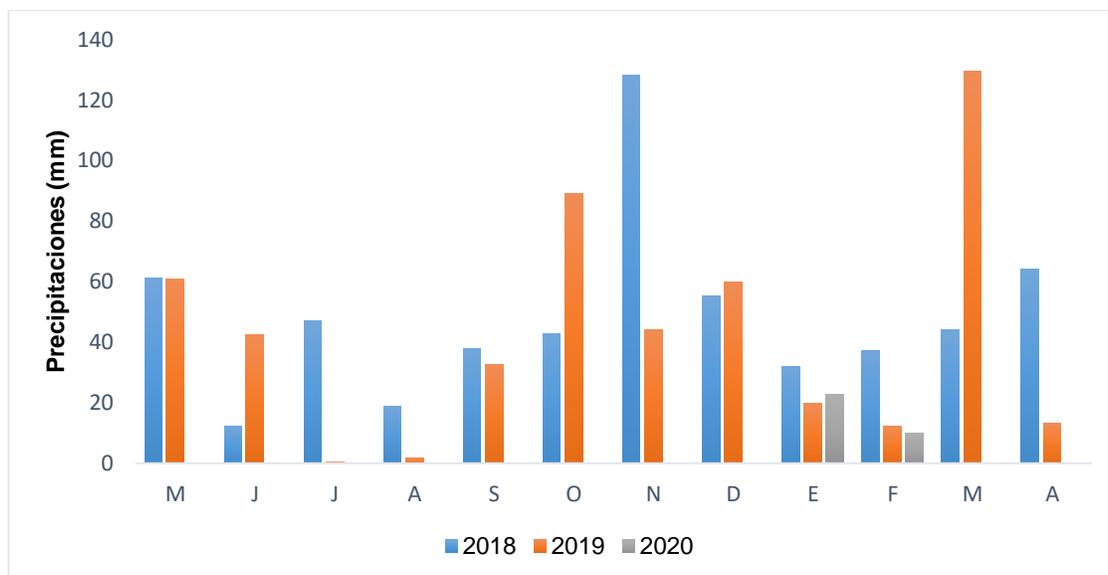


Figura 5.2. Precipitaciones (mm de agua). Datos cedidos por la Estación Meteorológica EMA NAPOSTÁ (38°25'49"S; 62°17'10.30"O).

2.2. Muestreo del suelo

Se tomaron muestras del suelo no rizosférico a los 39 días después de la siembra de girasol, en estado vegetativo (V), en la profundidad de 0-10 cm con un barreno manual (38 muestras en total de las dos campañas agrícolas). Las muestras fueron secadas al aire, tamizadas (<2 mm) y enviadas a analizar para determinar el contenido de Pe (Bray y Kurtz, 1945) al Laboratorio de Servicios Analíticos de Suelos, Plantas y Ambiente (LABSPA, CERZOS-CONICET-UNS).

El muestreo de rizosfera de girasol se realizó colectando al azar 2-3 plantas de las hileras centrales. Posteriormente se realizó la extracción de suelo rizosférico agitando moderadamente las raíces, para desprender el suelo no rizosférico (*bulk soil*) mientras que el suelo rizosférico se obtuvo removiéndolo de la raíz mediante desprendimiento manual con un pincel estéril de acuerdo con lo sugerido por Yanai *et al.*, (2003). Las muestras de suelo se preservaron a -80°C hasta la extracción de ADN y a 4°C para los análisis fisiológicos y químicos. El total de muestras del suelo rizosférico de las dos campañas agrícolas fue de 34.



Figura 5.3. A) Vista general del experimento de campo; B) Extracción de suelo rizosférico de una raíz de girasol.

Tabla 5.2. Tratamientos y designación de cada una de las muestras analizadas.

Muestras	Año	Método de finalización	Fósforo (P)	Tratamiento
IRP_1	2018	Rolado	Con P	RP
IIRP_1	2018	Rolado	Con P	RP
IIIRP_1	2018	Rolado	Con P	RP
IVRP_1	2018	Rolado	Con P	RP
IDQP_1	2018	Desección química	Con P	DQP
IIDQP_1	2018	Desección química	Con P	DQP
IIIDQP_1	2018	Desección química	Con P	DQP
IVDQP_1	2018	Desección química	Con P	DQP
IBP_1	2018	Barbecho	Con P	BP
IIBP_1	2018	Barbecho	Con P	BP
IIIBP_1	2018	Barbecho	Con P	BP
IVBP_1	2018	Barbecho	Con P	BP
IR_1	2018	Rolado	Sin P	R
IIR_1	2018	Rolado	Sin P	R
IIIR_1	2018	Rolado	Sin P	R
IDQ_1	2018	Desección química	Sin P	DQ
IIDQ_1	2018	Desección química	Sin P	DQ
IIIDQ_1	2018	Desección química	Sin P	DQ
IVDQ_1	2018	Desección química	Sin P	DQ
IIRP_2	2019	Rolado	Con P	RP
IIIRP_2	2019	Rolado	Con P	RP
IVRP_2	2019	Rolado	Con P	RP
IDQP_2	2019	Desección química	Con P	DQP
IIDQP_2	2019	Desección química	Con P	DQP
IIIDQP_2	2019	Desección química	Con P	DQP
IVDQP_2	2019	Desección química	Con P	DQP
IBP_2	2019	Barbecho	Con P	BP
IIBP_2	2019	Barbecho	Con P	BP
IIIBP_2	2019	Barbecho	Con P	BP
IVBP_2	2019	Barbecho	Con P	BP
IR_2	2019	Rolado	Sin P	R
IIR_2	2019	Rolado	Sin P	R
IIIR_2	2019	Rolado	Sin P	R
IVR_2	2019	Rolado	Sin P	R
IDQ_2	2019	Desección química	Sin P	DQ
IIDQ_2	2019	Desección química	Sin P	DQ
IIIDQ_2	2019	Desección química	Sin P	DQ
IVDQ_2	2019	Desección química	Sin P	DQ

2.3. Determinación de parámetros vegetativos y reproductivos de planta

Se evaluó la *performance* del cultivo de girasol en estado vegetativo midiendo la altura (cm), número de hojas y peso seco de tallos y hojas (g) (de 2-3 plantas de las hileras centrales). En estado reproductivo (R6, febrero 2019 y 2020) se registró la altura (cm), el número de hojas, el diámetro de la inflorescencia=capítulo (cm), el diámetro del tallo (cm) y el peso seco del capítulo con aquenios (g). Las determinaciones se realizaron de la siguiente manera: se enumeraron las hojas de más de 4 cm de largo; la altura se midió desde la base del suelo hasta la última hoja; el diámetro del tallo se midió a 2 cm del suelo y el material vegetal se secó en estufa a 40°C hasta peso constante. Para la recolección de estos datos se muestrearon todas las plantas menos las del borde.

2.4. Extracción de ADN de suelo rizosférico y cuantificación

La extracción de ADN a partir de 250 mg de suelo rizosférico se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen GmbH, Alemania); la cuantificación usando el kit QuantiFluor® ds DNA System (Promega®, Estados Unidos) en un fluorómetro Quantus (Promega®, Estados Unidos) y la calidad del ADN fue analizada en un gel de agarosa al 1% y en un espectrofotómetro de la serie DS-11 FX (DeNovix®, Estados Unidos), usando como indicador las relaciones de absorbancias (A260/A230 y A260/280A).

2.5. Análisis metagenómico y bioinformático de la comunidad microbiana

El proceso de secuenciación de amplicones del gen codificante para el ARNr 16S (“barcoded amplicon sequencing”, en inglés), se llevó a cabo con la tecnología Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) con un largo de lecturas de 2x300 pb y un mínimo de profundidad de secuenciación de 15000 *paired-end-reads* por corrida. La librería de genes fue preparada con los cebadores 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') dirigidos a la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S, usando el protocolo Fluidigm® (Anexo II). Los archivos FASTQ fueron generados y demultiplexados por el servicio de secuenciación con el Software de Conversión bcl2fastq v2.20 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos).

El archivo FASTQ fue procesado en QIIME2 2019.7 (Bolyen *et al.*, 2019) usando los *pipelines* recomendados para pares de lecturas basadas en el algoritmo *denoising dada2*. Los cebadores fueron removidos usando el argumento *p-trim-left* dentro del comando “*dada2 denoised-paired*”. El argumento de corte dentro del comando “*dada2 denoised-paired*” fue de 283 pb para las lecturas *forward* y 251 pb para las lecturas *reverse* (valores de Q media >27 informados por Interactive Quality Plot tool de QIIME2), mientras que se estableció un valor por *default* de 2 para el número esperado de errores (*E*). Después de las etapas de procesamiento, eliminación de cebadores, corte, filtrado, *denoising* y remoción de quimeras se obtuvo la tabla de ASVs. Finalmente, los ASVs fueron clasificados

taxonómicamente utilizando el clasificador RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Las secuencias fueron asignadas taxonómicamente a nivel de género, familia, orden, clase y filo.

La tabla de ASVs fue rarefaccionada (función *rarefy*) según la muestra con el menor número de secuencias (32093 secuencias) y se obtuvieron las curvas de rarefacción (función *rarecurve*). La tabla rarefaccionada fue utilizada en el paquete *vegan* v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2020) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1335) para el cálculo de las siguientes métricas de diversidad α : los índices de heterogeneidad de Shannon (H') y el recíproco del índice de Simpson ($1/\lambda$), la riqueza [número de ASVs observados (S') e índice de Chao-1] y la equitatividad de cada muestra (Anexo III).

Las secuencias fueron alineadas con el programa de múltiples alineamientos MAFFT v. 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html>) para calcular la distancia UniFrac. Con las secuencias alineadas se construyó un árbol filogenético basado en el método de Neighbor-joining usando el paquete *ape* v5.4-1 (Paradis y Schliep, 2018) y el paquete *phangorn* v2.5.5 (Schliep, 2011) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355). El árbol filogenético y la tabla de ASVs rarefaccionada fueron usados en el paquete *GUniFrac* v1.1 (Chen, 2021) del software estadístico R v3.6.1 para calcular la distancia UniFrac generalizada.

2.6. Análisis estadísticos

Los modelos lineales se ajustaron a las variables vegetales y Pe del suelo e índices de diversidad α (riqueza, equitatividad e índices de heterogeneidad) utilizando el procedimiento GLIMMIX del software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA), con el tratamiento como único efecto fijo, mientras que el año, bloque y sus interacciones con los tratamientos fueron considerados efectos aleatorios en los análisis de la varianza. Cuando fue apropiado, las medias de mínimos cuadrados (*lsmeans*) se separaron usando la opción de *lines* del comando *lsmeans*, estableciendo la probabilidad de error de Tipo I (α) en 0,05.

Los datos de secuenciación de amplicones se analizaron utilizando un enfoque tradicional y de composición (Gloor y Reid, 2016; Gloor *et al.*, 2017). En el primer caso, la distancia UniFrac fue usada como entrada en el paquete *vegan* v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2018) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1355) para el análisis multivariado de la diversidad beta a través del NMDS utilizando la función *metaMDS*. En el segundo caso partiendo de la tabla de ASVs inicial resultante de la plataforma de clasificación RDP, que contenía 18896 ASVs, se procedió a realizar una serie de pasos de filtrado y selección de ASVs. Primero, se agruparon las *reads* de los ASVs pertenecientes a un mismo género, lo que resultó en un total de 1157 géneros. Este conjunto se redujo aún más ya que sólo se mantuvieron los géneros con una abundancia relativa promedio $>0,1\%$ (Gloor y Reid, 2016), resultando 188 géneros. Estos géneros con las *reads* de los ASVs se ingresaron luego en la plataforma de detección de predictores JMP® para proporcionar una identificación inicial de los

géneros que responden a los efectos del tratamiento utilizando un método de remuestreo *bootstrap* (SAS Institute Inc, 2018; Villamil *et al.*, 2021). Como resultado se obtuvo una tabla de 26 ASVs clasificadas a nivel de género que contribuyeron al menos en un uno por ciento a la variabilidad de los algoritmos del modelo. Los datos de esta tabla fueron transformados a *centered log-ratio* (clr) (Aitchison, 1986), previo reemplazo de los valores ceros mediante el procedimiento “*cmultRep1*” del paquete *zCompositions* (Palarea-Albaladejo y Martín-Fernández, 2015). Luego, los datos transformados fueron usados como entradas para el ACP.

El ACP se realizó utilizando el procedimiento FACTOR en el software estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) con *priors=1*, los *reads* de los ASVs transformados a *centered log-ratio* se resumieron en un conjunto de variables compuestas no correlacionadas o componentes principales (CP). Las CP con autovalor ≥ 1 que explicaban al menos el 5% de la variabilidad en el conjunto de datos se utilizaron como variables independientes para análisis posteriores. Los géneros con correlación significativa con cada CP ($>|0,45|$) fueron considerados sensibles y se utilizaron en la descripción de las CP. Los modelos lineales mixtos se ajustaron a cada CP utilizando el procedimiento GLIMMIX para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la comunidad bacteriana de la rizosfera de girasol. Los tratamientos fueron considerados efectos fijos, mientras que el año, bloque y sus interacciones con los tratamientos se trataron como efectos aleatorios en los análisis de la varianza. Cuando fue apropiado, las medias de mínimos cuadrados (*lsmeans*) se separaron usando la opción de *lines* del comando *lsmeans*, estableciendo la probabilidad de error de Tipo I (α) en 0,05.

Se realizó un análisis multivariado de la varianza no paramétrico permutacional (PERMANOVA con la función *adonis* en el paquete *vegan*; Anderson, 2001) usando matrices de distancia (distancia UniFrac generalizada) y 1000 permutaciones para estudiar la existencia de efectos estadísticamente significativos ($P < 0,05$) de los tratamientos (Ramette, 2007). Las comparaciones de a pares fueron examinadas usando el paquete *RVAIDeMemoire* v0.9-78 (Hervé, 2020) (función *pairwise.perm.manova* sin correcciones, 1000 permutaciones) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (versión 1.2.1335).

Se utilizó el Software SigmaPlot versión 10.0 para graficar las relaciones estadísticamente significativa entre las CPs y el tratamiento, sobre los géneros cuyo *loading* fue $>|0,45|$. Las Figuras 5.1, 5.2, 5.3 y 5.5 se componen de dos gráficos: el primer gráfico (A) muestra los *scores* medios de la CP para cada tratamiento y sus errores estándar (como barras de error), y el segundo (B) señala la contribución de cada género indicador al valor medio de la CP para cada tratamiento. Esta contribución se calcula como el valor medio de la CP para un determinado tratamiento (Tabla 5.11) multiplicado por el *loading* de los géneros específicos dentro de la CP (Tabla 5.10), denominados MxL en cada gráfico.

3. Resultados

3.1. Contenido de fósforo

En la Tabla 5.3 se indican los resultados del análisis de Pe del suelo. Los resultados muestran que el efecto de los tratamientos no fue estadísticamente significativo ($P > 0,05$; Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para Pe (fósforo extractable). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).

		Pe mg kg⁻¹	
Tratamiento	n	Media	ES
BP	8	16,19	3,34
DQP	8	14,48	3,34
DQ	8	14,23	3,34
RP	7	18,52	3,42
R	7	11,75	3,42
	gl		P -valor
Tratamiento	4		0,362

La ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P > 0,05$).

3.2. Parámetros de crecimiento de girasol

En las Tablas 5.4 y 5.5 se indican los resultados del análisis de los parámetros de crecimiento de girasol medidos en estado vegetativo y reproductivo. Los resultados muestran diferencias altamente significativas para las variables N^oh.V (número de hojas), Alt.V (altura de planta) y PsTyH (peso seco de tallos y hojas) ($P < 0,001$; Tabla 5.4). Los tratamientos R (con o sin P) presentaron menor número de hojas con respecto a BP y DQ (con o sin P) (Tabla 5.4). En relación con la variable Alt.V, los tratamientos se diferenciaron entre sí en el orden de DQ (con o sin P) > BP > R (con o sin P) (Tabla 5.4). Para la variable PsTyH los tratamientos también se diferenciaron entre sí, en el orden de BP > DQ (con o sin P) > R (con o sin P) (Tabla 5.4).

El análisis de los parámetros de crecimiento de girasol medidos en estado reproductivo mostró diferencias significativas para las variables Alt.R6 (altura), N^oh.R6 (número de hojas), DT (diámetro de tallo), DC (diámetro de capítulo) y PsC (peso seco de capítulo) ($P < 0,05$; Tabla 5.5). El número de hojas

fue mayor en BP y DQ (con o sin P) con respecto a R (con o sin P) (Tabla 5.5). Para la variable Alt.R, los tratamientos se diferenciaron entre sí en el orden de DQ (con o sin P) > BP=R > RP (Tabla 5.5). El DT resultó menor en R (con o sin P) en comparación con el resto de los tratamientos (Tabla 5.5). El diámetro del capítulo fue menor en BP con respecto a DQ (con o sin P) y R (Tabla 5.5). La variable PsC resultó menor en RP en relación con DQ (con o sin P) y R, mientras que no se diferenció de BP (Tabla 5.5).

Tabla 5.4. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los caracteres morfológicos medidos en estado vegetativo de girasol: N°h.V (número de hojas en vegetativo), Alt.V (altura en vegetativo) y PsTyH (peso seco de tallos y hojas). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).

	N°h.V			Alt.V		PsTyH	
	<i>n</i>	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Tratamiento							
BP	8	10,36 A	1,14	16,65 B	2,99	6,80 A	1,12
DQP	8	9,74 A	1,14	20,03 A	2,99	2,94 B	1,12
DQ	8	9,92 A	1,14	21,11 A	2,99	3,58 B	1,12
RP	7	3,85 B	1,14	9,15 C	3,01	0,25 C	1,16
R	7	3,53 B	1,14	7,76 C	3,01	0,40 C	1,16
		<i>gl</i>		<i>P</i> -valor			
Tratamiento	4	<0,0001		<0,0001		<0,0001	

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla 5.5. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los caracteres morfológicos medidos en estado reproductivo de girasol: Alt.R6 (altura en R6), N°h.R6 (número de hojas en R6), DT (diámetro de tallo), DC (diámetro de capítulo), PsC (peso seco de capítulo). Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (*P*-valor) y grados de libertad (*gl*) asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).

	<i>n</i>	N°h.R6		Alt.R6		DT		DC		PsC	
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Tratamiento											
BP	8	21,67 A	3,33	68,62 B	15,88	1,48 B	0,25	7,98 C	0,59	22,43 BC	3,65
DQP	8	22,94 A	3,33	85,74 A	15,88	1,57 AB	0,25	9,42 AB	0,59	29,23 A	3,65
DQ	8	23,29 A	3,33	88,07 A	15,88	1,67 A	0,25	9,45 AB	0,59	32,07 A	3,65
RP	4	16,15 B	3,40	56,76 C	16,12	0,97 C	0,26	8,24 BC	0,72	18,01 C	4,61
R	3	17,40 B	3,43	70,38 B	16,25	1,20 C	0,27	9,92 A	0,77	28,81 AB	4,97
	<i>gl</i>										
Tratamiento	4	<0,0001		<0,0001		<0,0001		0,007		0,009	

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

3.3. Análisis metagenómico de la comunidad microbiana

El número total de secuencias de ARNr 16S de *Bacteria* en cada muestra después de cada etapa de procesamiento (filtrado, *denoising* y eliminación de quimeras) se muestra en la Tabla 5.6. Como se observa en esta tabla, luego de realizar las distintas etapas no se removieron un número significativo de lecturas (*reads*), lo que refleja la alta calidad del conjunto de datos. Se obtuvieron un total de 2086273 secuencias con una extensión promedio de 264 nucleótidos, incluyendo las correspondientes a *Bacteria* y *Archaea*. El número de ASVs definidas luego del procesamiento y limpieza del conjunto total de datos (34 muestras) fue de 19137 para *Bacteria+Archaea*, de los cuales 18960 fueron clasificados como pertenecientes a *Bacteria* (99,1% de los ASVs), 157 a *Archaea* (0,8%) y 20 ASVs (0,1%) no pudieron ser asignados a ninguno de ellos. Los análisis posteriores se centraron sólo en el dominio *Bacteria*. De las 18960 secuencias de *Bacteria* se retuvieron 18892 secuencias; un total de 68 (0,36%) secuencias se eliminaron debido a que su tamaño estaba fuera del valor promedio esperado para el amplicón, si bien previamente se chequeó si su identidad correspondía a secuencias bacterianas de la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S mediante la búsqueda en la base de datos BLASTn.

Tabla 5.6. Procesamiento de secuencias con QIIME 2. En la tabla se reporta el número de secuencias (sec.) obtenidas en los diferentes pasos del procesamiento. Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolado y la letra B barbecho. La letra P indica fertilización con fosfato diamónico y los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento.

Muestras	Número de sec. de entrada	Número de sec. filtradas	Número de sec. <i>denoised</i>	Número de sec. <i>merged</i>	Número de sec. sin quimeras	Número de sec. Bacteria
IRP_1	69280	64434	60820	51629	48398	47797
IDQP_1	75688	70485	66732	57819	55527	54892
IR_1	77792	72753	69142	59932	56764	56281
IDQ_1	69783	65407	61502	51875	49744	49425
IBP_1	59783	55985	52584	43994	41878	41510
IBP_2	139122	124316	120752	108713	99738	97813
IDQP_2	95230	86063	83040	73840	69015	67467
IDQ_2	67789	60351	57742	48619	45808	45174
IIDQ_1	84807	79381	75438	65661	62552	61832
IIBP_1	91746	86490	82987	73950	69187	68842
IIR_1	72443	67533	64241	55534	52895	52341
IIRP_1	71495	66952	63727	55337	51818	51153
IIDQP_1	60783	57048	53715	45440	42929	42453
IIBP_2	80751	72259	69978	61554	58104	57166
IIDQP_2	82985	73253	70348	59868	56737	55664
IIDQ_2	102566	92629	89295	76960	71924	70642
IIIDQP_1	70169	66107	62355	53358	51284	50948
IIIR_1	63054	58552	55436	47849	45776	45066
IIIBP_1	65618	61484	58293	50715	48041	47278
IIIRP_1	74434	69436	66014	57254	54048	53233
IIIDQ_1	69813	65414	62069	53376	50674	50249
IIIBP_2	78382	69271	66505	58177	53956	52935
IIIDQP_2	115939	104662	101063	88861	83745	82716
IIIDQ_2	118287	106264	102646	90778	83675	82456
IIIRP_2	115897	104152	100672	88218	82703	82003
IIIR_2	122027	109667	106118	94350	86765	85499
IIRP_2	87086	77812	74856	64073	59664	58345
IIR_2	106555	94638	91199	79409	73760	72571
IR_2	110752	97781	94644	83842	78063	76765
IVBP_2	78838	70540	67679	59148	55992	54658
IVDQP_2	68138	61248	58253	49105	46648	45359
IVDQ_2	50933	45462	42537	34072	32727	32093
IVRP_2	88345	78291	75258	65091	60670	59210
IVR_2	144710	129812	126475	117053	105064	102859

Los datos rarefaccionados correspondientes a *Bacteria* fueron los que se emplearon posteriormente para los correspondientes análisis de diversidad α y β . La rarefacción se llevó a cabo en base a la muestra con el menor número de secuencias, en este caso IVDQ_2 (32093 secuencias) (Figura 5.4).

