

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**LA DIVERSIDAD MICROBIANA Y LA INCIDENCIA DE
ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS DE
SUELO EN SOJA, EN RESPUESTA A LA
INTENSIFICACIÓN DE SISTEMAS AGRÍCOLAS**

Por

Ing. Agr. Danae Lilia Serri

Directora: Dra. Silvina Vargas Gil

Codirector: Dr. José Meriles

Instituto de Patología Vegetal (IPAVE)
CIAP - INTA



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina
2018

COMISIÓN ASESORA

Dra. Marta Cabello, Instituto Spegazzini - Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Dr. Daniel Ducasse, Instituto de Patología Vegetal - CIAP - INTA.

Dr. José Meriles, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal - CONICET.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

DEDICATORIA

A Juan Carlos mi compañero de vida.

A mis padres Dante y Viviana.

A mi hermana Antonella.

Por ser mis pilares y por su incondicional apoyo... Los amo!

AGRADECIMIENTOS

Al INTA que a través del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) - Centro de Investigaciones Agropecuarias me otorgó la beca y el financiamiento, y permitió el uso de las instalaciones y equipamiento para llevar adelante esta tesis.

A los profesionales Fernando Salvagiotti, Silvina Bacigaluppo y María Elena Lago, de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Oliveros por permitirme trabajar en el ensayo de larga duración y por su colaboración.

Al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)-Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-UNC, y la EEA INTA Cerrillos-Laboratorio de Biotecnología, lugares donde fue posible realizar análisis del presente trabajo.

Especialmente a la Dra. Silvina Vargas Gil por su dirección, su guía constante y visión sobre el tema. Por su confianza, apoyo incondicional y por todas sus enseñanzas que hicieron posible el desarrollo de esta tesis. Gracias por formar parte de mi crecimiento profesional.

A mi codirector el Dr. José Meriles, por brindarme sus conocimientos, por su apoyo, su excelente disposición, y por las sugerencias recibidas en el transcurso y escritura de la tesis. Gracias por estos años de trabajo en equipo.

A la Dra. Carolina Pérez Brandan por la capacitación recibida para la cuantificación de microorganismos del suelo por PCR cuantitativa.

A la Dra. Mercedes Scandiani por brindar tan abiertamente sus conocimientos en fitopatología.

Agradezco a mis asesores de Tesis, Dra. Marta Cabello y Dr. Daniel Ducasse, por sus valiosas contribuciones y consejos.

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

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

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	8
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
1.1. Realidad de los sistemas agrícolas de la región pampeana.....	10
1.2. El rol de la intensificación agrícola sustentable.....	12
1.3. El suelo y sus propiedades biológicas, químicas y físicas.....	14
1.4. Diversidad microbiana: estructura y funcionalidad.....	16
1.5. La diversidad microbiana en el manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo.....	20
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1. Sitio de estudio.....	24
4.2. Diseño experimental.....	26
4.3. Manejo del ensayo.....	27
4.4. Muestreo de suelo.....	28
4.5. Análisis de las muestras.....	29
4.5.1. Estructura de las comunidades microbianas.....	30
- Constitución de las comunidades microbianas por perfiles de fosfolípidos (PLFAs).....	30
- Abundancia de bacterias y hongos totales del suelo mediante qPCR.....	31
- Microorganismos biocontroladores.....	32
4.5.2. Funciones de las comunidades microbianas.....	33
- Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP).....	33
- Actividades enzimáticas.....	34
Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA).....	34

Actividad fosfatasa ácida (FA)	34
Actividad deshidrogenasa (DHG)	34
- Parámetros microbianos generales	35
Carbono de biomasa microbiana (CBM).....	35
Respiración microbiana (RM).....	35
Coeficiente metabólico (qCO ₂).....	36
Proteínas de suelo relacionadas con Glomalina (PSRG).....	36
4.5.3. Variables químicas de suelo	37
- Carbono orgánico (CO).....	37
- Nitratos (NO ₃ ⁻)	37
- Fósforo (P)	37
- Potencial hidrógeno (pH).....	37
- Conductividad eléctrica (Ce)	38
4.5.4. Variables físicas de suelo	38
- Infiltración básica (IB)	38
- Resistencia mecánica a la penetración (RMP)	38
4.5.5. Incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS) de la soja	39
4.5.6. Productividad de los cultivos	40
- Biomasa vegetal (BV)	40
- Rendimiento (R).....	41
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1. Estructura de las comunidades microbianas	42
6.1.1. Constitución de las comunidades microbianas por perfiles de fosfolípidos (PLFAs)	42
6.1.2. Abundancia de bacterias y hongos totales del suelo mediante qPCR....	44
6.1.3. Microorganismos biocontroladores.....	45
6.1.4. Relación entre los indicadores de estructura microbiana.....	45
6.2. Funciones de la comunidad microbiana	47
6.2.1. Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados y actividades enzimáticas	47
6.2.2. Parámetros microbianos generales.....	50
6.2.3. Relación entre los indicadores de actividad microbiana.....	51
6.3. Variables químicas de suelo.....	53
6.4. Variables físicas de suelo	55
6.5. Relación entre las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo	55
6.6. Incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS) de la soja	58

6.7. Productividad de los cultivos	60
6.8. Relación entre la ISMS y productividad del cultivo de soja	62
6.9. Relación entre la diversidad microbiana del suelo, la ISMS y productividad del cultivo de soja	64
7. DISCUSIÓN.....	66
7.1. La diversidad microbiana del suelo en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas.....	66
7.1.1. Estructura de las comunidades microbianas	66
7.1.2. Funciones en las que están involucrados los microorganismos.....	71
7.1.3. Indicadores de estructura y funcionalidad microbiana en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas.....	80
7.2. Interrelación de las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas.....	81
7.2.1. Variables químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas.....	81
7.2.2. Relación entre las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas.....	87
7.3. Relación entre la diversidad microbiana del suelo y la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y la productividad del cultivo.....	89
7.3.1. Efecto de la intensificación agrícola sustentable en la ISMS y productividad del cultivo de soja.....	89
7.3.2. Relación entre la diversidad microbiana del suelo, la ISMS y productividad del cultivo de soja.....	93
8. CONCLUSIONES	97
9. BIBLIOGRAFÍA.....	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índice de intensificación de la secuencia (ISI), tendiente a la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, donde las secuencias son resultado de la combinación de los cultivos soja (S), maíz (M), trigo (T) y cultivo de cobertura invernal (CC), los cuales se detallan para cada campaña agrícola.	27
Tabla 2. Perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos del suelo (PLFAs) en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.	43
Tabla 3. Abundancia de bacterias y hongos totales del suelo mediante qPCR en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.	44
Tabla 4. Porcentaje de potenciales biocontroladores en relación al número de hongos totales, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.	45
Tabla 5. Análisis estadístico de las funciones de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha de 2015, 2016 y 2017..	49
Tabla 6. Parámetros generales de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.	51
Tabla 7. Variables químicas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.	54
Tabla 8. Variables físicas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha de 2016.	55
Tabla 9. Producción de biomasa vegetal de los cultivos en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados a madurez fisiológica de cada cultivo en 2015, 2016 y 2017.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes satelitales de la localización del sitio de estudio y del experimento a campo establecido en EEA INTA Oliveros donde se muestran las parcelas productivas.	25
Figura 2. Precipitaciones ($\text{mm} \cdot \text{mes}^{-1}$) y temperaturas ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{mes}^{-1}$) registradas en la estación agro-meteorológica EEA INTA Oliveros, para las campañas agrícolas evaluadas (2014/2015, 2015/2016 y 2016/2017).	25
Figura 3. Esquema del experimento a campo establecido en EEA INTA Oliveros, donde las secuencias son resultado de la combinación de los cultivos soja (S), maíz (M), trigo (T) y cultivo de cobertura invernal (CC).....	26
Figura 4. Muestreo de suelos en la EEA INTA Oliveros, para las campañas agrícolas evaluadas (2014/2015, 2015/2016 y 2016/2017). A: Toma de muestra de suelo en parcela del ensayo con cultivo de soja; B: Muestras de suelo dispuestas en bolsas plásticas listas para su acondicionamiento; y C: Tamizado de muestras de suelo para su almacenamiento y análisis.	29
Figura 5. Escala diagramática de severidad en grados para el síndrome de la muerte súbita (SMS) de la soja por Lenzi et al. (2010).	40
Figura 6. Análisis de componentes principales (ACP) (A) y análisis de conglomerados basado en la distancia Euclídea (B) correspondientes a la estructura de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.....	46
Figura 7. Análisis de conglomerados basado en la distancia Euclídea para la diversidad catabólica medida por el consumo de distintos sustratos carbonados (CLPP), en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.....	48
Figura 8. Análisis de componentes principales (ACP) (A) y análisis de conglomerados basado en la distancia Euclídea (B) correspondientes de las funciones de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.....	52
Figura 9. Análisis de procrustes generalizado desde la matriz de datos microbiológicos y químicos-físicos del suelo, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.	56

Figura 10. Análisis de componentes principales (ACP) (A) y análisis de conglomerados basado en la distancia Euclidea (B) de las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.	57
Figura 11. Incidencia del síndrome de la muerte súbita de la soja (ISMS) e intensidad de la enfermedad (IE), en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante las campañas 2015 y 2017.	59
Figura 12. Evaluación de la incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS) de la soja en la EEA INTA Oliveros, para las campañas agrícolas 2014/2015 y 2016/2017. A: Evaluación de la ISMS en parcela del ensayo con cultivo de soja; B: Síntomas foliares típicos (clorosis y necrosis internerval) del SMS; y C: Estructuras del patógeno sobre la superficie de la raíz principal.	59
Figura 14. Rendimiento de los cultivos y análisis estadístico para soja de 1 ^a , en base a la intensificación de las secuencias agrícolas en un ensayo de larga duración, siendo los resultados a la cosecha de cada cultivo en 2015, 2016 y 2017.	62
Figura 15. Análisis de componentes principales (ACP) para evaluar la relación entre el síndrome de la muerte súbita y la productividad del cultivo de soja, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015 y 2017.	63
Figura 16. Diagrama de dispersión para evaluar la relación entre la incidencia del síndrome de la muerte súbita y la productividad del cultivo de soja en A: rendimiento y B: biomasa vegetal, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, para las cosechas 2015 y 2017.	64
Figura 17. Análisis de componentes principales (ACP) para evaluar la relación entre las variables microbiológicas, la incidencia del síndrome de la muerte súbita y la productividad del cultivo de soja, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.	65

ABREVIATURAS

ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANAVA	Análisis de la varianza
APG	Análisis de Procrustes generalizados
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
AUC	Área integrada bajo la curva
AWCD	Promedio de desarrollo de color del pocillo
BCR	Bolsa de Comercio de Rosario
BT	Bacterias totales
CBM	Carbono de biomasa microbiana
CC-S	Cultivo de cobertura invernal (trigo) - Soja
Ce	Conductividad eléctrica
CLPP	Perfiles fisiológicos a nivel comunidad
cm	centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CO	Carbono orgánico
CP	Componente principal
DHG	Actividad Deshidrogenasa
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
FA	Fosfatasa ácida
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la
FDA	Hidrólisis del diacetato de fluoresceína
g	gramos
h	horas
ha	hectárea
HMA	Hongos micorrícicos arbusculares
HT	Hongos totales
IE	Intensidad de la enfermedad
INT	2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio
INTF	Iodo-nitrotetrazolio-formazan
ISI	Índice de intensificación de la secuencia
kg	kilogramo
m	metros
M	Maíz
m ²	metros cuadrados
M-CC-S-T/S	Maíz - Cultivo de cobertura invernal (trigo) - Soja - Trigo/Soja
mg	miligramos
min	minutos

ml	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
MO	Materia orgánica
M-S-T/S	Maíz - Soja - Trigo/Soja
M-T/S	Maíz - Trigo/Soja
M-T/S-CC	Maíz - Trigo/Soja - Cultivo de cobertura invernal (trigo)
N	Nitrógeno
nm	nanómetro
nmoles	nanomoles
°C	grado centígrado
P	Fósforo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
PLFA	Ácidos grasos derivados de fosfolípidos
PMA	Fosfato monoamónico
ppm	partes por millón
PSRG	Proteínas de suelo relacionadas a glomalina
qCO ₂	Coeficiente metabólico
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
S	Soja
SAGyP	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca
SD	Siembra directa
seg	segundos
SMS	Síndrome de la muerte súbita
S-S	Soja - Soja
T	Trigo
TPLFAs	Biomasa microbiana total
UFC	Unidades formadores de colonias
µg	microgramo
µl	microlitro
v/v	volumen en volumen

RESUMEN

En las últimas décadas, los sistemas agrícolas de la pampa húmeda experimentaron un proceso de simplificación de las rotaciones, con predominio de soja en monocultivo y largos períodos de barbecho otoño-invernal, causando la degradación del suelo y disminuyendo su biodiversidad. En consecuencia, las comunidades microbianas del suelo sufren cambios en su estructura, y se alteran las funciones y procesos biológicos en los que están involucradas. Como resultado, se ha incrementado la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en el cultivo de soja. Para contrarrestar estos efectos, una estrategia de manejo promisorio es la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas, mediante la rotación de cultivos y el uso de cultivos de cobertura invernal. Esta diversificación del estrato superficial crea condiciones que favorecen el incremento de la diversidad de las comunidades microbianas de suelo, que determinan la capacidad de recuperación del sistema edáfico, aportando efectos benéficos a las plantas, al suelo y al ecosistema. El objetivo del estudio fue identificar el nivel de intensificación sustentable de un agroecosistema que contribuya a incrementar la diversidad microbiana del suelo, en sintonía con las variables químicas y físicas asociadas y la productividad del cultivo de soja, contrarrestando la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo que afectan al cultivo. El trabajo de investigación se llevó a cabo en un ensayo de larga duración, perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros, Santa Fe. Los tratamientos resultaron de la combinación de los cultivos de soja (S), maíz (M) y trigo (T), y la inclusión de un cultivo de cobertura invernal (CC): S-S; CC-S; M-S-T/S; M-CC-S-T/S; M-T/S y M-T/S-CC. El muestreo de suelo se realizó durante tres campañas consecutivas, y se llevó a cabo conjuntamente con el período de manifestación del síndrome de muerte súbita (SMS) de la soja. Se estudió la diversidad microbiana del suelo a partir de la estructura de la comunidad y sus funciones, junto a parámetros químicos y físicos edáficos, la incidencia del SMS y la productividad el cultivo de soja. Como resultados, se observaron cambios en la estructura de la comunidad microbiana que permitieron la diferenciación de las secuencias con rotación e inclusión del CC respecto de S-S (monocultivo), explicada principalmente por incrementos en la biomasa microbiana total. En cuanto a las funciones de los microorganismos, las secuencias agrícolas más diversificadas

influyeron positivamente en el aumento de la actividad enzimática del diacetato de fluoresceína y fosfatasa ácida, y en la disminución del coeficiente metabólico. Además, parámetros químicos como el contenido de carbono orgánico, nitratos y conductividad eléctrica, y físicos como la infiltración básica, incrementaron para las secuencias con mayor diversificación agrícola, las cuales a su vez mostraron una marcada acidificación edáfica. Con respecto al SMS de la soja, se observó un aumento de la incidencia e intensidad de la enfermedad para las secuencias con inclusión del CC, principalmente CC-S y M-CC-S-T/S, acompañado de menores niveles de productividad del cultivo. En general, la diversidad microbiana del suelo se incrementó en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas, pero no logró contrarrestar la incidencia del SMS de la soja y promover la productividad del cultivo.

SUMMARY

In the last decades, the agricultural systems of the humid Pampas underwent a process of simplification of the crop rotation, with predominance of soybean in monoculture and long periods of autumn-winter fallow, causing the degradation of the soil and diminishing its biodiversity. Consequently, the microbial communities of the soil undergo changes in their structure, functions and in the biological processes in which they are involved. As a result, the incidence of diseases caused by soil fungi in soybean has increased. To counteract these effects, a promising management strategy is the sustainable intensification of agricultural systems, through the rotation of crops and the use of winter cover crops. This diversification of the surface layer creates conditions that favor the increase of the diversity of soil microbial communities, which determine the recovery capacity of the edaphic system, contributing beneficial effects to plants, soil and ecosystem. The objective of the study was to identify the level of sustainable intensification of an agroecosystem that contributes to increase soil microbial diversity, in relation with the associated chemical and physical variables and soybean productivity, counteracting the incidence of diseases caused by soilborne fungi. The research work was carried out in a long-term trial, belonging to the INTA Oliveros Experimental Agricultural Station, Santa Fe. The treatments resulted from the combination of soybean (S), corn (M) and wheat (T) crops and the inclusion of a winter cover crop (CC), being: SS; CC-S; M-S-T/S; M-CC-S-T/S; M-T/S and M-T/S-CC. The soil sampling was carried out during three consecutive seasons, during the period of manifestation of the Sudden Death Syndrome (SDS). The microbial diversity of the soil was quantified by the determination of structure of the community and its functions, along with chemical and physical edaphic parameters, the incidence of SDS and soybean yield. The structure of the microbial community allowed the differentiation of the sequences under rotation and inclusion of the CC compared with S-S (monoculture), mainly explained by increases in total microbial biomass. Considering microbial functions, the most diversified crop sequences positively influenced the increase in enzymatic activity of fluorescein diacetate and acid phosphatase, and the decrease in the metabolic coefficient. In addition, chemical parameters such as total organic carbon content, nitrates and electrical conductivity, together with physical parameters as basic

infiltration were increased for the sequences with greater agricultural diversification, which in turn showed a marked edaphic acidification. About SDS, an increase in the incidence and intensity of the disease was observed for the sequences including CC, mainly CC-S and M-CC-S-T/S, accompanied by lower levels of crop productivity. In general, soil microbial diversity increased in response to sustainable intensification of agricultural systems, but failed to counteract the incidence of soybean SDS and promote crop productivity.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Realidad de los sistemas agrícolas de la región pampeana

Producto de una población en rápido crecimiento, la expansión e intensificación de la agricultura ha sido uno de los principales objetivos de la humanidad para satisfacer las demandas de alimentos (Huber et al., 2014; Sakschewski et al., 2014). En las últimas décadas, los notables incrementos en la producción global se debieron principalmente a la expansión de la superficie cultivada hasta mediados del siglo XX y luego, al aumento de los rendimientos por unidad de superficie basados en variedades de cultivos obtenidas a través del mejoramiento genético convencional y el uso masivo de insumos externos (Ceccon, 2008; Andrade, 2016). Actualmente, casi el 40% de la superficie terrestre del planeta (libre de hielo) se está utilizando para la agricultura, y gran parte de esta ha reemplazado a los bosques, sabanas y pastizales (Foley et al., 2005; FAOSTAT, 2016). Según datos estadísticos de la FAO, un tercio de la misma (13%) corresponde a tierras cultivadas, de las cuales el 18% está ocupado con soja y maíz, y el 14% con trigo (FAO-AMIS, 2016).

En este contexto, la agricultura argentina ha sido pionera en la adopción de nuevas tecnologías como la siembra directa (SD), el uso de agroquímicos y variedades de cultivos transgénicos (Satorre, 2012). Actualmente, nuestro país posee el 3% de la superficie agrícola mundial (40 millones de ha; FAOSTAT, 2016), y contribuye con el 16% de la producción global de soja, y aporta además un 4% y 2,5% de la producción de maíz y trigo, respectivamente (FAO-AMIS, 2016); siendo estos cultivos sembrados principalmente en la región pampeana. Esta llanura, con una superficie productora de 32 millones de ha, es una de las regiones del mundo con mayor capacidad para la producción de alimentos, debido a sus climas templados, adecuado régimen de precipitaciones y suelos de alto potencial agrícola (Barbieri et al., 2015). Actualmente, la región produce más del 80% de cada uno de los tres cultivos principales, destinando aproximadamente 17 millones de ha a soja y 4,5 millones de ha tanto para maíz como trigo (BCR, 2017), evidenciando una alta homogeneidad de cultivos y de paisaje (Rotolo y Guglielmone, 2018).

De esta manera, el proceso de agriculturización se ha destacado por un marcado incremento en el área sembrada de cultivos, el corrimiento de la frontera agropecuaria, el dominio del cultivo de soja y de las tecnologías de insumos (plaguicidas y fertilizantes) y la no contemplación de externalidades en cuanto a aspectos ambientales y sociales (Viglizzo et al., 2006). Como consecuencia, los sistemas productivos actuales de la región pampeana, se caracterizan por una deficiente planificación de rotaciones con predominio de cultivos de verano (soja y maíz), principalmente soja en monocultivo (Botta et al., 2013), alternando con largos períodos de barbecho otoño-invernal (Salado-Navarro y Sinclair, 2009).

El desbalance en las secuencias de cultivos afecta la sostenibilidad y eficiencia de los agroecosistemas (Caviglia y Andrade, 2010), impactando negativamente sobre la biodiversidad (Butchart et al., 2010), la calidad de los suelos, y contribuyendo al cambio climático global (Viglizzo et al., 1995; Viglizzo, 1997; Paruelo et al., 2006). La simplificación del sistema, explicada por una alta frecuencia del cultivo de soja en la secuencia, ocasiona un limitado aporte de residuos de baja relación carbono:nitrógeno (C:N) (Huggins et al., 2007), originando un serio deterioro de las propiedades biológicas, químicas y físicas de los suelos de la región (Martínez et al., 2013). Uno de los aspectos más importantes es la disminución del C orgánico del suelo (COS) (Novelli et al., 2011), ya que promueve la erosión, la pérdida de agua, degrada el suelo y reduce su biodiversidad. Con respecto a esta última, la pérdida de biodiversidad en los agroecosistemas de la pampa húmeda ha generado preocupación sobre las consecuencias en la funcionalidad y servicios ecosistémicos de los suelos (Sala et al., 2000). Ante esta realidad, deberían implementarse estrategias de manejo que contribuyan a preservar nuestros recursos naturales, especialmente el suelo, componente primordial en la producción de cultivos (Vargas Gil et al., 2011).

Un enfoque que administra los ecosistemas agrícolas para mejorar la productividad y la sostenibilidad es la agricultura de conservación, basada en un conjunto de tres principios de manejo: (1) SD de cultivos con perturbación mínima del suelo (sin labranza), (2) cobertura permanente del suelo por residuos de cultivos o cultivos de cobertura, y (3) rotación de cultivos (Pittelkow et al., 2014). De esta manera, para contrarrestar la simplificación de los agroecosistemas y reducir así la degradación ambiental, la mejora de la producción por unidad de

área a través de la intensificación agrícola, ha sido identificada como una estrategia promisorio (Lal, 2004; Caviglia y Andrade, 2010). Teniendo en cuenta la importancia económica de la producción agrícola para nuestro país, el diseño de sistemas productivos sostenibles es una necesidad urgente (Klein et al., 2012). En este escenario, es imprescindible preservar la salud de los suelos para sostener la productividad de los sistemas agrícolas a través de su diversificación y el empleo de prácticas culturales apropiadas.

1.2. El rol de la intensificación agrícola sustentable

En la visión tradicional de la intensificación, a menudo se reconoce que, implícita en el proceso, la especialización o simplificación en la producción ha sido cada vez mayor, lo que resulta en una reducción del número de cultivos tendientes al monocultivo. Hay, sin embargo, otros puntos de vista como la intensificación agrícola sustentable, que se define como el proceso que utiliza los recursos ambientales (agua, radiación solar, nutrientes) más intensamente, manteniendo o aumentando el rendimiento de los cultivos por unidad de área y utilizando fuentes químicas de manera racional (Caviglia y Andrade, 2010). Actualmente, este concepto tiene implícitos principios ecológicos como el incremento del nivel de biodiversidad vegetal y animal (Altieri, 1999), e incluye prácticas de manejo sostenibles, como labranza cero, fertilización balanceada, manejo integrado de plagas, cultivos de cobertura, entre otras (Caviglia y Andrade, 2010).

Los sistemas agrícolas de la región pampeana comenzaron su proceso de intensificación sustentable a partir de la adopción de la SD en la década de los 90's (Buschiazzo et al., 1998; Díaz-Zorita et al., 2002). Actualmente, de las prácticas de manejo sustentables que pueden realizarse bajo SD, la rotación de cultivos y/o la utilización de cultivos de cobertura (CC) invernales son opciones prácticas y rentables para ser incorporadas a los sistemas agrícolas pampeanos (Caviglia y Andrade, 2010). Por su parte, la rotación involucra la siembra secuencial de cultivos en el mismo espacio a lo largo del tiempo. En este contexto, los sistemas agrícolas podrían beneficiarse de la intensificación de la secuencia de cultivo mediante la introducción de más de un cultivo por año; ya sea un cultivo de cosecha o un CC (Caviglia et al., 2004; Salado-Navarro y Sinclair, 2009). Los CC, son especies

vegetales de ciclo invernal que se incorporan a la rotación entre el período de cosecha y siembra de los cultivos de verano. Se diferencian de una pastura o de un verdeo invernal porque no son de renta directa, es decir, no son pastoreados, cortados, ni incorporados al suelo. La biomasa producida por los CC, queda sobre la superficie luego de la suspensión del crecimiento (secado), realizada generalmente con herbicidas (Wagger, 1989).

Estas prácticas conservacionistas, aparecen como una oportunidad para mitigar y/o revertir una serie de procesos que pueden condicionar la sostenibilidad de los sistemas de producción (Kruger y Quiroga, 2012). Cuando la SD, y la cobertura permanente de residuos en la superficie, son combinados con la rotación de cultivos, muchos beneficios pueden ser obtenidos (Stirling et al., 2016). Desde el punto de vista biológico, la agricultura de conservación es el primer paso para construir una activa, diversa y resistente comunidad microbiana del suelo. Por ejemplo, la SD produce una mayor actividad y diversidad microbiana edáfica e incrementos en las densidades poblacionales de microorganismos benéficos en comparación con la labranza convencional (Vargas Gil et al., 2009a), debido principalmente a una menor perturbación física de la estructura del suelo. A su vez, la rotación de cultivos y/o el uso de cultivos de cobertura, pueden cambiar el hábitat del suelo al afectar el estado de los nutrientes, la profundidad de las raíces, la cantidad y calidad del residuo, la agregación y el hábitat microbiano estimulando de esta manera, la diversidad y actividad microbiana del suelo. En particular, los cultivos de cobertura invernales se utilizan para minimizar la erosión del suelo, promover el reciclaje de nutrientes y generar cobertura al suelo, lo que evita la pérdida de agua y aumenta el COS y la actividad biológica (Balota et al., 2014). Estos beneficios se deben a que las distintas especies de cultivos, involucrados en la intensificación sustentable del sistema, difieren en su composición bioquímica, además los cambios en la diversidad vegetal alteran la cantidad y calidad de los recursos aportados al suelo, determinando la composición y funcionamiento de las comunidades microbianas (Nilsson et al., 2008). Por este motivo, una de las principales consecuencias de la intensificación sustentable es el incremento de la diversidad a otros niveles tróficos, como el estrato microbiano, ya que los microorganismos encuentran en este tipo de sistemas un mejor hábitat (Altieri, 1999).

El desafío de desarrollar sistemas agrícolas sostenibles en el tiempo, está en la necesidad de considerar su utilidad para los humanos, su eficiencia en el uso de los recursos y su capacidad para mantener un equilibrio con el medio ambiente (Harwood, 1990; Doran y Zeiss, 2000). Basados en esto, varios autores consideran que la evaluación de la salud y/o calidad del suelo, se conceptualizan como el principal vínculo entre las prácticas de manejo agrícola y el logro de los principales objetivos de la agricultura sostenible (Papendick y Parr, 1992; Parr et al., 1992; Pierzynski et al., 1994; Doran y Zeiss, 2000).

1.3. El suelo y sus propiedades biológicas, químicas y físicas

El suelo es uno de los biomateriales más complejos de la tierra. Es el recurso más fundamental y básico, ya que es la base de toda la vida terrestre. Tradicionalmente, su principal función ha sido servir de medio para el crecimiento de las plantas (Blanco-Canqui y Lal, 2010). Actualmente, se reconoce al suelo como un sistema regulador y dinámico con múltiples funciones. Estas funciones apoyan la prestación de servicios ecosistémicos que dependen de las propiedades del suelo y de su interacción, y están influenciados principalmente por su uso y manejo. Entre las funciones del suelo se destacan el almacenar y liberar agua, descomponer residuos de plantas y animales, transformar y reciclar nutrientes, secuestrar y degradar compuestos tóxicos y promover la salud de las plantas al suprimir los microorganismos patógenos (Costanza et al., 1997). El interés en evaluar la salud y la calidad de nuestro recurso suelo se ha estimulado al aumentar la conciencia de que el suelo es un componente de importancia crítica de la biosfera de la tierra (Glanz, 1995; Doran y Zeiss, 2000). La salud del suelo está determinada principalmente por características ecológicas como la estabilidad y resistencia en respuesta a una perturbación o un factor de estrés para proporcionar las condiciones saludables para las plantas, mientras que el término calidad del suelo está caracterizado por tres componentes básicos: las propiedades biológicas, químicas y físicas (Doran y Zeiss, 2000). Por consiguiente, tanto la salud como la calidad del suelo determinan la sostenibilidad de la agricultura (Papendick y Parr, 1992; Rincón y Muñoz, 2005).

Se sabe que las prácticas culturales tienen una fuerte influencia en la salud y calidad del suelo, y más específicamente en los atributos biológicos del mismo (Janvier et al., 2007). En los ecosistemas agrícolas, la eliminación de la vegetación natural para implementar la introducción artificial de especies de plantas de alta productividad, junto con los aportes de nutrientes, es responsable de cambios significativos en las propiedades biológicas, químicas y físicas de los suelos y, en consecuencia, de su funcionamiento (Navarro-Noya et al., 2013; Massenssini et al., 2015). Por ejemplo, la disminución del CO₂ y la biodiversidad conducen a la degradación del suelo, lo que constituye un serio desafío para la sostenibilidad de los ecosistemas (Godfray et al., 2010). En la mayoría de las situaciones, el uso de indicadores simples, se emplean para evaluar la calidad del suelo, constituyendo alternativas promisorias para monitorear la sostenibilidad de la implementación de prácticas de manejo (Epelde et al., 2014).