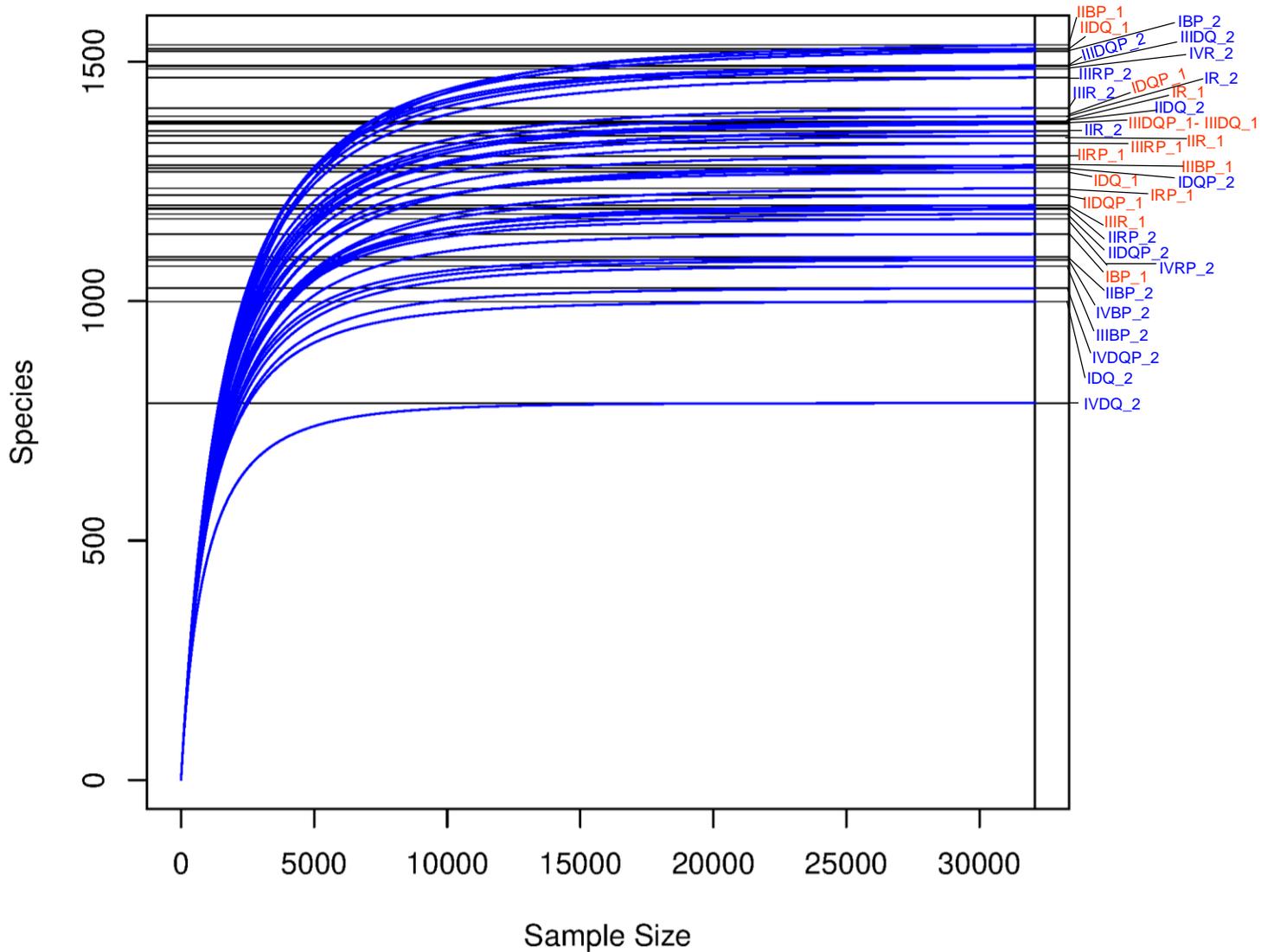


Figura 5.4. Curvas de rarefacción para las distintas muestras analizadas mediante barcoded amplicon-sequencing. Se indica el número de ASVs (“Species”) esperables para un número creciente de secuencias en cada muestra (“Sample size” o esfuerzo de muestreo). Las letras DQ indican desecación química, la letra R rolado y la letra B barbecho. La letra P indica fertilización con fosfato diamónico y los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento. En naranja se indican las muestras de 2018 y en azul las de 2019.

3.3.1. Diversidad α

Los resultados del análisis de la varianza para los índices de diversidad α : riqueza de especies (S' e índice de Chao-1), índice de Shannon, recíproco de Simpson e índice de equitatividad de Shannon se muestran en la Tabla 5.7. No se observó un efecto significativo de los tratamientos para los índices riqueza de especies, Shannon y recíproco de Simpson ($P>0,05$, Tabla 5.7). Sin embargo, los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre el índice de equitatividad de Shannon ($P<0,05$). Se observó mayor E_H en los tratamientos DQP y R con respecto a BP y RP, mientras que DQ no se diferenció del resto. Esto sugiere que la comunidad microbiana en la rizosfera de girasol cultivado en parcelas DQP y R está dominada por más grupos que en BP y RP.

Tabla 5.7. Valores de medias y errores estándares (ES) de las medias de los tratamientos para los índices de diversidad alfa: Chao-1: índice de Chao-1 (riqueza estimada); S' : riqueza observada (ASVs observados); $1/\lambda$: recíproco de Simpson; H' : índice de Shannon; E_H : índice de equitatividad de Shannon. Al final de la tabla se indican los valores de probabilidad (P -valor) y grados de libertad (gl) asociados a los tratamientos: barbecho con P (BP), desecación química con P (DQP), desecación química sin P (DQ), rolado con P (RP) y rolado sin P (R).

		Chao-1		S'		$1/\lambda$		H'		E_H		
		<i>n</i>	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Tratamiento												
	BP	7	1241	80,58	1236	80,05	558	41,48	6,73	0,07	0,945 B	0,004
	DQP	7	1273	84,24	1270	83,52	670	42,61	6,80	0,07	0,952 A	0,004
	DQ	7	1234	80,58	1231	80,05	600	41,48	6,72	0,07	0,949 AB	0,004
	RP	6	1262	85,43	1260	84,71	624	42,71	6,77	0,07	0,947 B	0,004
	R	7	1360	80,58	1357	80,05	709	41,48	6,88	0,07	0,954 A	0,004
			<i>gl</i>			<i>P</i> -valor						
	Tratamiento	4	0,764		0,755		0,120		0,474		0,013	

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) y la ausencia de letras indica diferencias no significativas ($P>0,05$).

3.3.2. Diversidad β

El análisis multivariado a través de PERMANOVA para estudiar la diversidad β indicó un efecto significativo del tratamiento ($P<0,05$; Tabla 5.8). Sin embargo, las comparaciones de a pares (PERMANOVA) utilizando la corrección de Benjamini y Hochberg (“*fdr*”) no arrojaron diferencias

significativas ($P > 0,05$; Tabla 5.9). Estos resultados también se visualizaron en el ordenamiento mediante NMDS con distancia UniFrac generalizada donde no se observó una separación entre las comunidades bacterianas de la rizosfera de girasol por el efecto de los tratamientos en el CCI antecesor (Figura 5.5).

Tabla 5.8. Análisis multivariado de la varianza no paramétrico (PERMANOVA) con 1000 permutaciones. *gl*: grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

PERMANOVA (distancia UniFrac generalizada)			
	<i>gl</i>	F. modelo	<i>P</i> -valor
Tratamiento	4	1,38	0,02
<i>gl</i> error	29		

Tabla 5.9. Comparación de datos metagenómicos entre métodos de finalización utilizando la corrección de Benjamini y Hochberg (“fdr”)

Comparación	PERMANOVA (distancia UniFrac generalizada)	
	<i>P</i> valor con correcciones	
DQ vs BP		0,16
DQP vs BP		0,16
R vs BP		0,24
RP vs BP		0,16
DQP vs DQ		0,53
R vs DQ		0,16
R vs DQP		0,24
RP vs DQ		0,22
RP vs DQP		0,22
RP vs R		0,52

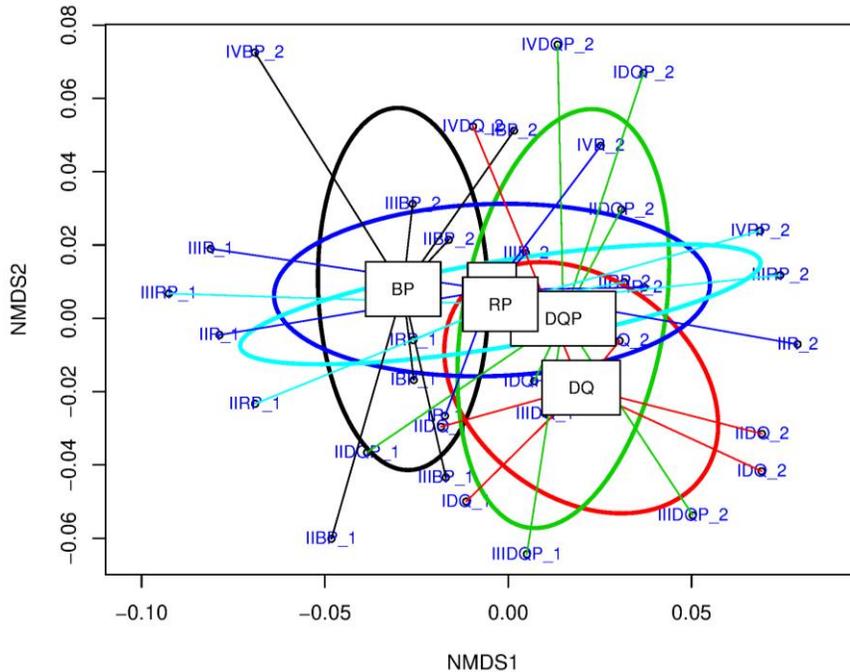


Figura 5.5. Análisis multivariado del conjunto de datos metagenómicos en la rizosfera de girasol.

Las letras indican los tratamientos BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P. Los números romanos (I al IV) identifican las réplicas de cada tratamiento y el número 1 indica las muestras de 2018 y el número 2 las de 2019. Los centroides se encuentran indicados con recuadros. El error estándar de BP, RP, R, DQP y DQ se indica con elipses de color negro, celeste, azul, verde y rojo, respectivamente. El ordenamiento se llevó a cabo mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y métrica de distancia UniFrac generalizada. *Stress-value*= 0,16.

3.3.3. Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de girasol

El ACP de los datos transformados a *clr* generaron ocho CP no correlacionadas con autovalor >1 que en conjunto explicaron el 71% de la variabilidad entre las muestras de rizosfera en base a los 26 géneros de mayor contribución seleccionados (Tabla 5.10). La CP1 presentó *loadings* positivos (>0,45) para *Aciditerrimonas*, *Aeromicrobium*, *Gaiella*, *Gemmatirosa*, *Limnoglobus*, *Niastella* y *Zavarzinella*, así como *loadings* negativos (<-0,45) para *Novosphingobium* y *Stenotrophomonas*. La CP2 mostró *loadings* positivos para *Hymenobacter*, *Pelomicrobium* y *Pseudarthrobacter* y *loadings* negativos para *Chryseolinea* y *Sandaracinus*. La CP3 tuvo *loadings* positivos para *Aeromicrobium*, *Lentzea* y *Pseudarthrobacter* y *loadings* negativos para *Gemmatirosa* y *Thermanaerothrix*. Los autovectores de la CP4 incluyeron *loadings* positivos para *Arma_gp5* y *Denitratisoma* y *loading* negativo para *Agromyces*. La CP5 mostró *loading* positivo para *Pantoea* y *loading* negativo para *Thermanaerothrix*. El autovector

de la CP6 incluyó *loading* negativo para *Mucilaginibacter*. La CP7 presentó *loading* negativo para *Denitratisoma*. La CP8 mostró *loading* positivo *Chitinispirillum* y *loading* negativo para *Limnoglobus*.

Tabla 5.10. Análisis de componentes principales usando la transformación de los datos *centered log ratio (clr)*, con autovalor y proporción acumulada de la variabilidad del conjunto de datos explicada por las ocho componentes principales (CP) (autovalor >1). Los autovectores con *loadings* >|0,45| están en negrita. En la parte de abajo de la tabla se detallan los valores de probabilidad (*P*-valor) y los grados de libertad (*gl*) del análisis de la varianza (ANOVA) para los tratamientos. Valores de $P < 0,05$ que indican significancia estadística se muestran en negrita.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	
Autovalor	4,53	3,08	2,76	2,19	1,73	1,48	1,34	1,32	
Proporción	0,17	0,12	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	
Proporción acumulada	0,17	0,29	0,40	0,48	0,55	0,61	0,66	0,71	
Correlaciones con las variables originales									
<i>Aciditerrimonas</i>	0,71	0,30	-0,18	-0,01	0,01	-0,33	-0,02	0,05	
<i>Aeromicrobium</i>	0,47	0,22	0,60	-0,15	0,04	0,13	-0,04	0,34	
<i>Agromyces</i>	0,17	0,34	0,25	-0,61	0,16	-0,31	-0,03	0,23	
<i>Arma_gp5</i>	0,10	-0,21	-0,06	0,71	0,34	-0,24	0,24	0,06	
<i>Chitinispirillum</i>	0,35	-0,09	-0,20	0,14	-0,02	-0,11	-0,02	0,51	
<i>Chryseolinea</i>	0,43	-0,80	0,15	-0,13	-0,15	-0,01	0,15	-0,10	
<i>Denitratisoma</i>	0,32	0,23	-0,25	0,52	-0,24	0,13	-0,48	0,20	
<i>Gaiella</i>	0,72	0,43	-0,22	0,02	0,23	-0,01	0,07	0,16	
<i>Gemmatirosa</i>	0,50	0,21	-0,49	0,20	0,05	0,22	0,27	0,08	
<i>Hymenobacter</i>	-0,42	0,60	0,17	0,08	0,24	-0,16	0,16	0,03	
<i>Jatrophihabitans</i>	-0,07	0,38	-0,42	-0,37	0,18	-0,28	0,05	-0,15	
<i>Lentzea</i>	0,27	0,18	0,49	0,10	-0,38	-0,05	0,40	-0,08	
<i>Limnoglobus</i>	0,47	0,17	0,30	-0,06	0,35	0,20	-0,18	-0,46	
<i>Marmoricola</i>	0,40	-0,03	0,19	-0,36	0,32	0,15	-0,32	0,20	
<i>Mesorhizobium</i>	0,27	-0,13	-0,40	0,01	0,42	0,23	0,38	0,13	
<i>Mucilaginibacter</i>	-0,13	-0,35	-0,33	-0,02	0,15	-0,47	-0,12	0,29	
<i>Niastella</i>	0,59	-0,29	0,19	-0,22	-0,35	0,19	0,22	0,12	
<i>Novosphingobium</i>	-0,48	-0,08	0,15	0,33	0,15	0,41	0,11	0,37	
<i>Ornatilinea</i>	0,44	-0,43	0,27	0,24	0,16	-0,27	0,12	-0,24	
<i>Pantoea</i>	-0,23	0,00	0,42	0,31	0,46	0,07	-0,36	-0,11	
<i>Pelomicrobium</i>	0,00	0,50	-0,38	-0,13	0,05	0,27	0,31	-0,28	
<i>Pseudarthrobacter</i>	0,35	0,51	0,53	0,20	-0,19	0,06	0,06	0,13	
<i>Sandaracinus</i>	0,25	-0,58	-0,22	-0,43	0,20	0,27	-0,09	0,04	
<i>Stenotrophomonas</i>	-0,57	0,03	0,06	-0,23	0,21	0,40	0,14	0,22	
<i>Thermanaerotherix</i>	0,12	0,18	-0,50	0,02	-0,46	0,22	-0,36	-0,11	
<i>Zavarzinella</i>	0,73	-0,04	-0,04	0,21	0,29	0,19	-0,13	-0,22	
	<i>gl</i>			<i>P</i> -valor					
Tratamiento	4	0,012	<0,0001	0,030	0,145	0,086	0,409	0,284	0,262

Tabla 5.11. Resultados del procedimiento de separación de medias para las componentes principales (CP) que mostraron una respuesta estadísticamente significativa del tratamiento (CP 1, 2, 3 y 5). Tratamientos: BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P).

	CP1	CP2	CP3	CP5
Tratamiento				
BP	0,61 A	0,87 A	0,55 AB	-0,55 B
DQ	-0,01 A	-0,70 B	-0,63 C	-0,42 B
DQP	0,60 A	-1,01 B	-0,19 BC	0,09 AB
R	0,02 A	0,66 A	-0,28 BC	0,75 A
RP	-0,94 B	0,25 A	0,74 A	0,23 AB

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Las ocho CPs fueron utilizadas como variables independientes en los análisis de la varianza (ANOVA) posteriores para evaluar los efectos de los tratamientos sobre las comunidades microbianas de la rizosfera de girasol. En la parte inferior de la Tabla 5.10 se informan los valores de probabilidad y grados de libertad asociados con estos análisis para cada CP. Los resultados mostraron un efecto estadísticamente significativo del tratamiento para las CPs 1, 2, 3 y 5 (Tabla 5.10). En la Figura 5.6A, 5.7A, 5.8A y 5.9A se muestran las medias de las CPs para cada tratamiento con sus respectivos errores estándar y los resultados de separación de medias (Tabla 5.11). La contribución de cada género a estos resultados se indica en la Figura 5.6B, 5.7B, 5.8B y 5.9B. Para la CP1, el grupo de bacterias con *loading* positivo aumentó significativamente en la rizosfera de girasol cuando se finalizó el cultivo antecesor con DQ (con o sin P), R y BP, mientras que el comportamiento opuesto fue observado para los géneros bacterianos con *loading* negativo, con respecto a RP (Figura 5.6B). Para la CP2, el grupo de bacterias con *loading* positivo disminuyó significativamente en la rizosfera de girasol cuando se finalizó el cultivo antecesor con DQ (con o sin P), mientras que el comportamiento opuesto fue observado para los géneros bacterianos con *loading* negativo, con respecto a BP y R (con o sin P) (Figura 5.7B). En la CP3 se observó que el grupo de bacterias con *loading* positivo disminuyó significativamente en la rizosfera de girasol cuando se finalizó el cultivo antecesor con DQ (con o sin P) y R, mientras que el comportamiento opuesto fue observado para los géneros bacterianos con *loading* negativo, con respecto a BP y RP (Figura 5.8B). Para la CP5, sólo dos géneros contribuyeron a explicar las diferencias entre los tratamientos. El género con *loading* positivo disminuyó significativamente en la rizosfera de girasol cuando se finalizó el cultivo antecesor con DQ y BP, mientras que el comportamiento opuesto fue observado para el género con *loading* negativo, con respecto a R (Figura 5.9B).

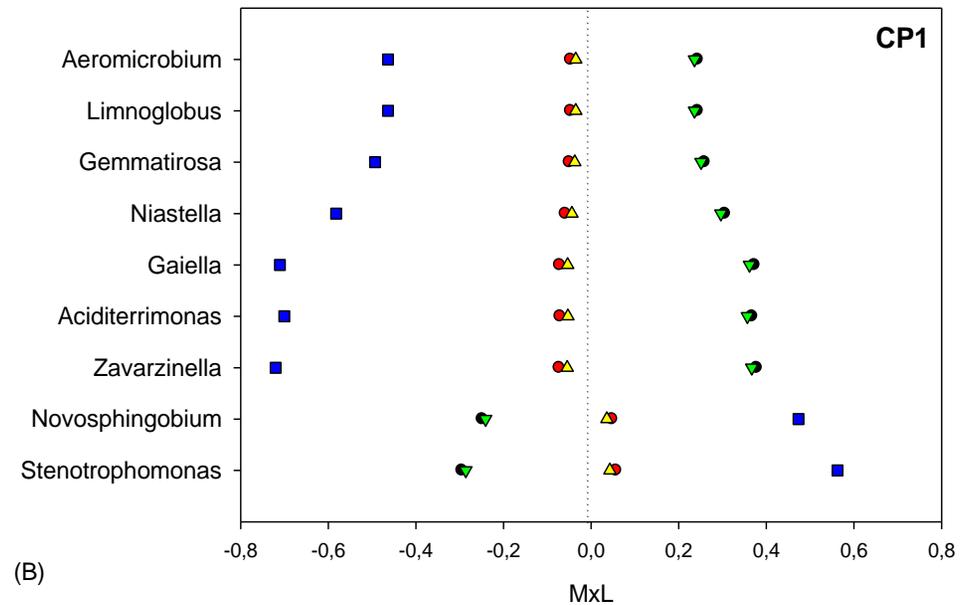
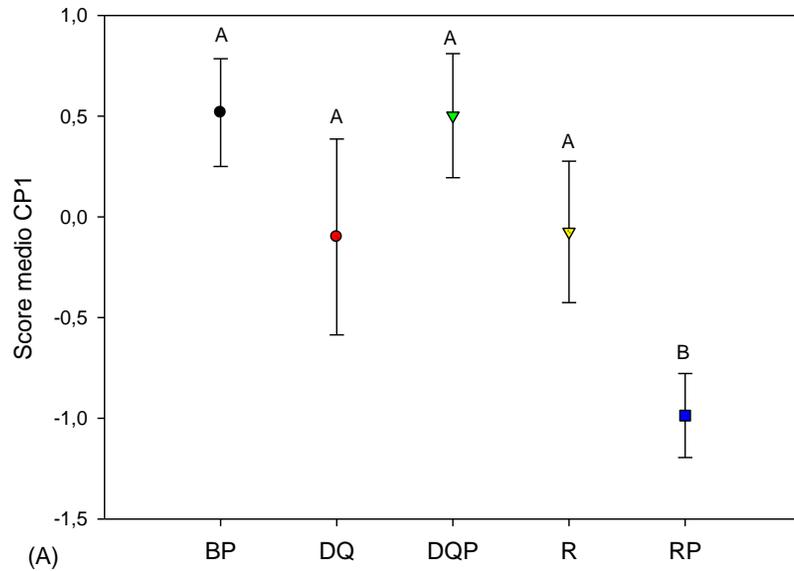


Figura 5.6. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución ($loadings > |0,45|$) según la Tabla 5.10 para la CP1. A) Valores medios de los scores de la CP1 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP1 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P).

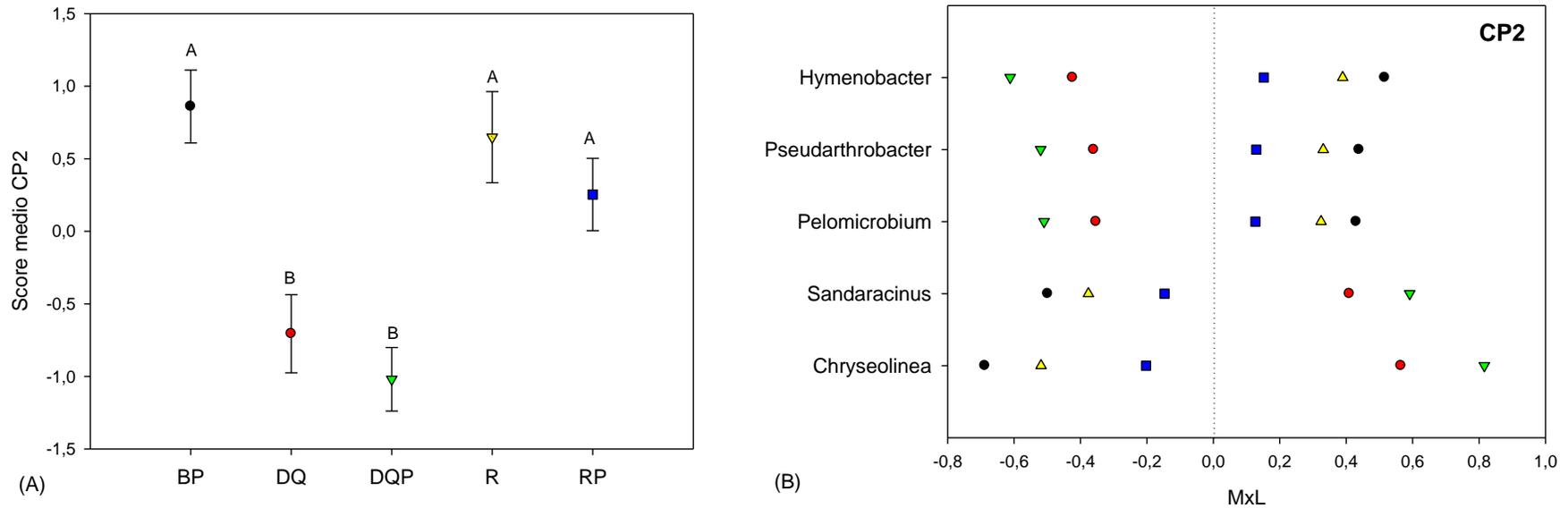


Figura 5.7. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución ($loadings > |0,45|$) según la Tabla 5.10 para la CP2. A) Valores medios de los *scores* de la CP2 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP2 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P).