Cuando se piensa en el suelo, usualmente se consideran solamente sus propiedades físicas y químicas. Sin embargo, en la búsqueda de nuevos indicadores, se descubrió que las propiedades biológicas del suelo actúan como indicadores precoces y sensibles en respuesta a la alteración en los sistemas de gestión (Kennedy y Papendick, 1995; Islam y Weil, 2000a). Generalmente, los principales indicadores físicos, que han sido utilizados y recomendados son textura, espesor (horizonte A), densidad del suelo, resistencia a la penetración, porosidad, capacidad de retención de agua, conductividad hidráulica y estabilidad de agregados. Los indicadores químicos normalmente son variables relacionadas con el contenido de materia orgánica (MO), la acidez del suelo, el contenido de nutrientes, elementos fitotóxicos y determinadas relaciones como la saturación de bases. Por su parte, los indicadores biológicos, como la biomasa microbiana del suelo, el nitrógeno mineralizable, la respiración microbiana, la actividad enzimática y el cociente metabólico, son importantes tanto en el ciclado de los nutrientes, así como en la estimación de la capacidad del suelo para el crecimiento vegetal (de Araújo et al., 2012). Debido a su abundancia, diversidad estructural y funcional, y que están correlacionados con funciones beneficiosas del suelo y del ecosistema (Pankhurst et al., 2003, Brussaard et al., 2007), los indicadores biológicos o bioindicadores representan parámetros ecológicos útiles para ser empleados en la evaluación de la sustentabilidad de los agroecosistemas.

1.4. Diversidad microbiana: estructura y funcionalidad

Un ecosistema sostenible depende de los flujos de nutrientes a través de los niveles tróficos, que están llevados a cabo principalmente por los microorganismos (Badiane et al., 2001; Singh et al., 2004; Chen et al., 2013). De hecho, entre un 80 y un 90% de los procesos biológicos que ocurren en el suelo son reacciones mediadas por microorganismos (Nannipieri y Badalucco, 2003). La capacidad de los microorganismos para desarrollar una gran variedad de funciones se debe a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una enorme diversidad o cantidad de tipos de reacciones (oxidaciones, reducciones y precipitaciones), sobre los elementos componentes del suelo, que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos edáficos (Floch et al., 2011). Entre sus funciones se incluyen, la descomposición de la MO en todas sus fracciones, el reciclado de material vegetal, la movilización e inmovilización de minerales y contaminantes, la mejora en la aireación del suelo, la inhibición de patógenos, el incremento de la resistencia en plantas, la estructuración física del suelo y el aumento de la nutrición vegetal promoviendo su crecimiento, entre otras, las cuales influyen sobre el normal desarrollo de un cultivo (Van der Heijden et al., 2008; Pérez Brandan et al., 2014a). En este sentido, las poblaciones microbianas tienen influencia sobre la nutrición de las plantas y su estado sanitario, como también contribuyen con la estructura y fertilidad del suelo (O'Donnell et al., 2001; Rillig y Lehmann, 2016), siendo estos atributos parte de los servicios ecosistémicos en los que están involucradas. La sensibilidad de las comunidades microbianas y su rápida respuesta a los cambios en el suelo, hacen que el monitoreo de su variación sea una herramienta muy valiosa para proveer señales tempranas de alteración del ambiente edáfico. Dentro de la diversidad es importante estudiar tanto la estructura genética como la función de las complejas comunidades microbianas (Sydorenko et al., 2011), como se describe a continuación.

Con respecto a la estructura de la comunidad de microorganismos se define como el número y la abundancia de las poblaciones microbianas del suelo en sus diferentes taxones (Kujur y Patel, 2014). En conjunto, estos organismos constituyen la biomasa del suelo, siendo esta un enorme reservorio de diversidad genética. Si bien se encuentran millones de bacterias y hongos en los suelos

fértiles (Tiedje et al., 2001), solo se ha cultivado y comprendido la función metabólica de alrededor del 0,1% de los taxones microbianos (Torsvik et al., 1990). Una de las técnicas más utilizadas en el monitoreo de microorganismos edáficos es el aislamiento y la cuantificación de hongos y bacterias totales cultivables mediante recuento en placa (Hill et al., 2000). Ésta también es empleada en el recuento de algunos grupos funcionales relacionados con la protección de los cultivos, como *Trichoderma* sp. y *Clonostachys* sp. considerados como biocontroladores ecológicamente relevantes de patógenos (Harman et al., 2004; Vargas Gil et al., 2009b). Por otro lado, técnicas de alta resolución como los perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos (PLFA), permiten un rápido estudio de los microorganismos con fines comparativos (Hebel et al., 2009). Esta técnica bioquímica permite la identificación de algunos taxones microbianos a partir de la cuantificación de bioindicadores lipídicos, componentes estructurales esenciales de todas las membranas celulares microbianas (Zelles, 1999; Frostegard et al., 2011). Actualmente, enfoques basados en el ADN se utilizan cada vez más para medir microorganismos. Un enfoque es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) que representa tanto un proceso rápido como cuantificable para evaluar hongos y bacterias en suelos. El análisis de ecosistemas microbianos enteros (sin necesidad de realizar cultivos específicos), podría proveer herramientas para caracterizar el impacto del manejo agrícola sobre los grandes taxones microbianos en los diferentes agroecosistemas edáficos (Maire et al., 1999; Hebel et al., 2009).

Por su parte, las actividades microbianas, son el reflejo del funcionamiento del suelo, que está condicionado por una compleja combinación de factores. Además de la influencia de las condiciones ambientales (como la temperatura y la humedad), la cantidad, disponibilidad y naturaleza de la MO, así como los aportes de nutrientes, desempeñan un papel crucial (Schloter et al., 2003). Una forma de determinar la diversidad funcional microbiana es mediante la evaluación de un amplio rango de enzimas. Estas enzimas desempeñan funciones bioquímicas clave en el proceso general de descomposición de la MO en el sistema del suelo (Sinsabaugh et al., 1991). Son importantes para catalizar varias reacciones vitales necesarias para los procesos de vida de los microorganismos edáficos y la estabilización de la estructura del suelo, la descomposición de los desechos orgánicos, la formación de materia orgánica y el ciclo de nutrientes, por lo tanto,

desempeñan un papel importante en la agricultura (Dick et al. 1994; Dick, 1997). Por ejemplo, la medición de exoenzimas y enzimas de membrana mediante la actividad de hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) (Adam y Duncan, 2001), es una buena estimación de la actividad microbiana total porque múltiples enzimas presentes en bacterias y hongos son responsables de esta hidrólisis. Las enzimas son una parte integral del ciclo de nutrientes en el suelo y generalmente se asocian con células de proliferación viables, por lo que actividades enzimáticas específicas, como la fosfatasa y deshidrogenasa, juegan un rol preponderante en el mantenimiento de la fertilidad y calidad de los suelos (Madejón et al., 2009). Otro método sencillo para estimar la diversidad de funciones de descomposición realizadas por microorganismos heterotróficos resulta de examinar el consumo de diferentes sustratos carbonados por la comunidad microbiana (CLPP) (Graham y Haynes, 2005). Este perfil fisiológico a nivel comunitario se ha empleado para diferenciar las comunidades microbianas según la influencia de una gran variedad de factores que incluyen, tipos de suelo, especies de plantas, prácticas de labranza y secuencias de cultivo, entre otras (Mazzola, 2004).

Finalmente, actividades resultantes de toda la comunidad microbiana pueden medirse globalmente a través de diferentes métodos. Uno de ellos, el C de la biomasa microbiana (CBM) proporciona una medida del tamaño de la comunidad (Dutta et al., 2010) y se correlaciona positivamente con la acumulación de MO (Bradford et al., 2013). Por lo tanto, en sistemas de cultivo diversificados, es de esperarse una mayor biomasa microbiana como consecuencia de la mayor disponibilidad de sustratos, es decir, una mayor retención y reciclaje de C mejoran el sustrato disponible para apoyar el crecimiento microbiano y la biosíntesis (Geyer et al., 2016). De igual manera, la respiración microbiana (RM) del suelo (Alef, 1995), es otro de los parámetros más usados para cuantificar la actividad metabólica debido a su directa relación con la biología del suelo, su facilidad de medición y su rápida respuesta a diferentes disturbios edáficos (Doran y Parkin, 1994). En general, se considera que el aumento de la RM (liberación de CO₂), implica una mayor actividad biológica (Balota et al., 2004). La relación entre el CBM y la RM se conoce como el cociente metabólico (qCO₂). Éste se considera un índice de eficiencia microbiana en la utilización de los recursos disponibles; cuando se registran altos valores de qCO₂, los microorganismos del suelo funcionan ineficientemente y desvían una alta proporción de C a los requisitos de

mantenimiento de la biosíntesis (Anderson y Domsch, 1993). Otro parámetro, que por sus características aglutinantes y su íntima relación con la estructura del suelo es considerado un indicador ideal de calidad edáfica (Rillig, 2004) son las proteínas relacionadas con la glomalina (PSRG), glicoproteínas producidas por hongos micorrícicos arbusculares, que poseen una gran adhesividad y resistencia a la degradación (Wright y Upadhyaya, 1996; Rillig, 2004). Estas actividades globales podrían estar relacionadas con el potencial de supresión general de los suelos, ya que se cree que una comunidad microbiana activa es más eficiente para controlar los patógenos del suelo (Janvier et al., 2007).

En conclusión, la biodiversidad es una propiedad que determina la capacidad de recuperación del sistema edáfico ante una alteración (Griffiths et al., 2001), confiriéndole estabilidad y resiliencia a los ecosistemas favoreciendo la resistencia a estreses. Las prácticas de manejo agrícola pueden tener grandes impactos en el tamaño, la actividad, la composición y diversidad de las comunidades microbianas del suelo (Tian et al., 2012). La degradación del suelo registrada en la región pampeana, trajo como consecuencia que las comunidades microbianas edáficas se vean afectadas por este tipo de producción, lo que genera cambios en su estructura y altera las funciones y procesos biológicos en los que están involucradas (Beck et al., 2005). En contraposición, los sistemas bajo siembra directa, con rotación de cultivos e inclusión de cultivos de cobertura contribuyen al aporte de importantes volúmenes de residuos en superficie, que no sólo aumentarían el ingreso de C al suelo con un mayor aporte de raíces, sino que también incrementarían la biomasa microbiana favoreciendo la continuidad de su actividad en el suelo debido a una mayor disponibilidad de compuestos orgánicos en la rizósfera derivados de la raíz a lo largo del año (Frasier et al., 2016). De esta manera, los sistemas agrícolas de la región pampeana podrían beneficiarse con la intensificación de las secuencias de cultivo que, combinados de manera apropiada, contribuirían a la diversificación del sistema, incrementando las oportunidades ambientales para los microorganismos y los servicios que brindan, para una mayor eficiencia en el uso de los recursos (Caviglia y Andrade, 2010) y determinando, junto con las propiedades químicas y físicas, la calidad de un suelo (Gelsomino et al., 2006).

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

Los sistemas de raíces de las plantas desempeñan un papel central en el mantenimiento de la salud de los suelos agrícolas. La zona del suelo que está influenciada por las raíces se conoce como rizósfera, siendo el motor del sistema suelo-planta (Pedraza et al., 2010). Dado el suministro de nutrientes que proviene de la rizósfera (principalmente carbohidratos), es una región de intensa biomasa y actividad microbiana. Por lo tanto, esta región es un entorno extremadamente competitivo en el que un grupo diverso de microorganismos no sólo compiten por el agua, el oxígeno y los nutrientes, sino también por un nicho. Una función importante de los microorganismos que se encuentran en la rizósfera es mejorar los mecanismos de defensa de las plantas, ya que ésta zona, también proporciona un hábitat para organismos fitopatógenos, incluidas varias especies de bacterias, hongos y nematodos (Stirling et al., 2016). En este sentido, la sanidad de los cultivos puede verse influenciada por la riqueza microbiana edáfica. Esto se debe a que en la matriz del suelo se dan complejas interacciones entre los microorganismos, quienes compiten por fuentes nutricionales o bien se interrelacionan mediante mecanismos de antibiosis, predación, parasitismo, entre otras. Esto determina cambios en las poblaciones de patógenos y de antagonistas, que comparten un mismo nicho ecológico en el suelo y en la rizósfera (Mazzola, 2004), afectando la manifestación de enfermedades causadas por patógenos que habitan en el suelo (Janvier et al., 2007).

Las enfermedades transmitidas por el suelo son difíciles de controlar debido al estado oculto de los agentes causales (Janvier et al., 2007), su persistencia en el suelo a través de la formación de estructuras de resistencia (principalmente hongos), la amplia gama de huéspedes susceptibles y la ineficiencia de los controles químicos (De Coninck et al., 2015). Sin embargo, una gran cantidad de organismos benéficos para la raíz y el suelo pueden inhibir a los patógenos, mejorar la nutrición de las plantas, promover el crecimiento y aumentar la productividad (Levesque y Rahe, 1992; Larkin, 2003). Microorganismos rizosféricos, como bacterias del género *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., hongos de los géneros *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp., hongos micorrícicos

arbusculares (HMA) y actinobacterias, son catalogados como agentes de control biológico (Sparling, 1997; Meriles et al., 2009; Cano, 2011). Estos microorganismos cumplen esa función a través de diversas estrategias. *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp., tienen la capacidad de producir metabolitos volátiles secundarios que cumplen la función de antibióticos (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991) al igual que funciones de micoparasitismo. De igual manera, las actinobacterias utilizan su potencial de producción de componentes antifúngicos (Chamberlain y Crawford, 1999). Por su parte, los HMA son hongos simbióticos obligados, que a través de una extensa red de micelio aumentan la superficie de absorción del suelo a partir del cual se pueden extraer los nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno), lo que permite a las plantas hospedadoras acceder a más recursos (Smith y Read, 2008), al mismo tiempo que ofrecen mayor resistencia a las plagas y enfermedades transmitidas por el suelo (Gosling et al., 2006).

Desde hace tiempo se reconoce que la disminución de los rendimientos bajo SD y monocultivo de soja se asoció en principio a la caída de los niveles de MO (Agaras et al., 2014), que impactaron negativamente en el balance de carbono (Andriulo et al., 1999) y en un marcado deterioro físico del suelo (Cordone et al., 2008). Este escenario productivo, ha generado condiciones favorables para la multiplicación y supervivencia de los patógenos, causando un cambio sustancial en la prevalencia, frecuencia e intensidad de las enfermedades (Carmona 2014). En los últimos 20 años, los microorganismos del suelo causantes de enfermedades de raíz y tallo en soja como, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia* spp., diversas especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. virguliforme* y *F. tucumaniae*), entre otros, han representado una amenaza consistente y de creciente preocupación para el futuro de la SD (Carmona et al., 2015). Particularmente, este incremento de la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo en el cultivo de soja (Pérez Brandan et al., 2012), se deben a que la siembra continua de una misma especie vegetal, favorece el establecimiento de poblaciones de patógenos específicas a ese cultivo (Janvier et al., 2007). Otro factor fue la aplicación de productos sin acción específica y de baja efectividad en el uso, debido a la dificultad de penetración del producto en la canopia del cultivo para llegar al suelo y lograr proteger la raíz (Augusto et al., 2010). Como consecuencia, se potenció la eliminación de la microbiota edáfica en su conjunto, incluyendo a los patógenos y

a microorganismos con funciones benéficas. Por lo tanto, la prevalencia de patógenos transmitidos por el suelo (como *Fusarium*) y otros microorganismos nocivos para el cultivo de soja pueden causar una enfermedad grave y/o reducir el vigor, el crecimiento y el rendimiento de las plantas.

Una de las enfermedades presentes en los principales países productores de soja es el síndrome de la muerte súbita (SMS) (Wrather et al., 2001), causado por cuatro especies de hongos relacionados al Clado 2 de *Fusarium solani* species complex (*F. virguliforme*, *F. tucumaniae*, *F. brasiliense* y *F. crassistipitatum*). En Argentina fue identificada por primera vez en la región pampeana norte, durante la campaña 1991/92, y en el noroeste argentino en la campaña siguiente. Progresivamente, se convirtió en una de las patologías de mayor importancia con daños en variedades muy susceptibles con un rango de 15% y 90%, en el centro y norte del país, respectivamente (Ploper, 1993). Un extenso relevamiento del SMS en Argentina reveló que *F. tucumaniae* fue el patógeno dominante, comprendiendo el 87% de los aislamientos genotipados, en comparación con *F. virguliforme* que solo representó el 7% (O'Donnell et al., 2010). Estos hongos son habitantes del suelo e infectan sólo las raíces, pero sus toxinas son trasladadas al follaje causando clorosis y necrosis internerval, defoliación prematura y finalmente la muerte de las plantas (Scandiani et al., 2012). Si bien la infección se produce generalmente durante las primeras etapas del cultivo, los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan a partir de la floración (estadio R4-R5), donde temperaturas menores a las normales (cerca de 15 °C) y alta humedad edáfica, favorecen el desarrollo de la enfermedad, por mayor severidad de la podredumbre radicular (Lenzi et al., 2010). El SMS se presenta generalmente en manchones cloróticos dispersos en los lotes agrícolas, lo que dificulta la estimación de su efecto sobre el rendimiento en condiciones de campo con infestación natural del patógeno (Lenzi et al., 2013). Ante la ausencia de fungicidas para su control, algunas prácticas de manejo como, mejorar el drenaje de los lotes, disminuir la compactación, controlar el nematodo del quiste, y atrasar la fecha de siembra para evitar suelos frescos y muy húmedos, pueden reducir el riesgo de daño, aunque ninguna de ellas puede prevenir la enfermedad. Hasta ahora, la principal herramienta para el manejo del SMS es el uso de cultivares de soja tolerantes, ya que no hay genotipos con resistencia completa (Westphal et al., 2008; Lenzi et al., 2013).

Ante la necesidad de encontrar métodos alternativos a los químicos para controlar las enfermedades transmitidas por el suelo, existe un renovado interés por los métodos conservacionistas como la rotación de cultivos y la reducción de la labranza, especialmente porque pueden contribuir a reducir la gravedad de las enfermedades (van Bruggen y Semenov, 2000; Janvier et al., 2007). Dichas prácticas disminuyen la densidad del inóculo del patógeno en el suelo, reducen su capacidad para sobrevivir y lo privan de su huésped, ya que crean condiciones que favorecen el crecimiento de otros microorganismos en detrimento del patógeno (Bailey y Lazarovits, 2003). Aun así, cada estrategia de secuencia afectará los complejos de patógenos formados, así como el potencial antagónico de los residentes microbianos en el agroecosistema del suelo (Cook, 1986; Bailey y Lazarovits, 2003). En consecuencia, es de primordial importancia monitorear la salud del suelo y medir el impacto de las prácticas culturales en las enfermedades transmitidas por el suelo (van Bruggen y Semenov, 2000; Janvier et al., 2007).

2. HIPÓTESIS

La diversidad microbiana del suelo se incrementa en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas, disminuyendo la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y promoviendo la productividad del cultivo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Identificar el nivel de intensificación sustentable de un agroecosistema que contribuya a incrementar la diversidad microbiana del suelo, en sintonía con las variables químicas y físicas asociadas y la productividad del cultivo de soja, contrarrestando la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo que afectan al cultivo.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la diversidad microbiana del suelo (estructura de las comunidades y funciones en las que están involucrados los microorganismos) en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas.
2. Interrelacionar las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas.
3. Evaluar la relación entre la diversidad microbiana del suelo y la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y la productividad del cultivo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sitio de estudio

El trabajo de investigación se llevó a cabo en un ensayo de larga duración, perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Oliveros, situada al sudeste de la provincia de Santa Fe (32° 56' S; 60° 87' O) en el departamento de Iriondo (Figura 1). El suelo corresponde a un Argiudol Típico serie Maciel (Soil Survey Staff, 2014); es un suelo profundo, desarrollado en áreas bien drenadas, sobre paisajes muy suavemente ondulados, cuyo horizonte superficial presenta textura franco limosa, 2,64% de MO, 0,15% de N total y pH 6,0, sin presentar limitaciones para su uso con cultivos agrícolas. En la región prevalece un clima templado con características pampeanas, es decir, no se registra calor extremo ni frío intenso. La humedad es abundante debido a las precipitaciones, que son más intensas en verano y disminuyen regularmente durante todo el año. Los registros pluviométricos y de temperaturas se obtuvieron de la estación agro-meteorológica de la EEA INTA Oliveros (Figura 2).



Figura 1. Imágenes satelitales de la localización del sitio de estudio y del experimento a campo establecido en EEA INTA Oliveros donde se muestran las parcelas productivas.

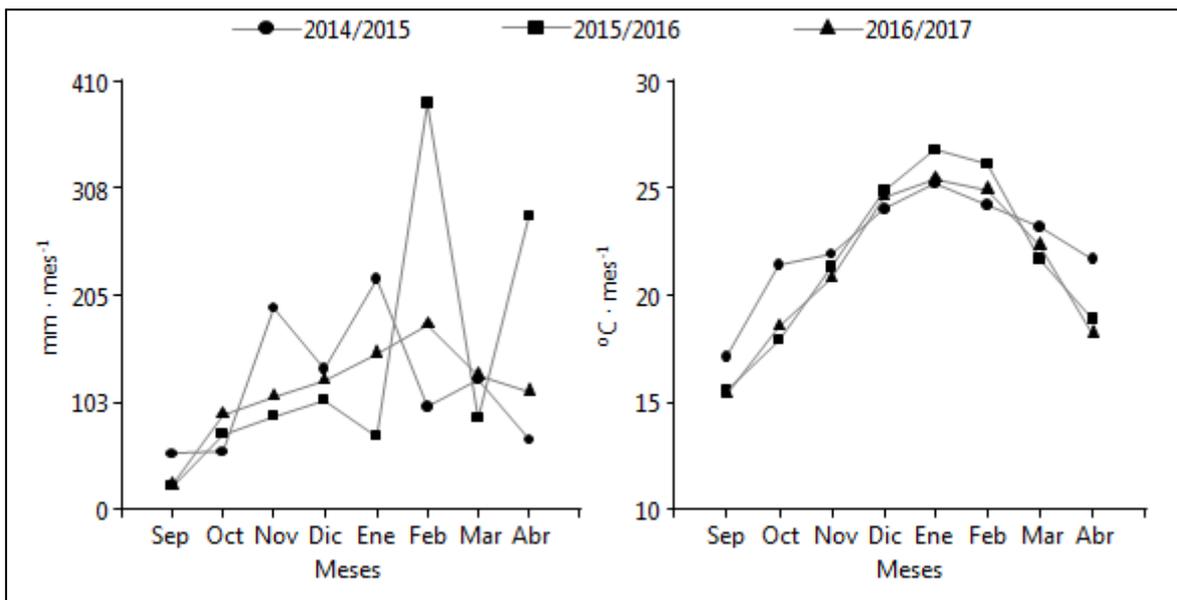


Figura 2. Precipitaciones ($\text{mm} \cdot \text{mes}^{-1}$) y temperaturas ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{mes}^{-1}$) registradas en la estación agro-meteorológica EEA INTA Oliveros, para las campañas agrícolas evaluadas (2014/2015, 2015/2016 y 2016/2017).

4.2. Diseño experimental

El ensayo se realizó bajo un diseño a un factor en bloques completos al azar con tres repeticiones, siendo el tamaño de las parcelas de 13 m de ancho y 50 m de largo. Los tratamientos fueron distintas secuencias agrícolas que resultaron de la combinación de los cultivos de soja (*Glycine max* L. Merr.), maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.), incluyendo la alternativa de trigo como cultivo de cobertura invernal (CC) (Figura 3). De esta manera, los tratamientos tendientes a la intensificación sustentable del sistema agrícola fueron:

T₁. Soja - Soja: S-S

T₂. Cultivo de cobertura invernal (trigo) - Soja: CC-S

T₃. Maíz - Soja - Trigo/Soja: M-S-T/S

T₄. Maíz - Cultivo de cobertura invernal (trigo) - Soja - Trigo/Soja: M-CC-S-T/S

T₅. Maíz - Trigo/Soja: M-T/S

T₆. Maíz - Trigo/Soja - Cultivo de cobertura invernal (trigo): M-T/S-CC

BLOQUE 1						BLOQUE 2						BLOQUE 3					
S-S	CC-S	M-S-T/S	M-T/S-CC	M-T/S	M-CC-S-T/S	M-T/S	S-S	M-T/S-CC	M-CC-S-T/S	M-S-T/S	CC-S	M-CC-S-T/S	M-S-T/S	M-T/S-CC	S-S	M-T/S	CC-S

Figura 3. Esquema del experimento a campo establecido en EEA INTA Oliveros, donde las secuencias son resultado de la combinación de los cultivos soja (S), maíz (M), trigo (T) y cultivo de cobertura invernal (CC).

Para cuantificar el nivel de intensificación se propuso el índice de intensificación de la secuencia (ISI), calculado como el cociente entre el número de cultivos y la duración de la secuencia (Farahani et al., 1998). Así las secuencias más intensificadas presentan un mayor índice (Tabla 1).

Tabla 1. Índice de intensificación de la secuencia (ISI), tendiente a la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, donde las secuencias son resultado de la combinación de los cultivos soja (S), maíz (M), trigo (T) y cultivo de cobertura invernal (CC), los cuales se detallan para cada campaña agrícola.

SECUENCIA	ISI	CAMPAÑA		
		2015	2016	2017
S-S	1	Soja	Soja	Soja
CC-S	2	CC-Soja	CC-Soja	CC-Soja
M-S-T/S	1,33	Soja	Trigo/Soja	Maíz
M-CC-S-T/S	1,66	CC-Soja	Trigo/Soja	Maíz
M-T/S	1,5	Maíz	Trigo/Soja	Maíz
M-T/S-CC	2	Trigo/Soja	CC-Maíz	Trigo/Soja

4.3. Manejo del ensayo

El ensayo se implantó en el año 2006, en un lote con 30 años de historia agrícola, bajo manejo de siembra directa (SD) en los últimos ocho años. La historia previa del lote consistía en una rotación de cultivos anuales (maíz-soja-trigo/soja). Al momento de implantar el ensayo, el lote presentaba problemas de compactación subsuperficial producto de un inadecuado manejo, por lo cual se realizó, por única vez, la descompactación con un escarificador marca CULTI-VIE de 4 rejas a 0,5 m de distancia entre ellas hasta 0,25 m de profundidad. El ensayo se continuó bajo SD y los cultivos agrícolas empleados fueron soja, maíz y trigo, manejados de acuerdo a las prácticas establecidas por los productores de la zona.

Durante el período de evaluación, las semillas de soja sembradas a una densidad de 40 y 52 semillas/m² a 52 cm de distancia entre surcos, correspondieron a variedades de grupo de madurez IV Largo (Don Mario 4970, campaña 2015 y 2016; Don Mario 4915, campaña 2017) para primera fecha de siembra (Noviembre), y grupo de madurez V Corto (Nidera 5009, campaña 2015 y 2017; Nidera 5258, campaña 2016) para segunda fecha de siembra (Diciembre). Las variedades mencionadas son de hábito de crecimiento indeterminado y tolerantes al herbicida glifosato. Para maíz se utilizaron dos variedades de semilla de la marca Dekalb (DK7210 VT3P y DK7310 VT3P) sembradas a finales de Diciembre a razón de 7 semillas/m² a 52 cm de distancia entre surcos, siendo tolerantes a

aplicaciones post-emergentes de glifosato. En cuanto al cultivo de trigo, ya sea para cosecha de grano o como CC, se emplearon indistintamente tres variedades de ciclo intermedio (Buck Meteoro, Buck SY 200 y ACA315) y una de ciclo corto (Don Mario Cronox), sin embargo, la densidad de siembra para el trigo destinado a cosecha de grano fue de 400 semillas/m², mientras que para CC se utilizaron 500 semillas/m², ambas a una distancia entre surcos de 21 cm.

La soja de primera fecha de siembra, el trigo y el maíz, fueron fertilizados con fosfato monoamónico (PMA) a razón de 60 kg · ha⁻¹. Simultáneamente, trigo y maíz recibieron urea en cantidades variables (80 a 220 kg ha⁻¹), mientras que la soja de segunda fecha de siembra y el CC no fueron fertilizados. Para el control de malezas se empleó principalmente glifosato (1,5 kg principio activo · ha⁻¹) en soja y maíz, y metsulfurón metil en trigo (10 g · ha⁻¹), mientras que para el control de plagas se aplicaron productos insecticidas (piretroides, benzoilurea y flubendiamide) y fungicidas según dosis de marbete. En relación a los fungicidas, se destaca la campaña 2016, donde las secuencias M-S-T/S, M-CC-S-T/S y M-T/S, recibieron una aplicación para enfermedades de fin de ciclo en trigo (550 cm³ ha⁻¹, formulación: metominostrobin 15% + tebuconazole 30%) y para enfermedades foliares en soja de segunda fecha de siembra (300 cm³ ha⁻¹, formulación: azoxistrobina 20 g + cyproconazole 8 g). Ese mismo año, el CC de las secuencias CC-S y M-T/S-CC recibió una aplicación para enfermedades de fin de ciclo. El crecimiento del CC se detuvo hacia principios del mes de Octubre mediante una pulverización de glifosato.

4.4. Muestreo de suelo

El muestreo de suelo se realizó anualmente, durante tres campañas agrícolas consecutivas (2015, 2016 y 2017). Con la finalidad de determinar la calidad edáfica conjuntamente con el período de manifestación de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja, los muestreos fueron realizados antes de la cosecha de los cultivos (pre-cosecha), durante el estadio reproductivo R5 para soja. La metodología de muestreo se realizó de acuerdo a Vargas Gil et al. (2011), donde seis muestras compuestas (réplicas) por 10 submuestras de suelo fueron tomadas por parcela desde el horizonte A, a una profundidad de 10 cm próximo a

la raíz, a partir de estaciones de muestreo al azar. Como resultado, el número de unidades observacionales por año quedó definido de la siguiente manera: 6 tratamientos x 3 repeticiones x 6 réplicas = 108 unidades experimentales. Después de pasar a través de tamiz de 2 mm, una parte de cada muestra fue almacenada a 4 °C para la realización de los análisis microbiológicos y químicos, y otra parte se colocó a -20 °C para los análisis de estructura de comunidades y los análisis genéticos (Figura 4).



Figura 4. Muestreo de suelos en la EEA INTA Oliveros, para las campañas agrícolas evaluadas (2014/2015, 2015/2016 y 2016/2017). A: Toma de muestra de suelo en parcela del ensayo con cultivo de soja; B: Muestras de suelo dispuestas en bolsas plásticas listas para su acondicionamiento; y C: Tamizado de muestras de suelo para su almacenamiento y análisis.

4.5. Análisis de las muestras

Objetivo 1: *Evaluar la diversidad microbiana del suelo (estructura de las comunidades y funciones en las que están involucrados los microorganismos) en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas.*

Para cumplir con este objetivo, se cuantificó la estructura de las comunidades microbianas del suelo y sus funciones a partir de las siguientes metodologías:

4.5.1. Estructura de las comunidades microbianas

Constitución de las comunidades microbianas por perfiles de fosfolípidos (PLFAs)

La estructura de las comunidades microbianas de suelo se estudió mediante sus perfiles de fosfolípidos, según la metodología utilizada por Meriles et al. (2009), basada en Zelles (1999). La metodología de extracción y condiciones de análisis de los perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos (PLFAs) se realizó acorde con Bossio et al. (1998). Las muestras de suelo (8 g suelo fresco) se extrajeron con 40 ml de una solución buffer que contiene una proporción de 1:2:0,8 cloroformo, metanol y buffer fosfato (8,7 g K_2HPO_4 -dibásico + 1,3 g K_2HPO_4 -monobásico l^{-1} , pH 7,4) y se dejó reposar durante 1 h. El sobrenadante obtenido se filtró en un tubo de vidrio y se le agregó 10 ml de cloroformo y 10 ml de buffer fosfato (pH: 7,4), se tapó y agitó en vortex. Se dejó reposar 24 h hasta la completa separación de las fases orgánica y acuosa. La fase orgánica fue colectada y posteriormente secada con N. Los lípidos neutros y los glicolípidos se eluyeron con 4 ml de cloroformo y 10 ml de acetona, respectivamente. La fracción de fosfolípidos se eluyó con el agregado de 5 ml de metanol. La metilación de los ácidos grasos se realizó con una solución de 1 ml de metanol/tolueno (1:1 v/v) y 1 ml de KOH 0,2 M incubados a 37 °C durante 15 min. Los ácidos grasos metil esterificados (FAMES) fueron extraídos con 2 ml de hexano durante un reposo de 30 min. Posteriormente, se extrajo la fase superior a la cual se adicionó 50 μ l de estándar interno (C19:0) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

La solución de FAMES fue posteriormente concentrada hasta sequedad con N y el residuo obtenido se resuspendió en 150 μ l de hexano y se midió por cromatografía de gases en un Perkin-Elmer Clarus 500 equipado con una columna Elite-5 (Crossbond 5% difenil - 95% dimetil polisiloxano) y detector de llama (FID). Los ácidos grasos fueron analizados con una pendiente térmica de 180 a 240 °C a 4 °C/min y una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Los FAMES fueron identificados mediante una corrida previa de un estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos bacterianos (Bacterial Acid Methyl Esters mix, Supelco, Bellefonte, PA). Para la cuantificación de PLFAs se utilizó como estándar interno nonadecanoate de metilo (C19:0). En cada muestra la abundancia individual de PLFAs se expresó como

nmoles% · g⁻¹ suelo seco, y las áreas de los picos de PLFA se combinaron en grupos de biomarcadores.

Se utilizó nomenclatura estándar, donde el número antes de los dos puntos representa el número de átomos de C, y el número después de los dos puntos indica el número de dobles enlaces y su ubicación (ω). El prefijo "cy" indica presencia de grupo ciclopropilo, los prefijos "i" (iso) y "a" (anteiso) indican ramificación en los átomos de C número 2 y 3, respectivamente. La configuración "c" (cis) y "t" (trans) de dobles enlaces se indican después de la posición. La biomasa microbiana total se estimó como PLFAs extraíbles totales. Los ácidos grasos i15:0 y a15:0 fueron elegidos para representar bacterias Gram positivas, mientras que cy17:0 y cy19:0 fueron elegidos para representar bacterias Gram negativas. El ácido graso 18:2 ω 6c representó la biomasa fúngica, mientras que los ácidos grasos 10-metil 18:0 y 16:1 ω 5c se utilizaron como indicadores de actinomicetos y hongos micorrícicos arbusculares respectivamente.

Abundancia de bacterias y hongos totales del suelo mediante qPCR

A partir de 0,5 g de suelo se realizaron las extracciones de ADN utilizando el kit NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) según las especificaciones del producto. El rendimiento y la pureza del ADN se midieron usando un fluoroespectrómetro de microvolumen (NanoDrop Technologies, Delaware). Para la cuantificación de bacterias y hongos totales, fue necesario realizar diluciones de las muestras de ADN del suelo, siendo 1/16 y 1/8, respectivamente. El número de copias del gen 16S rRNA bacteriano (conjunto de cebadores 338F/518R, Fierer et al., 2005) y el número de copias del gen 18S rRNA (conjunto de cebadores NS1-F/Fung R, May et al., 2001) de todas las muestras se determinaron siguiendo el protocolo de Liu et al. (2009). La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se cuantificó en un Line-Gene 9600 Plus mediante monitorización fluorométrica con Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La reacción se realizó en un volumen de 25 μ l que contenía 10 ng de ADN, 0,2 mg ml⁻¹ BSA, 0,2 μ M de cada primer y 12,5 μ l de SYBR premix EX TaqTM (Takara Shuzo, Shiga, Japón). Las condiciones de amplificación consistieron en un primer paso inicial de desnaturalización y activación de la enzima por 5 min a 94 °C seguida de 34 ciclos de 20 seg de desnaturalización a 94 °C, 20 seg de alineamiento a 55 °C

para 16S y 56 °C para 18S, 30 seg de extensión a 72 °C y un paso de extensión final de 2 min a 72 °C. Las curvas estándar se construyeron por separado para bacterias y hongos usando plásmidos de genes de ARNr clonados (Takara). También se incluyeron controles de ADN negativo (agua ultrapura) y positivo (*Pseudomonas aeruginosa*). El número de copias de los estándares se calculó a partir de la concentración de ADN de plásmido extraído. Las curvas estándar fueron generadas por triplicado a partir de diluciones en serie de 10 veces de ADN de plásmido, que oscilaban entre $2,07 \times 10^2$ y $2,07 \times 10^8$ copias para el gen 16S rRNA bacteriano, y $4,60 \times 10^2$ a $4,60 \times 10^8$ copias para el gen 18S rRNA fúngico por ensayo. Se obtuvo una eficacia de amplificación de cuantificación del 105% para el gen 16S rRNA bacteriano y 98,2% para el gen 18S rRNA fúngico, con un valor R^2 y una pendiente de 0,998 y -3,197, y 0,993 y -3,365, respectivamente. El análisis de la curva de fusión se realizó después de cada ensayo para confirmar la amplificación específica. Se realizó además una electroforesis en gel de agarosa al 2% en los productos de amplificación por PCR y en un blanco para verificar si se alcanzaba un tamaño apropiado. Se usó la mezcla maestra como control negativo para probar posibles efectos inhibidores sobre la amplificación de PCR cuantitativa causada por sustancias húmicas coextraídas. Las eficiencias de amplificación se calcularon usando la fórmula $Eff = [10^{(-1/slope)} - 1]$ (Hai et al., 2009). Se utilizaron los datos de fluorescencia de cada muestra y sus Cts para calcular el número de copias por gramo de suelo de acuerdo con el método propuesto por Brankatschk et al. (2012).

Microorganismos biocontroladores

Trichoderma spp. y *Clonostachys* spp., al igual que otros hongos, juegan un rol fundamental en los procesos ecosistémicos del suelo. Para el aislamiento y cuantificación de estos microorganismos cultivables de suelo se siguió la metodología de recuento en placa propuesta por Vargas Gil et al. (2009b). Donde, 10 g de suelo de cada muestra se transfirieron a frascos que contenían 100 ml de agua destilada estéril, y se colocaron en un agitador orbital (260 rpm, 15 min). Partiendo de esta suspensión se realizaron diluciones hasta 10^{-2} , de esta última, una alícuota de 400 ul se sembró en la placa que contiene como medio de cultivo Agar Papa Glucosado (39 g/l), cloranfenicol (0,3 g/l), streptomycin (0,1 g/l) y rosa

de bengala (0,02 g/l). Las placas se colocaron en incubadora a 25 °C en oscuridad, aproximadamente durante 7 días realizando la identificación y cuantificación de los biocontroladores cada 48 hs. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. en relación al número de hongos totales.

4.5.2. Funciones de las comunidades microbianas

Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP)

La diversidad microbiana funcional se cuantificó mediante perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (CLPP) (Ruiz et al., 2008). Las fuentes de C seleccionadas representaban una gama de calidad y complejidad de sustratos que consistieron en seis monosacáridos (D-dextrosa, D-manosa, D-fructosa, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa), un disacárido (D-lactosa), cuatro aminoácidos (DL-triptófano, L-arginina, L-asparagina, L-lisina), y una vitamina (tiamina). La solución madre de cada fuente de carbono se preparó con agua desionizada esterilizada por filtración (3 g l⁻¹) y se almacenó a 4 °C en la oscuridad. El medio basal consistió en K₂HPO₄ (21 g l⁻¹), KH₂PO₄ (9 g l⁻¹), MgSO₄ (0,3 g l⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1,5 g l⁻¹), CaCl₂ (0,03 g l⁻¹), FeSO₄ (0,015 g l⁻¹), MnSO₄ (0,0075 g l⁻¹), NaMoO₄ (0,0075 g l⁻¹). Una porción (2 g) de cada muestra de suelo se suspendió en 10 ml de agua desionizada esterilizada por filtración. Cada microplaca se preparó con solución madre (60 µl), medio basal (60 µl), y violeta tretrazolium (0,0075%). Finalmente, se añadieron suspensiones de suelo (120 µl) en los pocillos, y las placas se incubaron a 25 °C inmediatamente. Las lecturas (unidades de fluorescencia relativas, RFU) se obtuvieron a partir de la placa a las 24, 48 y 72 h (Wallac 1420 Victor2 contador multi-etiqueta, Perkin Elmer Life Sciences). El análisis de CLPP se expresó como el promedio de desarrollo de color del pocillo (AWCD; Garland y Mills, 1991), a partir de los datos obtenidos a las 72 h. Además, las RFU se trazaron frente al tiempo (horas) para obtener curvas respiratorias (Allegrini et al., 2015). El área integrada bajo la curva respiratoria (AUC) se calculó entre las 24 y 72 h con el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EE. UU.).

Actividades enzimáticas

Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA)

La estimación de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) mide la fluoresceína derivada de la hidrólisis de FDA por enzimas extracelulares y de membrana (esterasas, proteasas y lipasas) involucradas en la descomposición de muchos tipos de tejidos. Se cuantificó empleando la técnica de Adam y Duncan (2001). Se colocaron 2 g de suelo y 15 ml de 60 mM de solución buffer de fosfato de potasio pH 7,6 en un matraz cónico de 50 ml. Se añadió sustrato (FDA, 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) para iniciar la reacción. Los matraces se colocaron en una incubadora orbital a 30 °C y 100 rpm durante 20 min. Una vez retirado de la incubadora, 15 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v) se añadieron inmediatamente para terminar la reacción. Los contenidos de los matraces se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se filtró y se midió a 490 nm en un espectrofotómetro. La actividad de la enzima se expresó como $\mu\text{g fluoresceína} \cdot \text{g suelo}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Actividad fosfatasa ácida (FA)

Las enzimas fosfatasas, en especial las fosfomonoesterasas, se han estudiado ampliamente en el suelo por su papel en la mineralización del fósforo. Para la determinación de fosfatasa ácida (FA) se utilizó el método propuesto por Tabatabai y Bremner (1969), basado en la determinación de p-nitrofenol liberado luego de una incubación de suelo con p-nitrofenil fosfato (pNP). La actividad FA se analizó a partir de 1 g suelo, 4 ml de solución buffer universal de 0,1 M (pH 6,5) y 1 ml 25mM pNP. Después de una incubación a 37 ± 1 °C por 1 h, se detuvo la reacción enzimática añadiendo 4 ml 0,5 M NaOH y 1ml de 0,5 M CaCl_2 para evitar la dispersión de las sustancias húmicas. La absorbancia del sobrenadante se midió a 400 nm. La actividad de la enzima se expresó como $\mu\text{g p-nitrofenol} \cdot \text{g suelo}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Actividad deshidrogenasa (DHG)

La deshidrogenasa (DHG) es una enzima intracelular que se encuentra activa en las células vivas y constituye un indicador importante de la actividad microbiana del suelo. Su determinación se realizó de acuerdo a la técnica citada por García et

al. (1997). Se expuso 1 g de suelo (60% de su capacidad de campo) a 0,2 ml de una solución al 0,4% INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio) en agua destilada a 28 °C durante 24 h en la oscuridad. El INTF (iodo-nitrotetrazolio formazan) formado fue extraído con 10 ml de metanol mediante agitación rápida durante 1 min, y centrifugación a 4000 rpm, 4 min a 4 °C. El INTF se midió espectrofotométricamente a 490 nm. La actividad de la enzima se expresó como mg INTF · g suelo⁻¹.

Parámetros microbianos generales

Carbono de biomasa microbiana (CBM)

El contenido de C de la biomasa microbiana (CBM) se define como el C del suelo perteneciente a la microbiota. El CBM se determinó por el método de fumigación-extracción según metodología de Vance et al. (1987). El CBM fue extraído de suelos fumigados y no fumigados. Para ello, cada muestra (por duplicado) de 7,5 g de suelo se humedeció a una relación 3:1 (suelo:agua) y se incubó durante 15 h a 30 °C en oscuridad. Luego, se adicionó cloroformo como biocida y se extrajo con 30 ml K₂SO₄ 0,5 M en agitación durante 1 h. La solución se centrifugó, se filtró y se añadió un extracto de 4 ml a 1 ml de 0,06 M de K₂Cr₂O₇ y 4 ml H₂SO₄. Esta solución se digirió usando una placa digestora a 140 °C durante 30 min, y la absorbancia se midió a 590 nm en un espectrofotómetro. CBM se estimó mediante el cálculo de la diferencia entre las muestras fumigadas y no fumigadas, utilizando un factor de corrección (kc: 0,35). Los resultados se expresaron en µg CBM · g suelo⁻¹.

Respiración microbiana (RM)

La respiración microbiana (RM) del suelo se determinó como C potencialmente mineralizable de acuerdo con Alef (1995). La cantidad de CO₂ liberado se midió a partir de 10 g de muestra de suelo fresco junto a un recipiente con 15 ml NaOH 0,2 N, todo se incubó dentro de un frasco de vidrio cerrado herméticamente. Después de 7 días de incubación a 25 °C en oscuridad, el CO₂ desarrollado fue atrapado en el NaOH. Luego, 1 ml BaCl₂ 1 M se añadió a la

solución de NaOH para la precipitación de CO_3 y el NaOH restante se tituló con HCl 0,2 N utilizando fenolftaleína como indicador. Para la cuantificación de la respiración microbiana, recipientes sin contenido de tierra sirvieron como controles. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{g suelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

Coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$)

Este coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$) resulta del cociente entre la respiración microbiana (RM) y el carbono de la biomasa microbiana (CBM). Fisiológicamente, este índice describe el sustrato mineralizado por unidad de CBM (Insam y Haselwandter, 1989).

Proteínas de suelo relacionadas con Glomalina (PSRG)

La glomalina es una glicoproteína producida por los HMA. Por sus características aglutinantes, la glomalina tiene íntima relación con la estabilidad de agregados del suelo ya que posee una gran adhesividad y resistencia a la degradación, lo que la hace un componente importante de la MO, contribuyendo al secuestro de C en el suelo. La cuantificación de proteínas de suelo relacionadas con glomalina (PSRG), se realizó empleándose la técnica de Wright y Upadhyaya (1996) en la forma de proteína fácilmente extractable. La PSRG fácilmente extractable se determinó a partir de 1 g de suelo y 8 ml de citrato de sodio 20 mM de (pH 7,0) como extractante, esterilizando luego la solución por autoclave a 121 °C durante 30 min. Los extractos se centrifugaron a 10.000 g por 3 min y la proteína en el sobrenadante se determinó mediante el empleo de la coloración de Bradford con albúmina de suero de bovino como estándar (Wright y Upadhyaya, 1996). La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 595 nm. La cuantificación de PSRG se expresó como $\text{mg} \cdot \text{g suelo}^{-1}$.

Objetivo 2: *Interrelacionar las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas.*

Para cumplir con este objetivo, se cuantificaron las variables químicas y físicas edáficas de acuerdo a las siguientes metodologías:

4.5.3. Variables químicas de suelo

Carbono orgánico (CO)

El C orgánico (CO) del suelo se determinó por el método de Walkley y Black (1934) que consiste en la oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio en ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos, titulando luego el exceso del agente oxidante según metodología de Nelson y Sommers (1982).

Nitratos (NO_3^-)

Los nitratos (NO_3^-) son la forma de nitrógeno más importante para las plantas, ya que son la forma soluble en que pueden absorberlo. La determinación se llevó a cabo por el método de Bremner (1965).

Fósforo (P)

La estimación del fósforo disponible (P) en el suelo se realizó por el método de Bray y Kurtz (1945). La determinación consiste en una relación suelo-solución extractiva de 1:7, agitando vigorosamente por un minuto, para luego determinar el P en el extracto por colorimetría según metodología de Murphy y Riley (1962).

Potencial hidrógeno (pH)

La determinación de pH se realizó por el método potenciométrico en agua destilada (Norma IRAM 2009) en una relación 1:2.5 v/v suelo:agua.

Conductividad eléctrica (Ce)

La conductividad eléctrica (Ce) se determinó por suspensión de la muestra de suelo en una relación de 1:2,5 v/v suelo:agua, leyendo en celda conductimétrica ajustada con solución estándar de ClK 0,01 N (Norma IRAM, 2006).

4.5.4. Variables físicas de suelo

Infiltración básica (IB)

La infiltración básica es la velocidad de infiltración con la cual el agua penetra en el suelo. El agua se infiltra con rapidez en suelos secos, esta velocidad se conoce como la velocidad de infiltración inicial, a medida que el agua sustituye al aire que se encuentra en los poros, el agua de la superficie se infiltra a una velocidad menor y finalmente, cuando el suelo se satura de agua, alcanza una velocidad constante, que es la velocidad de infiltración básica. Se determinó con base en la profundidad (mm) de la lámina de agua que logra penetrar en el suelo en una hora (Brouwer et al., 1988).

Resistencia mecánica a la penetración (RMP)

La resistencia a la penetración es un indicador del nivel de compactación de un suelo. La compactación limita el crecimiento radicular y la cantidad de aire y agua de que disponen las raíces (Herrick y Jones, 2002). Se determinó a una profundidad de 15 cm del suelo a través del índice de cono utilizando un penetrómetro digital (Fieldscout SC 300). El resultado se expresó en kPa.

Objetivo 3: *Evaluar la relación entre la diversidad microbiana del suelo y la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y la productividad del cultivo.*

Durante las tres campañas en las que se llevó adelante el estudio, se realizaron evaluaciones para registrar las enfermedades causadas por hongos de suelo que se presentaran. Esto permitiría interrelacionar las condiciones propias del suelo con su capacidad para inhibir la presencia de hongos de suelo que

podrían afectar al cultivo de soja. La principal enfermedad que se manifestó en el ensayo durante el período de evaluaciones fue el síndrome de la muerte súbita (SMS) que se cuantificó de la siguiente manera:

4.5.5. Incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS) de la soja

El síndrome de la muerte súbita (SMS) de la soja se detectó por la presencia de síntomas típicos foliares (clorosis y necrosis) y pudrición de la raíz (Aoki et al., 2005; 2012), y fue confirmado posteriormente por aislamiento de los patógenos de las raíces (Scandiani et al., 2012). El método empleado para la evaluación de la incidencia del SMS (ISMS) de la soja se llevó a cabo de acuerdo con el trabajo previo de Pérez Brandan et al. (2014a). La ISMS se evaluó a partir del estado fenológico reproductivo cinco (R5: inicio de formación de semillas) mediante el establecimiento de 4 estaciones de muestreo (25 plantas cada una) en cada parcela. La incidencia de la enfermedad se determinó como el porcentaje de plantas que expresan síntomas foliares del SMS. A su vez, la evaluación del nivel de severidad se estimó en función del área foliar afectada con síntomas (Lenzi et al., 2010) utilizando una escala diagramática de 1 a 5 grados (Figura 5), siendo:

- Grado 1: plantas con hasta el 25% del área foliar (AF) afectada por SMS con arrugamiento de hojas, moteado clorótico, clorosis internerval, poca necrosis, síntomas en pocas hojas.
- Grado 2: desde 26 a 50% del AF afectada con clorosis y necrosis internerval, síntomas en varias hojas.
- Grado 3: desde 51 a 75% del AF afectada con clorosis y necrosis internerval, síntomas en la mayoría de las hojas, puede haber defoliación.
- Grado 4: más del 76% del AF afectada con necrosis internerval en la mayoría de las hojas, prácticamente sólo las nervaduras mantienen color verde; con defoliación.
- Grado 5: plantas muertas por SMS.

El nivel de los síntomas foliares del SMS en cada parcela se evaluará mediante la intensidad de la enfermedad (IE) (Lenzi et al., 2010), que puede tomar valores de 0 a 100, y se obtiene como, $IE = (Incidencia \times Severidad) / 5$.

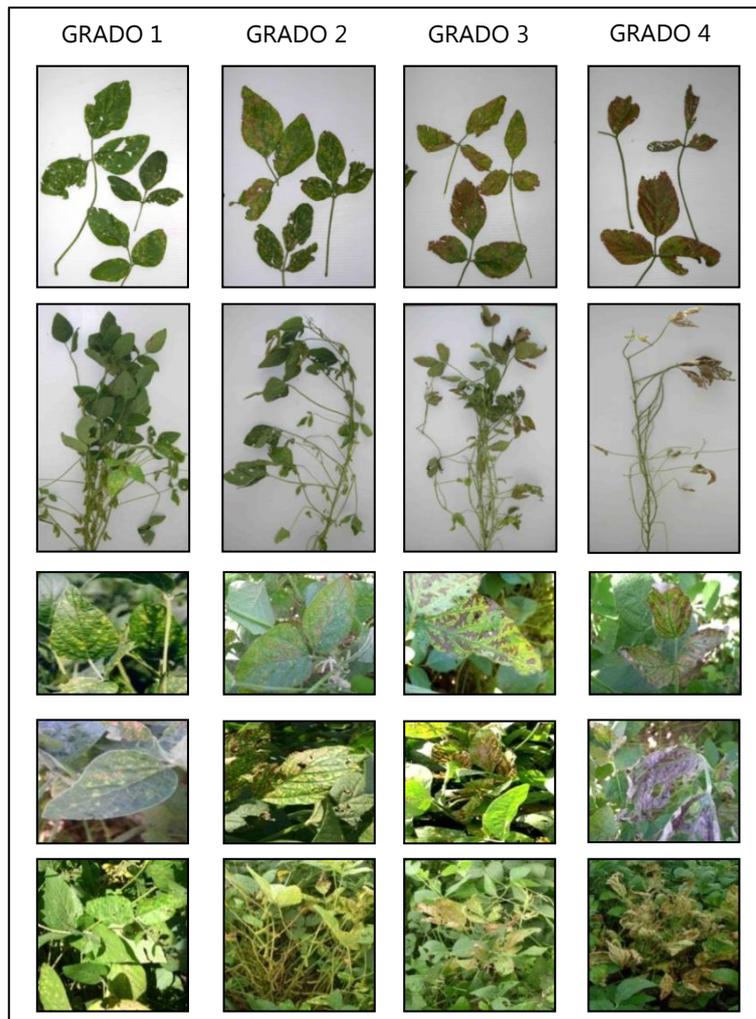


Figura 5. Escala diagramática de severidad en grados para el síndrome de la muerte súbita (SMS) de la soja por Lenzi et al. (2010).

4.5.6. Productividad de los cultivos

Por otra parte, se determinó la productividad de los cultivos de acuerdo a las siguientes metodologías:

Biomasa vegetal (BV)

Para la determinación de la biomasa vegetal (BV) de los cultivos de cada secuencia se recolectó 1 m² de biomasa aérea de plantas en etapa de madurez fisiológica. Se separó el grano para obtener la BV y se llevó a estufa a 60 °C hasta peso constante. Los resultados se expresaron en kg · ha⁻¹.

Rendimiento (R)

Se cuantificó el rendimiento total ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) del cultivo de soja, maíz y trigo luego de la cosecha de las parcelas.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando los modelos lineales, generales y mixtos mediante la plataforma R (R Core Team, 2009), a través de la interfase implementada con el programa InfoStat Versión 2015 (Di Rienzo et al., 2015). El análisis de datos se realizó bajo un diseño a un factor fijo (nivel de intensificación) y con los bloques como variable aleatoria. En los resultados expresados como promedio de los tres muestreos se consideró a la campaña como una repetición. La comparación entre medias de los tratamientos fue determinada mediante el uso de la prueba Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC; $p \leq 0,05$) (Di Rienzo et al., 2002).

Se utilizó como herramienta exploratoria el análisis de componentes principales (ACP), para detectar las variables microbiológicas que tuvieron mayor inercia en la separación de los tratamientos. También se empleó el análisis de conglomerados jerárquicos, con la finalidad de apreciar como los tratamientos van creando grupos cada vez más grandes y heterogéneos. Para los dendrogramas se utilizó el agrupamiento de Encadenamiento promedio y distancia Euclídea, siendo el criterio empleado para la determinación del número de clusters el 75% de la distancia total. Mientras que para estudiar cómo influye la interrelación de las variables microbiológicas, químicas y físicas en la separación de los tratamientos se empleó el análisis de procrustes generalizado (APG). A su vez, se empleó el análisis de correlación de Pearson como medida de la magnitud de asociación lineal entre dos variables.

6. RESULTADOS

Se presentan a continuación los resultados obtenidos de los muestreos de suelo y evaluación de enfermedades correspondientes a las campañas agrícolas 2015, 2016 y 2017, en base a los objetivos específicos del proyecto.

Objetivo 1: *Evaluar la diversidad microbiana del suelo (estructura de las comunidades y funciones en las que están involucrados los microorganismos) en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas.*

6.1. Estructura de las comunidades microbianas

6.1.1. Constitución de las comunidades microbianas por perfiles de fosfolípidos (PLFAs)

La cuantificación de la estructura de las comunidades microbianas del suelo mediante la técnica PLFAs permitió determinar bacterias Gram positivas (GP) y bacterias Gram negativas (GN), bacterias totales (BT) y hongos totales (HT), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), Actinobacterias (ACT) y biomasa total (TPLFAs) (Tabla 2). En general, los tratamientos tendientes a la intensificación agrícola no lograron diferenciarse claramente por la cuantificación de la biomasa de los grupos taxonómicos y la biomasa total de las comunidades microbianas del suelo (Tabla 2). Sin embargo, se destaca que la abundancia de bacterias GN fue mayor a la de bacterias GP, y que la abundancia de BT fue considerablemente superior a la registrada para HT, independientemente de las secuencias agrícolas. A partir del análisis estadístico, se observó una disminución en el porcentaje de bacterias GP para la secuencia S-S en la campaña 2015, resultado que también se registró en el año 2016 aunque sin diferencias estadísticamente significativas. A su vez, las bacterias GN también registraron un porcentaje menor para el tratamiento S-S en el año 2015, seguido de M-S-T/S y M-T/S. Una tendencia a menores contenidos de BT, se observaron en S-S para las campañas 2015 y 2016, en tanto que sólo se registraron diferencias estadísticamente significativas en la campaña 2017, siendo el mayor porcentaje de BT para M-T/S-CC. Por su parte, las diferencias entre los porcentajes obtenidos para HT fueron estadísticamente significativas para la

secuencia M-T/S, registrando valores superiores sólo en la campaña 2015. En lo que respecta a HMA y ACT, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas para el año 2016, dónde S-S registró el menor porcentaje. En relación a la abundancia por TPLFAs se presentaron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos evaluados en las campañas 2015 y 2017, destacándose un menor porcentaje para S-S y M-T/S, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos del suelo (PLFAs) en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.

SECUENCIAS		GP	GN	BT	HT	HMA	ACT	TPLFAs
		nmoles% · g suelo seco ⁻¹						
2015	S-S	19,30 b	27,72 b	47,02	2,43 b	6,84	5,79	62,08 b
	CC-S	21,88 a	29,10 a	50,99	2,37 b	7,40	4,90	65,65 b
	M-S-T/S	22,71 a	27,78 b	50,48	2,27 b	6,15	5,44	64,35 b
	M-CC-S-T/S	20,95 a	29,04 a	50,00	2,24 b	6,74	8,08	67,06 a
	M-T/S	20,74 a	28,11 b	48,85	3,39 a	6,35	6,22	64,81 b
	M-T/S-CC	21,06 a	28,77 a	49,84	2,58 b	7,38	5,82	65,61 b
<i>P-valor</i>		*	***	Ns	***	Ns	Ns	***
2016	S-S	13,90	25,01 b	38,90	2,10	5,12 b	3,06 b	49,19
	CC-S	15,13	25,86 b	40,99	1,79	5,90 a	3,91 b	54,30
	M-S-T/S	14,76	27,25 a	42,01	1,87	5,96 a	3,93 b	53,77
	M-CC-S-T/S	15,84	25,34 b	41,17	2,74	5,31 b	3,32 b	52,55
	M-T/S	15,87	24,01 b	39,88	1,83	6,15 a	3,89 b	51,74
	M-T/S-CC	16,51	27,32 a	43,83	1,52	5,47 b	4,82 a	55,64
<i>P-valor</i>		Ns	***	Ns	Ns	***	***	Ns
2017	S-S	12,36	34,25	46,61 b	1,88	2,40	2,43	53,33 a
	CC-S	13,54	33,31	46,85 b	1,94	3,92	2,78	55,48 a
	M-S-T/S	10,79	35,68	46,47 b	1,95	4,04	2,14	54,60 a
	M-CC-S-T/S	10,69	35,19	45,88 b	2,01	3,98	1,63	53,50 a
	M-T/S	11,74	33,59	45,33 b	1,90	2,38	1,96	51,57 b
	M-T/S-CC	14,29	33,21	47,50 a	1,99	4,81	1,82	56,13 a
<i>P-valor</i>		Ns	Ns	**	Ns	Ns	Ns	**

Referencias: GP (bacterias Gram positivas), GN (bacterias Gram negativas), BT (bacterias totales), HT (hongos totales), HMA (hongos micorrízicos arbusculares), ACT (Actinobacterias), TPLFAs (biomasa microbiana total). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por parámetro (columna) indican diferencias significativas para * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), Ns (no significativo).