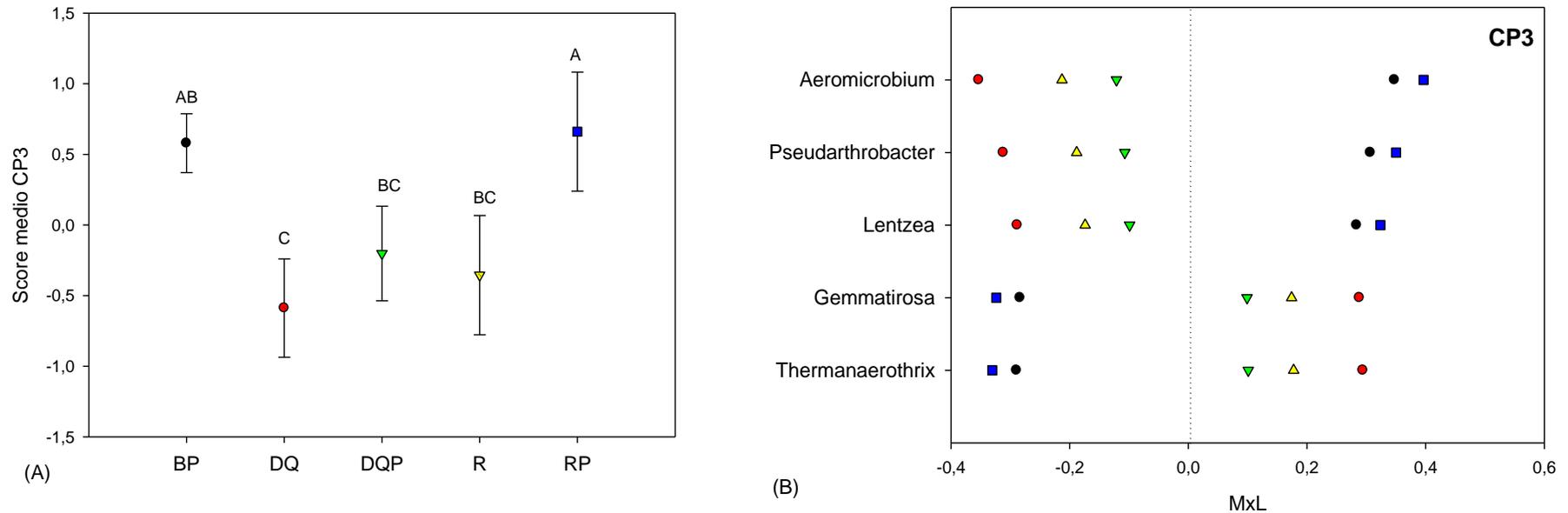


Figura 5.8. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución ($loadings > |0,45|$) según la Tabla 5.10 para la CP3. A) Valores medios de los scores de la CP3 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP3 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P).

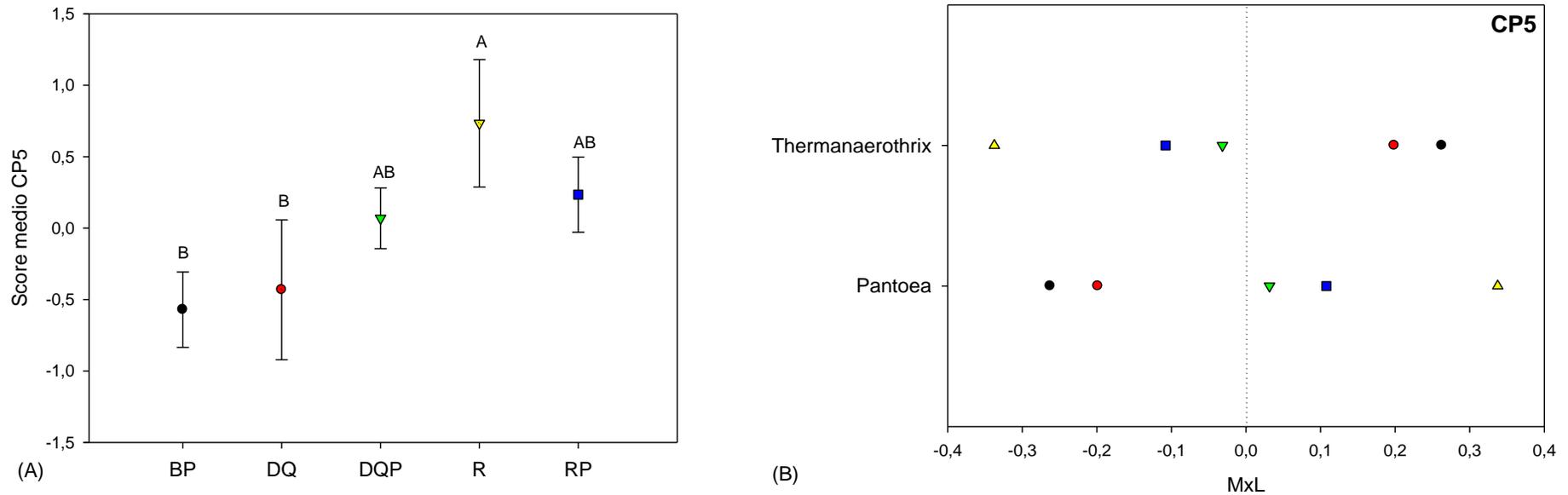


Figura 5.9. Representación visual de la combinación de los resultados del ACP y sus procedimientos de separación de medias, que muestran los géneros con mayor contribución ($loadings > |0,45|$) según la Tabla 5.10 para la CP5. A) Valores medios de los scores de la CP5 para cada tratamiento con sus errores estándar (como barras de error). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). B) Contribución de cada género indicador al valor medio de la CP5 (MxL) para cada tratamiento (BP: barbecho con P; DQ: desecación química sin P; DQP: desecación química con P; R: rolado sin P y RP: rolado con P).

4. Discusión

4.1. Parámetros de crecimiento de girasol

En la primera hipótesis se postuló que los métodos de finalización del CCI antecesor afectan la *performance* del cultivo de girasol sucesor en la rotación. Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que los tratamientos DQ (con o sin P) y R (con o sin P) afectaron significativamente las variables medidas en estado vegetativo (N^oh.V, Alt.V y PsTyH) y reproductivo (Alt.R6, N^oh.R6, DT, DC y PsC) de girasol (Tabla 5.4 y 5.5), por lo cual se acepta la hipótesis planteada. A su vez, las siguientes variables medidas en girasol Alt.V, Alt.R6, DT, DC y PsC mostraron menores valores con el tratamiento sin CCI (BP) respecto del tratamiento con CCI desecado químicamente (con o sin P).

Los parámetros medidos en estado vegetativo y reproductivo del cultivo sucesor mostraron un mejor comportamiento en plantas cultivadas en parcelas DQ (con o sin P) y BP respecto de las plantas cultivadas en parcelas R (con o sin P). Se observó que el rolado no logró un control adecuado de avena y de malezas, situación que generó competencia por recursos hídricos de por sí escasos en la zona. Esto indicaría que el estado fenológico (Z5.5) y la altura no fueron las adecuadas para un eficiente control por rolado. Al respecto, Mirsky *et al.*, (2009) reportaron que el centeno fue controlado efectivamente al estadio de Z6.1 (antesis), debido a que las plantas más grandes y maduras mejoran la infiltración de agua y la supresión de malezas y reduce la evaporación de la superficie del suelo (Mirsky *et al.*, 2009). Por su parte, se ha informado que el estrés hídrico disminuye el rendimiento y el contenido de aceite de girasol (Alahdadi *et al.*, 2011). Davis (2010) encontró que la supresión con glifosato o rolado del centeno, como CCI, no afectó el rendimiento del cultivo estival, mientras que con *V. villosa* fue un 25% menor en el tratamiento rolado que en el secado con herbicida. Dorn *et al.*, (2013) concluyeron que si bien el control mecánico de los CC ofrece la posibilidad de reducir el uso de herbicidas, el rolado como una herramienta independiente no controlaría las poblaciones de malezas naturales lo suficiente como para mantener el rendimiento del cultivo principal. Esto también ha sido observado por Miville y Leroux (2018), quienes reportaron que el rebrote de centeno finalizado con rolado actúa como maleza, compitiendo con el cultivo sucesor (*Cucurbita pepo* L.) por el espacio, luz, agua y nutrientes y afectando su crecimiento y rendimiento. A su vez, la avena puede liberar sustancias alelopáticas a través de la exudación radical o durante la descomposición de los residuos vegetales (Bahraminejad *et al.*, 2008; de Bertoldi *et al.*, 2009). Los compuestos aleloquímicos pueden tener un impacto negativo sobre el cultivo sucesor, por lo que se debe tener en cuenta el momento de finalización del CCI (Shekoofa *et al.*, 2020).

Las variables Alt.V, Alt.R6, DT, DC y PsC mostraron un mejor comportamiento en plantas cultivadas en parcelas DQ (con o sin P) respecto de las plantas cultivadas en parcelas BP. Tesfamariam *et al.*, (2009) reportaron que la aplicación de glifosato a raigrás resulta en una germinación no

homogénea y una gran diferencia en el desarrollo de las plántulas. Anza *et al.*, (2016) también observaron que el control de malezas con glifosato causa efectos fitotóxicos sobre el cultivo de interés (*Festuca arundinacea*). Por otra parte, Sá Pereira *et al.*, (2020) reportaron que avena (Marita INTA), empleada como CCI en el SOB afectó negativamente la superficie foliar, el número de plantas y el rendimiento de girasol, respecto del barbecho mecánico. Sin embargo, Rosner *et al.*, (2018) observaron que avena negra, como CCI, no modificó el rendimiento de girasol en comparación con el barbecho químico. Estos resultados contradictorios podrían deberse a que en condiciones de campo los efectos de los CCI sobre el cultivo sucesor pueden ser muy variables y dependientes de las condiciones climáticas, tipo de suelo, manejo y duración de los ensayos.

En la segunda hipótesis planteada en este capítulo se postuló que la fertilización fosforada a la siembra del cultivo de girasol afecta su *performance* cuando éste sucede en la rotación al CCI finalizado por desecación química. Los resultados obtenidos no mostraron efectos diferenciales de los tratamientos DQ (con o sin P) sobre los parámetros productivos de girasol. Esto se podría deber a que se aplicó el P en forma granular localizada en banda al costado de la semilla. Rose *et al.*, (2018) reportaron que este tipo de aplicaciones podría mitigar los efectos fitotóxicos potenciales de la interacción entre el fosfato y el glifosato, debido a que el herbicida solo se movilizaría desde el pequeño volumen de suelo inmediatamente adyacente a los gránulos del fertilizante fosforado. En contraste con estos resultados, Bott *et al.*, (2011) informaron que el glifosato tuvo un efecto fitotóxico sobre las plantas de soja cuando se aplicó fertilizante fosforado en forma líquida a la siembra en dosis de 20 a 240 kg ha⁻¹.

En este sentido, la investigación realizada en este capítulo contribuye al conocimiento del efecto del manejo del CCI en la zona semiárida del SOB para mejorar la toma de decisiones en el ámbito agropecuario.

4.2. Análisis metagenómico de la comunidad bacteriana de girasol

El índice E_H mostró un efecto significativo del tratamiento (Tabla 5.7), lo que sugiere que DQP y R comparten abundancias similares para los distintos ASVs en la rizosfera de girasol respecto de BP y RP. Sin embargo, los otros índices de diversidad α y β evaluados no se vieron afectados por los tratamientos. A su vez, se detectaron diferencias significativas entre tratamientos al considerar la abundancia de los taxones a nivel de género (Tabla 5.10).

Para la CP1, la respuesta de las bacterias al tratamiento fue significativa ($P < 0,05$; Tabla 5.10). Se generaron dos grupos, cada uno compuesto por 7 y 2 géneros, que respondieron de manera opuesta a los tratamientos (Figura 5.6B). Los tratamientos DQ (con o sin P), BP y R favorecieron a los géneros *Aciditerrimonas*, *Aeromicrobium*, *Gaiella*, *Gemmatirosa*, *Limnoglobus*, *Niastella* y *Zavarzinella* en la

rizosfera de girasol, mientras que desfavorecieron a *Novosphingobium* y *Stenotrophomonas*, respecto de RP.

Las tres actinobacterias en el grupo que respondieron positivamente a los tratamientos DQ (con o sin P), BP y R fueron *Aciditerrimonas*, una bacteria termoacidófila que no forma esporas (Itoh *et al.*, 2011), la cual fue identificada en un suelo con manejo orgánico y se correlacionó positivamente con el C orgánico total y el N-NH₄ (Cuartero *et al.*, 2021); *Aeromicrobium* aislada de distintos tipos de suelos, plantas, aire y ambientes acuáticos (Evtushenko y Krausova, 2015); y *Gaiella*, cuya presencia fue reportada en la rizosfera de diferentes especies de plantas (Zhou *et al.*, 2019; Cordero *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2020; Lazcano *et al.*, 2021). Qi *et al.*, (2020) reportaron que la abundancia de *Aeromicrobium* se incrementó en suelo rizosférico de tabaco que incluía rotaciones con CCI, y relacionaron su presencia con un efecto benéfico para el cultivo ya que puede producir metabolitos antimicrobianos (Miller *et al.*, 1991). Los antagonistas microbianos pueden prevenir las enfermedades de las plantas causadas por patógenos del suelo a través de la competencia por nutrientes, antibiosis y resistencia sistémica inducida (Haas y Défago, 2005). *Gaiella*, en la rizosfera, puede llevar a cabo la reducción de nitratos, ayudando a las plantas a asimilar carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos (Albuquerque *et al.*, 2011; Severino *et al.*, 2019).

Los géneros *Zavarzinella* y *Limnoglobus* pertenecen al filo Planctomycetes y a la familia Gemmataceae, cuyos miembros son aerobios estrictos, quimiorganótrofos y tienen una distribución cosmopolita en ambientes de agua dulce y terrestres (Kulichevskaya *et al.*, 2020). Sin embargo, sus funciones ecológicas siguen siendo poco conocidas. Duan *et al.*, (2021) reportaron que Gemmataceae fue asociada negativamente con el contenido de C orgánico asociado a la fracción mineral, sugiriendo un rol funcional en el secuestro de C orgánico del suelo. *Gemmatirosa*, perteneciente al filo Gemmatimonadetes, es una bacteria Gram-negativa, quimioheterótrofa y oligotrófica, que fue aislada de un suelo con rotaciones de trigo-maíz-soja en manejo orgánico (DeBruyn *et al.*, 2013). *Niastella*, representante del filo Bacteroidetes, fue identificada como un indicador en el grupo favorecido por los tratamientos DQ (con o sin P), BP y R. Esta bacteria fue aislada de la rizosfera de *Hibiscus syriacus* L. (Yan *et al.*, 2016), e identificada en la rizosfera de girasol (Oberholster *et al.*, 2018), maíz (Visioli *et al.*, 2018), soja (Lian *et al.*, 2017) y trigo (Chen *et al.*, 2019). Los miembros de este género pueden regular el crecimiento de las plantas y la disponibilidad de nutrientes a través de la producción de AIA y fosfatasas ácidas (Lian *et al.*, 2017; Visioli *et al.*, 2018).

Las dos proteobacterias en el grupo que responde negativamente a los tratamientos DQ (con o sin P), BP y R fueron *Stenotrophomonas* (Gammaproteobacteria), aislada de suelo rizosférico (Berg *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2002) y de tejido vascular de raíz y tallo (Ryan *et al.*, 2009) y *Novosphingobium* (Alfaproteobacteria), aislada de la rizosfera de distintas especies de plantas (Lin *et al.*, 2014b; Kämpfer *et al.*, 2015a, 2015b; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Bacterias del género *Stenotrophomonas* son

consideradas PGPR, tienen un rol importante en el ciclo de N y azufre y pueden producir compuestos antimicrobianos que protegen a las plantas de los patógenos del suelo (Park *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2012). *Novosphingobium* también es una PGPR y ha sido identificada en la rizosfera del CCI antecesor (sección 4.2 del capítulo 4).

La CP2 también presentó una respuesta significativa de las bacterias a los tratamientos ($P < 0,05$; Tabla 5.10). Los tratamientos DQ (con o sin P) disminuyeron la abundancia de los géneros *Hymenobacter*, *Pelomicrobium* y *Pseudarthrobacter* en la rizosfera de girasol, mientras que favorecieron a *Sandaracinus* y *Chryseolinea*, respecto de R (con o sin P) y BP.

Hymenobacter es el único representante del filo Bacteroidetes que resultó afectado por los tratamientos DQ (con o sin P). Es un género integrado por bacterias aerobias, Gram-negativas, heterótrofas y con preferencia por medios oligotróficos (Buczolits y Busse, 2015). Representantes de este género han sido aislados de distintos tipos de suelo (Kim *et al.*, 2008; Hoang *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014; Srinivasan *et al.*, 2015; Ohn *et al.*, 2018). Este género ha sido reportado como PGPR, al promover las propiedades antioxidantes, el contenido de compuestos fenólicos y ácidos grasos esenciales en planta (Dimitrijević *et al.*, 2018). *Pelomicrobium* es una bacteria Gram-negativa del filo Proteobacteria, anaerobia facultativa, quimiolitotrofa y metilotrófica facultativa, que recientemente fue aislada de un volcán de lodo (Slobodkina *et al.*, 2020). *Pseudarthrobacter* pertenece a la familia Micrococcaceae dentro del filo Actinobacteria y ha sido aislada de diferentes tipos de suelos (Busse y Wieser, 2018). Nordstedt y Jones (2020) reportaron que esta bacteria tiene propiedades PGPR en condiciones de estrés hídrico.

Sandaracinus pertenece al filo Proteobacteria (Deltaproteobacteria), es una bacteria Gram-negativa, aerobia y ha sido aislada del suelo (Mohr *et al.*, 2012). Este género posee característica de mixobacteria, como la producción de metabolitos secundarios y la formación de esporas durante condiciones ambientales adversas (Sharma *et al.*, 2016). Se ha informado que *Sandaracinus* puede degradar polímeros como almidón, no así celulosa, quitina o agar (Mohr *et al.*, 2012). El género *Chryseolinea* es el único representante del filo Bacteroidetes que resultó favorecido por los tratamientos DQ (con o sin P) en el CCI antecesor. Es una bacteria Gram-negativa, heterótrofa, aerobia estricta y ha sido aislada de distintos tipos de suelos (Kim *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019). *Chryseolinea* ha sido identificada en la rizosfera de pepino (Li *et al.*, 2021), tomate (Readyhough *et al.*, 2021) y ginseng americano (*Panax quinquefolius* L.) (Tian *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que correlaciona negativamente con la incidencia de la enfermedad causada por el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* (Ou *et al.*, 2019).

Para la CP3, la respuesta de las bacterias al tratamiento fue significativa ($P < 0,05$; Tabla 5.10). Los géneros que fueron desfavorecidos en la rizosfera de girasol por los tratamientos DQ (con o sin P)

y R en comparación con RP fueron tres actinobacterias (*Aeromicrobium*, *Lentzea* y *Pseudarthrobacter*) mientras que los géneros que aumentaron en abundancia fueron *Gemmatirosa* y *Thermanaerotherix*.

Lentzea, es una bacteria Gram-positiva, aerobia y ha sido aislada de diferentes tipos de suelos (Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018a; 2018b; Wang Longwei *et al.*, 2019; Maiti y Mandal, 2020). Los géneros *Aeromicrobium* y *Lentzea* han sido identificados en la rizosfera de sorgo (Wu *et al.*, 2019) y trigo (Huang *et al.*, 2020). Por otra parte, se reportó que *Lentzea* se correlaciona positivamente con el N disponible y el contenido de MO del suelo, así como con parámetros productivos de plantas (Wu *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020).

Dentro de las bacterias que resultaron favorecidas por los tratamientos DQ (con o sin P) y R se encuentra *Thermanaerotherix*. Este género pertenece al filo Chloroflexi y a la familia Anaerolineaceae, cuyos miembros son anaerobios estrictos y fueron identificados en suelo rizosférico de diferentes especies de plantas (Jiang *et al.*, 2017; Rodríguez-Caballero *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2020; Jia *et al.*, 2020). Jiang *et al.*, (2017) reportaron que la familia Anaerolineaceae correlaciona positivamente con el pH y la MO del suelo, por lo que estas bacterias podrían promover la descomposición de la MO edáfica. A su vez, cumple un rol importante en la degradación de hidrocarburos derivados del petróleo y pueden regular la solubilidad de cadmio en el suelo (Meng *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021).

Para la CP5, sólo dos géneros contribuyeron a explicar las diferencias entre los tratamientos (Tabla 5.10 y Figura 5.9B). *Pantoea* resultó desfavorecida en la rizosfera de girasol por los tratamientos BP y DQ respecto de R, mientras que *Thermanaerotherix* se vio favorecido.

Pantoea (Proteobacteria) es una bacteria Gram-negativa que incluye varias especies que fueron aisladas de ambientes acuáticos y terrestres como patógenos, simbioses, comensales y especies benéficas que pueden promover el crecimiento de las plantas (Walterson y Stavrínides, 2015). La capacidad de *Pantoea* de actuar como PGPR ha sido reportada para diferentes cultivos tales como arroz (Feng *et al.*, 2006), trigo (Amellal *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2017), maíz (Mishra *et al.*, 2011; Suman *et al.*, 2020), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), lenteja (*Lens culinaris* Medik), arveja (Sergeeva *et al.*, 2007) y caña de azúcar (Loiret *et al.*, 2004). La acción PGPR la ejercen por varios mecanismos que incluyen la producción de AIA, sideróforos, exopolisacáridos, solubilización de P, fijación de N y actividad de biocontrol (Amellal *et al.*, 1998; Loiret *et al.*, 2004; Sergeeva *et al.*, 2007; Cañamás *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017; Shariati *et al.*, 2017).

5. Conclusiones

En síntesis, los resultados presentados en este capítulo demuestran que la utilización del rolado como método de finalización del CCI tiene efectos negativos sobre la *performance* del cultivo de girasol en el SOB. Esto podría deberse a que el rolado no logró un control adecuado de avena y de malezas, situación que generó competencia por recursos hídricos de por sí escasos en la zona. A su vez, los resultados obtenidos en el análisis de secuenciación masiva de amplicones del ARNr 16S (V4) confirman la hipótesis de que los métodos de finalización del CCI inciden sobre el ensamblado de la microbiota rizosférica del cultivo sucesor probablemente debido a la presencia de residuos de raíces y material vegetal en descomposición. El tratamiento RP favoreció a géneros con características PGPR en la rizosfera de girasol, mientras que se vieron desfavorecidas bacterias consideradas antagonistas de patógenos de planta, que ayudan a la nutrición de las plantas, producen AIA y fosfatasa ácida, respecto de DQ, DQP, BP y R. La mayoría de las bacterias que disminuyeron en abundancia en la rizosfera de girasol por los tratamientos DQ (con o sin P) han sido identificadas como PGPR, mientras que dentro de las que se vieron favorecidas se encuentran géneros que correlacionan negativamente con la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum*, con característica de mixobacteria y degradadores de hidrocarburos derivados del petróleo. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que el CCI finalizado por DQ actué como “puente verde” transmitiendo patógenos al cultivo de girasol y afectando la habilidad de las PGPR para suprimir estos patógenos.