6.1.2. Abundancia de bacterias y hongos totales del suelo mediante qPCR

Los resultados para las campañas evaluadas indicaron que el número de copias del gen 16S rDNA fue variando en un rango entre $8,22 \cdot 10^{24}$ y $2,51 \cdot 10^{29}$ · g suelo seco⁻¹, mientras que el número de copias del gen 18S rDNA estuvo acotado en un rango entre $5,68 \cdot 10^{27}$ y $8,68 \cdot 10^{28}$ · g suelo seco⁻¹. En general, tanto la abundancia de genes de bacterias como de hongos, no expresaron una tendencia entre las secuencias de cultivos a lo largo del tiempo del ensayo. Sin embargo, se observó que en promedio todas las secuencias registraron una abundancia de copias de hongos por sobre la de bacterias. Para la campaña 2015 no se registraron diferencias para la abundancia de bacterias y hongos entre las secuencias. Sin embargo, en 2016 se registraron diferencias estadísticamente significativas entre las secuencias agrícolas, incrementándose la abundancia de genes de bacterias y hongos en un 200% y 110% en M-T/S-CC, respecto de M-T/S; además la abundancia de genes de hongos también se incrementó en S-S respecto de las demás secuencias (Tabla 3). La campaña 2017 sólo registró diferencias estadísticamente significativas para el número de copias de 18S rDNA, siendo mayor la abundancia para las secuencias M-S-T/S, M-T/S y M-CC-S-T/S.

Tabla 3. Abundancia de bacterias y hongos totales del suelo mediante qPCR en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.

SECUENCIAS	BACTERIAS			HONGOS		
	nro. copias de 16S rDNA · g suelo seco ⁻¹			nro. copias de 18S rDNA · g suelo seco ⁻¹		
	2015	2016	2017	2015	2016	2017
S-S	3,96E+26	4,41E+26 b	8,35E+28	2,15E+28	5,81E+28 a	2,42E+28 b
CC-S	2,07E+26	3,58E+26 b	1,07E+29	1,40E+28	4,18E+28 b	2,37E+28 b
M-S-T/S	6,80E+25	3,23E+26 b	6,82E+28	1,90E+28	4,20E+28 b	5,02E+28 a
M-CC-S-T/S	1,27E+26	5,89E+26 b	6,89E+28	1,92E+28	3,76E+28 b	3,67E+28 a
M-T/S	1,90E+28	3,19E+26 b	7,20E+28	1,64E+28	2,87E+28 b	4,48E+28 a
M-T/S-CC	1,73E+26	9,58E+26 a	6,80E+28	2,35E+28	6,05E+28 a	2,68E+28 b
<i>P-valor</i>	Ns	*	Ns	Ns	*	*

Referencias: Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por campaña (columna) indican diferencias significativas para * ($p \leq 0,05$), Ns (no significativo).

6.1.3. Microorganismos biocontroladores

Se cuantificaron mediante cultivo en placa de Petri potenciales biocontroladores como *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. Los resultados se expresaron en porcentaje de potenciales biocontroladores en relación al número de hongos totales, para cada secuencia agrícola. En general, se observó que los mayores porcentajes de *Trichoderma* spp. correspondieron a las secuencias con inclusión del cultivo de maíz (Tabla 4). *Trichoderma* spp. registró un menor porcentaje en S-S en todas las campañas evaluadas. Por ejemplo, en el año 2017 la cantidad se redujo 2,5 veces respecto de la secuencia M-T/S, siendo esta diferencia estadísticamente significativa y diferente del resto de los tratamientos. Por su parte, la cantidad de *Clonostachys* spp. se redujo para M-T/S, particularmente en el año 2015, donde su diferencia fue estadísticamente significativa respecto de las demás secuencias (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de potenciales biocontroladores en relación al número de hongos totales, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.

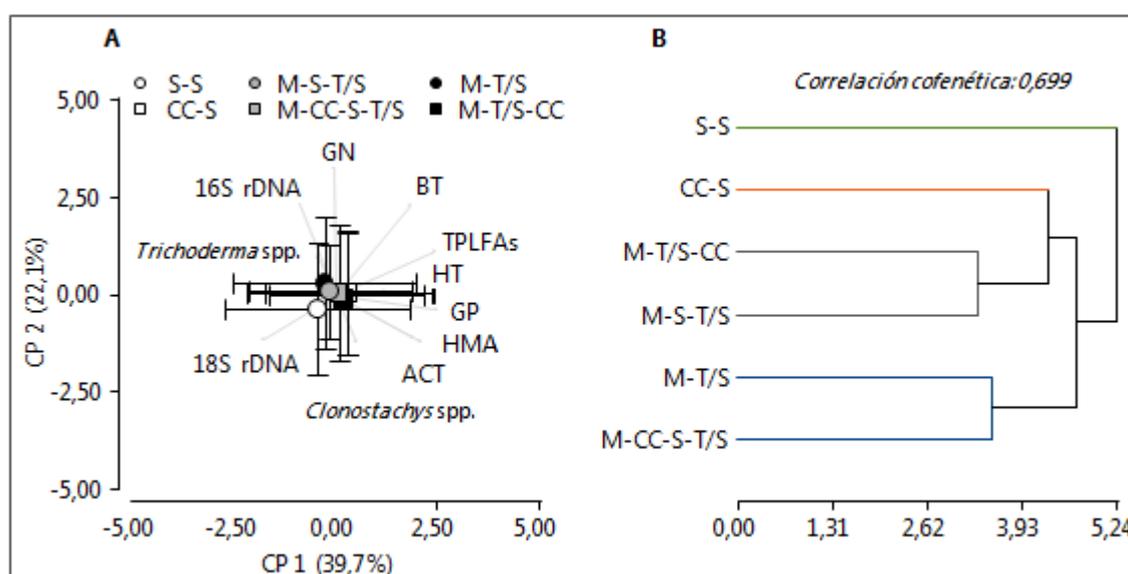
SECUENCIAS	<i>Trichoderma</i> spp.			<i>Clonostachys</i> spp.		
	%			%		
	2015	2016	2017	2015	2016	2017
S-S	5,78 b	9,22 b	7,58 b	6,83 a	8,22	4,81 b
CC-S	12,94 a	10,92 b	12,7 a	7,22 a	6,33	7,76 a
M-S-T/S	14,61 a	19,78 a	14,44 a	6,94 a	6,83	6,24 a
M-CC-S-T/S	13,89 a	14,5 b	15,09 a	7,33 a	7,11	2,04 b
M-T/S	16,06 a	9,22 b	19,06 a	0,67 b	5,17	3,53 b
M-T/S-CC	6,39 b	13,61 b	18,08 a	4,61 a	8,56	1,14 b
<i>P-valor</i>	*	*	*	*	Ns	*

Referencias: Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por campaña (columna) indican diferencias significativas para * ($p \leq 0,05$), Ns (no significativo).

6.1.4. Relación entre los indicadores de estructura microbiana

Los indicadores de estructura microbiana se examinaron mediante un análisis de componentes principales (ACP). El ACP generado no logró evidenciar

las diferencias entre las secuencias agrícolas evaluadas. Las primeras dos componentes principales, CP1 y CP2, explicaron el 39,7% y 22,1% de la variabilidad total de los datos, respectivamente. Según la CP1, se observó la mayor confluencia de los grupos microbianos hacia la diferenciación de las secuencias con inclusión del cultivo de cobertura, donde TPLFAs y GP explicaron la mayor variabilidad de este análisis (Figura 6 A). Para una mejor visualización de los resultados se realizó un análisis de conglomerados. El dendrograma reveló al 75% de la distancia total, los primeros dos conglomerados por similitud entre secuencias que incluyen al cultivo de maíz, a posterior se observó la asociación de la secuencia CC-S al 90% de la distancia total. Por último, casi al 100% de la distancia se agrupó la secuencia S-S (Figura 6 B).



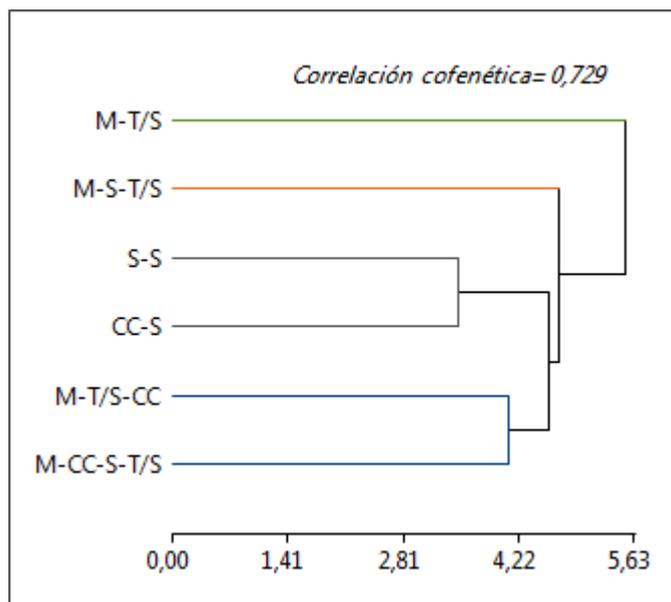
Referencias: GP (bacterias Gram positivas), GN (bacterias Gram negativas), BT (bacterias totales), HT (hongos totales), HMA (hongos micorrízicos arbusculares), ACT (Actinobacterias), TPLFAs (biomasa microbiana total). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). A) Las barras de error indican desviación estándar. B) Diferentes colores indican distintos clusters al 75% de la distancia Euclídea.

Figura 6. Análisis de componentes principales (ACP) (A) y análisis de conglomerados basado en la distancia Euclídea (B) correspondientes a la estructura de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.

6.2. Funciones de la comunidad microbiana

6.2.1. Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados y actividades enzimáticas

Las funciones de las comunidades microbianas se evaluaron a través de la cuantificación de la diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP), y las actividades enzimáticas como hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA), fosfatasa ácida (FA) y deshidrogenasa (DHG) (Tabla 5). Con respecto a CLPP, los resultados a partir del AWCD fueron variando entre las campañas agrícolas, resultando diferencias estadísticamente significativas y superiores para los niveles de consumo de las secuencias M-T/S y M-T/S-CC en 2015, M-S-T/S y M-CC-S-T/S en 2016 y, M-T/S y CC-S en 2017 (Tabla 5). A su vez, el AUC de las fuentes carbonadas se exploró mediante un análisis de conglomerados. El dendrograma reveló una primera asociación entre S-S y CC-S, una segunda entre M-T/S-CC y M-CC-S-T/S, para luego agruparse entre sí y sumarse las restantes secuencias (Figura 7). La mayor disimilitud entre los tratamientos se reflejó en la separación de M-T/S, ya que se agrupó al 100% de la distancia (Figura 7).



Referencias: S, soja; M, maíz; T, trigo; CC, cultivo de cobertura invernal. Diferentes colores indican distintos clusters al 75% de la distancia Euclídea.

Figura 7. Análisis de conglomerados basado en la distancia Euclídea para la diversidad catabólica medida por el consumo de distintos sustratos carbonados (CLPP), en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.

Por su parte, la actividad enzimática medida a través de la hidrólisis de FDA y FA registró los valores más altos para M-T/S-CC y M-T/S en todas las campañas evaluadas (Tabla 5). Por el contrario, S-S fue la secuencia que registró los menores valores de actividad, siendo sus diferencias estadísticamente significativas respecto de los demás tratamientos en cada una de las campañas. Así, en promedio para las tres campañas agrícolas, las actividades FDA y FA para S-S disminuyeron un 28,5% y 27% respecto de M-T/S-CC. En contraposición, los datos obtenidos para la actividad enzimática DHG registraron en general menores niveles en las secuencias con mayor inclusión de gramíneas en la rotación, y mayores niveles en S-S. Las diferencias significativas se registraron para M-S-T/S en 2015, S-S en 2016 y, S-S, CC-S, M-T/S y M-T/S-CC en 2017, con niveles de DHG superiores respecto de las demás secuencias. Por ejemplo, el promedio de la actividad DHG para S-S durante las tres campañas agrícolas fue 43% superior respecto de la secuencia M-T/S-CC. A su vez, se observó que en la campaña 2016 los valores hallados fueron más altos en comparación con los demás años de muestreo (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis estadístico de las funciones de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha de 2015, 2016 y 2017.

	SECUENCIAS	CLPP	FDA	FA	DHG
		AWCD*	$\mu\text{g fluoresceína} \cdot \text{g suelo}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\mu\text{g p-nitrofenol} \cdot \text{g suelo}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mg INTF}_1 \cdot \text{g suelo}^{-1}$
2015	S-S	0,45 b	106,58 d	523,47 d	12,89 b
	CC-S	0,40 c	121,02 c	595,59 c	15,58 b
	M-S-T/S	0,45 b	126,15 c	627,71 c	22,58 a
	M-CC-S-T/S	0,44 b	134,09 b	688,99 b	10,54 b
	M-T/S	0,50 a	139,49 b	808,96 a	10,76 b
	M-T/S-CC	0,50 a	149,21 a	800,05 a	6,30 c
	<i>P-valor</i>	***	***	***	***
2016	S-S	0,51 b	100,80 c	516,71 c	47,17 a
	CC-S	0,51 b	108,39 c	588,70 b	36,11 b
	M-S-T/S	0,53 a	122,01 b	666,76 a	35,44 b
	M-CC-S-T/S	0,54 a	120,73 b	592,88 b	26,74 b
	M-T/S	0,48 b	143,28 a	688,74 a	32,88 b
	M-T/S-CC	0,49 b	140,16 a	650,71 a	31,99 b
	<i>P-valor</i>	*	***	***	***
2017	S-S	0,46 b	100,58 d	428,73 c	14,47 a
	CC-S	0,50 a	110,58 c	469,55 b	12,02 a
	M-S-T/S	0,45 b	119,00 b	476,17 b	8,10 b
	M-CC-S-T/S	0,48 b	125,67 b	484,46 b	8,35 b
	M-T/S	0,51 a	127,70 b	503,48 b	10,49 a
	M-T/S-CC	0,46 b	141,20 a	570,24 a	13,72 a
	<i>P-valor</i>	**	***	***	*

Referencias: diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP), hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), actividad fosfatasa ácida (FA) y deshidrogenasa (DHG). *Average Well Color Development (Promedio del desarrollo de color del pocillo). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por parámetro (columna) indican diferencias significativas para * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

6.2.2. Parámetros microbianos generales

Se cuantificaron parámetros microbianos generales, que representan las condiciones biológicas globales del suelo como C de biomasa microbiana (CBM), la respiración microbiana (RM), coeficiente metabólico (qCO_2) y proteínas de suelo relacionadas con glomalina (PSRG). Para cada una de las variables se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las secuencias agrícolas (Tabla 6). En general, el contenido de CBM fue afectado por la secuencia agrícola empleada. Los niveles de CBM mostraron un rango de valores entre 23,1 - 359,6 μg CBM $\cdot g$ suelo⁻¹. En todas las campañas evaluadas, el contenido de CBM fue mayor en M-T/S, con excepción de 2017, donde a su vez, se observó una reducción del CBM de todas las secuencias agrícolas respecto de las campañas anteriores (Tabla 6). Cabe destacar que, para la secuencia S-S el nivel de CBM promedio de las tres campañas agrícolas se redujo un 32% respecto de la secuencia M-T/S.

Por su parte, la RM registró diferencias estadísticamente significativas entre las secuencias para todas las campañas evaluadas. Ésta, se diferenció en M-CC-S-T/S por su menor liberación de CO_2 , siendo su diferencia significativa para las campañas 2015 y 2016, registrando en promedio una reducción del 34% respecto a S-S. Para el coeficiente metabólico (qCO_2) se registraron diferencias significativas entre las secuencias para las campañas 2016 y 2017, en las cuales se observó el menor valor para M-T/S. En este sentido, para la campaña 2017, el qCO_2 registrado en la secuencia de monocultivo (S-S) fue significativamente superior al resto de los tratamientos, siendo 2,8 veces mayor que M-T/S (Tabla 6).

Las PSRG registraron diferencias entre tratamientos para todas las campañas evaluadas. Sin embargo, no se observó un patrón a través del tiempo entre las secuencias agrícolas. Los resultados obtenidos para las PSRG presentaron diferencias significativas e inferiores para S-S en 2015, M-CC-S-T/S en 2016 y, M-CC-S-T/S y M-T/S-CC en 2017. Al final del ensayo, el promedio de las campañas agrícolas registró para la secuencia M-T/S el mayor valor, siendo el total de 1,75 $mg \cdot g$ suelo⁻¹ de PSRG un 20% superior respecto al monocultivo (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros generales de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.

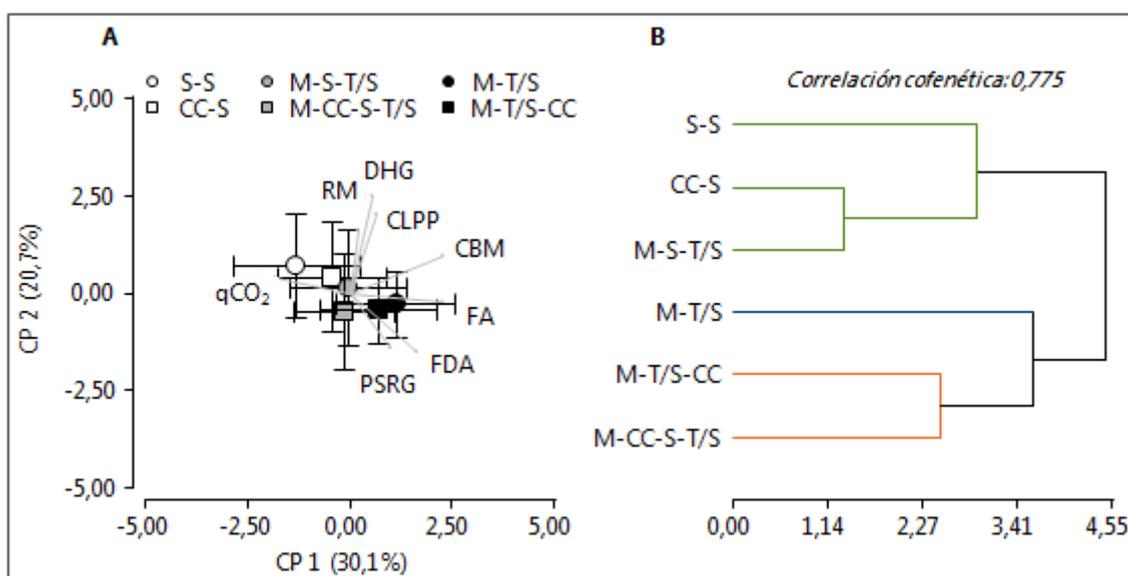
	SECUENCIAS	CBM	RM	qCO ₂	PSRG
		μg CBM · g suelo ⁻¹	μg CO ₂ -C · g suelo ⁻¹ día ⁻¹	μg CO ₂ -C (μg CBM) ⁻¹ día ⁻¹	mg · g suelo ⁻¹
2015	S-S	141,44 b	44,00 a	0,31	1,81 b
	CC-S	173,19 b	55,52 a	0,37	2,17 a
	M-S-T/S	154,75 b	47,49 a	0,34	2,14 a
	M-CC-S-T/S	146,80 b	35,10 b	0,27	2,25 a
	M-T/S	206,48 a	57,27 a	0,28	2,03 a
	M-T/S-CC	192,25 a	47,14 a	0,26	2,00 a
	<i>P-valor</i>	*	***	Ns	**
2016	S-S	165,97 a	53,43 a	0,35 a	1,23 a
	CC-S	181,79 a	60,41 a	0,32 a	1,42 a
	M-S-T/S	186,98 a	59,71 a	0,32 a	1,47 a
	M-CC-S-T/S	148,64 b	41,63 b	0,30 a	0,92 b
	M-T/S	198,61 a	46,17 a	0,24 b	1,45 a
	M-T/S-CC	134,33 b	49,59 a	0,40 a	1,43 a
	<i>P-valor</i>	***	***	**	**
2017	S-S	82,77	59,71 a	0,85 a	1,35 b
	CC-S	92,82	61,11 a	0,63 b	1,43 b
	M-S-T/S	95,19	51,68 a	0,57 b	1,46 b
	M-CC-S-T/S	99,32	27,38 b	0,34 c	1,08 c
	M-T/S	110,23	31,78 b	0,30 c	1,77 a
	M-T/S-CC	114,16	38,76 b	0,36 c	1,05 c
	<i>P-valor</i>	Ns	***	***	***

Referencias: carbono de biomasa microbiana (CBM), respiración microbiana (RM), coeficiente metabólico (qCO₂) y proteínas de suelo relacionadas a glomalina (PSRG). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por parámetro (columna) indican diferencias significativas para * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), Ns (no significativo).

6.2.3. Relación entre los indicadores de actividad microbiana

Las funciones y parámetros generales microbianos se analizaron a partir de un ACP para explorar la asociación de las secuencias de cultivos en función de las variables. El resultado generado no evidenció diferencias entre las secuencias agrícolas, explicando entre las primeras dos componentes principales, sólo un 50,8% de la variabilidad total de los datos. Sin embargo, para la CP1 se observó la

mayor influencia de los parámetros biológicos, principalmente CBM, FA y FDA, hacia la diferenciación de las secuencias M-T/S y M-T/S-CC respecto de la secuencia S-S (Figura 8 A). Esto fue confirmado a partir de un análisis de conglomerados, donde el dendrograma reveló la conformación de tres grupos entre las secuencias, quedando S-S en asociación con CC-S y M-S-T/S al 65% de la distancia total y M-T/S formando por sí mismo un conglomerado al 75% de la distancia (Figura 8 B).



Referencias: diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP), hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), actividad fosfatasa ácida (FA), deshidrogenasa (DHG), carbono de biomasa microbiana (CBM), respiración microbiana (RM), coeficiente metabólico (qCO_2) y proteínas de suelo relacionadas a glomalina (PSRG). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). A) Las barras de error indican desviación estándar. B) Diferentes colores indican distintos clusters al 75% de la distancia Euclídea.

Figura 8. Análisis de componentes principales (ACP) (A) y análisis de conglomerados basado en la distancia Euclídea (B) correspondientes de las funciones de las comunidades microbianas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.

Objetivo 2: *Interrelacionar las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas.*

6.3. Variables químicas de suelo

En relación al segundo objetivo de este trabajo los parámetros químicos evaluados en el suelo fueron el contenido de C orgánico (CO), nitratos (NO_3^-), fósforo (P), potencial hidrógeno (pH) y conductividad eléctrica (Ce). El resumen de las principales propiedades químicas del suelo se presenta en la Tabla 7, donde en general las variables fueron afectadas en distinto grado por las secuencias agrícolas empleadas.

En general, el contenido de CO se incrementó en las secuencias con mayor índice de intensificación agrícola. A su vez, se observó una disminución generalizada de los niveles de CO en la campaña 2017. En particular, el CO registró los menores contenidos para S-S, presentando en la campaña 2015, una disminución del 25% respecto de M-T/S (Tabla 7). En relación a los niveles de NO_3^- , en general se registraron menores contenidos en las secuencias agrícolas S-S y M-T/S. Ambas secuencias mostraron disminuciones en la campaña 2015, mientras que, en 2017 sólo S-S registró menores niveles de NO_3^- respecto de las demás secuencias (Tabla 7). El P disponible en el suelo para los cultivos presentó diferencias significativas entre las secuencias agrícolas en cada una de las campañas evaluadas. En oposición a NO_3^- , se observó un aumento significativo de P en las secuencias S-S y M-T/S para la campaña 2015. Estos resultados siguieron la misma tendencia en 2016 y 2017, pero acompañados de otras secuencias agrícolas (Tabla 7). En resumen, durante los tres años de muestreo, S-S y M-T/S registraron en promedio un 50% menos de NO_3^- y un 55% más de P respecto de CC-S, que fue la secuencia con mayor y menor contenido respectivamente.

Por otra parte, los valores registrados para el pH del suelo fueron diferentes entre las secuencias evaluadas, siendo S-S la secuencia con el nivel de pH más próximo al neutro, independientemente de la campaña agrícola. En las campañas 2016 y 2017, las diferencias registradas para el pH en S-S fueron significativamente superiores, y lograron diferenciar la secuencia de monocultivo del resto de los tratamientos. En contraposición, el pH del suelo mostró una marcada acidificación

bajo los tratamientos con rotación, registrándose los niveles más bajos para M-CC-S-T/S y M-T/S-CC, siendo sus diferencias significativas en la campaña 2015 (Tabla 7). En cuanto a la Ce, se observaron los niveles más bajos para S-S en todas las campañas evaluadas, siendo su diferencia significativa respecto del resto de las secuencias. En general, los valores observados para la Ce corresponden a suelos con ligera a moderada salinidad (Tabla 7).

Tabla 7. Variables químicas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha 2015, 2016 y 2017.

	SECUENCIAS	CO	NO ₃ ⁻	P	pH	Ce
		%	ppm	ppm	1:2,5	dS·m ⁻¹
2015	S-S	1,81 c	81,42 c	46,07 a	5,88 a	3,90 c
	CC-S	2,13 b	130,68 a	29,87 b	5,75 a	4,54 c
	M-S-T/S	2,23 b	109,51 b	31,79 b	5,52 b	5,55 b
	M-CC-S-T/S	2,13 b	147,00 a	39,49 b	5,30 c	6,64 a
	M-T/S	2,44 a	63,23 c	50,43 a	5,61 b	5,15 b
	M-T/S-CC	2,29 b	97,89 b	34,41 b	5,30 c	6,72 a
	<i>P-valor</i>	***	***	***	***	***
2016	S-S	1,97 b	103,79	42,67 a	5,64 a	3,56 b
	CC-S	2,05 b	133,81	26,02 b	5,32 b	5,10 a
	M-S-T/S	2,23 a	87,16	32,04 b	5,21 b	5,69 a
	M-CC-S-T/S	1,87 b	113,59	34,48 b	5,06 b	6,43 a
	M-T/S	2,26 a	101,78	38,56 a	5,14 b	6,04 a
	M-T/S-CC	2,26 a	120,00	45,00 a	4,94 b	6,99 a
	<i>P-valor</i>	***	Ns	***	**	**
2017	S-S	1,39 b	59,78 b	35,22 a	5,63 a	3,58 b
	CC-S	1,51 a	105,67 a	23,83 b	5,36 b	5,06 a
	M-S-T/S	1,43 b	91,89 a	33,94 a	5,24 b	5,66 a
	M-CC-S-T/S	1,48 a	96,11 a	36,11 a	5,09 b	6,39 a
	M-T/S	1,47 a	83,78 a	36,11 a	5,18 b	5,99 a
	M-T/S-CC	1,44 b	93,00 a	25,50 b	5,02 b	6,86 a
	<i>P-valor</i>	*	***	***	**	**

Referencias: carbono orgánico (CO), nitratos (NO₃⁻), fósforo (P), potencial hidrógeno (pH) y conductividad eléctrica (Ce). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por parámetro (columna) indican diferencias significativas para * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

6.4. Variables físicas de suelo

Los parámetros físicos evaluados en el suelo fueron infiltración básica (IB) del agua y resistencia mecánica a la penetración (RMP). Estos parámetros se cuantificaron por única vez durante la campaña 2016 (Tabla 8), dado que no suelen presentar gran variabilidad en el tiempo a diferencia de otras variables edáficas. Los resultados registraron una diferencia estadísticamente significativa para IB, correspondiendo el menor valor a la secuencia S-S, sin diferencias entre los demás tratamientos. Dicha secuencia, registró una capacidad de infiltración 3 veces inferior a la secuencia M-T/S-CC. Por su parte, la RMP registró una diferencia estadísticamente significativa para S-S, que registró el mayor valor respecto de las demás secuencias, que no fueron diferentes entre sí. En este caso, S-S registró una resistencia 1,7 veces superior respecto de M-T/S-CC, que fue la secuencia con menor RMP.

Tabla 8. Variables físicas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante la cosecha de 2016.

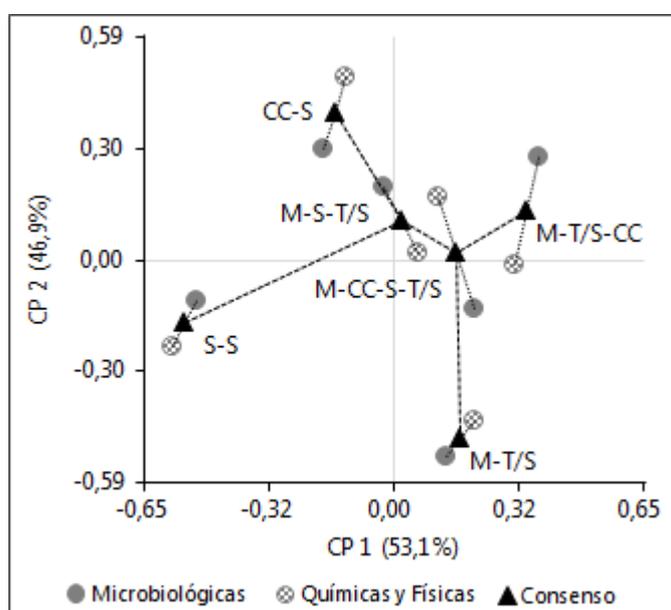
SECUENCIAS	IB	RMP
	mm/h	kPa
S-S	8,93 b	2640,33 a
CC-S	21,95 a	1915,67 b
M-S-T/S	22,32 a	1653,00 b
M-CC-S-T/S	26,04 a	1755,67 b
M-T/S	29,01 a	1649,00 b
M-T/S-CC	29,20 a	1527,00 b
<i>P-valor</i>	***	**

Referencias: infiltración básica (IB) y resistencia mecánica a la penetración (RMP). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por parámetro (columna) indican diferencias significativas para ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

6.5. Relación entre las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo

Con el objetivo de analizar el grado de concordancia entre los grupos de variables estudiadas y su influencia en la diferenciación de tratamientos se realizó

un análisis de procrustes generalizados (APG). El consenso resultante entre la ordenación producida por la matriz de datos microbiológicos (estructura, funciones y parámetros generales de las comunidades microbianas) y la obtenida a partir de datos químicos-físicos fue del 93% (Figura 9). A partir del APG generado, los dos primeros ejes explicaron el 53,1% y 46,9% de la variabilidad total de los datos, respectivamente. Respecto a la CP1 se observó a la derecha la diferenciación de la secuencia M-T/S-CC, mientras que a la izquierda se ubicó el monocultivo de soja (S-S). A partir de la CP2, se observó hacia abajo la diferenciación de M-T/S y en sentido opuesto, la secuencia CC-S.

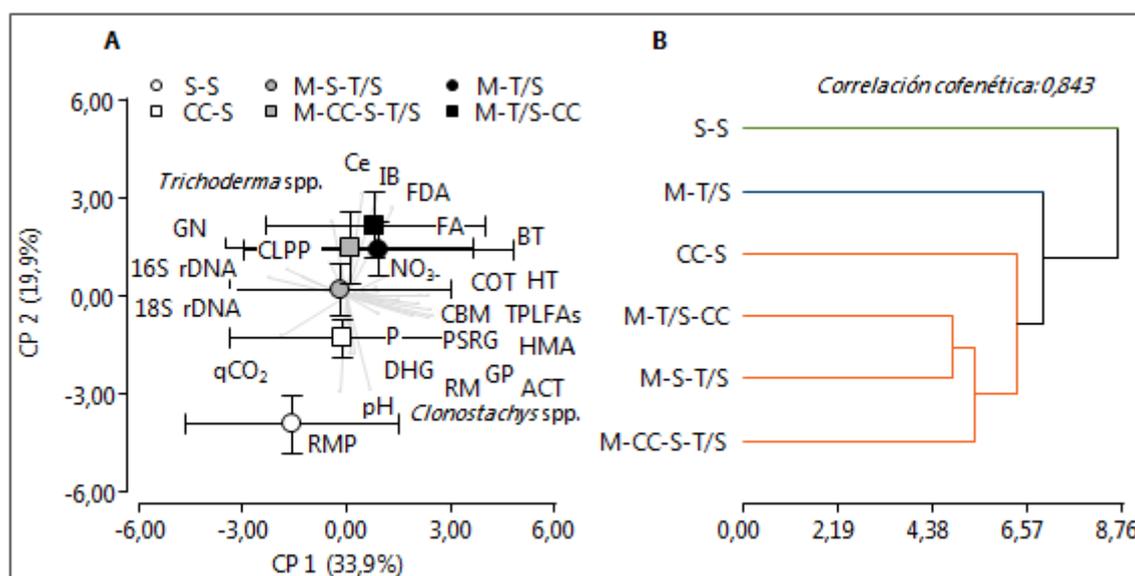


Referencias: Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC).

Figura 9. Análisis de procrustes generalizado desde la matriz de datos microbiológicos y químicos-físicos del suelo, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.

Para el análisis de integración, la estructura, funciones y parámetros generales de las comunidades microbianas junto a las variables químicas y físicas del suelo se analizaron a través de un análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados (Figura 10 A y B). El ACP generado explicó mediante las primeras dos componentes principales, CP1 y CP2, el 33,9% y 19,9% de la variabilidad de los datos, respectivamente. Respecto a la CP1 se observó a la derecha la mayor parte de los grupos microbianos que conforman la estructura del

suelo, las funciones y parámetros generales microbianos, sin poder diferenciar las secuencias agrícolas. A partir de la CP2, se observó hacia abajo la diferenciación de S-S principalmente por las variables DHG, RMP y pH, mientras que, hacia arriba se diferenció a M-T/S, M-T/S-CC y M-CC-S-T/S por las variables IB, Ce, FDA y FA. Para una mejor visualización de la integración se realizó un análisis de conglomerados (Figura 10 B), donde se observó al 75% de la distancia un grupo conformado entre las secuencias que contienen al CC y M-S-T/S, y a posterior la secuencia M-T/S seguida del monocultivo (S-S) en el último nivel de asociación, diferenciándolo del resto de las secuencias.



Referencias: GP (bacterias Gram positivas), GN (bacterias Gram negativas), BT (bacterias totales), HT (hongos totales), HMA (hongos micorrízicos arbusculares), ACT (Actinobacterias), TPLFAs (biomasa microbiana total). Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP), hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), actividad fosfatasa ácida (FA), deshidrogenasa (DHG), carbono de biomasa microbiana (CBM), respiración microbiana (RM), coeficiente metabólico (qCO_2) y proteínas de suelo relacionadas a glomalina (PSRG). Carbono orgánico (CO), nitratos (NO_3^-), fósforo (P), potencial hidrógeno (pH), conductividad eléctrica (Ce), infiltración básica (IB) y resistencia mecánica a la penetración (RMP). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). A) Las barras de error indican desviación estándar. B) Diferentes colores indican distintos clusters al 75% de la distancia Euclídea.

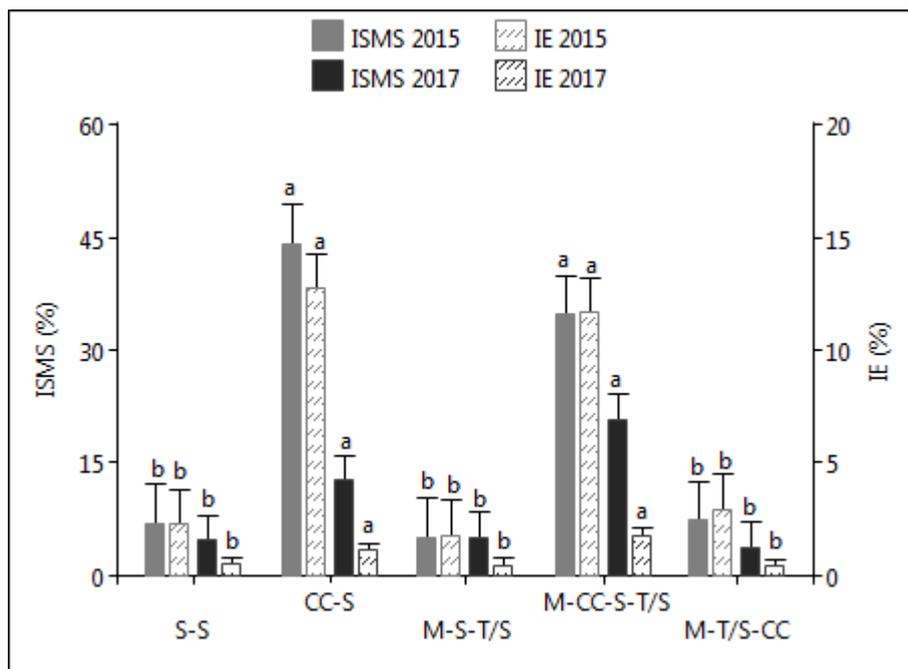
Figura 10. Análisis de componentes principales (ACP) (A) y análisis de conglomerados basado en la distancia Euclídea (B) de las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.

Objetivo 3: *Evaluar la relación entre la diversidad microbiana del suelo y la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y la productividad del cultivo.*

6.6. Incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS) de la soja

Durante cada campaña, se realizó un relevamiento de enfermedades causadas por hongos de suelo en el cultivo de soja. La principal enfermedad que se manifestó fue el síndrome de la muerte súbita (SMS) de la soja. Se cuantificó la incidencia de esta enfermedad en las campañas en las que se manifestó (2015 y 2017). Para ambos períodos evaluados se destacaron CC-S y M-CC-S-T/S como las secuencias con mayor porcentaje de plantas afectadas. CC-S registró un 44% (2015) y 13% (2017), mientras que M-CC-S-T/S registró un 35% (2015) y 21% (2017) de ISMS (Figura 11). Las diferencias en la ISMS de la soja para dichas secuencias fueron estadísticamente significativas respecto del resto de los tratamientos. A partir de los resultados, se pudo apreciar como la ISMS del cultivo de soja diferenció las secuencias agrícolas con y sin incorporación de CC, es decir, más o menos intensificada. Así, por ejemplo, CC-S respecto de S-S, manifestó un 44% a diferencia de un 7% en 2015, respectivamente (Figura 11).

En este trabajo fue posible aislar e identificar a las especies *F. virguliforme* y *F. tucumaniae* de las plantas recolectadas con síntomas de la enfermedad (Serri et al., 2015) (Figura 12). Se aclara que la secuencia agrícola M-T/S-CC conlleva la utilización de soja de segunda fecha de siembra. Además, la secuencia M-T/S no fue evaluada en las campañas 2015 y 2017 debido a que el cultivo presente fue maíz, mientras que, en 2016, cuando se encontraba presente el cultivo de soja, no se registró la enfermedad en el ensayo. Por otra parte, durante la campaña 2017, las secuencias M-S-T/S y M-CC-S-T/S se encontraban bajo cultivo de maíz, con lo cual la incidencia fue evaluada en las parcelas que tenían cultivo de soja de primera fecha de siembra, ya que se disponía en el ensayo de réplicas de ambas secuencias.



Referencias: Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas para ISMS e IE según año de evaluación (2015/2017) indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$. Las barras de error indican desviación estándar.

Figura 11. Incidencia del síndrome de la muerte súbita de la soja (ISMS) e intensidad de la enfermedad (IE), en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, durante las campañas 2015 y 2017.



Figura 12. Evaluación de la incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS) de la soja en la EEA INTA Oliveros, para las campañas agrícolas 2014/2015 y 2016/2017. A: Evaluación de la ISMS en parcela del ensayo con cultivo de soja; B: Síntomas foliares típicos (clorosis y necrosis internerval) del SMS; y C: Estructuras del patógeno sobre la superficie de la raíz principal.

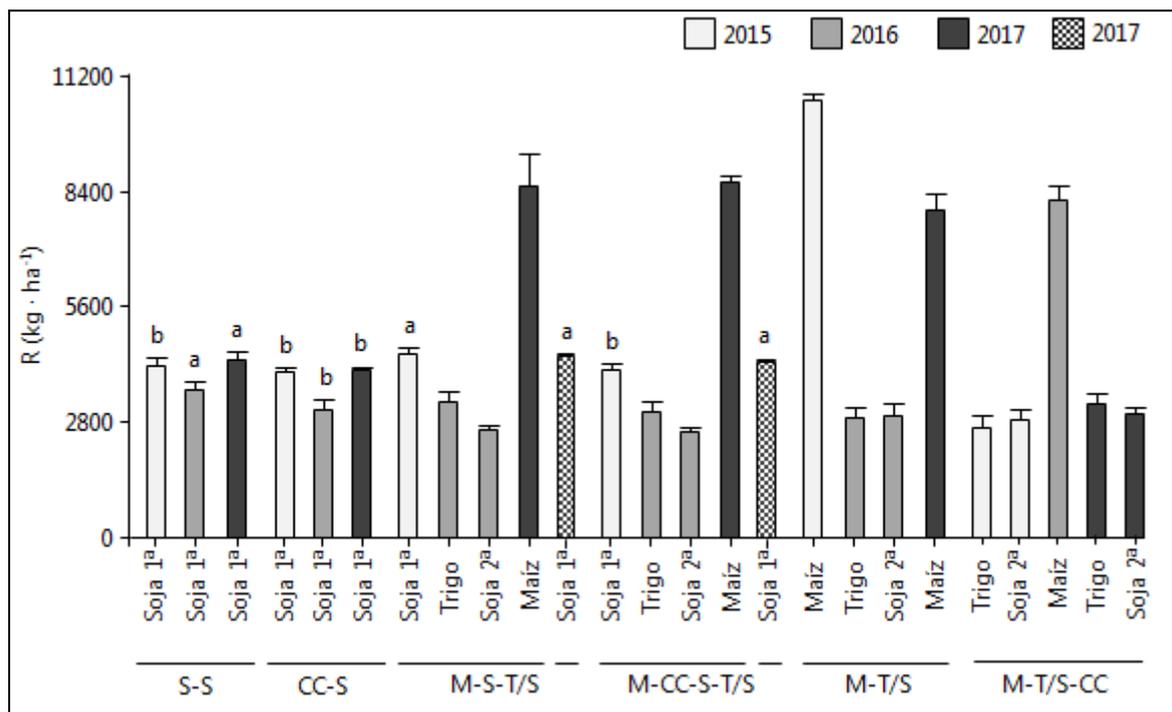
6.7. Productividad de los cultivos

Por otra parte, la productividad del cultivo fue evaluada, en primer lugar, por la producción aérea de biomasa vegetal (BV) (Tabla 9), determinada en etapa de madurez fisiológica para cada uno de los cultivos intervinientes en las secuencias. La BV acumulada durante los 3 años de evaluación para cada una de las secuencias, registró los valores más altos para CC-S y M-T/S-CC, siendo estas secuencias las de mayor índice de intensificación (ISI: 2) (Tabla 9). En segundo lugar, la productividad fue evaluada a través del rendimiento (R) de los cultivos en base a la producción de granos, determinado a la cosecha de los cultivos (Figura 13). En general, se observaron mayores R para el cultivo de soja de primera fecha de siembra (Soja 1^a) para todas las campañas agrícolas evaluadas (Figura 10). El análisis estadístico permitió diferenciar a la secuencia CC-S como la de menor rendimiento para el cultivo de soja siendo significativa en las campañas 2016 y 2017 (Figura 14).

Tabla 9. Producción de biomasa vegetal de los cultivos en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados a madurez fisiológica de cada cultivo en 2015, 2016 y 2017.

SECUENCIA	CULTIVOS	2015	2016	2017	TOTAL
		BV (kg · ha ⁻¹)			
S-S	Soja 1 ^a	5874	7960	8563	13834
CC-S	CC	3029	4552	3469	
	Soja1 ^a	5612	6804	8044	31508
M-S-T/S	Soja1 ^a	6240			
	Trigo		4808		
	Soja 2 ^a		4464		
	Maíz			4970	20483
M-CC-S-T/S	CC	2806			
	Soja1 ^a	5723			
	Trigo		4470		
	Soja 2 ^a		4369		
	Maíz			5032	22400
M-T/S	Maíz	6848			
	Trigo		4211		
	Soja 2 ^a		5026		
	Maíz			4641	20726
M-T/S-CC	Trigo	4264			
	Soja 2 ^a	5428			
	CC		3793		
	Maíz		5835		
	Soja 2 ^a			5483	
				4615	29417

Referencias: Biomasa vegetal (BV), Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC).



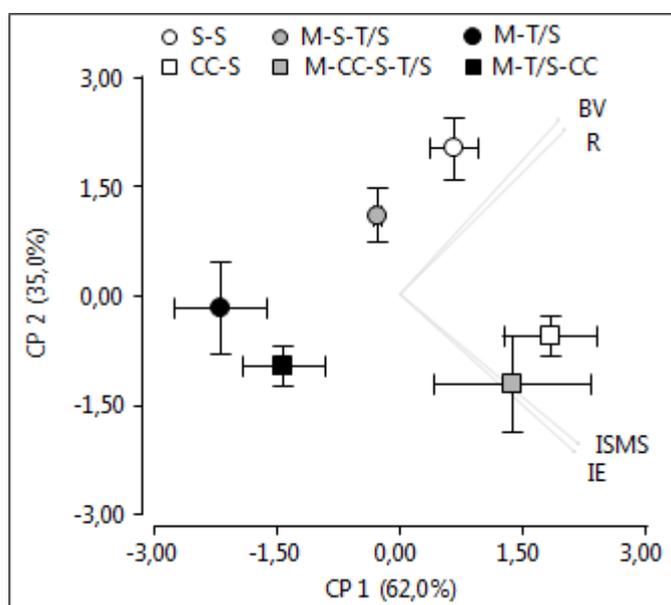
Referencias: Rendimiento (R), Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Letras distintas por campaña y cultivo indican diferencias significativas para ($p \leq 0,05$). Las barras de error indican desviación estándar.

Figura 14. Rendimiento de los cultivos y análisis estadístico para soja de 1ª, en base a la intensificación de las secuencias agrícolas en un ensayo de larga duración, siendo los resultados a la cosecha de cada cultivo en 2015, 2016 y 2017.

6.8. Relación entre la ISMS y productividad del cultivo de soja

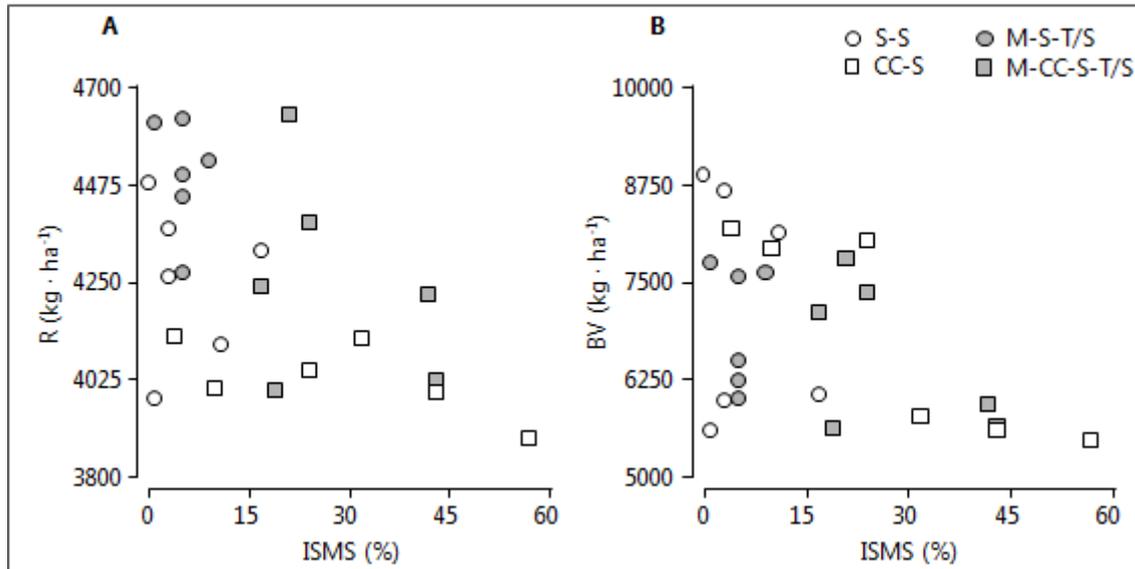
A su vez, mediante un análisis de componentes principales (ACP) a partir de la ISMS, IE y la productividad del cultivo (BV y R), se evidenciaron diferencias entre las secuencias agrícolas (Figura 15). El ACP explicó mediante las primeras dos componentes principales, CP1 y CP2, el 62% y 35% de la variabilidad total de los datos, respectivamente. A la derecha del eje CP1 se observaron los parámetros de productividad agrícola asociados a la secuencia S-S, mientras que la CP2 separó dichas secuencias con la inclusión de CC en relación con la ISMS. Por otra parte, en el cuadrante inferior izquierdo se observó la secuencia con el cultivo de soja de segunda fecha de siembra (M-T/S-CC), con menores niveles de productividad e ISMS (Figura 15).

A partir de lo observado en el ACP, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la ISMS y los parámetros de productividad. En este análisis sólo se incluyeron los años dónde se observó la presencia de la enfermedad (2015 y 2017) y las secuencias con cultivo de soja de primera fecha de siembra. Tanto para el rendimiento como la producción de biomasa del cultivo de soja se registró una correlación significativa ($p \leq 0,01$) y negativa, coeficientes $-0,52\%$ y $-0,51\%$, respectivamente. Los resultados se pueden observar mediante un diagrama de dispersión a partir de los parámetros productivos en relación a la ISMS de la soja (Figura 16 A y B).



Referencias: Incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS), intensidad de la enfermedad (IE), rendimiento (R) y biomasa vegetal (BV). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Las barras de error indican desviación estándar.

Figura 15. Análisis de componentes principales (ACP) para evaluar la relación entre el síndrome de la muerte súbita y la productividad del cultivo de soja, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015 y 2017.

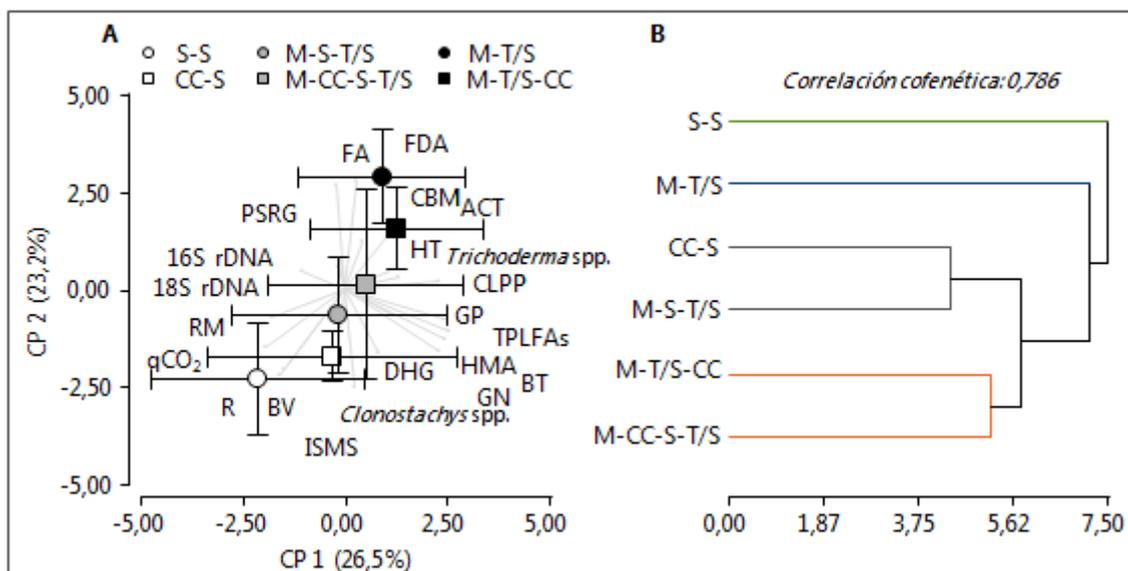


Referencias: Incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS), rendimiento (R) y biomasa vegetal (BV). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC).

Figura 16. Diagrama de dispersión para evaluar la relación entre la incidencia del síndrome de la muerte súbita y la productividad del cultivo de soja en A: rendimiento y B: biomasa vegetal, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, para las cosechas 2015 y 2017.

6.9. Relación entre la diversidad microbiana del suelo, la ISMS y productividad del cultivo de soja

La relación entre la estructura, funciones y parámetros generales de las comunidades microbianas del suelo en relación a la ISMS y la productividad del cultivo de soja se analizó mediante un ACP (Figura 17 A). El ACP explicó mediante las primeras dos componentes principales, CP1 y CP2, el 26,5% y 23,2% de la variabilidad total de los datos, respectivamente; evidenciando diferencias entre las secuencias agrícolas. A la derecha del eje CP1 se observó que las actividades enzimáticas FDA y FA, y el CBM, diferenciaron a M-T/S y M-T/S-CC respecto de S-S y CC-S. Estas últimas secuencias, principalmente S-S, se asociaron a las variables de productividad del cultivo de soja. Esto fue confirmado a partir de un análisis de conglomerados, donde el dendrograma reveló la conformación de cuatro grupos entre las secuencias, quedando M-T/S y S-S en los últimos niveles de asociación al 95% y 100% de la distancia total, respectivamente (Figura 17 B).



Referencias: GP (bacterias Gram positivas), GN (bacterias Gram negativas), BT (bacterias totales), HT (hongos totales), HMA (hongos micorrícicos arbusculares), ACT (Actinobacterias), TPLFAs (biomasa microbiana total). Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP), hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), actividad fosfatasa ácida (FA), deshidrogenasa (DHG), carbono de biomasa microbiana (CBM), respiración microbiana (RM), coeficiente metabólico (qCO_2) y proteínas de suelo relacionadas a glomalina (PSRG). Incidencia del síndrome de la muerte súbita (ISMS), rendimiento (R) y biomasa vegetal (BV). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). Soja (S), maíz (M), trigo (T), cultivo de cobertura invernal (CC). A) Las barras de error indican desviación estándar. B) Diferentes colores indican distintos clusters al 75% de la distancia Euclídea.

Figura 17. Análisis de componentes principales (ACP) para evaluar la relación entre las variables microbiológicas, la incidencia del síndrome de la muerte súbita y la productividad del cultivo de soja, en respuesta a la intensificación agrícola incluyendo cultivos de soja, maíz y trigo en un ensayo de larga duración, siendo los resultados un promedio para las cosechas 2015, 2016 y 2017.

7. DISCUSIÓN

7.1. La diversidad microbiana del suelo en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas.

7.1.1. Estructura de las comunidades microbianas

Constitución de las comunidades microbianas por perfiles de fosfolípidos (PLFAs)

Los fosfolípidos son un componente estructural esencial de las membranas de las células vivas, por lo tanto, el análisis de PLFAs proporciona información directa sobre la estructura de la comunidad microbiana activa del suelo (Kaur et al., 2005), y es capaz de determinar los cambios que acompañan a las perturbaciones del suelo, como las prácticas de cultivo (Zelles, 1999). En el presente trabajo las secuencias de cultivos no lograron diferenciarse claramente a través de la cuantificación de la biomasa de los grupos taxonómicos y la biomasa total de la comunidad microbiana edáfica.

Se sabe que la reducción en la diversidad de las plantas va acompañada de una disminución en la diversidad microbiana de ese suelo (Altieri, 1999; Hector y Bagchi, 2007). Sin embargo, en nuestro estudio no pudo evidenciarse este efecto posiblemente porque, como lo afirmaron algunos autores, la comunidad microbiana del suelo es bastante resistente a las alteraciones ambientales (Hirsch et al., 2009; Kulmatiski y Beard, 2011). Otro resultado encontrado fue una gran abundancia relativa de BT respecto de los HT. Esto puede deberse a la conversión de una comunidad de plantas estable (baja productividad, crecimiento lento, entorno pobre en nutrientes) como un sitio natural, en una comunidad de plantas inestable (alta productividad, crecimiento rápido, entorno rico en nutrientes) como son los agroecosistemas. Esto habría promovido un recambio intenso de la estructura de la comunidad microbiana de una red alimentaria del suelo conformada mayoritariamente por hongos a una constituida por bacterias (Van Der Heijden et al., 2008; Wardle et al., 2004). En relación con lo anterior, otras investigaciones reportaron que los patrones de crecimiento de los hongos, junto a su capacidad para degradar compuestos como lignina y celulosa, evidencian que

los hongos tienen menores requerimientos nutricionales que las bacterias (Güsewell y Gessner, 2009; Strickland y Rousk, 2010). Por lo tanto, estas diferencias fisiológicas pueden ser la razón del dominio de PLFAs bacterianos en el suelo, tal como lo demuestran estudios realizados por nuestro grupo de trabajo en sistemas agrícolas con inclusión de CC (Chavarría et al., 2016a) y aplicación de fertilización mineral (Verdenelli et al., 2013).

En particular, nuestros resultados mostraron que la biomasa de la comunidad procariota estuvo dominada por bacterias GN, independientemente de la secuencia agrícola. Además, las bacterias GN fueron las que más contribuyeron a la biomasa estimada por TPLFAs. En este sentido, se ha informado con frecuencia que las bacterias del suelo, y en particular las bacterias GN, parecen ser un indicador sensible de la fertilidad del suelo y la sostenibilidad de un sistema de manejo (Zhong et al., 2010), ya que utilizan preferentemente insumos vegetales frescos como fuentes de C (Si et al., 2017). Este podría ser el motivo por el cual se observaron en nuestro ensayo diferencias significativas para las secuencias con inclusión del CC o presencia de un cultivo invernal particularmente en la campaña 2015. A su vez, la mayor fertilización recibida en esos tratamientos podría estar contribuyendo a los incrementos de bacterias GN, tal como lo reportan Eo y Park (2016). Con respecto a las bacterias GP y ACT, en nuestros resultados, el número no difirió significativamente entre las distintas secuencias, con excepción de la campaña 2015 y 2016, donde menores porcentajes de bacterias GP y ACT respectivamente, se registraron en la secuencia de monocultivo (S-S ISI=1). Varios autores, han reportado que las bacterias GP incluyendo a las ACT, se comportan de manera diferente a los miembros de otros grupos taxonómicos. Por ejemplo, ya sea bajo CC (Buyer et al., 2010), incorporación de gramíneas (Bossio y Scow, 1998), o en suelos con pastizales (Denef et al., 2009) aumentaron su cantidad, pero en menor proporción que otros grupos, lo que indica que serían menos activas en la utilización de C (Buyer et al., 2010).

En cuanto a la biomasa de HT y HMA, en general, no se vieron afectadas por la intensificación de las secuencias agrícolas. Los resultados fueron muy variables en cada campaña evaluada, con lo cual no pudo registrarse una tendencia clara a lo largo del tiempo del ensayo. Tal como se mencionaba anteriormente, los menores requerimientos energéticos y una mayor eficiencia en la utilización de los

recursos por parte de las poblaciones fúngicas (Frey, 2007), podrían ser los motivos por los cuales no se observó una respuesta a la diversificación del sistema agrícola. Además, la proliferación bacteriana pudo generar efectos antagonistas en el crecimiento fúngico. Dicha acción antagonista entre hongos y bacterias del suelo ha sido reportada por diferentes autores (Meidute et al., 2008; Geisseler y Scow, 2014), y en particular para las ACT, conocidas por sus propiedades antagónicas, es decir, por la producción de compuestos antifúngicos (Chamberlain y Crawford, 1999). Específicamente, los HMA, forman asociaciones mutualistas (simbióticas) con las raíces de la mayoría de las plantas superiores, incluyendo los principales cultivos agrícolas (Rillig, 2004). Los HMA, han sido documentados por sus efectos sobre la nutrición de las plantas, la contribución al aumento de la resistencia a la sequía de los cultivos, protección contra patógenos y por su producto, la glomalina (PSRG) que juega un papel importante en la agregación del suelo afectando la dinámica del carbono (C) en los agroecosistemas (Singh, 2012). No es sorprendente que se haya documentado una reducida diversidad de HMA en los agroecosistemas (Rillig et al., 2003; Oehl et al., 2003; 2009). Un estudio llevado a cabo por Orio et al. (2016), en lotes de producción agrícola, informó menor riqueza y diversidad en suelos bajo sucesión de plantas monocotiledóneas respecto de suelos con alternancia y/o combinación de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los autores concluyen que la variabilidad de las comunidades de HMA está influenciada por los esquemas de rotación de cultivos que involucran un cambio en la clase de los componentes de la planta.

En resumen, las secuencias con mayor índice de intensificación ($ISI > 1$) se destacaron por presentar una mayor abundancia de grupos taxonómicos y TPLFAs. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores (Pankhurst et al., 2003), y podrían estar relacionados con las diferencias en el aporte de C lábil y otros nutrientes provistos por el rastrojo y los residuos específicos de cada cultivo (Montecchia et al., 2011), como también por la fertilización mineral (Zhong et al., 2010). En el ensayo, la tendencia puede deberse al aporte de nutrientes generado tanto por la inclusión del CC como por la presencia continua de sistemas de raíces vivas en el suelo, conduciendo a un aumento general de biomarcadores microbianos en las parcelas bajo intensificación agrícola sustentable.