Por lo tanto, si bien en este estudio se encontró que el mayor efecto sobre la *performance* de girasol se dio con el tratamiento rolado, que redujo significativamente las variables analizadas en planta, no se puede descartar que el glifosato incida negativamente sobre los parámetros de crecimiento vegetal tal como ha sido observado en otros estudios bajo condiciones controladas, ya que el control sin CCI (BP) establecido en este ensayo incluyó el uso de glifosato. Debido a las limitaciones del método mecánico (rolado) empleado, es necesario considerar soluciones alternativas en un manejo donde se quiera excluir el uso de herbicidas. Entre otras, se sugiere la búsqueda de especies de CCI que puedan ser controladas eficientemente con labores mecánicas en la zona, probar otros métodos mecánicos, así como el uso combinado de glifosato + rolado para disminuir la dosis aplicada de herbicida y por consiguiente reducir el impacto ambiental.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo general de esta tesis fue evaluar el impacto de la finalización mecánica y química de un CCI, sobre la diversidad microbiana en la rizosfera de avena y los potenciales efectos sobre el cultivo sucesor. Para ello, se realizó un ensayo con plantas de avena como CCI bajo condiciones controladas y otro a campo durante dos campañas agrícolas, en la localidad de Napostá al SOB. A lo largo de esta tesis se utilizó la metagenómica (secuenciación de amplicones del ARNr 16S) y la qPCR, con la cual se analizaron tanto marcadores filogenéticos (gen ARNr 16S) como funcionales (genes *amoA*, *nirS*, *nirK* y *phnJ*), así como también técnicas cualitativas para caracterizar los principales grupos funcionales químicos (ATR-FTIR) y cuantitativas (contenido de fenoles totales, P, APN) presentes en suelo rizosférico y exudados radicales de avena. Esto permitió avanzar en el conocimiento de lo que ocurre en la microbiota de la rizosfera de CCI luego de la desecación química y el control mecánico, las potenciales consecuencias ecológicas y para el cultivo sucesor.

Los resultados de esta tesis muestran que los métodos de finalización afectaron el microbioma rizosférico del CCI, lo cual incidió sobre el desarrollo y la estructura de la comunidad rizosférica del cultivo sucesor. Las diferencias se presentaron tanto a nivel fisiológico como en la abundancia de grupos específicos de microorganismos (BOA y AOA), e incluso a nivel de composición de la comunidad, y estarían relacionadas con diferencias en los exudados radicales. En este estudio, en condiciones controladas, se encontraron diferencias en el perfil de exudación radical de avena (FTIR) y en el contenido de fenoles y fósforo total en los exudados entre los métodos DQ y CM. La composición de la comunidad bacteriana rizosférica se vio afectada por el manejo del CCI con la potencial modificación de los procesos del suelo mediados por los microorganismos, tanto los benéficos como los perjudiciales para las funciones del agroecosistema. En general, los géneros que se vieron afectados negativamente por la DQ en la rizosfera de avena y en la de girasol han sido identificados como PGPR por otros autores. Por otro lado, entre las bacterias que aumentaron en abundancia se encuentran patógenos de planta, controladores biológicos, bacterias con capacidad de metabolizar compuestos orgánicos complejos, fenólicos, HAP, metales pesados y herbicidas. Si bien esto sugiere que el CCI finalizado por DQ podría actuar como “puente verde” transmitiendo patógenos al cultivo de girasol y afectando la habilidad de las PGPR para suprimir estos patógenos, esto no se vio reflejado sobre la *performance* de girasol en las variables estudiadas. Sin embargo, en este estudio no se evaluaron los efectos sobre la producción de aquenios y contenido de aceite, parámetros que podrían haber sido afectados por los residuos de glifosato en las raíces remanentes del CCI, por lo que deberían ser considerados en futuras investigaciones. Por otra parte, el control mecánico (corte o rolado) favoreció a ciertos géneros con función PGPR en la rizosfera de avena y de girasol. Sin embargo, los

resultados obtenidos de la *performance* de girasol demostraron que el rolado no serían una buena alternativa al uso de herbicidas en esta región. Esto estaría indicando que los beneficios asociados a los CCI podrían ser contrarrestados por los métodos usados para finalizarlos. Sería necesario complementar los estudios metagenómicos realizados en esta tesis con análisis del metatranscriptoma. La metatranscriptómica ofrece una perspectiva más informativa en comparación con la metagenómica, ya que permite estudiar la diversidad de genes activos en determinado momento en la comunidad microbiana, para cuantificar sus niveles de expresión y funciones. Esto permitiría tener un panorama más completo del efecto de los métodos utilizados para finalizar los CCI sobre el microbioma rizosférico. A su vez, sería importante conocer cómo se ven afectadas otras comunidades rizosféricas como los HMA y las *Archaea* y otras vías metabólicas de degradación del glifosato, lo que implicaría cuantificar, por ejemplo, otros genes de la vía del AMPA (*gox*, *thiO*).

Asimismo, sería importante considerar soluciones alternativas para el control mecánico de los CCI para superar sus limitaciones, evaluando el uso de otras herramientas (ejemplo, arado pie de pato, *undercutter*), especies de CCI que puedan ser controladas eficientemente con labores mecánicas en la zona y distintos momentos de terminación del CCI. En este sentido, resulta necesario identificar las estrategias de manejo de CCI para mejorar la sustentabilidad de los sistemas agrícolas en la región. Para ello, sería esencial establecer redes de ensayos con CCI en distintas localidades del SOB, con un manejo en común que se sostengan en el largo plazo y cuyos resultados puedan ser ampliamente difundidos entre productores, incentivando su adopción.

ANEXO**Anexo I****Tabla 1.** Protocolo de qPCR para la cuantificación del número de copias del gen *phnJ*.

Gen	<i>phnJ</i>
Reacción	
Volumen final	15 μ l
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (2x, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU)	7,5 μ l
Cebador directo y reverso	1,35 μ l
ADN	1 μ l de ADN (~1-10 ng μ l ⁻¹)
Agua bidestilada	3,8 μ l
Programa	Preincubación: 95°C, 5 min, 1 ciclo
	Amplificación: 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 35 ciclos
	Análisis de las curvas de fusión: 65°C-95°C
Curva estándar	10 ⁷ -10 ² copias
Referencia	Morales <i>et al.</i> , (2020)

Tabla 2. Protocolo de qPCR para la cuantificación del número de copias de los genes ARNr 16S, *amoA*, *nirK* y *nirS*.

Genes Reacción	ARNr 16S (<i>Bacteria</i>)	ARNr 16S (<i>Archaea</i>)	<i>amoA</i> (AOA)	<i>amoA</i> (BOA)	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>
Volumen final	15 μ l					
PCR iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x, Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU)	7,5 μ l					
Cebador directo (F) y reverso (R) (μ l)	0,3	0,6	0,9	0,45 F y 0,9 R	0,45	0,75
ADN (μ l)	1 μ l de ADN (\sim 1-10 ng μ l ⁻¹)					
Agua bidestilada (μ l)	5,9	5,3	4,7	5,19	5,6	5
Programa:	Preincubación: 95°C, 5 min, 1 ciclo					
Amplificación	95°C 15 s, 53°C 30 s, 72°C 45 s, 35 ciclos	95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 45 s, 40 ciclos	95°C 20 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 40 ciclos	95°C 20 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 40 ciclos	95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 45 s, 40 ciclos	95°C 15 s, 60°C 20 s, 72°C 45 s, 40 ciclos
	Análisis de las curvas de fusión: 65°C-95°C					
Curva estándar	10 ⁷ -10 ³ copias	10 ⁶ -10 ³ copias	10 ⁷ -10 ³ copias	10 ⁶ -10 ² copias	10 ⁷ -10 ² copias	10 ⁷ -10 ³ copias
Referencia	Zabaloy <i>et al.</i> , (2015)	Allegrini <i>et al.</i> , (2019)	Zabaloy <i>et al.</i> , (2017)	Zabaloy <i>et al.</i> , (2015)	Kandeler <i>et al.</i> , (2006)	

Anexo II

Protocolo Fluidigm®

Las muestras de ADN fueron cuantificadas usando el kit High Sensitivity DNA en un Qubit (Life Technologies), y posteriormente diluidas hasta obtener $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. La mezcla de reacción para la amplificación fue preparada utilizando el kit Roche High Fidelity Fast Start y el reactivo de carga 20x Access Array de acuerdo con los protocolos Fluidigm (San Francisco, CA, USA). Brevemente, para cada muestra se combinaron los siguientes reactivos: $0,5 \mu\text{l}$ de $10\times$ FastStart Reaction Buffer sin MgCl_2 , $0,9 \mu\text{l}$ de 25 mM MgCl_2 , $0,25 \mu\text{l}$ de DMSO, $0,1 \mu\text{l}$ de solución equimolar de una mezcla de nucleótidos (10 mM cada uno), $0,05 \mu\text{l}$ de FastStart High Fidelity Enzyme Blend ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$), $0,25 \mu\text{l}$ de $20\times$ Access Array Loading Reagent, $1,95 \mu\text{l}$ de agua y $1 \mu\text{l}$ de ADN previamente diluido. Esta mezcla de reacción ($4 \mu\text{l}$) y una solución equimolar conteniendo los cebadores directo y reverso ($4 \mu\text{l}$ de $1 \mu\text{M}$ cada uno), se cargaron en las respectivas entradas de un IFC Fluidigm LP 48.48 previamente preparado. El IFC se colocó en un sistema Juno® para la obtención de productos amplificados por PCR utilizando las siguientes condiciones: 50°C , 2 min (1 ciclo), 70°C , 20 min (1 ciclo), 95°C , 10 min (1 ciclo), 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C , 1 min (10 ciclos), 95°C 15 s, 80°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C , 1 min (2 ciclos), 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C , 1 min (8 ciclos), 95°C 15 s, 80°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C , 1 min (2 ciclos), 95°C 15 s, 55°C 30s, 72°C , 1 min (8 ciclos), 95°C 15 s, 80°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C , 1 min (5 ciclos). Posteriormente, se realizó una segunda ronda de amplificación con Illumina *linkers* CS1 (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACA) y CS2 (5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT) y *barcodes* o *index* (10 nt). Para la segunda ronda de PCR se preparó una mezcla de reacción conteniendo: $2,0 \mu\text{l}$ de $10\times$ FastStart Reaction Buffer sin MgCl_2 , $3,6 \mu\text{l}$ de 25 mM MgCl_2 , $1,0 \mu\text{l}$ de DMSO, $0,4 \mu\text{l}$ de de solución equimolar de una mezcla de nucleótidos (10 mM cada uno), $0,2 \mu\text{l}$ de FastStart High Fidelity Enzyme Blend ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$), $7,8 \mu\text{l}$ de Agua, $1 \mu\text{l}$ del producto diluido (1:100) de la primera ronda de PCR y $4 \mu\text{l}$ de adaptadores y *barcodes*. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 95°C , 10 min (1 ciclo), 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 1min (14 ciclos) y 72°C 3 min de extensión final.

Los productos de PCR fueron cuantificados utilizando un fluorómetro Qubit. A continuación, se combinaron las muestras en cantidades iguales según la concentración del producto. Los productos combinados se seleccionaron por tamaño en un gel de agarosa 2% (Life Technologies) y se extrajo una porción del gel aislado con un kit de extracción de gel (Qiagen). Los productos seleccionados por tamaños fueron corridos sobre un Agilent Bioanalyzer para confirmar el perfil apropiado y determinar el tamaño promedio.

Anexo III

Índices de diversidad α

Se calcularon los índices de heterogeneidad de Shannon (H') y el recíproco del índice de Simpson ($1/\lambda$), la riqueza [número de ASVs observados (S') e índice de Chao-1] y la equitatividad de cada muestra. Para el cálculo de las métricas de diversidad α se utilizó el paquete *vegan* v2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2020) del software estadístico R v3.6.1 dentro de RStudio (Versión 1.2.1335). La tabla de ASVs fue rarefaccionada (función *rarefy*) según la muestra con el menor número de secuencias y se obtuvieron las curvas de rarefacción (función *rarecurve*), previo al cálculo de las métricas de diversidad.

El índice de Chao-1 o S_{est} (Chao, 1984) estima la riqueza total de una comunidad (S), basado en los ASVs más raros de la misma:

$$S_{est} = S' + [(f_1)^2 / (2 f_2)]$$

Donde f_1 corresponde al número de ASVs singletones (solo una secuencia) y f_2 al de dobletones (solo dos secuencias).

El índice de Shannon se basa en la incertidumbre de poder predecir con exactitud a cuál de las especies de una muestra pertenece un determinado individuo seleccionado al azar. En este caso, de acuerdo al paquete estadístico utilizado (*vegan*), el índice de Shannon H' se calculó utilizando el logaritmo natural (\ln) (Oksanen, 2020):

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \quad (i=1 \text{ a } S', S' = \text{número de ASVs en la muestra})$$

Donde p_i =abundancia relativa del i -ésimo ASV.

El índice H' puede variar entre el valor mínimo $H'=0$ (cuando la muestra contenga solo una especie) y el valor máximo (H'_{max}) cuando todas las especies (S') se encuentren igualmente representadas ($H'_{max} = \ln S'$).

El índice de Simpson (λ), en cambio, se relaciona con la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar dentro de una muestra pertenezcan a la misma especie. El recíproco de este índice ($1/\lambda$) es sensible a las especies dominantes o mejor representadas (Peet, 1974) y puede variar entre 1 y el número de ASVs (S'). El índice de Simpson se calcula de la siguiente manera:

$$\lambda = \sum [n_i (n_i - 1)] / [N(N-1)]$$

Donde n_i =abundancia del i -ésimo ASV y N =tamaño de la muestra.

Dentro de los índices de equitatividad, uno de los evaluados fue el índice de equitatividad de Shannon (E_H), definido como la relación entre H' y H'_{max} , $E_H = H' / H'_{max}$. Este índice es uno de los más utilizados y puede variar entre 0 y 1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abiala, M. A., Odebode, A. C., Hsu, S. F., Blackwood, C. B. (2015). Phytobeneficial properties of bacteria isolated from the rhizosphere of maize in southwestern Nigerian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4736–4743. <https://doi.org/10.1128/AEM.00570-15>
- Abou-Shanab, R. A. I., van Berkum, P., Angle, J. S., Delorme, T. A., Chaney, R. L., Ghazlan, H. A., Ghanem, K., Moawad, H. (2010). Characterization of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale* by 16S rRNA gene sequence analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 101–108. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0148-6>
- Achouak, W., Abrouk, D., Guyonnet, J., Barakat, M., Ortet, P., Simon, L., Lerondelle, C., Heulin, T., El Zahar Haichar, F. (2019). Plant hosts control microbial denitrification activity. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(3), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz021>
- Acosta-Martínez, V., Dowd, S. E., Bell, C. W., Lascano, R., Booker, J. D., Zobeck, T. M., Upchurch, D. R. (2010). Microbial community composition as affected by dryland cropping systems and tillage in a semiarid sandy soil. *Diversity*, 2(6), 910–931. <https://doi.org/10.3390/d2060910>
- Agaras, B. C., Scandiani, M., Luque, A., Fernández, L., Farina, F., Carmona, M., Gally, M., Romero, A., Wall, L., Valverde, C. (2015). Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. *Biological Control*, 90, 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.07.003>
- Ahsan, N., Shimizu, M. (2021). *Lysinibacillus* species: Their potential as effective bioremediation, biostimulant, and biocontrol agents. *Reviews in Agricultural Science*, 9, 103–116. https://doi.org/10.7831/ras.9.0_103
- Ai, C., Liang, G., Sun, J., Wang, X., He, P., Zhou, W. (2013). Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.08.003>
- Aitchison, J. *The Statistical Analysis of Compositional Data*. (1986). London-New York: Chapman and Hall.
- Akinola, S. A., Ayangbenro, A. S., Babalola, O. O. (2021). Metagenomic insight into the community structure of maize-rhizosphere bacteria as predicted by different environmental factors and their functioning within plant proximity. *Microorganisms*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071419>
- Al-Rajab, A. J., Amellal, S., Schiavon, M. (2008). Sorption and leaching of 14C-glyphosate in agricultural soils. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 419–428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/agro:2008014>
- Alahdadi, I., Oraki, H., Khajani, F. P. (2011). Effect of water stress on yield and yield components of bread wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6504–6509. <https://doi.org/10.5897/AJB11.035>
- Albuquerque, L., França, L., Rainey, F. A., Schumann, P., Nobre, M. F., Da Costa, M. S. (2011). *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of Gaiellaceae fam. nov. and Gaiellales ord. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(8), 595–599. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.07.001>
- Aldana, A., Carioni, D. (2001). Influencia de la posición topográfica sobre propiedades edáficas de suelos en el predio de la UNS en Altos del Palihue. Trabajo final de tesina. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. Disponible en: <https://catalogoagronomia.uns.edu.ar>
- Allegrini, M., Gomez, E. del V., Smalla, K., Zabaloy, M. C. (2019). Suppression treatment differentially influences the microbial community and the occurrence of broad host range plasmids in the rhizosphere of the model cover crop *Avena sativa* L. *PLoS ONE*, 14(10), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223600>
- Alvarez, R., Steinbach, H. S., De Paepe, J. L. (2017). Cover crop effects on soils and subsequent crops in the pampas: A meta-analysis. *Soil and Tillage Research*, 170, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.still.2017.03.005>

- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F., Heulin, T. (1998). Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3740–3747. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3740-3747.1998>
- Amiotti, N.M., Blanco, M.C., Schmidt, E., Díaz, S. (2010). Variabilidad espacial de los suelos y su relación con el paisaje. En: Paoloni JD (ed). Ambiente y recursos naturales del partido de Bahía Blanca. Pp. 129-173. EdiUNS. Bahía Blanca, Buenos Aires.
- Amir, R. M., Anjum, F. M., Khan, M. I., Khan, M. R., Pasha, I., Nadeem, M. (2013). Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 1018–1023. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0424-y>
- Anderson, M., Habiger, J. (2012). Characterization and identification of productivity-associated rhizobacteria in wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4434–4446. <https://doi.org/10.1128/AEM.07466-11>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32–46. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9993.2001.01070.x>
- Anza, M., Epelde, L., Artetxe, U., Becerril, J. M., Garbisu, C. (2016). Control of *Cortaderia selloana* with a glyphosate-based herbicide led to a short-term stimulation of soil fungal communities. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(11), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5649-9>
- Araujo, R., Dunlap, C., Barnett, S., Franco, C. M. M. (2019). Decoding Wheat Endosphere–Rhizosphere Microbiomes in Rhizoctonia solani–Infested Soils Challenged by Streptomyces Biocontrol Agents. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01038>
- Aristilde, L., Reed, M. L., Wilkes, R. A., Youngster, T., Kukurugya, M. A., Katz, V., Sasaki, C. R. S. (2017). Glyphosate-Induced Specific and Widespread Perturbations in the Metabolome of Soil Pseudomonas Species. *Frontiers in Environmental Science*, 5(34), 0–13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00034>
- Arshad, M. A., Coen, G. M. (1992). Characterization of soil quality: Physical and chemical criteria. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7, 25–31. <https://doi.org/10.1017/S0889189300004410>
- Ashford, D. L., Reeves, D. W. (2003). Use of a mechanical roller-crimper as an alternative kill method for cover crops. *American Journal of Alternative Agriculture*, 18(1), 37–45. <https://doi.org/10.1079/AJAA2003037>
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
- Badri, D. V., Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 32(6), 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Bahraminejad, S., Asenstorfer, R. E., Riley, I. T., Schultz, C. J. (2008). Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots of oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Phytopathology*, 156(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01309.x>
- Bai, Y., Wang, G., Cheng, Y., Shi, P., Yang, C., Yang, H., Xu, Z. (2019). Soil acidification in continuously cropped tobacco alters bacterial community structure and diversity via the accumulation of phenolic acids. *Scientific Reports*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48611-5>
- Baigorria, T., Alvarez, C., Cazorla, C., Belluccini, P., Aimetta, B., Pegoraro, V., Boccolini, M., Conde, B., Faggioli, V., Ortiz, J. (2019). Impacto ambiental y rolado de cultivos de cobertura en producción de soja bajo siembra directa. *Ciencia del Suelo*, 37(2), 355–366. Disponible online en: <http://www.suelos.org.ar/publicaciones/Volumen37n2/13-Pag%20355-366%20%23474.pdf>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Baldani, J. I., Rouws, L., Cruz, L. M., Olivares, F. L., Schmid, M., Hartmann, A. (2014). The Family *Oxalobacteraceae*. En: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds)

- The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_291
- Balkcom, K. S., Duzy, L. M., Arriaga, F. J., Delaney, D. P., Watts, D. B. (2018). Fertilizer management for a rye cover crop to enhance biomass production. *Agronomy Journal*, 110(4), 1233–1242. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.08.0505>
- Balota, E. L., Calegari, A., Nakatani, A. S., Coyne, M. S. (2014). Benefits of winter cover crops and no-tillage for microbial parameters in a Brazilian Oxisol: A long-term study. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 197, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.07.010>
- Bannert, A., Kleineidam, K., Wissing, L., Mueller-Niggemann, C., Vogelsang, V., Welzl, G., Cao, Z., Schloter, M. (2011). Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in a tidal wetland versus paddy soils cultivated for different time periods. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6109–6116. <https://doi.org/10.1128/AEM.01751-10>
- Bano, S., Wu, X., Zhang, X. (2021). Towards sustainable agriculture: rhizosphere microbiome engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(19), 7141–7160. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11555-w>
- Baraibar, B., Hunter, M. C., Schipanski, M. E., Hamilton, A., Mortensen, D. A. (2018). Weed Suppression in Cover Crop Monocultures and Mixtures. *Weed Science*, 66(1), 121–133. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.59>
- Bardon, C., Piola, F., Bellvert, F., Haichar, F. el Z., Comte, G., Meiffren, G., Pommier, T., Puijalón, S., Tsafack, N., Poly, F. (2014). Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites. *New Phytologist*, 204(3), 620–630. <https://doi.org/10.1111/nph.12944>
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*, 64(2), 269–285. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.03.004>
- Basche, A. D., Miguez, F. E., Kaspar, T. C., Castellano, M. J. (2014). Do cover crops increase or decrease nitrous oxide emissions? a meta-analysis. *Journal of Soil and Water Conservation*, 69(6), 471–482. <https://doi.org/10.2489/jswc.69.6.471>
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., García, C. (2008). Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147(3–4), 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.08.007>
- Beauchemin, N. J., Furnholm, T., Lavenus, J., Svistoonoff, S., Doumas, P., Bogusz, D., Laplaze, L., Tisa, L. S. (2011). Casuarina Root Exudates Alter the Physiology, Surface Properties, and Plant Infectivity of *Frankia* sp. Strain Ccl3. *Applied and Environmental Microbiology*, 575–580. <https://doi.org/10.1128/AEM.06183-11>
- Behera, P., Mohapatra, M., Adhya, T. K., Suar, M., Pattnaik, A. K., Rastogi, G. (2018). Structural and metabolic diversity of rhizosphere microbial communities of *Phragmites karka* in a tropical coastal lagoon. *Applied Soil Ecology*, 125, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.023>
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berg, G., Marten, P., Ballin, G. (1996). *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research*, 151(1), 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80051-6](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80051-6)
- Bergmann, G. T., Bates, S. T., Eilers, K. G., Lauber, C. L., Caporaso, J. G., Walters, W. A., Knight, R., Fierer, N. (2011). The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(7), 1450–1455. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.012>
- Bevivino, A., Paganin, P., Bacci, G., Florio, A., Pellicer, M. S., Papaleo, M. C., Mengoni, A., Ledda, L., Fani, R., Benedetti, A., Dalmastri, C. (2014). Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105515>
- Blanco-Canqui, H., Shaver, T. M., Lindquist, J. L., Shapiro, C. A., Elmore, R. W., Francis, C. A., Hergert, G. W. (2015). Cover crops and ecosystem services: Insights from studies in temperate soils.