Abundancia de bacterias y hongos totales del suelo estimada por qPCR

En las últimas décadas, la aparición de técnicas moleculares ha sido una importante alternativa metodológica en la valoración de la diversidad taxonómica microbiana (Liu et al., 2006). La utilización de estas técnicas puede proporcionar una aproximación más exacta de la estructura y diversidad existente en el ecosistema edáfico (Nannipieri et al., 2003). En nuestro estudio, la abundancia de bacterias y hongos totales mediante qPCR no expresó una tendencia clara entre las secuencias de cultivos a lo largo del tiempo del ensayo. Nuestros resultados fueron coincidentes con los hallados por Pérez Brandan et al. (2017), quienes reportaron que luego de seis años de efecto acumulativo de la inclusión de una pastura tropical como CC, no se registró un efecto significativo en la abundancia de bacterias y hongos, comparado con la rotación convencional. Del mismo modo, Chavarría et al. (2018), estudiando sistemas agroecológicos vs convencionales con y sin CC, no lograron diferenciar los tratamientos mediante la cuantificación de las comunidades bacterianas y fúngicas mediante qPCR. Contrariamente a los resultados obtenidos para PLFAs, la cuantificación de bacterias y hongos por qPCR en todas las secuencias evaluadas registró en promedio una relación HT:BT positiva. En general, se reconoce que una alta relación HT:BT indica agroecosistemas más sostenibles y bajos impactos en el medio ambiente, en los que las comunidades microbianas del suelo dominadas por hongos pueden mejorar el almacenamiento de C y contribuir a la lenta mineralización de la MO, dominando el suministro de nutrientes a las plantas (Bardgett et al., 1999; Thiet et al., 2006). En este sentido, una alta proporción de HT:BT generalmente ocurre en ecosistemas de pastizales inalterados, pastizales que carecen de historias de fertilización a largo plazo y agroecosistemas bajo la labranza reducida (Bailey et al., 2002; Pérez Brandan et al., 2017). En resumen, la cuantificación de la abundancia de grupos taxonómicos de hongos y bacterias mediante qPCR tuvo menor influencia en la diferenciación de los tratamientos en comparación con PLFAs. Una posible explicación podría estar relacionada con la desventaja asociada a las técnicas de detección de ADN, que es la inclusión de elementos no viables de la comunidad microbiana, debido a la persistencia y posible extracción de la secuencia objetivo (Mazolla, 2004). Sin embargo, esta metodología puede proporcionar información sobre los mecanismos involucrados en la sostenibilidad

de los sistemas productivos, por lo tanto, profundizar en el estudio de diferentes grupos específicos de bacterias y hongos puede ser un objetivo a futuro.

Microorganismos biocontroladores

La diversidad funcional de los hongos del suelo y su capacidad para colonizar diversos microhábitats puede influir en los niveles de patógenos y desempeñar un papel importante en la mejora de la salud de las plantas (Vinale et al., 2008). En particular, los géneros *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y son utilizados en agricultura como agentes de control biológico de patógenos transmitidos por el suelo, debido a sus propiedades biopesticidas, biofertilizantes y promotoras de crecimiento de las plantas (Harman et al., 2004; Castillo et al., 2016). Por esta razón, la cuantificación de microorganismos del género *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp., puede ser útil para evaluar la salud edáfica (Sparling, 1997). Ambos géneros fúngicos habitan naturalmente una importante variedad de suelos agrícolas, preferentemente con abundante MO y altas densidades de raíces o desechos vegetales (Lenc et al., 2015). Los resultados del ensayo destacaron mayores porcentajes de *Trichoderma* spp. correspondientes a las secuencias con inclusión del cultivo de maíz en la rotación. Al mismo tiempo, el monocultivo (S-S) registró los menores porcentajes respecto del total de hongos cultivables. Esta situación no se vio reflejada en el porcentaje de *Clonostachys* spp. siendo sus resultados variables respecto de cada campaña agrícola, sin lograr una clara diferenciación de las secuencias bajo intensificación sustentable respecto del monocultivo. Autores como Meriles et al. (2009), Larkin (2003) y Shen et al. (2013), afirmaron que los residuos aportados por el cultivo antecesor son capaces de alterar las poblaciones de biocontroladores. Nuestros resultados fueron coincidentes con los reportados por Pérez Brandan et al. (2014a) donde los residuos de maíz aportados por el cultivo en la rotación tuvieron un efecto benéfico sobre las poblaciones de *Trichoderma* spp. En concordancia, Qiao et al. (2017) indicaron que los residuos de maíz producen mayores cantidades de C comparados con los de soja, resaltando los efectos de la inclusión del maíz en los sistemas de rotación de cultivos y su impacto sobre el establecimiento de microorganismos benéficos. Al respecto, varios autores han observado que poblaciones de potenciales biocontroladores

presentaron una marcada disminución bajo manejos convencionales, particularmente cuando se incrementan los años de implantación del cultivo de soja (Shen et al., 2008; Meriles et al., 2009). Igualmente, Vargas Gil et al. (2011) observaron una disminución en las poblaciones de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. por efecto de prácticas no conservacionistas y sistemas agrícolas convencionales. Por otra parte, la relación entre los microorganismos biocontroladores y la aplicación de fertilizantes no tiene respuestas concluyentes. En particular, algunas especies de *Trichoderma* spp. se han visto incrementadas con fertilizaciones combinadas de nitrógeno-fósforo-potasio-azufre (NPKS) (Nie et al., 2018).

7.1.2. Funciones en las que están involucrados los microorganismos

Diversidad catabólica por consumo de sustratos carbonados (CLPP)

El perfil fisiológico a nivel comunitario (CLPP) refleja la capacidad fisiológica de las comunidades microbianas heterotróficas para utilizar una variedad de sustratos de C, y de esta manera estimar la diversidad funcional del suelo (Brackin et al., 2013). Su evaluación se ha empleado como medio para diferenciar las comunidades microbianas según la influencia de una variedad de factores que incluyen el tipo de suelo, las especies de plantas, las prácticas de labranza, y secuencias de cultivo, entre otras (Mazzola, 2004). En relación a CLPP, los resultados a partir del AWCD fueron variando entre las campañas agrícolas. En general, las secuencias con inclusión del CC y rotación con cultivo de maíz, se destacaron por incrementos en el consumo de fuentes carbonadas. Otros autores, reportaron un alto consumo general de los sustratos de C en tratamientos con inclusión de CC (Chavarría et al., 2016b; Nivelles et al., 2016), indicando una mejora de la diversidad catabólica. A su vez, Govaerts et al. (2007) informaron que la rotación de maíz y trigo bajo labranza convencional con retención de residuos mostró un valor global de AWCD significativamente más alto en comparación con otros tratamientos, mientras que el AWCD bajo labranza cero y remoción de residuos fue significativamente menor. En adición, Lupwayi et al. (1998) registraron la influencia negativa de la labranza sobre la diversidad de bacterias al reducir la riqueza y la uniformidad del sustrato. Estos autores también observaron que la

diversidad microbiana fue mayor para el cultivo de trigo cuando éste estuvo precedido por residuos verdes de leguminosas, que cuando su antecesor fue un trigo o barbecho. Con esos antecedentes, se destaca la importancia de las prácticas de manejo conservacionistas. Sin embargo, debe mencionarse que existen reportes donde se considera que la mayoría de los suelos agrícolas presentan un bajo número de especies y alta homogeneidad en comparación con áreas de pastizales no perturbadas (Graham y Haynes, 2005). Así, por ejemplo, Gomez et al. (2004) encontraron que CLPP fue consistentemente distintivo entre sitios, en la medida que aumentaba el tiempo transcurrido desde la pérdida de vegetación nativa. Tal como lo afirmó Giller (1996), la diversidad catabólica en el suelo depende, entre otros factores, de la heterogeneidad de los recursos alimenticios y de la especialización trófica, con lo cual, sería de esperar que los hábitats con alta y variada producción de residuos, resultaran en una alta diversidad catabólica. Retomando a los sistemas productivos, el suelo bajo planteos agrícolas con SD, rotación de cultivos y cobertura permanente (CC), luego de varios años, podría resultar con una mayor variedad de sustratos, lo que probablemente explica en parte por qué los microorganismos utilizaron más sustratos en las secuencias intensificadas que bajo la exposición al monocultivo.

Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas del suelo dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este heterogéneo y complejo sistema. Están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas y químicas, y son sensibles a los cambios generados por las prácticas de manejo (Rincón y Muñoz, 2005). Los microorganismos, juegan un papel clave en el ciclo de los nutrientes del suelo, ya que producen enzimas que catalizan innumerables reacciones necesarias para sus propios procesos metabólicos (Tabatabai, 1994; Dick, 1997).

Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA)

La hidrólisis de FDA proporciona información sobre la actividad microbiana total, debido a que este sustrato es digerido por una gran variedad de enzimas (esterasas, proteasas y lipasas no específicas), presentes en bacterias y hongos, involucradas en la descomposición microbiana de la MO (Gajda et al., 2013). En nuestras evaluaciones, la actividad enzimática medida a través de la hidrólisis de FDA registró incrementos para las secuencias M-T/S-CC y M-T/S, a lo largo del tiempo del ensayo. Por el contrario, S-S fue la secuencia con menores valores de actividad FDA. De manera similar, Serri et al. (2018) obtuvieron mayores valores de actividad global para las secuencias que incluyeron trigo como cultivo invernal (S-T/S y M-T/S) respecto de las secuencias basadas únicamente en cultivos de verano (S-S y M-S). Shahzad et al. (2015) encontraron que los exudados de las raíces son utilizados por los microorganismos en su mayoría para sintetizar y liberar enzimas extracelulares. A su vez, las comunidades microbianas del suelo en la rizósfera responden de manera diferente a los exudados de la raíz asociados con varios cultivos (Costa et al., 2006; Wardle et al., 2004). En este sentido, las rotaciones de cultivos responden a una mayor abundancia y diversidad de desechos vegetales, y a un extenso sistema de raíces, lo que puede soportar una mayor diversidad de descomponedores microbianos (Venter et al., 2016). Por otra parte, una explicación a la baja actividad de FDA en el monocultivo, podría deberse a que la fijación biológica del nitrógeno, asociada principalmente a la simbiosis de leguminosa-rizobio, ocurre a través de una cascada de reacciones que involucran sistemas complejos de enzimas, muchas de ellas extracelulares (Sathya et al., 2016). En este sentido, la inoculación al cultivo de soja con bacterias fijadoras de nitrógeno, podría alterar la producción de enzimas extracelulares como consecuencia del mecanismo de fijación biológica. A su vez, la baja incorporación de residuos por la siembra continua de un mismo cultivo (S-S), disminuye la disponibilidad de fuentes carbonadas, además de otras fuentes nutricionales, lo que explicaría el detrimento de la actividad enzimática global.

Actividad fosfatasa ácida (FA)

Los microorganismos del suelo producen fosfatasas ácidas o alcalinas, realizadas por un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de ácido fosfórico (Nahas, 2002). La actividad FA libera fosfato inorgánico de la materia orgánica, dejándolo disponible para las plantas (Allison et al., 2010). Además, se ha demostrado que la actividad de la fosfatasa está inversamente relacionada con la disponibilidad de P inorgánico en los sistemas del suelo, motivo por el cual son extensamente estudiadas (Allison et al., 2007). Nuestros resultados fueron consistentes con los informados por otros autores, quienes registraron un aumento de la actividad enzimática FA, a raíz de la incorporación de cultivos invernales vs barbecho, independientemente del sistema de labranzas (Balota et al., 2014). De igual manera, Ferreras et al. (2009) registraron mayor actividad FA sobre la base de ensayos bajo rotación (maíz-soja-trigo/soja) vs monocultivo (soja-soja), y siembra directa con CC vs labranza combinada. En relación al contenido de P en el suelo, cuyo aumento puede inhibir la FA (Nannipieri et al., 2002), nuestros resultados fueron inconsistentes. Sin embargo, haciendo una observación particular sobre la secuencia S-S, ésta registró menores valores de FA en todas las campañas evaluadas en concordancia con incrementos de P respecto de algunas secuencias bajo intensificación sustentable. Se ha comprobado que la eficiencia microbiana disminuye cerca de 100 veces con incrementos de las relaciones C:N y C:P de los sustratos (Goldman et al., 1987). Por el contrario, enmiendas orgánicas con bajos índices de C:N y C:P, como los residuos de soja, satisfacen la demanda de nutrientes de los microbios y se descomponen rápidamente, lo que da como resultado una mineralización neta temprana de los nutrientes (Hadas et al., 2004), lo que podría explicar la mayor disponibilidad de P en el suelo. A su vez, dado que la FA es una exoenzima, puede permanecer retenida en los sitios de intercambio y, en condiciones de baja concentración de P en la solución del suelo, libera fosfatos de los complejos orgánicos para equilibrar los niveles de P edáfico (Tabatabai, 1982). Esto pone de manifiesto la importancia de la enzima en el ciclo del P y en el mantenimiento de niveles de P biodisponible del suelo (Quiquampoix y Mousain, 2005), y más aún en sistemas con cultivos de cobertura debido al potencial aporte de P del residuo vegetal (Kwabiah et al., 2003).

Actividad deshidrogenasa (DHG)

Enzimas intracelulares como la DHG, permiten tener una idea de los procesos microbianos que ocurren en el suelo debido a que se encuentran asociadas a la biomasa activa. La actividad de estas enzimas constituye un indicador del sistema redox microbiano, por lo que se la suele considerar un buen exponente de las actividades oxidativas del suelo (Camiña et al., 1998; Nannipieri et al., 2003). En contraposición a las actividades FDA y FA, los datos obtenidos para la actividad enzimática DHG registraron en general menores niveles en las secuencias con mayor inclusión de gramíneas en la rotación, y mayores niveles en S-S. Nuestros resultados se contraponen a los hallados por otros autores. De hecho, varios han informado que la DHG fue mucho mayor en sistemas bajo rotación de cultivos que bajo monocultivo (Zhang et al., 2010; Velmourougane et al., 2013). Otros, informaron que la actividad DHG fue significativamente mayor en sistemas de labranza cero, independientemente de la presencia de CC (Nivelle et al., 2016). Sin embargo, para algunos autores, deben incluirse otros factores como la composición de especies, la textura del suelo, la disponibilidad de nutrientes y datos climáticos estacionales, entre otros; que son grandes determinantes en las variaciones de la enzima DHG, incluso más que las prácticas de manejo antrópico (Quilchano et al., 2002; Badiane et al., 2001). En este sentido, se han reportado estudios en los que el pH influyó sobre la actividad DHG, produciendo aumentos de actividad a medida que el pH se acercaba a la neutralidad (7,8) (Ramos Vásquez y Zúñiga Dávila, 2008). Situación que se observó en nuestro ensayo para el monocultivo (S-S). A su vez, Verdenelli et al. (2018) informaron que excepto por la actividad DHG, las demás actividades enzimáticas tendieron a aumentar en los tratamientos fertilizados en comparación a los suelos sin fertilizar. Mastro et al. (2006) sugirieron que la actividad DHG es sensible a los efectos inhibidores asociados con la adición de fertilizantes, principalmente nitrogenados. Lo cual podría deberse al incremento de nitratos y su efecto de interferencia como aceptores de electrones alternativos en la reacción redox (Casida et al., 1964). Durante el ensayo los cultivos de maíz y trigo recibieron fertilización nitrogenada a diferencia del cultivo de soja. Esto podría explicar por qué las secuencias más intensificadas no registraron aumentos de la actividad DHG.

Parámetros microbianos generales

Carbono de biomasa microbiana (CBM)

La biomasa microbiana representa el componente vivo de la MO del suelo, excluyendo las raíces de las plantas y, la meso y macrofauna (Jenkinson y Ladd, 1981). Aunque, suele representar menos del 5% de la MO del suelo, lleva a cabo muchas funciones críticas en el ecosistema edáfico, entre las cuales se destaca la conducción de la transformación biogeoquímica de la mayoría de los nutrientes, determinando su disponibilidad en el suelo (Nannipieri et al., 2002). Entre los parámetros generales, el CBM es considerado por muchos investigadores el más confiable (Gil-Sotres et al., 2005). En nuestros resultados, el contenido de CBM fue afectado por la secuencia agrícola empleada. El promedio de CBM para todas las campañas evaluadas, indicó para la secuencia S-S una importante reducción respecto de M-T/S, que fue la secuencia con mayor CBM. Sin embargo, la inclusión del CC no registró incrementos significativos respecto de las secuencias equivalentes, con excepción de CC-S cuyo contenido de CBM siempre fue superior al de S-S. Hallazgos realizados por King y Hofmockel (2017) sugieren que los sistemas de cultivo diversificados (maíz/soja/grano pequeño + alfalfa/alfalfa), incluso cuando se laborean periódicamente, soportan niveles más altos de biomasa microbiana (mayor retención de C) y presentan una capa microbiana activa más profunda (0-20 cm) que los sistemas de cultivo menos diversos (maíz/soja). A su vez, González-Chávez et al. (2010) recomiendan la labranza cero junto con la rotación de cultivos para aumentar el secuestro de C del suelo. Por lo tanto, una mayor biomasa microbiana en sistemas de cultivo diversificados puede ser consecuencia de la mayor disponibilidad de sustratos, donde una mayor retención y reciclaje de C mejora el sustrato disponible para apoyar el crecimiento microbiano y la biosíntesis (Geyer et al., 2016). A pesar de los bajos valores de stock de CMB en términos absolutos, esta reserva de C orgánico se considera la fuente de C lábil más importante, vital para la dinámica del COS, el ciclo de los nutrientes y para el mantenimiento de la calidad ambiental del suelo (Maia et al., 2007).

Respiración microbiana (RM)

La respiración del suelo representa la oxidación de la materia orgánica mediada por los organismos aeróbicos del suelo (Saviozzi et al., 2001). La RM se considera un bioindicador de la calidad edáfica y su evaluación proporciona una medida de la actividad potencial de la comunidad microbiana (Dutta et al., 2010). Nuestro estudio reveló, para todas las campañas evaluadas, que la RM fue diferente entre las secuencias agrícolas. Sin embargo, los resultados no mostraron una tendencia clara en respuesta a la inclusión de CC. Solo de manera estable, se diferenció la secuencia M-CC-S-T/S (ISI=1,66) por su menor liberación de CO₂. En general, el aumento de la RM involucra una mayor actividad biológica, lo que para algunos autores implica la conservación de la calidad del suelo (Balota et al., 2004). En este sentido, diversos estudios han demostrado que la RM se incrementa por el agregado de compost (Pérez-Piqueres et al., 2006) y residuos de cosecha (Geisseler et al., 2011), inclusión de CC (Chavarría et al., 2016b) y prácticas de manejo como la SD (Babujia et al., 2010). Por lo tanto, una alta actividad biológica indicada por la liberación de CO₂, puede ser el resultado de una gran reserva de C lábil, donde la descomposición es intensa; o bien, podría estar asociado con la oxidación de materiales orgánicos como resultado de la adición de residuos orgánicos (Maia et al., 2007). Sin embargo, se debe tener cuidado al interpretar la RM, ya que las altas emisiones de CO₂ por la biomasa microbiana del suelo podrían indicar una situación de perturbación, pero también, podrían indicar un estado de equilibrio de la materia orgánica del suelo (Islam y Weil 2000b; Maia et al., 2007). Gilani y Bahmanyar (2008) demostraron que la RM se encuentra en estrecha relación con el contenido de COS, por lo cual para entender mejor los efectos de la intensificación agrícola sustentable respecto del monocultivo se propuso el cálculo de la relación entre el CBM y la RM, es decir el coeficiente metabólico (qCO₂).

Coefficiente metabólico (qCO_2)

El qCO_2 es un índice que fisiológicamente describe el sustrato mineralizado por unidad de carbono de biomasa microbiana (Bastida et al., 2008). Esta relación se ha utilizado ampliamente como un buen indicador de las alteraciones que tienen lugar en el suelo, como las prácticas de manejo (Dilly et al., 2003). El qCO_2 indica el nivel de estrés de la población microbiana, mientras más alto, esa población es metabólicamente menos eficiente, ya que libera más C del que incorpora a su biomasa (Anderson, 2003). Las parcelas en estudio sólo registraron diferencias significativas para algunas de las campañas evaluadas. En general, el menor valor se observó para la secuencia M-T/S, mientras que la secuencia de monocultivo (S-S) fue significativamente superior al resto de los tratamientos. Según Anderson y Domsch (1993), coeficientes metabólicos comparativamente bajos constituyen una característica típica de comunidades microbianas diversas y muy relacionadas entre sí. Ferreras et al. (2009) hallaron que el qCO_2 en parcelas cultivadas fue mayor respecto al suelo prístino, poniendo en evidencia un mayor gasto energético para el mantenimiento metabólico, ya que, en las parcelas se determinó una población microbiana de menor tamaño que respiraba a una tasa mayor. Otros estudios, registraron un bajo valor del qCO_2 para el tratamiento más diversificado, entre ellos, agrosilvopastoril (Maia et al., 2007) o rotación continua de cultivos (Anderson y Domsch, 1990) respecto del monocultivo; lo que podría estar asociado con una mayor diversidad de sustratos orgánicos en ese sistema y favoreciendo una utilización más eficiente de la MO del suelo por parte de la comunidad microbiana. En otras palabras, una RM más elevada en relación al tamaño de la biomasa microbiana (CBM), como lo observado en S-S, puede estar manifestando una menor eficiencia metabólica de los microorganismos ($>qCO_2$), como respuesta a la baja disponibilidad de nutrientes o sustratos como el C orgánico (Agnelli et al., 2001). A pesar de que, nuestros resultados registraron en ocasiones mayores valores de RM en los suelos bajo intensificación agrícola sustentable, el aumento del CBM en esas secuencias consiguió una disminución del qCO_2 , lo cual sugiere que el ecosistema de dichos suelos es más estable que el de los suelos bajo monocultivo.

Proteínas de suelo relacionadas con Glomalina (PSRG)

La glomalina es una glicoproteína liberada por las hifas de los HMA, cuya presencia en las raíces y el suelo juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura edáfica (Wright y Upadhyaya, 1996). Un gran avance en la investigación sobre el rol de las PSRG ha sido la demostración de una fuerte y positiva correlación con la estabilidad de los agregados del suelo en una amplia variedad de ecosistemas (Wright y Upadhyaya, 1998). En el contexto agrícola, se ha demostrado que las concentraciones de PSRG responden de manera diferente a las especies de plantas (Rillig et al., 2002), prácticas de labranza (Wright et al., 1999) y sistemas de rotación de cultivos (Wright y Anderson, 2000). Estos son resultados importantes, ya que demuestran claramente que los grupos PSRG son sensibles a las prácticas de manejo (Singh, 2012). En nuestro estudio, el promedio de las campañas agrícolas registró para la secuencia M-T/S el mayor contenido de PSRG. Al respecto, existen indicios de que algunos sistemas agrícolas sustentables favorecen la producción de PSRG (Wright et al., 2005; 2007). De acuerdo con esto, otros autores informaron que la inclusión de maíz en la rotación a largo plazo incrementó la variedad y cantidad de los nutrientes del suelo, permitiendo un aumento en los niveles de PSRG (Preger et al., 2007; Wright y Upadhyaya, 1998). A su vez, varios autores reportan una mayor diversidad de HMA producto de rotaciones de cultivos, que podrían tener un rol importante en las concentraciones de PSRG (Oehl et al., 2003; 2010; Hijri et al., 2006; Cofré et al., 2017). Aunque la rotación parece tener efectos favorables, la intensificación de la secuencia mediante la inclusión del CC no marcó una diferencia sobre la producción de PSRG. Sin embargo, otras investigaciones registraron un incremento en parámetros relacionados con HMA, incluyendo las PSRG, ante la inclusión de CC en sistemas de cultivo de maíz, siendo el CC también una gramínea (García-González et al., 2016). A su vez, varios autores reconocen la importancia de la SD sobre la preservación de los contenidos de PSRG, pero están de acuerdo en que se deben reforzar las estrategias que coaccionan para mejorar las condiciones del suelo a través del empleo de tácticas conservacionistas (Wright y Upadhyaya, 1996; Haddad et al., 2009).

7.1.3. Indicadores de estructura y funcionalidad microbiana en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas

El análisis conjunto de los indicadores de estructura microbiana (ACP) fue menos preciso en la diferenciación de la secuencia de monocultivo respecto de los sistemas agrícolas con intensificación sustentable, que los parámetros de funcionalidad microbiana. En la diferenciación de las secuencias agrícolas, según el comportamiento de las variables de estructura, se evidenció una leve diferenciación de las secuencias con maíz e inclusión del CC, donde TPLFAs fue el parámetro con mayor influencia (Figura 6A). Esto fue corroborado por el conglomerado conformado únicamente por la secuencia de monocultivo (S-S), que se presentó completamente diferenciado del conjunto integrado por las demás secuencias (Figura 6B). Este escenario fue compatible con el análisis de integración de PLFAs realizado por Pérez Brandan et al. (2014b), quienes registraron una transición entre el monocultivo de maíz, la rotación maíz/soja y el monocultivo de soja, presentando la rotación los valores más altos de biomasa total. Por su parte, la integración de las funciones y parámetros microbianos generales, no hizo más que reflejar los resultados individuales obtenidos en nuestro estudio. Los conglomerados generados han registrado una asociación entre las secuencias con mayor frecuencia de gramíneas en la rotación. Wardle (2002), afirmó que las propiedades microbiológicas del suelo pueden ser fluctuantes según distintos niveles de perturbación. Sin embargo, la extrema perturbación que ocurre bajo la presión de selección impuesta por el monocultivo a largo plazo, puede reducir la actividad y crecimiento microbiano del suelo. Esto puede tender a la predominancia de un menor número de especies y, por lo tanto, provocar la reducción de la diversidad y la funcionabilidad de las enzimas intervinientes en los ciclos biogeoquímicos (Wardle, 2002), como lo observado en la mayoría de los parámetros funcionales evaluados en este trabajo. Además del aumento observado para la funcionalidad edáfica, los resultados sugirieron un incremento de la biomasa de suelo como respuesta a la diversificación del sistema mediante la rotación y/o el uso del CC. Esto se comprobó por la estrecha asociación observada entre el CBM y las actividades enzimáticas FDA y FA (Figura 8A), las cuales registraron valores significativamente mayores bajo CC. Por lo tanto, los resultados sugieren que diferentes especies de plantas pueden mejorar la calidad y la

cantidad de exudados radicales liberados al suelo modificando las interacciones microbianas de la rizósfera y promoviendo una mayor actividad de enzimas (el Zahar Haichar et al., 2014). En resumen, si bien la diversidad de los organismos del suelo es importante, la capacidad de las comunidades microbianas del suelo para mantener la diversidad funcional durante los procesos críticos del suelo a través de la perturbación o el estrés podría ser, en última instancia, más importante para la productividad y estabilidad del ecosistema que la diversidad taxonómica (Caldwell, 2005).

7.2. Interrelación de las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas.

7.2.1. Variables químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas

La MO de los suelos, en sentido amplio, está constituida por todas las sustancias orgánicas del mismo. En nuestro ensayo, los macronutrientes evaluados en el suelo fueron afectados en distinto grado por las secuencias agrícolas empleadas. El principal constituyente de la MO es el C, que llega a representar entre el 40 y el 60 % de su masa dependiendo del grado de transformación. El CO del suelo constituye un componente significativo del "pool" de C global (Alvarez, 2005). En general, el contenido de CO se incrementó en las secuencias con mayor índice de intensificación agrícola. Por su parte, el N es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. En el suelo se encuentra bajo la forma de N orgánico (98%) e inorgánico (2%), representando en total el 5% de la MO (Bono y Romano, 2012). El ion NO_3^- , como resultado del proceso de mineralización del N orgánico, es la principal forma de N en el suelo fácilmente disponible para las plantas. En relación a los niveles de NO_3^- , en general se observaron menores contenidos en las secuencias agrícolas S-S y M-T/S. En sentido opuesto, el P disponible en el suelo se incrementó para dichas secuencias. El efecto de los CC en los suelos y cultivos subsiguientes en la región pampeana, fue estudiado por Alvarez et al. (2017) mediante un metanálisis en base a resultados de 67

experimentos de campo, en los que se analizaron los efectos del CC de invierno en los suelos y cultivos. Su análisis determinó que las reservas de CO del suelo generalmente mejoraron bajo los CC. Varios estudios han informado que las prácticas de manejo, como la rotación de cultivos y la intensificación de las secuencias de cultivos mediante el uso de CC, aumentan la retención de CO en el suelo (López-Fando y Pardo, 2011). McDaniel et al. (2014) han encontrado que la adición de uno o más cultivos en rotación aumentó el C y N total, pero cuando las rotaciones incluían un CC (es decir, cultivos que no se cosechan, pero se producen para enriquecer el suelo y capturar N inorgánico), el C y N total duplicaron su aumento. Estos resultados pueden estar relacionados con la mejora de las condiciones estructurales de algunos suelos bajo tratamiento de CC (Fageria et al., 2005; Harrwing y Ulrich Ammon, 2002). A su vez, dada la mayor biomasa del maíz (radical y foliar) y la biomasa incorporada por el CC, resulta esperable que la contribución de estos cultivos al contenido de MO y consecuentemente de CO, sea superior a la de soja (Belay et al., 2002). En este sentido, otras investigaciones reportan que el aumento en la frecuencia de cultivo de la soja redujo el stock de CO en el suelo (Novelli et al., 2011).