- Agronomy Journal*, 107(6), 2449–2474. <https://doi.org/10.2134/agronj15.0086>
- Bøhn, T., Millstone, E. (2019). The Introduction of Thousands of Tonnes of Glyphosate in the food Chain—An Evaluation of Glyphosate Tolerant Soybeans. *Foods*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120669>
- Bolsa de Cereales de Buenos Aires. (2022). Relevamiento de tecnología agrícola aplicada de la Bolsa de Cereales. Campaña 2021/22. <https://www.bolsadecereales.com/estimaciones-informes>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Borggaard, O. K., Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review. *Pest Management Science*, 64(4), 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>
- Borowik, A., Wyszowska, J., Kucharski, J., Baćmaga, M., Tomkiel, M. (2017). Response of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbuthylazine, mesotrione, and S-metolachlor. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1910–1925. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7919-z>
- Bott, S., Tesfamariam, T., Kania, A., Eman, B., Aslan, N., Römheld, V., Neumann, G. (2011). Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation. *Plant and Soil*, 342(1–2), 249–263. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0689-3>
- Bowles, T. M., Jackson, L. E., Loeher, M., Cavagnaro, T. R. (2016). Ecological intensification and arbuscular mycorrhizas: a meta-analysis of tillage and cover crop effects. *Journal of Applied Ecology*, 54(6), 1785–1793. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12815>
- Bray, R. H., Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59(1), 39–46. <https://doi.org/doi:10.1097/00010694-194501000-00006>
- Buckley, D. H., Huangyutitham, V., Nelson, T. A., Rumberger, A., Thies, J. E. (2006). Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4522–4531. <https://doi.org/10.1128/AEM.00149-06>
- Buckley, D. H., Schmidt, T. M. (2001). Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(1), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00122-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00122-7)
- Buczolits, S., & Busse, H. (2015). *Hymenobacter*. In DeVos P, Dedysh S, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey F, Trujillo ME, Bowman JP, Brown DR, Glöckner FO, Oren A, Paster BJ, Wade W, Ward N, Busse H-J, Reysenbach AL (ed), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00267>
- Bunaciu, A. A., Aboul-enein, H. Y., Fleschin, S. (2012). FTIR Spectrophotometric Methods Used for Antioxidant Activity Assay in Medicinal Plants. *Applied Spectroscopy Reviews*, 47(4), 245–255. <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.645260>
- Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., de Goede, R., Fleskens, L., Geissen, V., Kuyper, T. W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J. W., Brussaard, L. (2018). Soil quality – A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105–125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.030>
- Burkett-Cadena, M., Sastoque, L., Cadena, J., Dunlap, C. A. (2019). *Lysinibacillus capsici* sp. nov, isolated from the rhizosphere of a pepper plant. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112(8), 1161–1167. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01248-w>
- Busse, H., Wieser, M. (2018). *Pseudarthrobacter*. In DeVos P, Dedysh S, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey F, Trujillo ME, Bowman JP, Brown DR, Glöckner FO, Oren A, Paster BJ, Wade W, Ward N, Busse H-J, Reysenbach AL (ed), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01438>
- Calderón, F. J., Nielsen, D., Acosta-Martínez, V., Vigil, M. F., Lyon, D. (2016). Cover Crop and Irrigation Effects on Soil Microbial Communities and Enzymes in Semiarid Agroecosystems of the Central Great Plains of North America. *Pedosphere*, 26(2), 192–205. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60034-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60034-0)

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campiglia, E., Caporali, F., Radicetti, E., Mancinelli, R. (2010). Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth.) cover crop residue management for improving weed control and yield in no-tillage tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) production. *European Journal of Agronomy*, 33(2), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2010.04.001>
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N. (2009). Acid tolerance response induced in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 and effect on its survival ability in acidic environments. *Microbiological Research*, 164(4), 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.02.007>
- Capstaff, N. M., Domoney, C., Miller, A. J. (2021). Real-time monitoring of rhizosphere nitrate fluctuations under crops following defoliation. *Plant Methods*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00713-w>
- Carey, C. J., Dove, N. C., Beman, J. M., Hart, S. C., Aronson, E. L. (2016). Meta-analysis reveals ammonia-oxidizing bacteria respond more strongly to nitrogen addition than ammonia-oxidizing archaea. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.014>
- Carey, C. J., Michael Beman, J., Eviner, V. T., Malmstrom, C. M., Hart, S. C. (2015). Soil microbial community structure is unaltered by plant invasion, vegetation clipping, and nitrogen fertilization in experimental semi-arid grasslands. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00466>
- Carrión, V. J., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., De Hollander, M., Ruiz-Buck, D., Mendes, L. W., van Ijcken, W. F. J., Gomez-Exposito, R., Elsayed, S. S., Mohanraju, P., Arifah, A., van der Oost, J., Paulson, J. N., Mendes, R., van Wezel, G. P., Medema, M. H., Raaijmakers, J. M. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*, 366, 606–612. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9285>
- Castaño, F. D. (2018). The sunflower crop in Argentina: Past, present and potential Future. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 25(1), 1–10. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017043>
- Castellano-Hinojosa, A., Strauss, S. L. (2020). Impact of cover crops on the soil microbiome of tree crops. *Microorganisms*, 8(3), 328. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030328>
- Chao, A. (1984). Nonparametric-estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11, 265–270.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal*, 8(4), 790–803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>
- Chavarría, D. N., Pérez-Brandan, C., Serri, D. L., Meriles, J. M., Restovich, S. B., Andriulo, A. E., Jacquelin, L., Vargas-Gil, S. (2018). Response of soil microbial communities to agroecological versus conventional systems of extensive agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 264, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.05.008>
- Chavarría, D. N., Verdenelli, R. A., Muñoz, E. J., Conforto, C., Restovich, S. B., Andriulo, A. E., Meriles, J. M., Vargas-Gil, S. (2016a). Soil microbial functionality in response to the inclusion of cover crop mixtures in agricultural systems. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(2). <https://doi.org/10.5424/sjar/2016142-8395>
- Chavarría, D. N., Verdenelli, R. A., Serri, D. L., Restovich, S. B., Andriulo, A. E., Meriles, J. M., Vargas-Gil, S. (2016b). Effect of cover crops on microbial community structure and related enzyme activities and macronutrient availability. *European Journal of Soil Biology*, 76, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.07.002>
- Chen, C., Xin, K., Liu, H., Cheng, J., Shen, X., Wang, Y., Zhang, L. (2017). *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. *Scientific Reports*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep41564>
- Chen, G., Weil, R. R., Hill, R. L. (2014). Effects of compaction and cover crops on soil least limiting

- water range and air permeability. *Soil and Tillage Research*, 136, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.still.2013.09.004>
- Chen, J. (2021). GUniFrac: Generalized UniFrac Distances and Distance-Based Multivariate Analysis of Variance. Paquete de R version 1.2. Disponible online: <https://cran.r-project.org/web/packages/GUniFrac/GUniFrac.pdf>
- Chen, S., Waghmode, T. R., Sun, R., Kuramae, E. E., Hu, C., Liu, B. (2019). Root-associated microbiomes of wheat under the combined effect of plant development and nitrogen fertilization. *Microbiome*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0750-2>
- Chen, Z., Luo, X., Hu, R., Wu, M., Wu, J., Wei, W. (2010). Impact of Long-Term Fertilization on the Composition of Denitrifier Communities Based on Nitrite Reductase Analyses in a Paddy Soil. *Microbial Ecology*, 60(4), 850–861. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9700-z>
- Chin, J. P., McGrath, J. W., Quinn, J. P. (2016). Microbial transformations in phosphonate biosynthesis and catabolism, and their importance in nutrient cycling. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.010>
- Chon, S. U., Kim, Y. M. (2004). Herbicidal potential and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190(2), 145–150. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2004.00088.x>
- Chu, H., Fujii, T., Morimoto, S., Lin, X., Yagi, K. (2008). Population size and specific nitrification potential of soil ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1960–1963. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.006>
- Chung, E. J., Park, T. S., Jeon, C. O., Chung, Y. R. (2012). *Chitinophaga oryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere soil of rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), 3030–3035. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.036442-0>
- Chhetri, G., Kim, I., Kang, M., Kim, J., So, Y., Seo, T. (2021). *Nocardioides baculatus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the rhizosphere of *Tagetes patula*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 71(9). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005012>
- Clua, A., Conti, M., Beltrano, J. (2012). The Effects of Glyphosate on the Growth of Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus*) and Its Interaction with Different Phosphorus Contents in Soil. *Journal of Agricultural Science*, 4(7), 208–218. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n7p208>
- Cordero, J., de Freitas, J. R., Germida, J. J. (2020). Bacterial microbiome associated with the rhizosphere and root interior of crops in Saskatchewan, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(1), 71–85. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0330>
- Couëdel, A., Alletto, L., Kirkegaard, J., Justes, É. (2018). Crucifer glucosinolate production in legume-crucifer cover crop mixtures. *European Journal of Agronomy*, 96, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.02.007>
- Coupland, B. D., Caseley, J. C. (1979). Presence of ¹⁴C activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with ¹⁴C-labelled glyphosate. *New Phytologist*, 83, 17–22.
- Creamer, N. G., Plassman, B., Bennett, M. A., Wood, R. K., Stinner, B. R., Cardina, J. (1995). A method for mechanically killing cover crops to optimize weed suppression. *American Journal of Alternative Agriculture*, 10(4), 157–162. <https://doi.org/10.1017/S0889189300006408>
- Creamer, N. G., Dabney, S. M. (2002). Killing cover crops mechanically: Review of recent literature and assessment of new research results. *American Journal of Alternative Agriculture*, 17(1), 32–40. <https://doi.org/10.1079/ajaa200204>
- Cuartero, J., Özbolat, O., Sánchez-Navarro, V., Egea-Cortines, M., Zornoza, R., Canfora, L., Orrù, L., Pascual, J. A., Vivo, J. M., Ros, M. (2021). Changes in bacterial and fungal soil communities in long-term organic cropping systems. *Agriculture*, 11(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050445>
- Cuhra, M. (2018). Evolution of glyphosate resistance is the rhizosphere microbiome a key factor?. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 18(2), 78–93. <https://doi.org/10.4024/18cu17a.jbpc.18.02>
- Cuhra, M., Bøhn, T., Cuhra, P. (2016). Glyphosate: Too much of a good thing?. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00028>
- Dahal, R. H., Chaudhary, D. K., Kim, D. U., Kim, J. (2021). *Luteolibacter luteus* sp. nov., isolated from

- stream bank soil. *Archives of Microbiology*, 203(1), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02048-x>
- Dai, Y., Liu, R., Zhou, Y., Li, N., Hou, L., Ma, Q., Gao, B. (2020). Fire Phoenix facilitates phytoremediation of PAH-Cd co-contaminated soil through promotion of beneficial rhizosphere bacterial communities. *Environment International*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105421>
- Dal Cortivo, C., Ferrari, M., Visioli, G., Lauro, M., Fornasier, F., Barion, G., Panozzo, A., Vamerali, T. (2020). Effects of Seed-Applied Biofertilizers on Rhizosphere Biodiversity and Growth of Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Field. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00072>
- Damin, V., Franco, H. C. J., Moraes, M. F., Franco, A., Trivelin, P. C. O. (2008). Nitrogen loss in *Brachiaria decumbens* after application of glyphosate or glufosinate-ammonium. *Scientia Agricola*, 65(4), 402–407. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400012>
- Damin, V., Trivelin, P. C. O., Carvalho, S. J. P., Moraes, M. F., & Barbosa, T. G. (2010). Herbicide application increases nitrogen (¹⁵N) exudation and root detachment of *Brachiaria decumbens* Stapf. *Plant Soil*, 334, 511–519. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0402-6>
- Daniel, O., Meier, M. S., Schlatter, J., Frischknecht, P. (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: Ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107(1), 109–114. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s1109>
- Daryanto, S., Fu, B., Wang, L., Jacinthe, P. A., Zhao, W. (2018). Quantitative synthesis on the ecosystem services of cover crops. *Earth-Science Reviews*, 185, 357–373. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2018.06.013>
- Davis, A. S. (2010). Cover-Crop Roller-Crimper Contributes to Weed Management in No-Till Soybean. *Weed Science*, 58(3), 300–309. <https://doi.org/10.1614/ws-d-09-00040.1>
- de Alencar Menezes Júnior, I., Feitosa de Matos, G., Moura de Freitas, K., da Conceição Jesus, E., Rouws, L. F. M. (2019). Occurrence of diverse *Bradyrhizobium* spp. in roots and rhizospheres of two commercial Brazilian sugarcane cultivars. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 759–767. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00090-6>
- de Araujo, A. S. F., Miranda, A. R. L., Sousa, R. S., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., Oliveira, L. M. de S., de Araujo, F. F., Melo, V. M. M., Figueiredo, M. do V. B. (2019). Bacterial community associated with rhizosphere of maize and cowpea in a subsequent cultivation. *Applied Soil Ecology*, 143, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.019>
- de Bertoldi, C., De Leo, M., Braca, A., Ercoli, L. (2009). Bioassay-guided isolation of allelochemicals from *Avena sativa* L.: Allelopathic potential of flavone C-glycosides. *Chemoecology*, 19(3), 169–176. <https://doi.org/10.1007/s00049-009-0019-5>
- de Graaff, M. A., Hornslein, N., Throop, H. L., Kardol, P., van Diepen, L. T. A. (2019). Effects of agricultural intensification on soil biodiversity and implications for ecosystem functioning: A meta-analysis. In Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, 1–44. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.01.001>
- De Leij, F. A. A. M., Whipps, J. M., Lynch, J. M. (1993). The Use of Colony Development for the Characterization of Bacterial Communities in Soil and on Roots. *Microbial Ecology*, 27, 81–97.
- De Leo, G., Carbonell, C. T., Lauric, A., Ross, F., Massigoge, J., Vigna, M., Irastorza, J., Dumrauf, M. (2020). Evaluación de cultivos de servicio en maíces de baja densidad en el Sudoeste Bonaerense semiárido. Disponible online en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/cultivo_de_servicio_en_maiz_baja_densidad_-_bahia_blanca_-_inta_-_aapresid.pdf
- DeBruyn, J. M., Fawaz, M. N., Peacock, A. D., Dunlap, J. R., Nixon, L. T., Cooper, K. E., Radosevich, M. (2013). *Gemmatirosa kalamazoonesis* gen. nov., sp. nov., a member of the rarely-cultivated bacterial phylum Gemmatimonadetes. *Journal of General and Applied Microbiology*, 59(4), 305–312. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.305>
- DeBruyn, J. M., Nixon, L. T., Fawaz, M. N., Johnson, A. M., Radosevich, M. (2011). Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6295–6300. <https://doi.org/10.1128/AEM.05005-11>

- Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G. E. (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicology Reports*, 5, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025>
- Dey, R., Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R. (2012). Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 82(3), 341–352. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0030-4>
- Di Benedetto, N. A., Campaniello, D., Bevilacqua, A., Cataldi, M. P., Sinigaglia, M., Flagella, Z., Corbo, M. R. (2019). Isolation, screening, and characterization of plant-growth-promoting bacteria from durum wheat rhizosphere to improve N and P nutrient use efficiency. *Microorganisms*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110541>
- Di, H. J., Cameron, K. C., Shen, J. P., Winefield, C. S., Ocallaghan, M., Bowatte, S., He, J. Z. (2009). Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience*, 2(9), 621–624. <https://doi.org/10.1038/ngeo613>
- Díaz-Zorita, M., Duarte, G. A., Plante, E. (2003). El Cultivo de Girasol. *ASAGIR – Asociación Argentina de Girasol*.
- Dimitrijević, S., Pavlović, M., Maksimović, S., Ristić, M., Filipović, V., Antonović, D., Dimitrijević-Branković, S. (2018). Plant growth-promoting bacteria elevate the nutritional and functional properties of black cumin and flaxseed fixed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1584–1590. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8631>
- Dohrmann, A. B., Tebbe, C. C. (2005). Effect of elevated tropospheric ozone on the structure of bacterial communities inhabiting the rhizosphere of herbaceous plants native to Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7750–7758. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7750-7758.2005>
- Doran, J. W., Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability : managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 3–11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00067-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6)
- Dorn, B., Stadler, M., Van Der Heijden, M., Streit, B. (2013). Regulation of cover crops and weeds using a roll-chopper for herbicide reduction in no-tillage winter wheat. *Soil and Tillage Research*, 134, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.still.2013.07.014>
- Dourado, M. N., Camargo Neves, A. A., Santos, D. S., Araújo, W. L. (2015). Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic methylobacterium spp. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/909016>
- Druille, M., Cabello, M. N., Omacini, M., Golluscio, R. A. (2013). Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 64, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.007>
- Drury, C. F., Hart, S. C., Yang, X. M. (2006). Nitrification Techniques for Soils. *In Soil Sampling and Methods of Analysis. Part. 2. Eds. M. R. Carter and E. G. Gregorich* (Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group. Canadian Society of Soil Science), 495–515.
- Du, H. J., Zhang, Y. Q., Liu, H. Y., Su, J., Wei, Y. Z., Ma, B. P., Guo, B. L., Yu, L. Y. (2013). *Allonocardiopsis opalescens* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder Streptosporangineae, from the surface-sterilized fruit of a medicinal plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 900–904. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.041491-0>
- Duan, Y., Chen, L., Li, Y., Wang, Q., Zhang, C., Ma, D., Li, J., Zhang, J. (2021). N, P and straw return influence the accrual of organic carbon fractions and microbial traits in a Mollisol. *Geoderma*, 403, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115373>
- Duke, S. O., Hoagland, R. E., Elmore, C. D. (1980). Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds V.L-aminooxy-phenylpropionic acid and glyphosate effects on phenylalanine ammonia-lyase in soybean seedlings. *Plant Physiology*, 65, 17–21. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076438>
- Duke, S. O., Hoagland, R. E. (1978). Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds II. Influence on soluble hydroxyphenolic compound, free amino acid and soluble protein levels in dark-grown maize roots. *Plant Science Letters*, 11(4), 185–190. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(78\)90205-5](https://doi.org/10.1016/0304-4211(78)90205-5)

- Duke, S. O., Lydon, J., Koskinen, W. C., Moorman, T. B., Chaney, R. L., Hammerschmidt, R. (2012). Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10375–10397. <https://doi.org/10.1021/jf302436u>
- Duke, S. O., Rimando, A. M., Reddy, K. N., Cizdziel, J. V., Bellaloui, N., Shaw, D. R., Williams, M. M., Maul, J. E. (2018). Lack of transgene and glyphosate effects on yield, and mineral and amino acid content of glyphosate-resistant soybean. *Pest Management Science*, 74(5), 1166–1173. <https://doi.org/10.1002/ps.4625>
- Egle, K., Wilhelm, R., Egle, K., Wilhelm, R. (2003). Exudation of low molecular weight organic acids by *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. and *Lupinus luteus* L. as affected by phosphorus supply. *Agronomie*, 23, 511–518. <https://doi.org/10.1051/agro>
- Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., Fry, J. C. (2003). Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3223–3230. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3223-3230.2003>
- Erreguerena, I. A., Formento, A. N., Couretot, L. A. (2020). En los cultivos de cobertura ¿Se “esconden” los patógenos que afectan a los principales cultivos agrícolas? Disponible online en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/cultivos_de_cobertura_y_patogenos_de_principales_cultivos_agricolas_2020_0.pdf
- Evtushenko, L. I., Krausova, V. I. (2015). *Aeromicrobium*. In DeVos P, Dedysh S, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey F, Trujillo ME, Bowman JP, Brown DR, Glöckner FO, Oren A, Paster BJ, Wade W, Ward N, Busse H-J, Reysenbach AL (ed), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00156>
- Farenhorst, A., Papiernik, S. K., Saiyed, I., Messing, P., Stephens, K. D., Schumacher, J. A., Lobb, D. A., Li, S., Lindstrom, M. J., Schumacher, T. E. (2008). Herbicide Sorption Coefficients in Relation to Soil Properties and Terrain Attributes on a Cultivated Prairie. *Journal of Environmental Quality*, 37(3), 1201–1208. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0109>
- Farh, M. E. A., Kim, Y. J., Singh, P., Hoang, V. A., Yang, D. C. (2016). *Phenylobacterium panacis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rusty mountain ginseng. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(7), 2691–2696. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001109>
- Feng, D., Soric, A., Boutin, O. (2020). Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review. *Science of the Total Environment*, 742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140559>
- Feng, Y., Shen, D., Song, W. (2006). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 938–945. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02843.x>
- Fernández, R., Alvarez, C. O., Eggmann Owen, E. R., Quiroga, A. R. (2020). Efecto del uso de cultivo de cobertura en una secuencia de soja continua en la región semiárida pampeana. *Semiárida*, 30(2), 37–49. [https://doi.org/10.19137/semiarida.2020\(02\).37-49](https://doi.org/10.19137/semiarida.2020(02).37-49)
- Fernández, R., Quiroga, A., Noellemeyer, E. (2012). Cultivos de cobertura, ¿una alternativa viable para la región semiárida Pampeana? *Ciencia Del Suelo*, 30(2), 137–150.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4117–4120. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>
- Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME Journal*, 6(5), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.159>
- Foesel, B. U., Geppert, A., Rohde, M., Overmann, J. (2016). *Parviterribacter kavangonensis* gen. Nov., sp. nov. and *Parviterribacter multiflagellatus* sp. nov., Novel members of Parviterribacteraceae fam. nov. within the order Solirubrobacterales, and emended descriptions of the classes Thermoleophilia and Rubrobact. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 652–665. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000770>
- Foesel, B. U., Rohde, M., Overmann, J. (2013). *Blastocatella fastidiosa* gen. nov., sp. nov., isolated

- from semiarid savanna soil - The first described species of Acidobacteria subdivision 4. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.11.002>
- Frasier, I., Noellemeyer, E., Figuerola, E., Erijman, L., Permingeat, H., Quiroga, A. (2016). High quality residues from cover crops favor changes in microbial community and enhance C and N sequestration. *Global Ecology and Conservation*, 6, 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.03.009>
- Fu, S., Cheng, W. (2004). Defoliation affects rhizosphere respiration and rhizosphere priming effect on decomposition of soil organic matter under a sunflower species: *Helianthus annuus*. *Plant and Soil*, 263(2), 345–352. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000047745.30929.32>
- García-González, I., Quemada, M., Gabriel, J. L., Alonso-Ayuso, M., Hontoria, C. (2018). Legacy of eight-year cover cropping on mycorrhizae, soil, and plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 181(6), 818–826. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700591>
- García-González, I., Quemada, M., Gabriel, J. L., Hontoria, C. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal activity responses to winter cover crops in a sunflower and maize cropping system. *Applied Soil Ecology*, 102, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.006>
- García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdà, A., Campoy, M., Zornoza, R., Bárcenas, G., Caravaca, F. (2010). Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research*, 109(2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.still.2010.05.005>
- Gardner, J. G. (2016). Polysaccharide degradation systems of the saprophytic bacterium *Cellvibrio japonicus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2068-6>
- Gautam, A., Sekaran, U., Guzman, J., Kovács, P., Hernandez, J. L. G., Kumar, S. (2020). Responses of soil microbial community structure and enzymatic activities to long-term application of mineral fertilizer and beef manure. *Environmental and Sustainability Indicators*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2020.100073>
- Giancotti, P. R. F., Nepomuceno, M. P., Alves, P. L. C. A., Yamauti, M. S. (2014). Ideal desiccation periods of *Urochloa ruziziensis* for a no-till sunflower crop. *International Journal of Plant Production*, 9(1), 39–50. <https://doi.org/10.22069/ijpp.2015.1865>
- Gimsing, A. L., Borggaard, O. K. (2002a). Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. *Clay Minerals*, 37(3), 509–515. <https://doi.org/10.1180/0009855023730049>
- Gimsing, Anne Louise, Borggaard, O. K. (2002b). Effect of phosphate on the adsorption of glyphosate on soils, clay minerals and oxides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 82(89), 545–552. <https://doi.org/10.1080/0306731021000062964>
- Glaser, K., Hackl, E., Inselsbacher, E., Strauss, J., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., Sessitsch, A. (2010). Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 575–591. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00970.x>
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., Egozcue, J. J. (2017). Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>
- Gloor, G. B., Reid, G. (2016). Compositional analysis: A valid approach to analyze microbiome high-throughput sequencing data. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(8), 692–703. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0821>
- Gomes, M. P., Maccario, S., Lucotte, M., Labrecque, M., Juneau, P. (2015). Consequences of phosphate application on glyphosate uptake by roots: Impacts for environmental management practices. *Science of the Total Environment*, 537, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.054>
- Gonzalez-Quiñones, V., Stockdale, E. A., Banning, N. C., Hoyle, F. C., Sawada, Y., Wherrett, A. D., Jones, D. L., Murphy, D. V. (2011). Soil microbial biomass interpretation and consideration for soil monitoring. *Soil Research*, 49(4), 287–304. <https://doi.org/10.1071/SR10203>
- Graf, D. R. H., Jones, C. M., Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the

- denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. *PLoS ONE*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114118>
- Green, P. N. (2015). *Methylobacterium*. In DeVos P, Dedysh S, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey F, Trujillo ME, Bowman JP, Brown DR, Glöckner FO, Oren A, Paster BJ, Wade W, Ward N, Busse H-J, Reysenbach AL (ed), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00830>
- Gu, Y., Wang, Y., Lu, S., Xiang, Q., Yu, X., Zhao, K., Zou, L., Chen, Q., Tu, S., Zhang, X. (2017). Long-term fertilization structures bacterial and archaeal communities along soil depth gradient in a paddy soil. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01516>
- Guitian, R., Bardgett, R. D. (2000). Plant and soil microbial responses to defoliation in temperate semi-natural grassland. *Plant and Soil*, 220, 271–277. <https://doi.org/10.1023/a:1004787710886>
- Guo, X., Zhou, X., Hale, L., Yuan, M., Feng, J., Ning, D., Shi, Z., Qin, Y., Liu, F., Wu, L., He, Z., Van Nostrand, J. D., Liu, X., Luo, Y., Tiedje, J. M., Zhou, J. (2018). Taxonomic and functional responses of soil microbial communities to annual removal of aboveground plant biomass. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00954>
- Gutiérrez Avella, M. D., Ortiz García, C. A., Cisneros, A. M. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología*, 1–5. http://cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
- Haas, D., Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307–319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Hallama, M., Pekrun, C., Lambers, H., Kandeler, E. (2019). Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant and Soil*, 434, 7–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3810-7>
- Hallama, M., Pekrun, C., Pilz, S., Jarosch, K. A., Fraç, M., Uksa, M., Marhan, S., Kandeler, E. (2021). Interactions between cover crops and soil microorganisms increase phosphorus availability in conservation agriculture. *Plant and Soil*, 463(1–2), 307–328. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04897-x>
- Hamilton, E. W., Frank, D. A., Hinchey, P. M., Murray, T. R. (2008). Defoliation induces root exudation and triggers positive rhizospheric feedbacks in a temperate grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2865–2873. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.08.007>
- Hammerschmidt, R. (2018). How glyphosate affects plant disease development: it is more than enhanced susceptibility. *Pest Management Science*, 74(5), 1054–1063. <https://doi.org/10.1002/ps.4521>
- Hamonts, K., Clough, T. J., Stewart, A., Clinton, P. W., Richardson, A. E., Wakelin, S. A., O'Callaghan, M., Condon, L. M. (2013). Effect of nitrogen and waterlogging on denitrifier gene abundance, community structure and activity in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3), 568–584. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12015>
- Hara, S., Morikawa, T., Wasai, S., Kasahara, Y., Koshiba, T., Yamazaki, K., Fujiwara, T., Tokunaga, T., Minamisawa, K. (2019). Identification of nitrogen-fixing bradyrhizobium associated with roots of field-grown sorghum by metagenome and proteome analyses. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00407>
- Haramoto, E. R., Gallandt, E. R. (2004). Brassica cover cropping for weed management: A review. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 19(04), 187–198. <https://doi.org/10.1079/rafs200490>
- Hargreaves, S. K., Williams, R. J., Hofmockel, K. S. (2015). Environmental filtering of microbial communities in agricultural soil shifts with crop growth. *PLoS ONE*, 10(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134345>
- Hart, M. M., Powell, J. R., Gulden, R. H., Dunfield, K. E., Peter Pauls, K., Swanton, C. J., Klironomos, J. N., Antunes, P. M., Koch, A. M., Trevors, J. T. (2009). Separating the effect of crop from herbicide on soil microbial communities in glyphosate-resistant corn. *Pedobiologia*, 52(4), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2008.10.005>
- Hart, S. C., Stark, J. M., Davidson, E. A., Firestone, M. K. (1994). Nitrogen Mineralization, Immobilization, and Nitrification. En *Methods of Soil Analysis, Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*. Eds. R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomeo, D. Bezdicek, S. Smith, A.

- Tabatabai and A. Wollum (Madison, WI: Soil Science Society of America), 985–1018. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c42>
- Hartwig, N. L., Ammon, H. U. (2002). Cover crops and living mulches. *Weed Science*, 50(6), 688–699. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0688:aiacca\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0688:aiacca]2.0.co;2)
- Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.002>
- Hernández Guijarro, K., De Gerónimo, E., Erijman, L. (2021). Glyphosate Biodegradation Potential in Soil Based on Glycine Oxidase Gene (thiO) from Bradyrhizobium. *Current Microbiology*, 78(5), 1991–2000. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02467-z>
- Hervé, M. (2021). RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics. Paquete de R versión 0.9–80. Disponible online: <https://cran.r-project.org/web/packages/RVAideMemoire/RVAideMemoire.pdf>
- Hiera Da Cruz, L., De Santana, H., Zaia, C. T. B. V., Zaia, D. A. M. (2007). Adsorption of glyphosate on clays and soils from Paraná State: Effect of pH and competitive adsorption of phosphate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 385–394. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000300004>
- Hink, L., Gubry-Rangin, C., Nicol, G. W., Prosser, J. I. (2018). The consequences of niche and physiological differentiation of archaeal and bacterial ammonia oxidisers for nitrous oxide emissions. *ISME Journal*, 12(4), 1084–1093. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0025-5>
- Hoagland, R. E., Duke, S. O., Elmore, C. D. (1979). Effects of Glyphosate on Metabolism of Phenolic Compounds: III. Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity, Free Amino Acids, Soluble Protein and Hydroxyphenolic Compounds in Axes of Dark-Grown Soybeans. *Physiologia Plantarum*, 46(4), 357–366. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb02633.x>
- Hoang, V. A., Kim, Y. J., Nguyen, N. L., Yang, D. C. (2013). *Hymenobacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 661–666. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.039719-0>
- Hobbs, P. R., Sayre, K., Gupta, R. (2008). The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 543–555. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2169>
- Hokka, V., Mikola, J., Vestberg, M., Setälä, H. (2004). Interactive effects of defoliation and an AM fungus on plants and soil organisms in experimental legume-grass communities. *Oikos*, 106(1), 73–84. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12963.x>
- Hontoria, C., García-González, I., Quemada, M., Roldán, A., Alguacil, M. M. (2019). The cover crop determines the AMF community composition in soil and in roots of maize after a ten-year continuous crop rotation. *Science of the Total Environment*, 660, 913–922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.095>
- Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kypides, N. C., Woyke, T., Göker, M. (2020). Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>
- Hoshino, Y. T., Morimoto, S., Hayatsu, M., Nagaoka, K., Suzuki, C., Karasawa, T., Takenaka, M., Akiyama, H. (2011). Effect of soil type and fertilizer management on archaeal community in upland field soils. *Microbes and Environments*, 26(4), 307–316. <https://doi.org/10.1264/j sme2.ME11131>
- Hossain, S., Bergkvist, G., Glinwood, R., Berglund, K., Mårtensson, A., Hallin, S., Persson, P. (2015). Brassicaceae cover crops reduce *Aphanomyces* pea root rot without suppressing genetic potential of microbial nitrogen cycling. *Plant and Soil*, 392(1–2), 227–238. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2456-y>
- Hou, J., Liu, W., Wang, B., Wang, Q., Luo, Y., Franks, A. E. (2015). PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response. *Chemosphere*, 138, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.025>
- Hou, Q., Wang, W., Yang, Y., Hu, J., Bian, C., Jin, L., Li, G., Xiong, X. (2020). Rhizosphere microbial diversity and community dynamics during potato cultivation. *European Journal of Soil Biology*,

- 98(March). <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103176>
- Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., Jochimsen, B. (2014). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 176–197. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00040-13>
- Hryniewicz, K., Baum, C., Leinweber, P. (2010). Density, metabolic activity, and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(5), 747–756. <https://doi.org/10.1002/jpln.200900286>
- Hu, J., Jin, V. L., Konkel, J. Y. M., Schaeffer, S. M., Schneider, L. G., Debruyne, J. M. (2021). Soil Health Management Enhances Microbial Nitrogen Cycling Capacity and Activity. *MSphere* 6, 6(1), 1–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mSphere.01237-20>.
- Huang, C., Han, X., Yang, Z., Chen, Y., Rengel, Z. (2020). Sowing Methods Influence Soil Bacterial Diversity and Community Composition in a Winter Wheat-Summer Maize Rotation System on the Loess Plateau. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00192>
- Huang, J., Su, Z., Xu, Y. (2005). The evolution of microbial phosphonate degradative pathways. *Journal of Molecular Evolution*, 61(5), 682–690. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0349-4>
- Huang, L., Riggins, C. W., Rodríguez-Zas, S., Zabaloy, M. C., Villamil, M. B. (2019). Long-term N fertilization imbalances potential N acquisition and transformations by soil microbes. *Science of the Total Environment*, 691, 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.154>
- Hünninghaus, M., Dibbern, D., Kramer, S., Koller, R., Pausch, J., Schloter-Hai, B., Urich, T., Kandeler, E., Bonkowski, M., Lueders, T. (2019). Disentangling carbon flow across microbial kingdoms in the rhizosphere of maize. *Soil Biology and Biochemistry*, 134, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.03.007>
- Imparato, V., Santos, S. S., Johansen, A., Geisen, S., Winding, A. (2016). Stimulation of bacteria and protists in rhizosphere of glyphosate-treated barley. *Applied Soil Ecology*, 98, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.09.007>
- locoli, G. A., Pieroni, O. I., Gómez, M. A., Alvarez, B., Galantini, J. A., Alejandro, G., Pieroni, O. I., Gómez, M. A. (2017). Rapid characterisation of agro-industrial effluents for environmental fate by UV – visible and infrared spectroscopy from fractions obtained by centrifugation. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1354993>
- Islam, M. R., Sultana, T., Joe, M. M., Yim, W., Cho, J. C., Sa, T. (2013). Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12), 1004–1015. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200141>
- Itoh, T., Yamanoi, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Takashina, T. (2011). *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(6), 1281–1285. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023044-0>
- Jang, S. J., Mallory-smith, C., Kuk, Y. I. (2020). Inhibition of wheat growth planted after glyphosate application to weeds. *Weed Science*, 68, 373–381. <https://doi.org/10.1017/wsc.2020.34>
- Jang, Y. H., Kim, S. J., Tamura, T., Hamada, M., Weon, H. Y., Suzuki, K. I., Kwon, S. W., Kim, W. G. (2013). *Lysinimonas soli* gen. nov., sp. nov., isolated from soil, and reclassification of *Leifsonia kribbensis* Dastager et al. 2009 as *Lysinimonas kribbensis* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1403–1410. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.042945-0>
- Jansa, J., Wiemken, A., Frossard, E. (2006). The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Geological Society Special Publication*, 266, 89–115. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2006.266.01.08>
- Jenkins, M., Locke, M., Reddy, K., McChesney, D. S., Steinriede, R. (2017). Glyphosate Applications, Glyphosate Resistant Corn, and Tillage on Nitrification Rates and Distribution of Nitrifying Microbial Communities. *Soil Science Society of America Journal*, 81(6), 1371–1380. <https://doi.org/10.2136/sssaj2017.02.0063>
- Jia, X., Wang, L., Zhao, Y., Zhang, C., Li, X. (2020). Soil microbial communities in the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. after being exposed to elevated atmospheric CO₂ and cadmium for 4 years. *Applied Soil Ecology*, 154(126). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103661>

- Jiang, J., Song, Z., Yang, X., Mao, Z., Nie, X., Guo, H., Peng, X. (2017). Microbial community analysis of apple rhizosphere around Bohai Gulf. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08398-9>
- Jiang, P. X., Wang, H. S., Zhang, C., Lou, K., Xing, X. H. (2010). Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1077–1088. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2375-z>
- Jin, L., Lee, H. G., Kim, S. G., Lee, K. C., Ahn, C. Y., Oh, H. M. (2014). *Hymenobacter ruber* sp. nov., isolated from grass soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 979–983. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057976-0>
- Jinal, H. N., Amaresan, N., Sankaranarayanan, A. (2020). *Methylobacterium*. Capítulo 24, in *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 509–519. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00024-1>
- Jochimsen, B., Lolle, S., McSorley, F. R., Nabi, M., Stougaard, J., Zechel, D. L., Hove-Jensen, B. (2011). Five phosphonate operon gene products as components of a multi-subunit complex of the carbon-phosphorus lyase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11393–11398. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104922108>
- Jones, C. M., Spor, A., Brennan, F. P., Breuil, M. C., Bru, D., Lemanceau, P., Griffiths, B., Hallin, S., Philippot, L. (2014). Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. *Nature Climate Change*, 4(9), 801–805. <https://doi.org/10.1038/nclimate2301>
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1955–1966. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn146>
- Jung, H. M., Lee, J. S., Bae, H. M., Yi, T. H., Kim, S. Y., Lee, S. T., Im, W. T. (2011). *Inquilingus ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 201–204. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018689-0>
- Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R. Z., El-Enshasy, H. A., Dailin, D. J., Suriani, N. L. (2020). Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>
- Kämpfer, P., Martin, K., McInroy, J. A., Glaeser, S. P. (2015a). *Novosphingobium gossypii* sp. nov., isolated from *Gossypium hirsutum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(9), 2831–2837. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000339>
- Kämpfer, P., Martin, K., McInroy, J. A., Glaeser, S. P. (2015b). Proposal of *Novosphingobium rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 195–200. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070375-0>
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschierko, D., Bru, D., Philippot, L. (2006). Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957–5962. <https://doi.org/10.1128/AEM.00439-06>
- Kanissery, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O., Alferez, F. (2019). Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. *Plants*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/plants8110499>
- Kavamura, V. N., Robinson, R. J., Hayat, R., Clark, I. M., Hughes, D., Rossmann, M., Hirsch, P. R., Mendes, R., Mauchline, T. H. (2019). Land Management and Microbial Seed Load Effect on Rhizosphere and Endosphere Bacterial Community Assembly in Wheat. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02625>
- Kennedy, A. C., Smith, K. L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170(1), 75–86. <https://doi.org/10.1007/BF02183056>
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. In *The Prokaryotes*. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1
- Kim, J. J., Alkawally, M., Brady, A. L., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. S., Dunfield, P. F. (2013). *Chryseolinea serpens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 654–660. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.039404-0>
- Kim, K. H., Im, W. T., Lee, S. T. (2008). *Hymenobacter soli* sp. nov., isolated from grass soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 941–945.

- <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64447-0>
- Kim, N., Zabaloy, M. C., Guan, K., Villamil, M. B. (2020). Do cover crops benefit soil microbiome? A meta-analysis of current research. *Soil Biology and Biochemistry*, 142, 107701. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107701>
- Kim, S. J., Cho, H., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Joa, J. H., Hong, S. B., Seok, S. J., Kim, J. S., Kwon, S. W. (2017). *Chitinophaga rhizosphaerae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of a tomato plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3435–3439. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002134>
- Kobae, Y. (2019). Dynamic Phosphate Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Under Field Conditions. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 159. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00159>
- Kremer, R. J., Means, N. E., Kim, S. (2005). Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85(15), 1165–1174. <https://doi.org/10.1080/03067310500273146>
- Krishnan, R., Menon, R. R., Likhitha, Busse, H. J., Tanaka, N., Krishnamurthi, S., Rameshkumar, N. (2017). *Novosphingobium pokkali* sp nov, a novel rhizosphere-associated bacterium with plant beneficial properties isolated from saline-tolerant pokkali rice. *Research in Microbiology*, 168(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.09.001>
- Krueger, E. S., Ochsner, T. E., Porter, P. M., Baker, J. M. (2011). Winter rye cover crop management influences on soil water, soil nitrate, and corn development. *Agronomy Journal*, 103(2), 316–323. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0327>
- Krüger, H. R., Zilio, J. P., Frolla, F. D. (2019). Criterios Básicos para la Producción Agropecuaria Sustentable en el Sudoeste Bonaerense. Disponible online en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_bordenave_-_criterios_basicos_prod_agropecuaria.pdf
- Kulichevskaya, I. S., Naumoff, D. G., Miroshnikov, K. K., Ivanova, A. A., Philippov, D. A., Hakobyan, A., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. S., Liesack, W., Dedysh, S. N. (2020). *Limnoglobus roseus* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater planctomycete with a giant genome from the family gemmataceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 1240–1249. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003904>
- Kulikova, N. A., Zhelezova, A. D., Voropanov, M. G., Filippova, O. I., Plyushchenko, I. V., Rodin, I. A. (2020). Monoammonium Phosphate Effects on Glyphosate in Soils: Mobilization, Phytotoxicity, and Alteration of the Microbial Community. *Eurasian Soil Science*, 53(6), 787–797. <https://doi.org/10.1134/S106422932006006X>
- Kumar, A., Dubey, A. (2020). Rhizosphere microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. *Journal of Advanced Research*, 24, 337–352. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.04.014>
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E. (2015). Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- Laitinen, P., Rämö, S., Siimes, K. (2007). Glyphosate translocation from plants to soil – does this constitute a significant proportion of residues in soil?. *Plant Soil*, 300, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9387-1>
- Lanoue, A., Burlat, V., Henkes, G. J., Koch, I., Schurr, U., Röse, U. S. R. (2010). De novo biosynthesis of defense root exudates in response to Fusarium attack in barley. *New Phytologist*, 185(2), 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03066.x>
- Lazcano, C., Boyd, E., Holmes, G., Hewavitharana, S., Pasulka, A., Ivors, K. (2021). The rhizosphere microbiome plays a role in the resistance to soil-borne pathogens and nutrient uptake of strawberry cultivars under field conditions. *Scientific Reports*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82768-2>
- Lee, D. W., Lee, S. Y., Yoon, J. H., Lee, S. D. (2011). *Nocardioides ultimimeridianus* sp. nov. and *Nocardioides maradonensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8), 1933–1937. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022715-0>
- Lee, J. C., Whang, K. S. (2014). *Chitinophaga ginsengihumi* sp. nov., isolated from soil of ginseng rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2599–2604.

- <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062612-0>
- Lee, K. C. Y., Dunfield, P. F., Stott, M. B. (2014). The Phylum Armatimonadetes. *E. Rosenberg et Al. (Eds.), The Prokaryotes – Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_388
- Lee, S. A., Kim, Y., Sang, M. K., Song, J., Kwon, S. W., Weon, H. Y. (2019). *Chryseolinea soli* sp. nov., isolated from soil. *Journal of Microbiology*, 57(2), 122–126. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8562-4>
- Lee, Soon Dong, Kim, Y.-J., Kim, I. S. (2019). *Erythrobacter suaedae* sp. nov., isolated from a rhizosphere mudflat of a halophyte (*Suaeda japonica*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(10), 3287–3292. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003625>
- Lehmann, J., Bossio, D. A., Kögel-Knabner, I., Rillig, M. C. (2020). The concept and future prospects of soil health. *Nature Reviews Earth and Environment*, 1(10), 544–553. <https://doi.org/10.1038/s43017-020-0080-8>
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C., Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442, 806–809. <https://doi.org/10.1038/nature04983>
- Levičnik-Höfferle, Š., Nicol, G. W., Ausec, L., Mandić-Mulec, I., Prosser, J. I. (2012). Stimulation of thaumarchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(1), 114–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01275.x>
- Li, D., Jiang, H., Han, L., Li, Y., Zhao, J., Jiang, S., Wang, X., Xiang, W. (2018a). *Lentzea terrae* sp. nov., isolated from soil and an emended description of *Lentzea soli*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(11), 3528–3533. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003024>
- Li, D., Zheng, W., Zhao, J., Han, L., Zhao, X., Jiang, H., Wang, X., Xiang, W. (2018b). *Lentzea soli* sp. Nov., an actinomycete isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(5), 1496–1501. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002698>
- Li, P. P., Zhang, S. Q., Li, F., Zhang, Y. T., Han, Y. L. (2020). Long term combined fertilization and soil aggregate size on the denitrification and community of denitrifiers. *Applied Soil Ecology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103718>
- Li, Xiangzhen, Rui, J., Mao, Y., Yannarell, A., Mackie, R. (2014). Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Li, Xiaogang, Zhang, Y., Ding, C., Jia, Z., He, Z., Zhang, T., Wang, X. (2015). Declined soil suppressiveness to *Fusarium oxysporum* by rhizosphere microflora of cotton in soil sickness. *Biology and Fertility of Soils*, 51(8), 935–946. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1038-8>
- Li, Xiaomin, Zhang, L., Ding, Y., Gao, Y., Ruan, J., Huang, Y. (2012). *Lentzea jiangxiensis* sp. nov., isolated from acidic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(10), 2342–2346. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033795-0>
- Li, Yan-Qiong, Li, L., Chen, W., Duan, Y. Q., Nimaichand, S., Guo, J. W., Gao, R., Li, W. J. (2015). *Novosphingobium endophyticum* sp. nov. isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Archives of Microbiology*, 197(7), 911–918. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1124-1>
- Li, Yanan, Li, J., Wang, D., Wang, G., Yue, X., Kong, X., Young, L., Huang, W. (2020). Denitrifying Microbial Community Structure and bamA Gene Diversity of Phenol Degraders in Soil Contaminated from the Coking Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(3), 966–981. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03144-5>
- Li, Yang, Chi, J., Ao, J., Gao, X., Liu, X., Sun, Y., Zhu, W. (2021). Effects of Different Continuous Cropping Years on Bacterial Community and Diversity of Cucumber Rhizosphere Soil in Solar-Greenhouse. *Current Microbiology*, 78(6), 2380–2390. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02485-x>
- Lian, T. X., Wang, G. H., Yu, Z. H., Li, Y. S., Liu, X. B., Zhang, S. Q., Herbert, S. J., Jin, J. (2017). Bacterial communities incorporating plant-derived carbon in the soybean rhizosphere in Mollisols that differ in soil organic carbon content. *Applied Soil Ecology*, 119, 375–383.

- <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.07.016>
- Liang, S., Grossman, J., Shi, W. (2014). Soil microbial responses to winter legume cover crop management during organic transition. *European Journal of Soil Biology*, 65, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.08.007>
- Lin, S. Y., Hameed, A., Liu, Y. C., Hsu, Y. H., Lai, W. A., Huang, H. I., Young, C. C. (2014a). *Chitinophaga taiwanensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 426–430. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054452-0>
- Lin, S. Y., Hameed, A., Liu, Y. C., Hsu, Y. H., Lai, W. A., Huang, H. I., Young, C. C. (2014b). *Novosphingobium arabidopsis* sp. nov., a DDT-resistant bacterium isolated from the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 594–598. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054460-0>
- Linton, N. F., Ferrari Machado, P. V., Deen, B., Wagner-Riddle, C., Dunfield, K. E. (2020). Long-term diverse rotation alters nitrogen cycling bacterial groups and nitrous oxide emissions after nitrogen fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107917>
- Littell, R. C., Stroup, W. W., Freund, R. J. (2002). “Analysis of variance for balanced data,” in *SAS for Linear Models*. ed. SAS Institute. Fourth ed (Cary, NC: Wiley Series in Probability and Statistics), 87–88.
- Liu, J., Li, X., Jia, Z., Zhang, T., Wang, X. (2017). Effect of benzoic acid on soil microbial communities associated with soilborne peanut diseases. *Applied Soil Ecology*, 110, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.001>
- Liu, Y., Fan, X., Zhang, T., He, W., Song, F. (2020). Effects of the long-term application of atrazine on soil enzyme activity and bacterial community structure in farmlands in China. *Environmental Pollution*, 262, 114264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114264>
- Locke, M. A., Zablutowicz, R. M., Steinriede, R. W., Testa, S., Reddy, K. N. (2013). Conservation Management in Cotton Production: Long-Term Soil Biological, Chemical, and Physical Changes. *Soil Science Society of America Journal*, 77(3), 974–984. <https://doi.org/10.2136/sssaj2012.0325>
- Loiret, F. G., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rodés, P., Rodés, R., Dong, Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 504–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02329.x>
- Lorch, M., Agaras, B., García-Parisi, P., Druille, M., Omacini, M., Valverde, C. (2021). Repeated annual application of glyphosate reduces the abundance and alters the community structure of soil culturable pseudomonads in a temperate grassland. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 319. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107503>
- Lupwayi, N. Z., Fernandez, M. R., Kanashiro, D. A., Petri, R. M. (2021). Profiles of wheat rhizobacterial communities in response to repeated glyphosate applications, crop rotation, and tillage. 101, 157–167. <https://dx.doi.org/10.1139/cjss-2020-0008>
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Saravanan, V. S., Hari, K., Lee, K. C., Lee, J. S. (2013). *Duganella sacchari* sp. nov. and *Duganella radialis* sp. nov., two novel species isolated from rhizosphere of field-grown sugar cane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1126–1131. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.040584-0>
- Maiti, P. K., Mandal, S. (2020). *Lentzea indica* sp. nov., a novel actinobacteria isolated from Indian Himalayan-soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(10), 1411–1423. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01449-8>
- Marchiosi, R., Lucio Ferrarese, M. de L., Bonini, E. A., Fernandes, N. G., Ferro, A. P., Ferrarese-Filho, O. (2009). Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.09.003>
- Marinari, S., Mancinelli, R., Brunetti, P., Campiglia, E. (2015). Soil quality, microbial functions and tomato yield under cover crop mulching in the Mediterranean environment. *Soil and Tillage Research*, 145, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.still.2014.08.002>
- Martinez, A., Tyson, G. W., Delong, E. F. (2010). Widespread known and novel phosphonate utilization pathways in marine bacteria revealed by functional screening and metagenomic analyses.

- Environmental Microbiology*, 12(1), 222–238. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02062.x>
- Martinez, D. A., Loening, U. E., Graham, M. C. (2018). Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: a review. *Environmental Sciences Europe*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0131-7>
- Mbuthia, L. W., Acosta-Martínez, V., DeBryun, J., Schaeffer, S., Tyler, D., Odoi, E., Mpheshea, M., Walker, F., Eash, N. (2015). Long term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.016>
- McDaniel, M. D., Tiemann, L. K., Grandy, A. S. (2014). Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. *Ecological Applications*, 24(3), 560–570. <https://doi.org/10.1890/13-0616.1>
- McGrath, J. W., Chin, J. P., Quinn, J. P. (2013). Organophosphonates revealed: New insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 412–419. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3011>
- Mendonca, C. M., Reed, M. L., Kukurugya, M. A., Aristilde, L. (2019). Adverse Metabolic Outcomes in Soil Pseudomonas Species Exposed to Polyethoxylated Tallow Amine and Glyphosate. *Environmental Science and Technology Letters*, 6(8), 448–455. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.9b00363>
- Meng, D., Li, J., Liu, T., Liu, Y., Yan, M., Hu, J., Li, X., Liu, X., Liang, Y., Liu, H., Yin, H. (2019). Effects of redox potential on soil cadmium solubility: Insight into microbial community. *Journal of Environmental Sciences*, 75, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.03.032>
- Miguez, F. E., Bollero, G. A. (2005). Review of corn yield response under winter cover cropping systems using meta-analytic methods. *Crop Science*, 45(6), 2318–2329. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0014>
- Mijangos, I., Becerril, J. M., Albizu, I., Epelde, L., Garbisu, C. (2009). Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(3), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.12.009>
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(4), 465–478. <https://doi.org/10.13080/z-a.2015.102.060>
- Miller, E. S., Woese, C. R., Brenner, S. (1991). Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 363–368. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-363>
- Min, K., Freeman, C., Kang, H., Choi, S. U. (2015). The Regulation by Phenolic Compounds of Soil Organic Matter Dynamics under a Changing Environment. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/825098>
- Mirsky, S. B., Curran, W. S., Mortensen, D. A., Ryan, M. R., Shumway, D. L. (2009). Control of cereal rye with a roller/crimper as influenced by cover crop phenology. *Agronomy Journal*, 101(6), 1589–1596. <https://doi.org/10.2134/agronj2009.0130>
- Mishra, A., Chauhan, P. S., Chaudhry, V., Tripathi, M., Nautiyal, C. S. (2011). Rhizosphere competent *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(3), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9596-8>
- Mitter, E. K., de Freitas, J. R., Germida, J. J. (2017). Bacterial root microbiome of plants growing in oil sands reclamation covers. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00849>
- Miville, D., Leroux, G. D. (2018). Rolled winter rye-hairy vetch cover crops for weed control in no-till pumpkin. *Weed Technology*, 32(3), 251–259. <https://doi.org/10.1017/wet.2018.9>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., et al. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>

- Mohr, K. I., Garcia, R. O., Gerth, K., Irschik, H., Müller, R. (2012). *Sandaracinus amylolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading soil myxobacterium, and description of Sandaracinaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(5), 1191–1198. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.033696-0>
- Morales, M. E., Allegrini, M., Basualdo, J., Villamil, M. B., Zabaloy, M. C. (2020a). Primer design to assess bacterial degradation of glyphosate and other phosphonates. *Journal of Microbiological Methods*, 169, 105814. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105814>
- Morales, M. E., Iocoli, G. A., Basualdo, J., Allegrini, M., Gomez, E., Villamil, M. B., Zabaloy, M. C. (2020b). La desecación química de avena afecta a los microorganismos implicados en el ciclo del N. *Actas del XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Corrientes, octubre 2020. Pág. 279
- Mukumbareza, C., Muchaonyerwa, P., Chiduzza, C. (2016). Bicultures of oat (*Avena sativa* L.) and grazing vetch (*Vicia dasycarpa* L.) cover crops increase contents of carbon pools and activities of selected enzymes in a loam soil under warm temperate conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62(5–6), 447–455. <https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1206833>
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinninghe Damsté, J. S., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Müller, A., Daims, H., Wagner, M., Head, I. M. (2011). Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16771–16776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106427108>
- Myrold, D. D., Posavatz, N. R. (2007). Potential importance of bacteria and fungi in nitrate assimilation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1737–1743. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.033>
- Navarrete, A. A., Soares, T., Rossetto, R., van Veen, J. A., Tsai, S. M., Kuramae, E. E. (2015). Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(3), 741–752. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0530-3>
- Neumann, G., Kohls, S., Landsberg, E., Stock-Oliveira Souza, K., Yamada, T., Römheld, V. (2006). Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *Journal of Plant Diseases and Protection, Supplement*, 969(20), 963–969.
- Nevins, C. J., Nakatsu, C., Armstrong, S. (2018). Characterization of microbial community response to cover crop residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 127, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.015>
- Newman, M. M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C., Kloepper, J. W. (2016). Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Science of the Total Environment*, 543, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.008>
- Nguyen, P. M., Niemeyer, E. D. (2008). Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8685–8691. <https://doi.org/10.1021/jf801485u>
- Nordstedt, N. P., Jones, M. L. (2020). Isolation of Rhizosphere Bacteria That Improve Quality and Water Stress Tolerance in Greenhouse Ornamentals. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00826>
- Oberholster, T., Vikram, S., Cowan, D., Valverde, A. (2018). Key microbial taxa in the rhizosphere of sorghum and sunflower grown in crop rotation. *Science of the Total Environment*, 624, 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.170>
- Ofek, M., Hadar, Y., Minz, D. (2012). Ecology of root colonizing Massilia (Oxalobacteraceae). *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040117>
- Ohn, J. E., Ten, L. N., Kim, B. O., Cho, Y. J., Jung, H. Y. (2018). *Hymenobacter rufus* sp. Nov., a bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2983–2989. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002934>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). Vegan: Community Ecology Package. Paquete de R versión 2.5–7. Disponible online: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>

- Ortega, J. S. E., Salamone, I. E. G. de. (2017). Dynamics of Rhizosphere Microbial Communities of Cover Crops Dried with Glyphosate. D.P. Singh et al. (eds.), *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-5813-4_2
- Osman, J. R., Fernandes, G., DuBow, M. S. (2017). Bacterial diversity of the rhizosphere and nearby surface soil of rice (*Oryza sativa*) growing in the Camargue (France). *Rhizosphere*, 3, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.03.002>
- Otsuka, S., Suenaga, T., Vu, H. T., Ueda, H., Yokota, A., Senoo, K. (2013). *Brevifollis gellanilyticus* gen. nov., sp. nov., a gellan-gum-degrading bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3075–3078. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048793-0>
- Otte, B. A., Rice, C. P., Davis, B. W., Schomberg, H. H., Mirsky, S. B., Tully, K. L. (2020). Phenolic acids released to soil during cereal rye cover crop decomposition. *Chemoecology*, 30, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s00049-019-00295-z>
- Ou, Y., Penton, C. R., Geisen, S., Shen, Z., Sun, Y., Lv, N., Wang, B., Ruan, Y., Xiong, W., Li, R., Shen, Q. (2019). Deciphering Underlying Drivers of Disease Suppressiveness Against Pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02535>
- Ouyang, Y., Evans, S. E., Friesen, M. L., Tiemann, L. K. (2018). Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: A meta-analysis of field studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 127, 71–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.024>
- Oyarzabal, M., Oesterheld, M. (2009). Phosphorus reserves increase grass regrowth after defoliation. *Oecologia*, 159(4), 717–724. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1263-z>
- Palarea-Albaladejo, J., Martín-Fernández, J. A. (2015). ZCompositions - R package for multivariate imputation of left-censored data under a compositional approach. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 143, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.02.019>
- Panth, M., Baysal-Gurel, F., Simmons, T., Adesso, K. M., Witcher, A. (2020). Impact of winter cover crop usage in soilborne disease suppressiveness in woody ornamental production system. *Agronomy*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy10070995>
- Paradis, E., Schliep, K. (2018). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35, 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.003>
- Pascual, J., García-López, M., Bills, G. F., Genilloud, O. (2016). *Longimicrobium terrae* gen. Nov., sp. Nov., an oligotrophic bacterium of the under-represented phylum gemmatimonadetes isolated through a system of miniaturized diffusion chambers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5), 1976–1985. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000974>
- Paterson, E., Sim, A. (1999). Rhizodeposition and C-partitioning of Lolium perenne in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant and Soil*, 216, 155–164. <https://doi.org/10.1023/a:1004789407065>
- Paterson, E., Sim, A. (2000). Effect of nitrogen supply and defoliation on loss of organic compounds from roots of *Festuca rubra*. *Journal of Experimental Botany*, 51(349), 1449–1457. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.349.1449>
- Paterson, E., Thornton, B., Midwood, A. J., Sim, A. (2005). Defoliation alters the relative contributions of recent and non-recent assimilate to root exudation from *Festuca rubra*. *Plant, Cell and Environment*, 28(12), 1525–1533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01389.x>
- Peet, R. (1974). The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology, Evolutions and Systematic*, 5, 285–307.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pisa, G., Magnani, G. S., Weber, H., Souza, E. M., Faoro, H., Monteiro, R. A., Daros, E., Baura, V., Bessalho, J. P., Pedrosa, F. O., Cruz, L. M. (2011). Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of

- sugarcane rhizosphere soil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(12), 1215–1221. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500148>
- Pittelkow, C. M., Liang, X., Linnquist, B. A., Van Groenigen, L. J., Lee, J., Lundy, M. E., Van Gestel, N., Six, J., Venterea, R. T., Van Kessel, C. (2015). Productivity limits and potentials of the principles of conservation agriculture. *Nature*, 517, 365–368. <https://doi.org/10.1038/nature13809>
- Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., Topp, E., Soulas, G., Martin-Laurent, F. (2003). Isolation and characterisation of *Nocardioide* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters*, 221(1), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00168-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00168-X)
- Pongrac, P., Castillo-michel, H., Reyes-herrera, J., Hancock, R. D., Fischer, S., Kelemen, M., Thompson, J. A., Wright, G., Likar, M., Broadley, M. R., Pelicon, P., White, P. J. (2020). Effect of phosphorus supply on root traits of two *Brassica oleracea* L. genotypes. *BMC Plant Biology*, 20, 368. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02558-2>.
- Poole, P., Ramachandran, V., Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291–303. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1), 63–77. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>
- Qi, G., Chen, S., Ke, L., Ma, G., Zhao, X. (2020). Cover crops restore declining soil properties and suppress bacterial wilt by regulating rhizosphere bacterial communities and improving soil nutrient contents. *Microbiological Research*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126505>
- Qin, W., Amin, S. A., Martens-Habbena, W., Walker, C. B., Urakawa, H., Devol, A. H., Ingalls, A. E., Moffett, J. W., Armbrust, E. V., Stahl, D. A. (2014). Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12504–12509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324115111>
- Qiu, Y. L., Kuang, X. Z., Shi, X. S., Yuan, X. Z., Guo, R. B. (2014). *Paludibacter jiangxiensis* sp. nov., a strictly anaerobic, propionate-producing bacterium isolated from rice paddy field. *Archives of Microbiology*, 196(3), 149–155. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0951-1>
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142–160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Rascovan, N., Carbonetto, B., Perrig, D., Díaz, M., Canciani, W., Abalo, M., Alloati, J., González-Anta, G., Vazquez, M. P. (2016). Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Scientific Reports*, 6(1150), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28084>
- Ratcliff, A. W., Busse, M. D., Shestak, C. J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*. 34, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.03.002>
- Ray, P., Lakshmanan, V., Labbé, J. L., Craven, K. D. (2020). Microbe to Microbiome: A Paradigm Shift in the Application of Microorganisms for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622926>
- Readyhough, T., Neher, D. A., Andrews, T. (2021). Organic amendments alter soil hydrology and belowground microbiome of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081561>
- Reddy, K. N., Koger, C. H. (2004). Live and Killed Hairy Vetch Cover Crop Effects on Weeds and Yield in Glyphosate-Resistant Corn. *Weed Technology*, 18(3), 835–840. <https://doi.org/10.1614/wt-03-228r>
- Reddy, K. N., Zablotowicz, R. M., Locke, M. A., Koger, C. H. (2003). Cover crop, tillage, and herbicide effects on weeds, soil properties, microbial populations, and soybean yield. *Weed Science*, 51(6), 987–994. <https://doi.org/10.1614/P2002-169>
- Reiter, M. S., Reeves, D. W., Burmester, C. H., Torbert, H. A. (2008). Cotton Nitrogen Management in a High-Residue Conservation System: Cover Crop Fertilization. *Soil Science Society of America Journal*, 72(5), 1321–1329. <https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0313>
- Ren, N., Wang, Y., Ye, Y., Zhao, Y., Huang, Y., Fu, W., Chu, X. (2020). Effects of Continuous Nitrogen

- Fertilizer Application on the Diversity and Composition of Rhizosphere Soil Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01948>
- Restovich, S. B., Andriulo, A. E., Portela, S. I. (2012). Introduction of cover crops in a maize-soybean rotation of the Humid Pampas: Effect on nitrogen and water dynamics. *Field Crops Research*, 128, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.12.012>
- ReTAA (2021). Página web (<https://www.bolsadecereales.com/imagenes/retaa/2021-03/220-retaamensualn%C2%BA42-cultivoscobertura.pdf>).
- Ridley, Nicolás. 2012. “Cultivos de cobertura en el sur de Santa Fé: Efectos sobre la eficiencia de barbecho y la porosidad del suelo.” En *Contribuciones de los cultivos de cobertura a la sostenibilidad de los sistemas de producción*, editado por Cristian Álvarez; Alberto Quiroga; Diego Santos; Marcelo Bodrero, 170. La Pampa: INTA.
- Rimski-Korsakov, H., Alvarez, C. R., Lavado, R. S. (2015). Cover crops in the agricultural systems of the Argentine Pampas. *Journal of Soil and Water Conservation*, 70(6), 134A-140A. <https://doi.org/10.2489/jswc.70.6.134A>
- Rochester, I., Peoples, M. (2005). Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: Inputs of fixed N, N fertiliser savings and cotton productivity. *Plant and Soil*, 271, 251–264. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-2621-1>
- Rodrigues, J. J. V., Douglas Worsham, A., Corbin, F. T. (1982). Exudation of Glyphosate from Wheat (*Triticum aestivum*) Plants and Its Effects on Interplanted Corn (*Zea mays*) and Soybeans (*Glycine max*). *Weed Science*, 30, 316–320.
- Rodríguez-Caballero, G., Caravaca, F., Fernández-González, A. J., Alguacil, M. M., Fernández-López, M., Roldán, A. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation mediated changes in rhizosphere bacterial community structure while promoting revegetation in a semiarid ecosystem. *Science of the Total Environment*, 584–585, 838–848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.128>
- Romdhane, S., Spor, A., Buset, H., Falchetto, L., Martin, J., Bizouard, F., Bru, D., Breuil, M. C., Philippot, L., Cordeau, S. (2019). Cover crop management practices rather than composition of cover crop mixtures affect bacterial communities in no-till agroecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01618>
- Ronco, M. G., Ruscitti, M. F., Arango, M. C., Beltrano, J. (2008). Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(4), 497–505. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512413>
- Rosa, S. M., Behrends Kraemer, F., Soria, M. A., Guerrero, L. D., Morrás, H. J. M., Figuerola, E. L. M., Erijman, L. (2014). The influence of soil properties on denitrifying bacterial communities and denitrification potential in no-till production farms under contrasting management in the Argentinean Pampas. *Applied Soil Ecology*, 75, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.11.012>
- Rose, T. J., van Zwieten, L., Claassens, A., Scanlan, C., Rose, M. T. (2018). Phytotoxicity of soilborne glyphosate residues is influenced by the method of phosphorus fertiliser application. *Plant and Soil*, 422, 455–465. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3482-8>
- Rosner, K., Bodner, G., Hage-Ahmed, K., Steinkellner, S. (2018). Long-term soil tillage and cover cropping affected arbuscular mycorrhizal fungi, nutrient concentrations, and yield in sunflower. *Agronomy Journal*, 110(6), 2664–2672. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.03.0177>
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704–4712. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D., Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 514–525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Sá Pereira, E. de, Arroquy, G., Minoldo, G., Galantini, J., Holzmann, A., Ducos, I. (2020). Cultivos de cobertura en ambiente subhúmedo bonaerense: poáceas y leguminosas antecesoras de girasol.

- FAVE- Ciencias Agrarias*, 19(2), 7-21. <https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.9753>
- Saleem, M., Law, A. D., Sahib, M. R., Pervaiz, Z. H., Zhang, Q. (2018). Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome. *Rhizosphere*, 6, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.02.003>
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujč, V. (2021). The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants*, 10, 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>
- Sarathchandra, S. U., Burch, G., Cox, N. R. (1997). Growth patterns of bacterial communities in the rhizoplane and rhizosphere of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in long-term pasture. *Applied Soil Ecology*, 6(3), 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(97\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(97)00015-2)
- SAS Institute Inc. (2018). JMP 14 Predictive and Specialized Modeling. SAS Institute: Cary, NC, USA.
- Schafer, J. R., Hallett, S. G., Johnson, W. G. (2014). Rhizosphere Microbial Community Dynamics in Glyphosate-Treated Susceptible and Resistant Biotypes of Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*). *Weed Science*, 62. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00164.1>
- Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Sharma, S., Wilke, B. M., Matthies, M., Smalla, K., Munch, J. C., Amelung, W., Kaupenjohann, M., Schloter, M., Schleper, C. (2009). Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 11(2), 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01783.x>
- Schlatter, D. C., Yin, C., Hulbert, S., Burke, I. (2017). Impacts of Repeated Glyphosate Use on Wheat-Associated Bacteria Are Small and Depend on Glyphosate Use History. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(22), 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.01354-17>
- Schlatter, D. C., Yin, C., Hulbert, S., Paulitz, T. C. (2020). Core rhizosphere microbiomes of dryland wheat are influenced by location and land use history. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02135-19>
- Schliep, K. P. (2011). Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>.
- Schmidt, C. S., Alavi, M., Cardinale, M., Müller, H., Berg, G. (2012). *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405 T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 48(8), 947–960. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0688-z>
- Schnurer, Y., Persson, P., Nilsson, M., Nordgren, A., Giesler, R. (2006). Effects of surface sorption on microbial degradation of glyphosate. *Environmental Science and Technology*, 40(13), 4145–4150. <https://doi.org/10.1021/es0523744>
- Schoenholtz, S. H., Miegroet, H. Van, Burger, J. A. (2000). A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: Challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management*, 138(1–3), 335–356. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00423-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00423-0)
- Scholberg, J. M. S., Dogliotti, S., Leoni, C., Cherr, C. M., Zotarelli, L., Rossing, W. A. H. (2010). Cover crops for sustainable agrosystems in the Americas. Chapter 2. In E. Lichtfouse (Ed.), *Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic farming* (pp. 23-58). (Sustainable Agriculture Reviews; No. 4). https://doi.org/10.1007/978-90-481-8741-6_2
- Sergeeva, E., Hirkala, D. L. M., Nelson, L. M. (2007). Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. *Plant and Soil*, 297(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9314-5>
- Severino, R., Froufe, H. J. C., Barroso, C., Albuquerque, L., Lobo-da-Cunha, A., da Costa, M. S., Egas, C. (2019). High-quality draft genome sequence of *Gaiella occulta* isolated from a 150 meter deep mineral water borehole and comparison with the genome sequences of other deep-branching lineages of the phylum Actinobacteria. *MicrobiologyOpen*, 8(9), 1–8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.840>
- Shackelford, G. E., Kelsey, R., Dicks, L. V. (2019). Effects of cover crops on multiple ecosystem services: Ten meta-analyses of data from arable farmland in California and the Mediterranean. *Land Use Policy*, 88, 104204. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.104204>
- Shang, S., Yi, Y. (2015). A Greenhouse Assay on the Effect of Applied Urea Amount on the Rhizospheric Soil Bacterial Communities. *Indian Journal of Microbiology*, 55(4), 406–414.

- <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0551-7>
- Shariati, V. J., Malboobi, M. A., Tabrizi, Z., Tavakol, E., Owilia, P., Safari, M. (2017). Comprehensive genomic analysis of a plant growth-promoting rhizobacterium *Pantoea agglomerans* strain P5 /631/208/212/748 /631/208/464 /38/43 /45 article. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15820-9>
- Sharma-Poudyal, D., Paulitz, T. C., Dutoit, L. J. (2016). Timing of glyphosate applications to wheat cover crops to reduce onion stunting caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Disease*, 100(7), 1474–1481. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1234-RE>
- Sharma, G., Khatri, I., Subramanian, S. (2016). Complete Genome of the Starch-Degrading Myxobacteria *Sandaracinus amylolyticus* DSM 53668T. *Genome Biology and Evolution*, 8(8), 2520–2529. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw151>
- Sharma, S. K., Ramesh, A., Sharma, M. P., Joshi, O. P., Govaerts, B., Steenwerth, K. L., Karlen, D. L. (2010). Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality. In *En: Lichtfouse E, editor. Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture. Sustainable Agriculture Reviews 5*. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9513-8_11
- Sharma, S., Kumar, S., Khajuria, A., Ohri, P., Kaur, R., Kaur, R. (2020). Biocontrol potential of chitinases produced by newly isolated *Chitinophaga* sp. S167. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(6), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02864-9>
- Shekoofa, A., Safikhani, S., Raper, T. B., Butler, S. A. (2020). Allelopathic impacts of cover crop species and termination timing on cotton germination and seedling growth. *Agronomy*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/agronomy10050638>
- Shen, F. T., Lin, S. H. (2021). Shifts in bacterial community associated with green manure soybean intercropping and edaphic properties in a tea plantation. *Sustainability*, 13(20). <https://doi.org/10.3390/su132011478>
- Sheng, M., Hamel, C., Fernandez, M. R. (2012). Cropping practices modulate the impact of glyphosate on arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria in agroecosystems of the semiarid prairie. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(8), 990–1001. <https://doi.org/10.1139/W2012-080>
- Shi, S., Nuccio, E., Herman, D. J., Rijkers, R., Estera, K., Li, J., Da Rocha, U. N., He, Z., Pett-Ridge, J., Brodie, E. L., Zhou, J., Firestone, M. (2015). Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons. *MBio*, 6(4), 13–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00746-15>
- Singh, Hardeep, Kandel, T. P., Gowda, P. H., Northup, B. K., Kakani, V. G., Baath, G. S. (2020). Soil N₂O emissions following termination of grass pea and oat cover crop residues with different maturity levels. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 183(6), 734–744. <https://doi.org/10.1002/jpln.202000239>
- Singh, Hina, Yin, C. S. (2016). *Nocardioides flava* sp. nov., isolated from rhizosphere of poppy plant, Republic of Korea. *Archives of Microbiology*, 198(3), 279–285. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1178-0>
- Singh, R., Dubey, A. K. (2018). Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01767>
- Siqueira, J. O., Nair, M. G., Hammerschmidt, R., Safir, G. R., Putnam, A. R. (1991). Critical Reviews in Plant Sciences Significance of phenolic compounds in plant - soil - microbial systems Significance of Phenolic Compounds in Plant-Soil-Microbial Systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(1), 63–121. <https://doi.org/10.1080/07352689109382307>
- Slobodkina, G. B., Merkel, A. Y., Novikov, A. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Slobodkin, A. I. (2020). *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano. *Extremophiles*, 24(1), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01145-0>
- Smith, R. G., Atwood, L. W., Warren, N. D. (2014). Increased productivity of a cover crop mixture is not associated with enhanced agroecosystem services. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097351>
- Smith, R. G., Warren, N. D., Cordeau, S. (2020). Are cover crop mixtures better at suppressing weeds than cover crop monocultures? *Weed Science*, 68(2), 186–194.