Nuestro ensayo, al igual que la mayoría de los sistemas agrícolas se caracterizó por complementar la nutrición de los cereales con N y P, siendo sólo este último también empleado en el cultivo de soja (Cordone y Martínez, 2004), ya que se ha comprobado que dicho cultivo no responde a la aplicación de N (Cordone et al., 2003; Ventimiglia et al., 2003). En general, la exportación de nutrientes en forma de granos excede a la reposición de los mismos a través de fertilizantes, generando balances nutricionales negativos para los suelos (Andriulo et al., 1996; García, 2001). Ante esta situación, se pueden emplear diversas estrategias para agregar N a los sistemas agrícolas continuos, como lo son, aumentar la participación del doble cultivo (T/S: reponiendo N a la siembra del cereal); doble cultivo de gramíneas (T/M de segunda: implican dejar de producir soja en una campaña), o la inclusión de gramíneas para ser utilizadas como CC invernal en secuencias agrícolas con predominio de soja (Cordone y Martínez, 2004). La introducción de CC en sistemas poco diversificados constituyen una herramienta estratégica para mitigar o controlar la lixiviación de NO_3^- (Constantin et al., 2010). Un estudio llevado a cabo por Restovich et al. (2012), reveló que todas las especies evaluadas como CC, al momento de secado, redujeron el contenido de

NO_3^- en el suelo entre un 50 a 90% en comparación con el control. Esta reducción, no es negativa, sino que por el contrario demuestra el potencial de los CC para reducir las pérdidas de N en los agroecosistemas, que pueden ocurrir durante el período de barbecho (otoño/invernal) y durante las primeras etapas de los cultivos de verano, cuando la lluvia supera la evapotranspiración (Constantin et al., 2010, 2015; Valkama et al., 2015). Esto explicaría en parte los menores niveles de NO_3^- obtenidos en nuestro ensayo para S-S y M-T/S, que presentan grandes períodos de barbecho, principalmente el monocultivo, comparado con las demás secuencias. Además, es muy probable que, al haberse producido una disminución en el contenido de CO, en el suelo bajo monocultivo los procesos de descomposición de la MO no se lleven a cabo normalmente, de manera que habrá menos sustrato disponible para los microorganismos que intervienen en la mineralización, incluida la del N del suelo y con ello menores valores de NO_3^- (Pérez Brandan et al., 2014b). Por otra parte, la utilización de CC depende de la relación C:N de sus residuos. En general, varios estudios sobre CC registraron una asociación positiva con el contenido de N en el suelo cuando estos fueron a base de especies leguminosas, probablemente debido a la fijación de N, en comparación con las gramíneas (Samarappuli et al., 2014; Mbutia et al., 2015). Sin embargo, de acuerdo con el nivel de N disponible, las entradas de C pueden correlacionarse negativamente con el secuestro de C a través de una aceleración inducida de la descomposición de C (Fontaine et al., 2004), teniendo en cuenta la baja relación C:N de las leguminosas. En este sentido, las gramíneas (alta relación C:N) responden a la captura de N con un aumento de la producción de materia seca; de este modo el N es retenido en forma orgánica (residuo) y podría estar disponible cuando el cultivo siguiente lo demande (Cordone y Martínez, 2004).

En cuanto al P, la mayor parte de este se encuentra en el suelo bajo formas insolubles o fijadas. Teniendo en cuenta que es un nutriente poco móvil, la mineralización del P orgánico proveniente de la MO representa una contribución significativa a las necesidades de P de la mayoría de los cultivos extensivos (Simpson et al., 2001). En muchas áreas agrícolas, el P a menudo es deficiente y los rendimientos de los cultivos se limitan si no se aplica mediante fertilización (Wang et al., 2014). A diferencia del N, el P no ha sido estudiado en profundidad en la región pampeana de Argentina. Algunos estudios realizados en la región, concluyen que la escasa reposición del P extraído ha resultado en la disminución

del P disponible, y algunas áreas han pasado de rangos de valores promedio altos ($> 20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a medios ($10\text{-}20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) o bajos ($<10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), como los determinados al sur de la provincia de Santa Fe (Rozas et al., 2012). Investigaciones realizadas en numerosos sitios de la región pampeana y también por otros países indican que los niveles de P disponible en el suelo deberían ubicarse por arriba de 20-25 ppm para lograr mayores rendimientos en los cultivos (García, 2001). Del P total del suelo, sólo las fracciones solubles y lábiles (inorgánicas) están disponibles para las plantas durante el ciclo del cultivo. Sin embargo, el P puede acumularse en el suelo bajo adición continua de fertilizantes fosfatados, creando un efecto residual que genera respuestas positivas en cultivos sucesivos (Fontanetto et al., 2000; Ciampitti et al., 2011). En el ensayo, los principales cultivos (soja de primera fecha de siembra, trigo y maíz) fueron fertilizados con PMA y urea (N), mientras que la soja de segunda fecha de siembra y el CC no fueron fertilizados. Por una parte, esto podría explicar por qué ninguna de las secuencias del ensayo mostró valores inferiores a 25 ppm de P. Por otro lado, podría estar explicando los valores más altos de P disponible en las secuencias S-S y M-T/S, en comparación con las secuencias que contienen CC o soja de segunda fecha de siembra. Además, los residuos de cultivos con baja concentración de P (alta relación C:P), como el rastrojo de cereales (debido a la re-translocación de una gran proporción de P de los tejidos vegetales al grano), no harán una contribución agrónomicamente significativa a la disponibilidad de P en el suelo, ya que se descomponen lentamente y pueden reducir la disponibilidad de P dando como resultado una inmovilización neta o asimilación en la biomasa microbiana (Damon et al., 2014; Nguyen y Marschner, 2017). En consonancia con nuestros resultados, Piotrowska y Wilczewski (2012) hallaron que el contenido de N total fue significativamente menor en el suelo control que en los tratamientos con cultivos de captura (leguminosas), mientras que la concentración de P disponible se comportó de manera opuesta; explicando que el posible efecto de los cultivos de captura podría ser interferido por la reserva de P relativamente alta en el suelo y la adición de P con fertilizantes cada año. A su vez, Varela et al. (2014) informaron que la presencia de CC no afectó el contenido de P en un sistema de monocultivo de soja. Sin embargo, otros estudios han demostrado que las leguminosas mejoran la nutrición de P de los cereales posteriores (Nuruzzaman et al., 2005; Rose et al., 2010). En resumen, el P bajo planteos de sistemas que contribuyen a aumentar la

calidad del suelo, requiere estudios más profundos ya que su disponibilidad no sólo es afectada por el cultivo de superficie y el manejo fertilizante, sino también por factores químicos (mineralogía del suelo, pH, MO, interacciones con otros productos químicos), físicos (textura, temperatura, aireación, humedad del suelo), la presencia y características de las raíces, residuos, bacterias y hongos (Ciampitti et al., 2011).

Potencial hidrógeno (pH) y Conductividad eléctrica (Ce)

Los indicadores químicos como el pH y la Ce hacen referencia a las condiciones que afectan la relación suelo-planta, y a la calidad y la disponibilidad de agua y nutrimentos para las plantas y los microorganismos (Romero et al., 2009). Ambos se relacionan con la solución externa del suelo sobre la que se realizan los aportes (riego, fertilización, etc.) y de la que se producen las extracciones (nutrición, lixiviación, etc.). El pH edáfico no solo indica si un suelo es ácido, neutro o alcalino, sino que también aporta información básica para conocer su potencial de uso agrícola, estimar la disponibilidad de nutrientes esenciales y la toxicidad de otros elementos e interpretar las tasas de muchos procesos biológicos en el suelo (Miller y Kissel, 2010). Por su parte, la Ce es proporcional al número de iones presentes en la solución del suelo y a su movilidad, por lo que permite estimar el contenido de sales. Un suelo salino se define como aquel con Ce en extracto de pasta saturada de $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ o mayor (USDA, 1993). En las campañas evaluadas el pH del suelo registró un rango entre 4,94 y 5,88, mostrando una marcada acidificación, principalmente bajo los tratamientos con rotación, mientras que, la secuencia S-S registró el nivel de pH más próximo al neutro. Por su parte, la Ce registró un rango entre 3,56 y 6,99, manifestando una clara tendencia a suelos salinos. En el ensayo los niveles más bajos de Ce fueron registrados para S-S. Mtambanengwe et al. (2006), sostienen que los suelos ácidos implican una baja en la calidad del suelo, excepto en el rango óptimo de pH 6-7, es decir, ligeramente ácido a neutro. Este rango, se corresponde con el crecimiento óptimo de las plantas y la absorción de nutrientes (Fageria, 2009), aunque algunos cultivos funcionan bien en condiciones ligeramente más ácidas, por ejemplo, 5,5-7,0 para maíz (Mutiro et al., 2006). En el caso de la Ce, valores entre $0\text{-}0,8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, son aceptables para el crecimiento de los cultivos (Luters y Salazar, 1999). Algunos

estudios han reportado acidificación en la capa superficial bajo la labranza de conservación atribuyendo esto a la retención de residuos en la superficie del suelo (Hickman, 2002; Houx et al., 2011) y a la falta de homogeneización del suelo en esos sistemas (Kautz et al., 2013). En concordancia, muchos trabajos, reportaron que el pH del suelo se correlacionó negativamente con el CO en las capas superficiales del suelo bajo SD, situación que reviste el monocultivo de soja (Miglierina et al., 2000; Martínez et al., 2016). Otros autores sugieren que las pérdidas de MO, pueden incrementar la retención de cationes, alterando el efecto tampón del pH, la infiltración del agua en el perfil del suelo y disminuyendo la Ce (Fares y Polyakov, 2006). Además, una ligera acidificación observada en las capas superficiales del suelo bajo SD, podría reducir la disponibilidad de algunos nutrientes para los cultivos (Fuentes et al., 2009; Soane et al., 2012). También es importante considerar que todos los fertilizantes inorgánicos son sales y por lo tanto tienen un efecto directo sobre el pH y la Ce. La fertilización, principalmente con N, ha sido reportada tanto en la región pampeana y en otras partes del mundo, como una de las causas de la acidificación del suelo (Miglierina et al., 2000; Graham y Haynes 2005; Iturri et al., 2011; Iturri y Buschiazzo, 2016). En cuanto a la Ce, esta puede incrementarse por la presencia de fertilizantes insolubles, como los de liberación lenta y/o la incorporación de una cantidad de fertilizante superior a las absorbidas o lixiviadas (Barbaro et al., 2014).

Infiltración básica (IB) y resistencia mecánica a la penetración (RMP)

La velocidad de infiltración es la velocidad con la cual el agua penetra en el suelo. Hay varias características que influyen en la velocidad de infiltración como la textura y estructura del suelo, las grietas, las prácticas de cultivo y la expansión del suelo cuando se humedece (Govaerts et al., 2006). Por su parte, la resistencia a la penetración es un indicador del nivel de compactación de un suelo. La compactación limita el crecimiento radicular y la cantidad de aire y agua de la que disponen las raíces (Lampurlanés y Cantero-Martínez, 2003). Los resultados de los parámetros físicos evaluados fueron contundentes en cuanto a la diferenciación del monocultivo respecto de las demás secuencias. S-S mostró una reducción e incremento significativos en la capacidad de IB y RMP, respectivamente. Estudios realizados por otros autores confirman que la SD combinada con la retención de

residuos mejoran las condiciones físicas del suelo. Por el contrario, la eliminación de residuos provocó una baja estabilidad de los agregados, una alta RMP y un planchado de la superficie (<IB), lo que dio como resultado un alto escurrimiento (Govaerts et al., 2006). A su vez, Tosi et al. (2016), registraron en suelos agrícolas con monocultivo de soja a largo plazo (>20 años) un contenido de arena un 60% más alto y una capacidad de retención de agua un 20% más baja, que en los suelos prístinos. En base a sistemas sin labranzas con adición de CC invernales, Villamil et al. (2006) informaron que bajo esos sistemas se redujo la densidad aparente y la RMP de la superficie del suelo y aumentaron la porosidad total y de almacenamiento, junto con el agua disponible para las plantas. De igual manera, Blanco-Canqui et al. (2011) registraron que la utilización de CC en la rotación mejoró las propiedades físicas del suelo. En resumen, la utilización de CC invernales tendría un impacto positivo en la sustentabilidad de los agroecosistemas permitiendo un aumento de la IB (Lal et al., 1978) y una disminución en la RMP (Folorunso et al., 1992).

7.2.2. Relación entre las variables microbiológicas, químicas y físicas del suelo en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas

En los ecosistemas agrícolas, la eliminación de la vegetación natural para implementar la introducción artificial de especies de plantas de alta productividad, junto con los aportes de nutrientes, es responsable de cambios significativos en las propiedades biológicas, químicas y físicas de los suelos y, en consecuencia, de su funcionamiento (Navarro-Noya et al., 2013; Massenssini et al., 2015). Por ese motivo, en la actualidad, la mayoría de los trabajos de evaluación de impacto antrópico sobre el suelo incluyen un abordaje multivariado que contemple un amplio grupo de aspectos microbiológicos y físico-químicos. Nuestro estudio arribó a un alto valor de consenso (93%) entre las variables de diversidad microbiana y las variables físicas-químicas, evidenciando la estrecha relación que existe entre estas propiedades edáficas (Figura 9). El resultado, fue una contundente separación del suelo bajo manejo de monocultivo respecto de las secuencias con rotación agrícola, independientemente del índice de intensificación. El ACP entre los parámetros microbiológicos, químicos y físicos

puso en evidencia aquellas variables que podrían explicar mayoritariamente la mencionada separación de tratamientos. Mientras que las variables asociadas a S-S (ISI=1) fueron la actividad DHG, el qCO_2 , el pH y la RMP, las actividades enzimáticas FDA y FA, la Ce y la IB, incidieron en la diferenciación de la secuencia M-T/S-CC (ISI=2) (Figura 10).

Los resultados de esta tesis sugieren que la intensificación agrícola sustentable influyó en el aumento del contenido de CO, lo cual genera varios beneficios en la funcionalidad del suelo de los agroecosistemas, proporcionando los recursos energéticos necesarios para el desarrollo de los cultivos. Esto fue reforzado por la correlación positiva (coeficiente de Pearson: coef.) encontrada entre las variables CBM y CO (coef. 0,90; $p < 0,01$) y, TPLFAs y CO (coef. 0,48; $p < 0,05$). De igual manera, Pérez Brandan et al. (2014a) describieron que el CBM, los hongos y bacterias totales, las PSRG y agentes potenciales de control biológico (*Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp.), fueron algunos de los parámetros microbianos que indicaron el efecto benéfico del maíz en el agroecosistema. A estos también se suman las actividades microbianas como FDA y RM que aumentaron en presencia de maíz (Pérez Brandan et al., 2014b). En el mismo sentido, en nuestro estudio se ubicaron el contenido de biomasa de HMA y el de PSRG (coef. 0,53; $p < 0,05$) que también se relacionaron de manera positiva con el CO (con HMA: coef. 0,81; $p < 0,01$ y con PSRG coef. 0,51; $p < 0,05$). Este resultado concuerda con lo expresado en la bibliografía, ya que la glomalina representa más del 5% del CO (Rillig et al., 2002) y, además, se estima que las hifas micorrícicas junto con la glomalina contribuyen con más del 15% al CO total del suelo (Miller y Jastrow, 2000).

Otra de las asociaciones encontradas fue entre las actividades enzimáticas FDA y FA (coef. 0,73; $p < 0,01$), que también se correlacionaron de manera positiva con la capacidad de IB del suelo (con FDA: coef. 0,83; $p < 0,01$ y con FA: coef. 0,60; $p < 0,01$). Esto demuestra que una mayor retención de agua generada por la diversificación del sistema (rotación + CC) puede dar lugar a una comunidad microbiana más activa, lo cual es fundamental para el desarrollo de los cultivos. Justamente, los sistemas radicales de diferentes especies vegetales, interactúan generando estructuras y niveles de agregación variables, explorando de manera diferencial las porciones de suelo y evitando la compactación edáfica (Greogory et

al., 2006). A su vez, como era de esperarse, la RMP se correlacionó negativamente con la IB (coef. -0,85; $p < 0,01$) y con la actividad FDA (coef. -0,66; $p < 0,05$). Altos valores de RMP son propios de suelos compactos y poco porosos, con aireación deficiente e infiltración lenta del agua, lo cual puede provocar anegamiento o anoxia, presentando dificultades tanto para las raíces como para la funcionalidad de la biota edáfica (Lampurlanés y Cantero-Martínez, 2003).

Las correlaciones obtenidas a partir de nuestros resultados, demuestran la importancia de estudiar la diversidad microbiana del suelo en relación a las propiedades químicas y físicas edáficas, para entender de manera global los procesos que se llevan a cabo en el sistema del suelo bajo los distintos manejos agrícolas. De acuerdo con esto, varios son los autores que concluyen sus estudios con análisis de integración de variables respecto a diferentes manejos agrícolas comparados a su vez con situaciones inalteradas (suelos prístinos) o manejos agroecológicos para lograr entender los cambios que generan a lo largo del tiempo las prácticas agrícolas (Pérez Brandan et al., 2016; Tosi et al., 2016; Chavarría et al., 2018).

7.3. Relación entre la diversidad microbiana del suelo y la incidencia de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja y la productividad del cultivo.

7.3.1. Efecto de la intensificación agrícola sustentable en la ISMS y productividad del cultivo de soja

En el presente trabajo la principal enfermedad encontrada con mayor incidencia en el cultivo de soja, fue el síndrome de la muerte súbita (SMS). El SMS es causado por un complejo de especies de *F. solani*, entre los cuales se pudo determinar la presencia de *F. virguliforme* y *F. tucumaniae*. Durante los años de evaluación, tanto el cultivo de soja de primera fecha de siembra (GM IV largo) bajo monocultivo o post-barbecho como el de segunda fecha de siembra (GM V Corto), presentaron los menores niveles de incidencia del SMS (ISMS), sin diferencias significativas entre sí. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, la inclusión del CC

mostró un claro efecto ante la incidencia de la enfermedad, que se reflejó en una correlación negativa con la productividad del cultivo.

La infección y el desarrollo del SMS son altamente dependientes de las condiciones ambientales. La humedad del suelo y las temperaturas cálidas/frías juegan un papel importante en la aparición y severidad del SMS, y los síntomas foliares son más severos durante las estaciones húmedas cuando los suelos están saturados (Leandro et al., 2013). Por su parte, la disminución del rendimiento en plantas afectadas es variable, y depende de varios factores, entre ellos la especie de *Fusarium*, genotipo y edad de la planta al momento de infección, condiciones edáficas y ambientales, fecha de siembra del cultivo, entre otras (Scandiani, 2004, Navi y Yang, 2008, Góngora-Canul y Leandro, 2011; Scandiani 2014). En nuestro país, los registros de pérdidas de rendimiento en lotes de producción asociadas con el SMS, en general estuvieron en el orden del 15 al 90% en variedades muy susceptibles, en el centro y norte respectivamente (Ivancovich et al., 1992; Pioli et al., 1993; Ploper, 1993). Otros autores reportan niveles del orden del 5 al 15%, aunque en casos puntuales se han informado pérdidas superiores al 80% (Roy et al., 1997; Westphal et al., 2008). Hasta el momento, no existe control químico adecuado para el SMS, siendo la principal herramienta para su manejo el uso de cultivares de soja parcialmente resistentes, ya que no hay genotipos con resistencia completa (Gásperi et al., 2003; Westphal et al., 2008). Por lo tanto, cualquier variedad de soja puede desarrollar la enfermedad en condiciones particularmente favorables para los patógenos (Scandiani, 2014). En nuestro estudio los GM empleados (IV largo y V Corto) no registraron diferencias entre sí, ya que se observó una ISMS similar entre ellos. Estudios realizados en base a los genotipos presentes en el país, informaron que el promedio de IE, en general, fue mayor entre los cultivares de GM V a VIII, respecto a los de GM III y IV; entre los que se encuentran los utilizados en nuestro ensayo (Lenzi et al., 2013). En consonancia, Lopes de Farias Neto et al. (2013) en Brasil, informaron que los cultivares de ciclo de maduración precoz (GM más bajos) presentaron índices de SMS inferiores a los de los genotipos de ciclo de maduración medio y tardío.

Desde hace tiempo, numerosos estudios han demostrado que la producción de soja se mejora utilizando la rotación de cultivos como una práctica de manejo (Crookston et al., 1991; Meese et al., 1991). Actualmente, las rotaciones agrícolas

con foco en el cultivo de soja se rotan con trigo como cultivo antecesor y/o los cultivos de cereales de verano, especialmente maíz y sorgo. Esta acción tiene por objetivos maximizar el potencial de rendimiento y reducir la población de patógenos (Kelley et al., 2003). Sin embargo, Whiting y Crookston (1993) encontraron que el beneficio en el rendimiento de la rotación de la soja con el maíz no parecía deberse a la reducción en la incidencia de enfermedades. A favor, otros estudios sugirieron que el aumento de los rendimientos asociados con la rotación se debió al aumento de la función radical (Copeland et al., 1993; Nickel et al., 1995) o a una reducción de los microorganismos perjudiciales del suelo que afectan el crecimiento de la raíz (Johnson et al., 1992; Vargas Gil et al., 2008a). Investigaciones basadas en el SMS, han informado que algunas prácticas culturales han sido capaces de reducir su impacto (Rupe y Hartman, 1999). En el trabajo de Rupe et al. (1997), demostraron que la rotación de soja con sorgo y trigo redujo significativamente la población del patógeno. Del mismo modo, Pérez Brandan et al. (2014a) reportaron una menor ISMS en lotes bajo rotación maíz/soja en comparación con lotes bajo monocultivo de soja en el noroeste argentino. Sin embargo, otros autores reportan que el maíz no proporcionó beneficios de rendimiento en comparación con el monocultivo de soja, y a su vez, la severidad foliar y radicular del SMS en las parcelas de rotación nunca fueron menores que en las parcelas de monocultivo de soja (Xing y Westphal, 2009). De hecho, ha habido indicios de que la presencia de residuos de maíz en el campo puede mantener los niveles de inóculo del hongo (Yang y Navi, 2010). Algunos autores, afirmaron que cultivos como maíz, trigo, raigrás, entre otros, son susceptibles de infección por *F. virguliforme*, pero no desarrollan síntomas de necrosis radicular. En sus estudios, estas plantas parecían ser asintomáticas a la enfermedad, sin embargo, las cantidades de ADN del patógeno detectado en sus raíces inoculadas fueron similares a las detectadas en plantas de soja inoculadas con el mismo patógeno (Li et al., 2000; Kolander et al., 2012). A su vez, algunos estudios han informado que en determinados sitios el monocultivo de soja resultó en la supresión del SMS en comparación con la rotación maíz/soja (Xing y Westphal, 2009). En consecuencia, y en vista de nuestros resultados, la especie de cultivo a incorporar en la rotación con soja debería ser tomada en cuenta a la hora de implementar acciones tendientes al control de esta enfermedad (Stone y Putman, 2004; Xing y Westphal, 2009; Pérez Brandan et al., 2014). A pesar de toda la información, se esperaba que

la diversificación del sistema agrícola estuviera asociada con una reducción en la presión de la enfermedad, situación que no se pudo registrar en nuestros resultados. Hay otros aspectos del manejo que pueden tenerse en cuenta para evitar esta enfermedad. Algunos autores recomiendan mejorar el drenaje de los lotes y disminuir la compactación (Lenzi et al., 2010). Suelos bien drenados, junto con el uso de cultivares resistentes, han sido informadas como prácticas agronómicas eficientes para reducir el impacto de esta enfermedad (Lopes de Farias Neto et al., 2006). Por lo tanto, el incremento de la IB y disminución de la RMP, registrados en el ensayo para las parcelas con mayor presencia de gramíneas podría ser un factor importante para disminuir la incidencia del SMS, algo que se habría esperado encontrar en este trabajo.

Los rendimientos obtenidos en el cultivo de soja en este estudio presentaron alteraciones ante la inclusión del CC durante el período evaluado. Si bien se registró una correlación negativa entre la producción de grano y la ISMS, al igual que lo reportado por Pérez Brandan et al. (2014b); se debe tener en cuenta la alta producción de BV generada en las secuencias con inclusión del CC, que podría haber afectado negativamente el rendimiento del grano de soja. Aunque es aceptado que los CC tienen el potencial de mejorar la calidad del suelo, como lo registrado en nuestro trabajo, existe información contradictoria sobre el efecto en el rendimiento de esta estrategia de manejo. En general, no se han registrado reducciones de rendimiento ante la inclusión de CC en secuencias de cultivos cuando existe disponibilidad de agua libre durante la época de producción (Ruffo et al., 2004; Capurro et al., 2010; Restovich et al., 2012). Sin embargo, diferentes revisiones mostraron que en ambientes áridos y semiáridos (<500 mm de precipitación anual) el agua almacenada en los suelos disminuyó con los cultivos de cobertura reduciendo el rendimiento de los cultivos (Cherr et al., 2006; Reeves, 1994). En la Pampa húmeda los resultados indican que el impacto negativo de los CC en el agua almacenada sería insignificante y no produciría una disminución significativa en el rendimiento de los cultivos (Blanco-Canqui et al., 2015). Aunque las pérdidas de rendimiento pueden ocurrir en años con baja cantidad de precipitaciones, los beneficios netos que proporcionan los CC al sistema en condiciones normales (sin estrés hídrico) justifican el empleo de esta técnica agrícola en regiones sin limitaciones hídricas. Tal como lo observado en las tres campañas evaluadas los regímenes de lluvias superaron los 800 mm durante el

período del cultivo de soja. En este sentido, también es interesante la mención que hacen Hartman et al. (2015) sobre la soja cultivada después del trigo de invierno, diciendo que la severidad del SMS a menudo se reduce, excepto en aquellos años en que la humedad del suelo es alta durante la siembra. Su observación indica que la alta humedad del suelo puede ser uno de los puntos más críticos, ya que se asocia con síntomas foliares graves de SMS. Por lo tanto, y teniendo en cuenta los beneficios de los CC a los agroecosistemas, habría que profundizar en el estudio del agua almacenada en el suelo al momento de la implantación del cultivo de soja, ya que podría ser un factor importante en el establecimiento del patógeno y la consecuente productividad del cultivo.

7.3.2. Relación entre la diversidad microbiana del suelo, la ISMS y productividad del cultivo de soja

La supresión biológica natural de las enfermedades transmitidas por el suelo es una función de la actividad y composición de las comunidades microbianas del suelo. Las interacciones entre microbios y fitopatógenos en el suelo pueden ocurrir antes de la siembra del cultivo y/o en la rizósfera, lo que posteriormente influye en el crecimiento y la productividad de las plantas (Penton et al., 2014). El uso de coberturas vegetales, la rotación de cultivos y sistemas de labranza reducida han sido promovidas como opciones de manejo tendientes a mejorar la calidad biológica del suelo y contribuir a la reducción de la incidencia de enfermedades fúngicas (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006; Vargas Gil et al., 2008b; Pérez Brandan et al., 2012, 2014a). En este sentido, varios trabajos informan que el empleo de prácticas conservacionistas favoreció el desarrollo de microorganismos antagonistas de patógenos, además de contribuir en la mejora de las condiciones edáficas (Danon et al., 2010; Sennoi et al., 2013). En algunos casos, se han reportado aumentos en las enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo a corto plazo (Roget, 1995; Paulitz, 2006). Sin embargo, la adopción a largo plazo de prácticas de manejo de cultivos que suministran niveles más altos de insumos de C biológicamente disponibles puede respaldar niveles más altos de supresión. Esto ocurre a través de cambios en la composición y actividad de la comunidad microbiana del suelo (Bonanomi, 2010; Postma, 2003).

El presente trabajo mostró una mejora de la condición del suelo a partir de los parámetros biológicos, químicos y físicos evaluados en respuesta a la intensificación agrícola sustentable. En particular, el ACP generado para la integración de los parámetros microbiológicos, la ISMS y el rendimiento del cultivo de soja, registró que las actividades enzimáticas FDA y FA, y el CBM, diferenciaron a M-T/S y M-T/S-CC respecto de S-S, que se asoció a las variables de productividad. Contrariamente a lo esperado, la ISMS no registró correlaciones significativas con ningún parámetro microbiológico evaluado en la tesis. Por su parte, el rendimiento de soja presentó correlaciones negativas con los parámetros biológicos CBM (coef. -0,50; $p < 0,05$), FDA (coef. -0,66; $p < 0,05$) y FA (coef. -0,61; $p < 0,05$), variables microbiológicas que fueron marcadamente inferiores para el monocultivo de soja, mientras que registró una correlación positiva con el qCO_2 (coef. 0,48; $p < 0,05$).

Muchos trabajos han demostrado la estrecha relación existente entre las enfermedades radicales y la diversidad biológica del suelo (Meriles et al., 2009; Vargas Gil, et al., 2009). De hecho, estos mismos autores reportaron que una menor incidencia de enfermedad se correlaciona con altos niveles de CBM, actividad enzimática general y densidades de microorganismos de biocontrol. Ante la aparición de SMS causada por *F. crassistipitatum*, Pérez Brandan et al. (2013) encontraron correlaciones negativas entre la ISMS y algunos parámetros biológicos como CBM, PSRG e hidrólisis de FDA, y agentes potenciales de control biológico como *Trichoderma* spp., actinobacterias y *Pseudomonas fluorescentes*. Un estudio reciente, llevado a cabo por Srour et al. (2017) reveló que el número total de taxones microbianos fue ligeramente más alto para los suelos sanos en comparación con los suelos enfermos por SMS. Sus resultados sugirieron que la abundancia relativa de múltiples taxones microbianos en el suelo juega un rol clave en la ISMS. Por ejemplo, encontraron que miembros del complejo de especies de *F. oxysporum*, *T. harzianum*, entre otros, estuvieron bien representados en los suelos sanos contribuyendo en gran medida a la supresión de enfermedades. En contraste, los suelos enfermos tenían una mayor abundancia relativa de patógenos fúngicos y bacterianos, nematodos y saprófitos. Así, por ejemplo, miembros del complejo de especies de *F. solani* sp. fueron más evidentes en los suelos enfermos (Srour et al., 2017). A su vez, estos autores no registraron diferencias significativas entre los sitios de muestreo con individuos enfermos y

sanos, basados en variables químicas edáficas. Otro relevamiento similar en nuestro país, evaluando la relación entre el estado del suelo (parámetros biológicos, químicos y físicos) asociado a plantas afectadas por SMS y plantas asintomáticas, reportaron sólo un incremento significativo del CBM en plantas asintomáticas para algunos sitios de estudio (Serri et al., 2014), identificándose aislados de *F. tucumaniae*, *F. virguliforme* y *F. crassistipitatum* (Scandiani et al., 2014). A su vez, dicho estudio informó la presencia de *Heterodera glycines*, el nematodo del quiste de la soja, cuyas densidades poblacionales fueron más elevadas en los rodales con plantas enfermas (Coronel et al., 2014). En nuestro país no existe información de la relación entre el nematodo del quiste y el SMS (Coronel et al., 2014). Sin embargo, el papel de *H. glycine* es bastante controvertido (Hartman et al., 2015), ya que algunos estudios muestran que las infestaciones por nematodos aumentan la gravedad foliar del SMS (McLean y Lawrence, 1993) y otros no (Marburger et al., 2013).