<https://doi.org/10.1017/wsc.2020.12>

- Solanki, M. K., Wang, Z., Wang, F. Y., Li, C. N., Gupta, C. L., Singh, R. K., Malviya, M. K., Singh, P., Yang, L. T., Li, Y. R. (2020). Assessment of Diazotrophic Proteobacteria in Sugarcane Rhizosphere When Intercropped With Legumes (Peanut and Soybean) in the Field. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01814>
- Sorokin, D. Y., Lücker, S., Daims, H. (2018). *Nitrolancea*. In: *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*, eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, et al. (Hoboken, NJ: Wiley), 1–6. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01563>
- Sorokin, D. Y., Rakitin, A. L., Gumerov, V. M., Beletsky, A. V., Sinninghe Damsté, J. S., Mardanov, A. V., Ravin, N. V. (2016). Phenotypic and genomic properties of *Chitinispirillum alkaliphilum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic anaerobic chitinolytic bacterium representing a novel class in the phylum fibrobacteres. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00407>
- Sousa, R. M. S., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., Oliveira, L. M. de S., Sousa, A. M. de C. B., Gomes, R. L. F., Lopes, A. C. de A., Araújo, F. F., Melo, V. M. M., Araujo, A. S. F. (2020). Diversity and structure of bacterial community in rhizosphere of lima bean. *Applied Soil Ecology*, 150, 103490. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103490>
- Sravan Kumar, S., Manoj, P., Giridhar, P. (2015). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, chlorophyll content and antioxidant properties of native and defatted foliage of green leafy vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8131–8139. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1959-0>
- Srinivasan, S., Lee, J. J., Park, K. R., Park, S. H., Jung, H. Y., Kim, M. K. (2015). *Hymenobacter terrae* sp. nov., a Bacterium Isolated from Soil. *Current Microbiology*, 70(5), 643–650. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0760-z>
- Stoklosa, A., Hura, T., Stupnicka-Rodzynkiewicz, E., Dabkowska, T., Lepiarczyk, A. (2008). The influence of plant mulches on the content of phenolic compounds in soil and primary weed infestation of maize. *Acta Agrobotanica*, 61(2), 205–219.
- Stopnišek, N., Gubry-Rangin, C., Höfferle, Š., Nicol, G. W., Mandič-Mulec, I., Prosser, J. I. (2010). Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7626–7634. <https://doi.org/10.1128/AEM.00595-10>
- Stosiek, N., Talma, M., Klimek-ochab, M. (2019). Carbon-Phosphorus Lyase — the State of the Art. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(4), 1525–1552. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-019-03161-4> Carbon-Phosphorus
- Stowe, G. L., Osborn, A. (1980). The influence of nitrogen and phosphorus levels on the phytotoxicity of phenolic compounds. *Canadian Journal of Botany*, 58(10), 1149–1153.
- Strauss, S. L., Reardon, C. L., Mazzola, M. (2014). The response of ammonia-oxidizer activity and community structure to fertilizer amendment of orchard soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.016>
- Su, R., Huang, R., Zeng, J., Zhao, D., He, R., Yu, Z., Wu, Q. L. (2021). Rhizosphere-associated nosZII microbial community of *Phragmites australis* and its influence on nitrous oxide emissions in two different regions. *Journal of Soils and Sediments*, 21(10), 3326–3341. <https://doi.org/10.1007/s11368-021-02967-2>
- Suarez, C., Ratering, S., Kramer, I., Schnell, S. (2014). *Cellvibrio diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of salt meadow plants and emended description of the genus *Cellvibrio*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 481–484. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054817-0>
- Subbarao, G. V., Yoshihashi, T., Worthington, M., Nakahara, K., Ando, Y., Sahrawat, K. L., Rao, I. M., Lata, J. C., Kishii, M., Braun, H. J. (2015). Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Science*, 233, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.01.012>
- Suh, M. K., Lee, K. C., Kim, J. S., Han, K. I., Kim, H. S., Eom, M. K., Shin, Y. K., Lee, J. S. (2021). *Nocardioides cynanchi* sp. nov., isolated from soil of rhizosphere of *Cynanchum wilfordii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(2). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004640>. PMID: 33470927.

- Suman, A., Shukla, L., Marag, P. S., Verma, P., Gond, S., Prasad, J. S. (2020). Potential use of plant colonizing *Pantoea* as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops. *Journal of Environmental Biology*, 41, 987–994. <http://doi.org/10.22438/jeb/41/5/MRN-1250>
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Leontievsky, A. A. (2014). Glyphosate: Safety Risks, Biodegradation, and Bioremediation. In: Cao G., Orrù R. (eds) *Current Environmental Issues and Challenges*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-8777-2_11
- Tang, T., Sun, X., Dong, Y., Liu, Q. (2019). *Erythrobacter aureus* sp. nov., a plant growth-promoting bacterium isolated from sediment in the Yellow Sea, China. *3 Biotech*, 9(11), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1958-3>
- Teasdale, J. R., Pillai, P., Collins, R. T., Teasdale, J. R., Collins, R. T. (2005). Synergism between cover crop residue and herbicide activity on emergence and early growth of weeds. *Weed Science*, 53(4), 521–527. <http://dx.doi.org/10.1614/WS-04-212R>
- Tenuta, M., Beauchamp, E. G. (1996). Denitrification following herbicide application to a grass sward. *Canadian Journal of Soil Science*, 76(1), 15–22. <https://doi.org/10.4141/cjss96-003>
- Tesfamariam, T., Bott, S., Cakmak, I., Römheld, V., Neumann, G. (2009). Glyphosate in the rhizosphere—Role of waiting times and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.03.007>
- Thapa, R., Poffenbarger, H., Tully, K. L., Ackroyd, V. J., Kramer, M., Mirsky, S. B. (2018). Biomass production and nitrogen accumulation by hairy vetch–cereal rye mixtures: A meta-analysis. *Agronomy Journal*, 110(4), 1197–1208. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0544>
- Thornton, B., Paterson, E., Midwood, A. J., Sim, A., Pratt, S. M. (2004). Contribution of current carbon assimilation in supplying root exudates of *Lolium perenne* measured using steady-state ¹³C labelling. *Physiologia Plantarum*, 120(3), 434–441. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00250.x>
- Tian, G. L., Bi, Y. M., Jiao, X. L., Zhang, X. M., Li, J. F., Niu, F. B., Gao, W. W. (2021). Application of vermicompost and biochar suppresses *Fusarium* root rot of replanted American ginseng. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6977–6991. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11464-y>
- Tiecher, T., dos Santos, D. R., Calegari, A. (2012). Soil organic phosphorus forms under different soil management systems and winter crops, in a long term experiment. *Soil and Tillage Research*, 124, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.still.2012.05.001>
- Tonon, L. A. C., Moreira, A. P. B., Thompson, F. (2014). The Family *Erythrobacteraceae*. En: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_376
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M., Wagner, M., Richter, A., Schleper, C. (2011). *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8420–8425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013488108>
- Treseder, K. K. (2004). A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist*, 164(2), 347–355. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01159.x>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Tush, D., Meyer, M. T. (2016). Polyoxyethylene Tallow Amine, a Glyphosate Formulation Adjuvant: Soil Adsorption Characteristics, Degradation Profile, and Occurrence on Selected Soils from Agricultural Fields in Iowa, Illinois, Indiana, Kansas, Mississippi, and Missouri. *Environmental Science and Technology*, 50(11), 5781–5789. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00965>
- Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D., Ueki, K. (2006). *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology*, 56(1), 39–44. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63896-0>
- USDA- United States Department of Agriculture. (2016). <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>.
- Van Bruggen, A. H. C., Semenov, A. M., Van Diepeningen, A. D., De Vos, O. J., Blok, W. J. (2006). Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *European Journal of Plant Pathology*, 115(1), 105–122. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1250-8>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Varela, M. F., Scianca, C. M., Taboada, M. A., Rubio, G. (2014). Cover crop effects on soybean residue decomposition and P release in no-tillage systems of Argentina. *Soil and Tillage Research*, 143, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.still.2014.05.005>
- Vasilyeva, L. V. (1985). *Stella*, a new genus of soil prosthecobacteria, with proposals for *Stella humosa* sp. nov. and *Stella vacuolata* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(4), 518–521. <https://doi.org/10.1099/00207713-35-4-518>
- Vendan, R. T., Yu, Y. J., Lee, S. H., Rhee, Y. H. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *Journal of Microbiology*, 48(5), 559–565. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0082-1>
- Venter, Z. S., Jacobs, K., Hawkins, H. J. (2016). The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. *Pedobiologia*, 59(4), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2016.04.001>
- Verma, P., Yadav, A. N., Kazy, S. K. (2014). Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 432–447.
- Villamil, M. B., Kim, N., Riggins, C. W., Zabaloy, M. C., Allegrini, M., Rodríguez-Zas, S. L. (2021). Microbial Signatures in Fertile Soils Under Long-Term N Management. *Frontiers in Soil Science*, 1, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2021.765901>
- Visioli, G., Sanangelantoni, A. M., Vamerali, T., Dal Cortivo, C., Blandino, M. (2018). 16S rDNA profiling to reveal the influence of seed-applied biostimulants on the rhizosphere of young maize plants. *Molecules*, 23(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23061461>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Vukicevich, E., Lowery, T., Bowen, P., Urbez-Torres, J. R., Hart, M. (2016). Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(3). <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0385-7>
- Wagner, S. C., Zablutowicz, R. M., Locke, M. A., Smeda, R. J., & Bryson, C. T. (1995). *Influence of Herbicide-Desiccated Cover Crops on Biological Soil Quality in the Mississippi Delta*. En: Kingerey WL, BuehringN, editores. Conservation Farming: A Focus on Water Quality. MAFES Special Bulletin No. 88-7. Mississippi Agricultural Fores-try Experiment Station, MS,55–8.
- Walterson, A. M., Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968–984. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>
- Wang, H., Kuang, S., Lang, Q., Wang, L. (2021). Bacterial community structure of aged oil sludge contaminated soil revealed by illumina high-throughput sequencing in East China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(11), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03059-6>
- Wang, J., Jenkins, C., Webb, R. I., Fuerst, J. A. (2002). Isolation of Gemmata-like and Isosphaera-like planctomycete bacteria from soil and freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 417–422. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.417-422.2002>
- Wang, Longwei, Li, Y., Li, Y. (2019). *Lentzea isolaginshaensis* sp. nov., an actinomycete isolated from desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112(4), 633–639. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1193-7>
- Wang, Q., Jiang, X., Guan, D., Wei, D., Zhao, B., Ma, M., Chen, S., Li, L., Cao, F., Li, J. (2018). Long-

- term fertilization changes bacterial diversity and bacterial communities in the maize rhizosphere of Chinese Mollisols. *Applied Soil Ecology*, 125, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.007>
- Wang, W., Yang, M., Shen, P., Zhang, R., Qin, X., Han, J., Li, Y., Wen, X., Liao, Y. (2019). Conservation tillage reduces nitrous oxide emissions by regulating functional genes for ammonia oxidation and denitrification in a winter wheat ecosystem. *Soil and Tillage Research*, 194, 104347. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104347>
- Wang, Y., Liu, L., Yang, J., Duan, Y., Luo, Y., Taherzadeh, M. J., Li, Y., Li, H., Awasthi, M. K., Zhao, Z. (2020). The diversity of microbial community and function varied in response to different agricultural residues composting. *Science of the Total Environment*, 715. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136983>
- Ward, N., Staley, J. T., Fuerst, J. A., Giovannoni, S., Schlesner, H., Stackebrandt, E. (2006). The order Planctomycetales, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the Candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. *Prokaryotes*, 7, 757–793. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_31
- Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Radl, V., Dong, X., Schloter, M., Berg, G., Smalla, K. (2010). Effects of genetically modified potatoes with increased zeaxanthin content on the abundance and diversity of rhizobacteria with in vitro antagonistic activity do not exceed natural variability among cultivars. *Plant and Soil*, 326(1), 437–452. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0024-z>
- Wen, L., Lee-Marzano, S., Ortiz-Ribbing, L. M., Gruver, J., Hartman, G. L., Eastburn, D. M. (2017). Suppression of soilborne diseases of soybean with cover crops. *Plant Disease*, 101(11), 1918–1928. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1067-RE>
- Wessén, E., Nyberg, K., Jansson, J. K., Hallin, S. (2010). Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Applied Soil Ecology*, 45(3), 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.003>
- White, C. M., Weil, R. R. (2010). Forage radish and cereal rye cover crop effects on mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Plant and Soil*, 328(1), 507–521. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0131-x>
- Willems, A. (2014). The Family Comamonadaceae. In: *Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg.* https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_238
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., Berg, G. (2002). *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 1937–1944. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02135-0>
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Zielenkiewicz, U., Izak, D., Szafranek-Nakoneczna, A., Banach, A., Błaszczuk, M. (2017). Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. *Applied Soil Ecology*, 119, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.009>
- Wortman, S. E., Francis, C. A., Bernards, M. A., Blankenship, E. E., Lindquist, J. L. (2013). Mechanical Termination of Diverse Cover Crop Mixtures for Improved Weed Suppression in Organic Cropping Systems. *Weed Science*, 61(1), 162–170. <https://doi.org/10.1614/ws-d-12-00066.1>
- Wortman, S. E., Francis, C. A., Bernards, M. L., Drijber, R. A., Lindquist, J. L. (2012). Optimizing cover crop benefits with diverse mixtures and an alternative termination method. *Agronomy Journal*, 104(5), 1425–1435. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0185>
- Wu, A. L., Jiao, X. Y., Fan, F. F., Wang, J. S., Guo, J., Dong, E. W., Wang, L. G., Shen, X. M. (2019). Effect of continuous sorghum cropping on the rhizosphere microbial community and the role of *Bacillus amyloliquefaciens* in altering the microbial composition. *Plant Growth Regulation*, 89(3), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00533-y>
- Wu, H., Wu, L., Wang, J., Zhu, Q., Lin, S. (2016). Mixed Phenolic Acids Mediated Proliferation of Pathogens *Talaromyces helicus* and *Kosakonia sacchari* in Continuously Monocultured *Radix pseudostellariae* Rhizosphere Soil. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00335>
- Xia, Q., Chen, H., Yang, T., Miller, G., Shi, W. (2019). Defoliation management and grass growth habits modulated the soil microbial community of turfgrass systems. *PLoS ONE*, 14(6), 1–18.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218967>
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Sekiguchi, Y. (2007). *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2299–2306. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65098-0>
- Yan, L., Penttinen, P., Mikkonen, A., Lindström, K. (2018). Bacterial community changes in response to oil contamination and perennial crop cultivation. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 14575–14584. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1635-9>
- Yan, Z. F., Lin, P., Wang, Y. S., Gao, W., Li, C. T., Kook, M. C., Yi, T. H. (2016). *Niastella hibisci* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of mugunghwa, the Korean national flower. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5218–5222. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001498>
- Yanai, R. D., Majdi, H., Park, B. B. (2003). Measured and modelled differences in nutrient concentrations between rhizosphere and bulk soil in a Norway spruce stand. *Plant and Soil*, 257, 133–142.
- Yang, C. H., Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 345–351. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.345-351.2000>
- Yang, J., Pan, X. (2013). Root exudates from sunflower (*Helianthus annuus* L.) show a strong adsorption ability toward Cd (II). *Journal of Plant Interactions*, 8(3), 263–270. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.737030>
- Yang, Yadong, Zhao, J., Jiang, Y., Hu, Y., Zhang, M., Zeng, Z. (2017). Response of bacteria harboring *nirS* and *nirK* genes to different N fertilization rates in an alkaline northern Chinese soil. *European Journal of Soil Biology*, 82, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.05.006>
- Yang, Yi, Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., Ye, B. (2017). Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by highthroughput pyrosequencing. *PLoS ONE*, 12(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178425>
- Ye, Y. H., Anwar, N., Xamxidini, M., Zhang, R., Yan, C., Nie, Y. F., Zhao, Z., Sun, C., Wu, M. (2020). Description of *Erythrobacter mangrovi* sp. nov., an aerobic bacterium from rhizosphere soil of mangrove plant (*Kandelia candel*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(10), 1425–1435. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01451-0>
- Yin, C., Hulbert, S. H., Schroeder, K. L., Mavrodi, O., Mavrodi, D., Dhingra, A., Schillinger, W. F., Paulitz, T. C. (2013). Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7428–7438. <https://doi.org/10.1128/AEM.01610-13>
- Zabaloy, M. C., Zanini, G. P., Bianchinotti, V., Gomez, M. A., L.Garland, J. (2011). Herbicides in the Soil Environment: Linkage between Bioavailability and Microbial Ecology. *En: Herbicides, Theory and Applications, Sonia Soloneski and Marcelo L. Larramendy, IntechOpen*, 161–192. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/12880>
- Zabaloy, M. C., Carné, I., Viassolo, R., Gómez, M. A., Gomez, E. (2015). Soil ecotoxicity assessment of glyphosate use under field conditions: Microbial activity and community structure of Eubacteria and ammonia-oxidising bacteria. *Pest Management Science*, 72(4), 684–691. <https://doi.org/10.1002/ps.4037>
- Zabaloy, M. C., Garland, J. L., Gómez, M. A. (2008). An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.02.004>
- Zabaloy, M. C., Allegrini, M., Tebbe, D. A., Schuster, K., Gomez, E. del V. (2017). Nitrifying bacteria and archaea withstanding glyphosate in fertilized soil microcosms. *Applied Soil Ecology*, 117–118, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.012>
- Zablotowicz, R. M., Locke, M. A., Gaston, L. A. (2007). Tillage and cover effects on soil microbial properties and fluometuron degradation. *Biology and Fertility of Soils*, 44(1), 27–35. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0175-0>

- Zablotowicz, R. M., Reddy, K. N. (2004). Impact of Glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* Symbiosis with Glyphosate-Resistant Transgenic Soybean: A Minireview. *Journal of Environmental Quality*, 33(3), 825–831. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0825>.
- Zadel, U., Nesme, J., Michalke, B., Vestergaard, G., Plaza, G. A., Schröder, P., Radl, V., & Schloter, M. (2020). Changes induced by heavy metals in the plant-associated microbiome of *Miscanthus x giganteus*. *Science of the Total Environment*, 711. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134433>
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zaller, J., Vienna, L. S., Heigl, F., Vienna, L. S. (2014). Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. *Scientific Reports*, 4, 5634. <https://doi.org/10.1038/srep05634>
- Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., Chen, S. (2018). Recent advances in glyphosate biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5033–5043. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>
- Zhang, C. J., Yang, Z. L., Shen, J. P., Sun, Y. F., Wang, J. T., Han, H. Y., Wan, S. Q., Zhang, L. M., He, J. Z. (2018). Impacts of long-term nitrogen addition, watering and mowing on ammonia oxidizers, denitrifiers and plant communities in a temperate steppe. *Applied Soil Ecology*, 130, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.06.017>
- Zhang, L., Gao, J. S., Kim, S. G., Zhang, C. W., Jiang, J. Q., Ma, X. T., Zhang, J., Zhang, X. X. (2016). *Novosphingobium oryzae* sp. nov., a potential plant-promoting endophytic bacterium isolated from rice roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 302–307. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000718>
- Zhang, M., Wang, W., Tang, L., Heenan, M., Xu, Z. (2018). Effects of nitrification inhibitor and herbicides on nitrification, nitrite and nitrate consumptions and nitrous oxide emission in an *Australian sugarcane* soil. *Biology and Fertility of Soils*, 54(6), 697–706. <https://doi.org/10.1007/s00374-018-1293-6>
- Zhang, X., Zhang, Q., Liang, B., Li, J. (2017). Changes in the abundance and structure of bacterial communities in the greenhouse tomato cultivation system under long-term fertilization treatments. *Applied Soil Ecology*, 121, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.08.016>
- Zhang, Y., Zhao, Z., Dai, M., Jiao, N., Herndl, G. J. (2014). Drivers shaping the diversity and biogeography of total and active bacterial communities in the South China Sea. *Molecular Ecology*, 23(9), 2260–2274. <https://doi.org/10.1111/mec.12739>
- Zhao, G. Y., Shao, F., Zhang, M., Zhang, X. J., Wang, J. Y., Fan, S. J., Dai, M. X. (2018). *Luteimonas rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4), 1197–1203. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002649>
- Zheng, W., Gong, Q., Zhao, Z., Liu, J., Zhai, B., Wang, Z., Li, Z. (2018). Changes in the soil bacterial community structure and enzyme activities after intercrop mulch with cover crop for eight years in an orchard. *European Journal of Soil Biology*, 86(3), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.01.009>
- Zhou X., Yu, G., Wu, F. (2012). Soil phenolics in a continuously mono-cropped cucumber (*Cucumis sativus* L.) system and their effects on cucumber seedling growth and soil microbial communities. *European Journal of Soil Science*, 63, 332–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2012.01442.x>
- Zhou, Q., Zhang, X., He, R., Wang, S., Jiao, C., Huang, R., He, X., Zeng, J., Zhao, D. (2019). The composition and assembly of bacterial communities across the rhizosphere and phyllosphere compartments of phragmites *Australis*. *Diversity*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/D11060098>
- Zhou, Xiaoqi, Wu, H., Koetz, E., Xu, Z., Chen, C. (2012). Soil labile carbon and nitrogen pools and microbial metabolic diversity under winter crops in an arid environment. *Applied Soil Ecology*, 53(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.002>
- Zhou, Xiaoqi, Wu, H., Li, G., Chen, C. (2016). Short-term contributions of cover crop surface residue return to soil carbon and nitrogen contents in temperate Australia. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(22), 23175–23183. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7549-5>
- Zhou, Xingang, Zhang, J., Pan, D., Ge, X., Jin, X., Chen, S., Wu, F. (2018). *p*-Coumaric can alter the composition of cucumber rhizosphere microbial communities and induce negative plant-microbial

- interactions. *Biology and Fertility of Soils*, *54*, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00374-018-1265-x>
- Zobiolo, L. H. S., Kremer, R. J., Oliveira, R. S., Constantin, J. (2011). Glyphosate affects microorganisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied Microbiology*, *110*(1), 118–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04864.x>
- Zotarelli, L., Avila, L., Scholberg, J. M. S., Alves, B. J. R. (2009). Benefits of vetch and rye cover crops to sweet corn under no-tillage. *Agronomy Journal*, *101*(2), 252–260. <https://doi.org/10.2134/agronj2008.0033x>
- Zou, Y., Zhang, X., Song, H., Liu, Y., Cheng, Q. (2019). *Chitinophaga alhagiae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of *Alhagi sparsifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *69*(4), 1179–1184. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003292>
- Zwetsloot, M. J., Muñoz Ucros, J., Wickings, K., Wilhelm, R. C., Mu, J., Sparks, J., Buckley, D. H., Bauerle, T. L. (2020). Prevalent root-derived phenolics drive shifts in microbial community composition and prime decomposition in forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *145*(107797). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107797>