Confirmando los resultados obtenidos en nuestros análisis, varios autores afirman que la rotación de cultivos mejora la estructura del suelo y la fertilidad debido al crecimiento de diferentes tipos de cultivos en estaciones secuenciales (Balota et al., 2003; Govaerts et al., 2008) e incrementan el desarrollo de la biomasa microbiana (Angers et al., 1993; Mercante et al., 2008). Sin embargo, en cuanto a las relaciones encontradas para el rendimiento del cultivo de soja y parámetros biológicos como CBM y qCO_2 , nuestros resultados fueron opuestos a los reportados por otros autores. Investigaciones han registrado que el rendimiento de soja se correlacionó positivamente con el CBM y negativamente con el qCO_2 (Insam et al., 1991). En particular, la evaluación del qCO_2 podría explicar lo ocurrido en esta tesis. Ampliamente utilizado como indicador del desarrollo o madurez de un ecosistema, durante el cual supuestamente disminuye (Insam y Haselwandter, 1989), como también es un indicador de la perturbación del sistema, dónde supuestamente aumenta (Anderson y Domsch, 1985), el qCO_2 revela el nivel de influencia de las condiciones del medio ambiente sobre el CO del suelo (Kaschuk et al., 2010). En los suelos agrícolas, un qCO_2 alto significa que el recambio de nutrientes se realiza a altos costos de C. Esto tiene importantes implicaciones en la agricultura, ya que, si la pérdida de C por la RM es mayor a la entrada de C, podría verse afectado el contenido de CO del suelo (Insam et al., 1991). En este sentido, y tal como lo registrado en este trabajo, Pérez Brandan et al. (2017) a partir de un

análisis multivariado observaron una asociación entre el qCO_2 y el monocultivo de leguminosa, en detrimento de los contenidos de C en el suelo. Esto sugiere que los mayores rendimientos obtenidos por el monocultivo podrían deberse a la disponibilidad de C lábil del suelo de la MO, explicado por la correlación negativa con el CBM, y a la capacidad del cultivo de soja para adquirir N, lo cual no implica una limitante. Como podemos observar, estos resultados medidos luego de 10 años de la presencia del monocultivo en el ensayo, estarían indicando la pérdida de diversidad microbiana, evidenciando un deterioro del suelo.

8. CONCLUSIONES

Si bien la modernización agrícola ha conducido a un aumento sin precedentes de los rendimientos, también ha causado problemáticas y conflictos ambientales. En este sentido, los sistemas agrícolas se han perjudicado a través de la degradación de los suelos y pérdida de biodiversidad. Actualmente, el desafío se encuentra en el desarrollo de agrosistemas sostenibles que contribuyan a los servicios ecosistémicos. Ante esto, surgió la propuesta de este trabajo de tesis para evaluar el impacto de prácticas agrícolas sustentables, bajo una visión integral del agroecosistema. De esta manera, prácticas como la rotación e incorporación de un CC, factibles de ser incorporadas a los sistemas productivos actuales de la región Pampeana, son consideradas en nuestro enfoque de trabajo, para estudiar los cambios que las mismas generan en la comunidad microbiana nativa del suelo y a su vez, como ésta influye en el manejo de enfermedades en los cultivos. Esta mirada sobre las prácticas referidas constituyen aportes originales y novedosos respecto al funcionamiento de sistemas agrícolas tendientes a la intensificación sustentable.

El estudio de la diversidad microbiana del suelo representada principalmente en su estructura por la biomasa total (TPLFAs), y en sus funciones por el CBM y las actividades enzimáticas (FDA y FA), logró diferenciar al monocultivo de las secuencias bajo intensificación agrícola sustentable, evidenciando estas últimas por medio de las variables mencionadas, una mejora de las condiciones del suelo, generada por la diversificación del sistema mediante la rotación y/o inclusión del CC.

Se demostró el efecto mejorador de la diversificación agrícola en la fertilidad química del suelo, reflejado particularmente por el aumento de los contenidos de CO y NO₃⁻.

La respuesta de la condición física del suelo fue contundente y diferencial en cuanto al monocultivo de soja respecto de las demás secuencias, evidenciando el primero una reducción en la capacidad de IB e incrementos en la RMP, generando un impacto negativo en la sustentabilidad de los agroecosistemas.

Con respecto al SMS de la soja, se observó que la incidencia aumenta para las secuencias con inclusión del CC, acompañada de menores niveles de productividad del cultivo.

Si bien no se observó un efecto mejorador sobre la ISMS en soja ante la inclusión del CC, es posible que el efecto benéfico de la diversificación sobre las variables microbianas contribuya al manejo de esta enfermedad en el largo plazo. Durante estos primeros ciclos del ensayo, el trigo utilizado para CC puede haber actuado como hospedante del patógeno durante el periodo invernal. Por lo tanto, es necesario continuar analizando el desarrollo de esta enfermedad en relación con las mejoras edáficas registradas en este estudio.

Con respecto a las variables microbiológicas, químicas y físicas, el monocultivo de soja (S-S) evidenció un deterioro del suelo, explicado por un incremento del qCO_2 y la RMP. La secuencia M-T/S-CC, la más intensificada y diversificada del ensayo, se diferenció totalmente del resto de los tratamientos a través de las actividades enzimáticas FDA y FA junto a la IB. A su vez, esta secuencia presentó una menor ISMS probablemente porque la soja de segunda fecha de siembra escape a la enfermedad. Sin embargo, se debe tener en cuenta que sin verse afectada por el SMS su productividad fue menor respecto de una soja de primera fecha de siembra.

Considerando la prevalencia del monocultivo de soja en Argentina durante las últimas décadas y su consecuente efecto negativo en los suelos, la diversificación agrícola, mediante el uso de rotaciones y CC, supone una alternativa de manejo viable. Sin embargo, sus efectos sobre el desarrollo de enfermedades causadas por hongos de suelo en soja deben continuar siendo investigados.

Respondiendo a nuestra hipótesis de trabajo, la diversidad microbiana del suelo se incrementó en respuesta a la intensificación sustentable de los sistemas agrícolas de la región pampeana, pero no logró contrarrestar la incidencia del SMS de la soja y promover la productividad del cultivo.

En este sentido, habiéndose comprobado que la diversificación en los sistemas agrícolas constituye una herramienta útil para mejorar la diversidad microbiana y la fertilidad del suelo, se propone el estudio de la inclusión de diferentes especies como CC en cuanto a su influencia sobre las enfermedades causadas por hongos de suelo en soja.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, G., Duncan, H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 943-951.
- Agaras, B.C., Wall, L.G., Valverde, C. 2014. Influence of agricultural practices and seasons on the abundance and community structure of culturable pseudomonads in soils under no-till management in Argentina. *Plant Soil.* 382(1-2): 117-131.
- Agnelli, A., Ugolini, F.C., Corti, G., Pietramellara, G. 2001. Microbial biomass C and basal respiration of fine earth and highly altered rock fragments of two forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 613-620.
- Alef, K. 1995. Soil respiration. En: Alef, K., Nanninieri, P. (eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry.* Academic Press. Pp. 214-219. Harcourt Brace and Company publishers, London U.K.
- Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E.D.V. 2015. Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Sci. Total Environ.* 533: 60-68.
- Allison, S.D., Weintraub, M.N., Gartner, T.B., Waldrop, M.P. 2010. Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. En: Shukla, G., Varma, A. (eds.). *Soil enzymology.* Pp. 229-243. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Allison, V.J., Condron, L.M., Peltzer, D.A., Richardson, S.J., Turner, B.L. 2007. Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* 39(7):1770-1781.
- Altieri, M.A., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74: 19-31.
- Alvarez, R. 2005. A review of nitrogen fertilization and conservation tillage effects on soil C storage. *Soil Use Manage.* 21: 38-52.
- 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 Till. Res.* 170: 53-65.
- Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98(1-3): 285-293.
- Anderson, T.H., Domsch, K. H. 1985. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biol. Fert. Soils.* 1(2): 81-89.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1993. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effect of environmental conditions such as pH on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25: 393-395.
- Anderson, T-H., Domsch, K. 1990. Application of eco-physiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.* 22(2): 251-255.
- Andrade, F. 2016. Impacto ambiental de la agricultura. En: Andrade, F. (ed.). *Los desafíos de la agricultura.* IPNI. 136 pp.
- Andriulo, A., Galantini, J., Abrego, F. 1996. Exportación y balance edáfico de nutrientes luego de 80 años de agricultura continua. *Información Técnica No. 147(XIV):* 1-10. Carpeta de Producción Vegetal, Serie Generalidades. EEA INTA Pergamino.
- Andriulo, A., Guérif, J., Mary, B. 1999. Evolution of soil carbon with various cropping sequences on the rolling pampas. Determination of carbon origin using variations in natural ¹³C abundance. *Agronomie.* 19: 349-364.

- Angers, D.A., Bissonnette, N., Légère, A., Samson, N. 1993. Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. *Can. J. Soil Sci.* 73: 39-50.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Scandiani, M.M. 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, 46(3): 162-183.
- Aoki, T., Scandiani, M.M., O'Donnell, K.L. 2012. Phenotypic, molecular phylogenetic and pathogenic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov. a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. *Mycoscience*. 53: 167-186.
- Augusto, J., Brenneman, T.B., Culbreath, A.K., Sumner, P. 2010. Night spraying peanut fungicides I. Extended fungicide residual and integrated disease management. *Plant Dis.* 94(6): 676-682.
- Babujia, L.C., Hungria, M., Franchini, J., Brookes, P.C. 2010. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biol. Biochem.* 42(12): 2174-2181.
- Badiane, N.N.Y., Chotte, J.L, Pate, E., Masse, D. and Rouland, C. 2001. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Appl. Soil Ecol.* 18(3): 229-238.
- Bailey, K.L., Lazarovits, G. 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil Till Res.* 72(2): 169-180.
- Bailey, V.L., Peacock, A.D., Smith, J.L., Bolton Jr, H. 2002. Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 34(9): 1385-1389.
- 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. *Agric. Ecosyst. Environ.* 197: 31-40.
- Balota, E.L., Colozzi Filho, A., Andrade, D.S., Dick, R.P. 2004. Long-term tillage and crop rotation 411 effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. *Soil Till. Res.* 412 77(2): 137-145.
- Balota, E.L., Colozzi-Filho, A., Andrade, D.S., Dick, R.P. 2003. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. *Biol. Fert. Soils.* 38(1): 15-20.
- Barbaro, L., Karlanian, M., Mata, D. 2014. Importancia del pH y la Conductividad Eléctrica (CE) en los sustratos para plantas. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. pp. 11.
- Barbieri, P.A., Echeverría, H.E., Rozas, H.S., Martínez, J.P. 2015. Soybean and wheat response to lime in no-till Argentinean mollisols. *Soil Till. Res.* 152: 29-38.
- Bardgett, R.D., McAlister, E. 1999. The measurement of soil fungal: bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biol. Fert. Soils.* 29(3): 282-290.
- 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.
- BCR. 2017. Mejores rindes remontan la producción de soja a 56 M t y la de maíz a 38,0 M t. Informe especial sobre cultivos. Guía Estratégica para el Agro. AÑO IX, N° 086.
- Beck, L., Römbke, J., Breure, A.M., Mulder, C. 2005. Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotox Environ Safe.* 62: 189-200.
- Belay, A., Claassens, A.S., Wehner, F.C. 2002. Effect of direct nitrogen and potassium and residual phosphorus fertilizers on soil chemical properties, microbial components and maize yield under long-term crop rotation. *Biol. Fert. Soils.* 35: 420-427.

- Blanco-Canqui, H., Lal, R. 2010. Soil and Water Conservation. En: Blanco-Canqui H., Lal R. (eds.). Principles of Soil Conservation and Management. Pp. 1-19. Springer, Dordrecht.
- Blanco-Canqui, H., Mikha, M.M., Presley, D.R., Claassen, M.M. 2011. Addition of cover crops enhances no-till potential for improving soil physical properties. *SSSA J.* 75(4): 1471-1482.
- 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 ecosystems services: insights from studies in temperate soils. *Agron. J.* 107: 2449-2474.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F. 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* 42: 136-144.
- Bono, A., Romano, N. 2012. Nitrógeno. En: Quiroga, A., Bono, A. (eds.). Manual de fertilidad y evaluación de suelos. Publicación Técnica N° 89. Pp. 101-105. Ediciones INTA.
- Bossio, DA., Scow, K.M. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: Phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb. Ecol.* 35: 265-278
- Botta, G.F., Tolón-Becerra, A., Lastra-Bravo, X., Tourn, M., Balbuena, R., Rivero, D. 2013. Continuous application of direct sowing: Traffic effect on subsoil compaction and maize (*Zea mays* L.) yields in Argentinean Pampas. *Soil Till. Res.* 134: 111-120.
- Brackin, R., Robinson, N., Lakshmanan, P., Schmidt, S. 2013. Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 57: 68-77.
- Bradford, M.A., Keiser, A.D., Davies, C.A., Mersmann, C.A., Strickland, M.S. 2013. Empirical evidence 426 that soil carbon formation from plant inputs is positively related to microbial growth. *427 Biogeochem.* 113: 271-281.
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., Bürgmann, H., 2012. Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 4481-9.
- Bray, R.H., Kurtz, L.T. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59: 39-45.
- Bremner, JM. 1965. Inorganic forms of nitrogen. En: Black, C.A. (ed.). Methods of soil analysis. Part 2: Chemical and Microbiological properties. Pp. 1179-1232. ASA. Madison–Wisconsin–USA.
- Brouwer, C., Prins, K., Kay, M., Heibloem, M. 1988. Irrigation on water management: Irrigation on methods Training manual no 5. FAO Land and water development division, FAO, Rome.
- Brussaard, L., de Ruiter, P.C. Brown, G.G. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agric. Ecosyst. Environ.* 121(3): 233-244.
- Buschiazzo, D.E., Panigatti, J.L. Unger, P.W. 1998. Tillage effects on soil properties and crop production in the subhumid and semiarid Argentinean Pampas. *Soil Till. Res.* 49(1–2): 105-116.
- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J.P.W., Almond, R.E.A., Baillie, J.E.M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K.E., Carr, G.M., Chanson, J., Chenery, A.M., Csirke, J., Davidson, N.C., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., Galloway, J.N., Genovesi, P., Gregory, R.D., Hockings, M., Kapos, V., Lamarque, J.-F., Leverington, F., Loh, J., McGeoch, M.A., McRae, L., Minasyan, A., Morcillo, M.H., Oldfield, T.E.E., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J.R., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S.N., Symes, A., Tierney, M., Tyrrell, T.D., Vie, J.-C., Watson, R. 2010. Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science.* 328(5982): 1164-1168.
- Buyer, J.S., Teasdale, J.R., Roberts, D.P., Zasada, I.A., Maul, J.E. 2010. Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems. *Soil Biol. Biochem.* 42(5): 831-841.
- Caldwell, B.A. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia.* 49(6): 637-644.

- Camiña, F., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leirós, C. 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 30(8-9):1005-1011.
- Cano, M.A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2): 15-31.
- Capurro, J., Surjack, J., Andriani, J., Dickie, Mj., González, M.C. 2010. Evaluación de distintas especies de cultivos de cobertura en secuencias soja-soja en el área sur de la provincia de Santa Fe. Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rosario, 224 pp.
- Carmona, M. 2014. La siembra directa tiene nuevos desafíos y este año se hace notar: los patógenos habitantes del suelo y otros del tallo. Trabajo de divulgación. Cátedra de Fitopatología. FAUBA.
- Carmona, M.A., Gally, M.E., Grijalba, P.E., Sautua, F.J. 2015. Evolución de las enfermedades de la soja en la Argentina: pasado, y presente. Aportes de la FAUBA al manejo integrado. *Agronomía & Ambiente. Rev. Facultad de Agronomía UBA.* 35(1): 37-52.
- Casida, Jr, L.E., Klein, D.A., Santoro, T. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98(6): 371-376.
- Castillo, H., Rojas, R., Villalta, M. 2016. *Gliocladium* sp., important biocontrol agent with promising applications. *Revista Tecnología en Marcha. Espec. Biocontrol.* 29: 65-73.
- Caviglia, O.P., Andrade, F.H. 2010. Sustainable intensification of agriculture in the Argentinean Pampas: Capture and use efficiency of environmental resources. *Am. J. Plant. Sci. Biot.* 3(1): 1-8.
- Caviglia, O.P., Sadras, V.O., Andrade, F.H. 2004. Intensification of agriculture in the south-eastern Pampas: I. Capture and efficiency in the use of water and radiation in double-cropped wheat-soybean. *Field Crops Res.* 87(2-3): 117-129.
- Ceccon, E. 2008. La revolución verde: tragedia en dos actos. *Ciencias.* 91(1): 21-29.
- Chamberlain, K., Crawford, D.L. 1999. In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23(1): 641-646.
- 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. *Agric. Ecosyst. Environ.* 264: 1-8.
- Chavarría, D.N., Verdenelli, R.A., Muñoz, E.J., Conforto, C., Restovich, S.B., Andriulo, A.E., Meriles, J.M., Vargas Gil, S. 2016b. Soil microbial functionality in response to the inclusion of cover crop mixtures in agricultural systems. *Span. J. Agric. Res.* 14(2): e0304. 12 pp.
- Chavarría, D.N., Verdenelli, R.A., Serri, D.L., Restovich, S.B., Andriulo, A.E., Meriles, J.M., Vargas Gil, S. 2016a. Effect of cover crops on microbial community structure and related enzyme activities and macronutrient availability. *Eur. J. Soil Biol.* 76: 74-82.
- Chen, F., Zheng, H., Zhang, K., Ouyang, Z., Huailin, L. and Qian, S. 2013. Changes in soil microbial community structure and metabolic activity following conversion from native *Pinus massoniana* plantations to exotic *Eucalyptus* plantations. *Forest Ecol. Manag.* 291: 65-72.
- Cherr, C.M., Scholberg, J.M.S., McSorley, R. 2006. Green manure approaches to crop production: a synthesis. *Agron. J.* 98: 302-319.
- Ciampitti, I.A., García F.O., Picone L.I., Rubio G. 2011. Phosphorus budget and soil extractable dynamics in field crop rotations in mollisols. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75: 131-142.
- Cofré, M.N., Ferrari A.E., Becerra, A., Dominguez, L., Wall, L.G., Urcelay, C. 2017. Effects of cropping systems under no-till agriculture on arbuscular mycorrhizal fungi in Argentinean Pampas. *Soil Use and Manage.* 33(2): 364-378.

- Constantin, J., Le Bas, C., Justes, E. 2015. Large-scale assessment of optimal emergence and destruction dates for cover crops to reduce leaching in temperate conditions using STICS soil-crop model. *Eur. J. Agron.* 69: 75-87.
- Constantin, J., Mary, B., Aubrion, G., Laurent, F., Fontaine, A., Kerveillant, P., Beaudoin, N. 2010. Effects of catch crops, no till and reduced nitrogen fertilization on nitrogen leaching and balance in three long-term experiments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 135: 268-278.
- Cook, R.J. 1986. Plant health and the sustainability of agriculture with special reference to disease control by beneficial microorganisms. *Biol. Agric. Hort.* 3: 211-232.
- Copeland, P.J., Allmaras, R.R., Crookston, R.K., Nelson, W.W. 1993. Corn-soybean rotation effects on soil water depletion. *Agron. J.* 85(2): 203-210.
- Cordone, G., Martínez, F. 2004. El monocultivo de soja y el déficit de nitrógeno. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur.* 24: 1-4.
- Cordone, G., Martínez, F., Vernizzi, A., Andriulo, A., Pagani, R., Bacigaluppo, S. 2008. Efecto de la secuencia de cultivos sobre algunas propiedades edáficas monitoreadas en sistemas reales de producción. *Actas XXI Congreso Argentino Ciencia del Suelo.*
- Cordone, G., Salvagiotti, F., Bodrero, M., Capurro, J., Martínez, F., Enrico, J., Turinetto, M., Méndez, J., Trentino, N. 2003. Respuesta de soja de primera al agregado de nitrógeno en estado reproductivo. Para mejorar la producción (Campaña 2002/03 Soja). 24: 124-129.
- Coronel, N., Martínez, C., González, V., Scandiani, M., Luque, A., Serri, D., Chavarría, D., Vargas Gil, S., Carracedo, C., Carmona, M., Lenzi, L., Distéfano, S., Formento, A.N. 2014. Relación entre nematodos fitoparásitos y la ocurrencia del síndrome de la muerte súbita de la soja. 3º Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán.
- Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., Smalla, K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 236-249.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-259.
- Crookston, R.K., Kurlle, J.E., Copeland, P.J., Ford, J.H., Lueschen, W.E. 1991. Rotational cropping sequence affects yield of corn and soybean. *Agron. J.* 83(1): 108-113.
- Damon, P.M., Bowden, B., Rose, T., Rengel, Z. 2014. Crop residue contributions to phosphorus pools in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.* 74: 127-137.
- Danon, M., Chen, Y., Hadar, Y. 2010. Ascomycete communities associated with suppression of *Sclerotium rolfsii* in compost. *Fungal Ecol.* 3(1): 20-30.
- de Araújo, E.A., Ker, J.C., Neves, J.C.L., Lani, J.L. 2012. Qualidade do solo: conceitos, indicadores e avaliação. *Applied Research & Agrotechnology*, 5(1): 187-206.
- De Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B.A., Kazan, K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends Plant Sci.* 20: 91-101.
- Denef, K., Roobroeck, D., Manimel Wadu, M.C.W., Lootens, P., Boeckx, P. 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 41: 144-153.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2015. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Di Rienzo, J.A., Guzmán A.W., Casanoves F. 2002. A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat* 7(2): 1-14.

- Díaz-Zorita, M., Duarte, G.A., Grove, J.H. 2002. A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina. *Soil Till. Res.* 65(1): 1-18.
- Dick, R.P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. En: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (eds.). *Biological indicators of soil health*. Pp 121-156. CABI, Wellingford.
- Dick, R.P., Sandor, J.A., Eash, N.S. 1994. Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley. Peru. *Agric. Ecosyst. Environ.* 50: 123-131.
- Dilly, O., Blume, H.P., Sehy, U., Jiménez, M., Munich, J.C. 2003. Variation of stabilised, microbial 448 and biologically active carbon and nitrogen soil under contrasting land use and agricultural 449 management practices. *Chemosphere* 52: 557-569.
- Doran, J.W., Parkin, T.B. 1994. Defining and assessing soil quality. En: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicsek, D.F. (eds.). *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Society of America Special Publication (SSSA Spec.Publ). 35. Pp 3-21. SSSA and ASA. Madison, Wisconsin.
- Doran, J.W., Zeiss, M.R., 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 15: 3-11.
- Dutta, M., Sardar, D., Pal, R., Kole, R.K. 2010. Effect of chlorpyrifos on microbial biomass and 458 activities in tropical clay loam soil. *Environ. Monit. Assess.* 160(1): 385-391.
- el Zahar Haichar, F., Santaella, C., Heulin, T., Achouak, W. 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol. Biochem.* 77: 69-80.
- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47(1): 25-35.
- Eo, J., Park, K.C. 2016. Long-term effects of imbalanced fertilization on the composition and diversity of soil bacterial community. *Agric. Ecosyst. Environ.* 231: 176-182.
- Epelde, L.A.B., Mijangos, I. Garbisu, C. 2014. Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study. *Appl. Soil Ecol.* 75: 1-12.
- Fageria, N.K. 2009. *The Use of Nutrients in Crop Plants*. CRC Press Taylor & Francis Group, FL, USA.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., Bailey, B.A. 2005. Role of cover crops in improving soil and row crop productivity. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 36: 2733-2757.
- FAO-AMIS. 2016. Market Database. Disponible en: <http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html#DOWNLOAD>.
- FAOSTAT. 2016. Data. Land Use. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RL>.
- Farahani, H.J., Peterson G.A., Westfall D.G. 1998. Dryland cropping intensification: a fundamental solution to efficient use of precipitation. *Advances in Agronomy* 64: 197-223.
- Fares, A., Polyakov, V. 2006. Advances in crop water management using capacitive water sensors. *Adv. Agro.* 90: 43-77.
- Ferreras, L., Toresani, S., Bonel, B., Fernández, E., Bacigaluppo, S., Faggioli, V., Beltrán, C. 2009. Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *Ci. Suelo.* 27(1): 103-114.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7): 4117-4120.
- Finlay, R.D. 2004. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist* 18: 91-96.

- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., 2005. Global consequences of land use. *Science*. 309(5734): 570-574.
- Folorunso, O.A., Rolston, D.E., Prichard, T., Louie, D.T. 1992. Soil surface strength and infiltration rate as affected by winter cover crops. *Soil Technol.* 5: 189-197.
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A. 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecol. Lett.* 7(4): 314-320.
- Fontanetto, H., Keller, O., Inwinkelried, R., Citroni, N., García F. 2000. Phosphorus and sulfur fertilization of corn in the Northern Pampas. *Better Crop. Int.* 14: 3-5.
- 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. *Glob. Ecol. Conserv.* 6(Supplement C): 242-256.
- Frey, S.D. 2007. Spatial distribution of soil organisms. En: Paul, E.A. (ed.). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Pp. 283-300. 3ed. Elsevier.
- Frostegard, A., Tunlid, A., Baath, E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soil. *Soil Biol Biochem.* 43(8): 1621-25.
- Fuentes, M., Govaerts, B., De León, F., Hidalgo, C., Dendooven, L., Sayre, K.D., Etchevers, J. 2009. Fourteen years of applying zero and conventional tillage: crop rotation and residue management systems and its effect on physical and chemical soil quality. *Eur. J. Agron.* 30: 228-237.
- Gajda, A., Przewloka, B., Gawryjolek, K. 2013. Changes in soil quality associated with tillage system applied. *Int. Agrophysics.* 27: 133-141.
- García, C., Hernández, M.T., Costa, F. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 28: 123-134.
- García, F. 2001. Balance de fósforo en los suelos de la región pampeana. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur.* 9: 1-3.
- Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24: 289-300.
- Garland, J.L., and Mills, A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2351-2359.
- Gásperi, A.C., Prestes, A.M., Costamilan, L.M. 2003. Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycyne*s. *Fitopatol. Bras.* 28: 544-547.
- Geisseler, D., Horwath, W. R., Scow, K. M. 2011. Soil moisture and plant residue addition interact in their effect on extracellular enzyme activity. *Pedobiologia*, 54(2): 71-78.
- Geisseler, D., Scow, K.M. 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. *Soil Biol. Biochem.* 75: 54-63.
- Gelsomino, A., Badalucco, L., Ambrosoli, R., Crecchio, C., Puglisi, E., Meli, S.M. 2006. Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: A case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2069-2080.
- Geyer, K.M., Kyker-Snowman, E., Grandy, A.S., Frey, S.D. 2016. Microbial carbon use efficiency: accounting for population, community, and ecosystem-scale controls over the fate of metabolized organic matter. *Biogeochem.* 127: 173-188.
- Ghisalberti, E.L Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* 23: (11): 1011-1020.

- Gilani, S.S., Bahmanyar, M.A. 2008. Impact of organic amendments with and without mineral fertilizers on soil microbial respiration. *J. Appl. Sci.* 8: 642-647.
- Giller, K.E., Beare, M.H., Lavelle, P., Izac, A.M., Swift, M.J. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 6: 3-16.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37(5): 877-887.
- Glanz, J.T., 1995. *Saving Our Soil: Solutions for Sustaining Earth's Vital Resource.* Johnson Books, Boulder, CO, USA. 182 pp.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327(5967): 812-818.
- Goldman, J.C., Caron, D.A., Dennett, M.R. 1987. Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnol. Oceanogr.* 32(6): 1239-1252.
- Gomez, E., Garland, J., Conti, M. 2004. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* 26(1): 21-30.
- Gongora-Canul, C., Leandro, L. 2011. Effect of soil temperature and plant age at time of inoculation on progress of root rot and foliar symptoms of soybean sudden death syndrome. *Plant Disease* 95: 436-440.
- Gongora-Canul, C., Leandro, L. 2011. Plant age affects root infection and development of foliar symptoms of soybean sudden death syndrome. *Plant Dis.* 95: 242-247.
- González-Chávez, M.d.C.A., Aitkenhead-Peterson, J.A., Gentry, T.J., Zuberer, D., Hons, F., Loeppert, R. 2010. Soil microbial community, C, N, and P responses to long-term tillage and crop rotation. *Soil Till. Res.* 106(2): 285-293.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agric Ecosyst Environ.* 113: 17-35.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y., Sayre, K. D., Luna-Guido, M., Vanherck, K., Dendooven, L., Deckers, J. 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Appl. Soil Ecol.* 37(1-2): 18-30.
- Govaerts, B., Sayre, K. D., Deckers, J. 2006. A minimum data set for soil quality assessment of wheat and maize cropping in the highlands of Mexico. *Soil Till. Res.* 87(2): 163-174.
- Graham, M., Haynes, R. 2005. Organic matter accumulation and fertilizer induced acidification interact to affect soil microbial and enzyme activity on a long-term sugarcane management experiment. *Biol. Fertil. Soils.* 41: 249-256.
- Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J., Ritz, K., 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Appl. Soil Ecol.* 16: 49-61.
- Güsewell, S., Gessner, M.O. 2009. N:P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Funct. Ecol.* 23(1): 211-219.
- Hadas, A., Kautsky, L., Goek, M., Erman Kara, E. 2004. Rates of decomposition of plant residues and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biol. Biochem.* 36: 255-266.
- Haddad, F., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Teixeira, H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Bio. Control.* 49: (2): 114-119.
- Hai, B., Diallo, N.H., Sall, S., Haesler, F., Schauss, K., Bonzi, M., Assigbetse, K., Chotte, J.L., Munch, J.C., Schloter, M. 2009. Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the

- rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(15): 4993-5000.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43-56.
- Harrwing, N.L., Ulrich Ammon, H. 2002. Cover crops and living mulches. *Weed Sci.* 50: 688-699.
- Hartman, G.L., Chang, H.X., Leandro, L.F. 2015. Research advances and management of soybean sudden death syndrome. *Crop Prot.* 73: 60-66.
- Harwood, R.R., 1990. A history of sustainable agriculture. En: Edwards, C.A., Lal, R., Madden, P., Miller, R.H., House, G. (eds.). *Sustainable Agricultural Systems. Soil and Water Conservation Society.* Pp. 3-19. Ankeny, Iowa, USA.
- Hebel, C.L., Smith, J.E., Cromack, J.K. 2009. Invasive plant species and soil microbial response in the cascade range of Oregon. *Appl. Soil Ecol.* 42: 150-159.
- Hector, A., Bagchi, R., 2007. Biodiversity and ecosystem multifunctionality. *Nature* 448: 188-190.
- Herrick, J.E., Jones, T.L. 2002. A dynamic cone penetrometer for measuring soil penetration on resistance. *Soil Sci. Soc. Am J.* 66: 1320-1324.
- Hickman, M.V. 2002. Long-term tillage and crop rotation effects on soil chemical and mineral properties. *J. Plant Nutr.* 25: 1457-1470.
- Hijri, I., Sýkorová, Z., Oehl, F., Ineichen, K., Mäder, P., Wiemken, A., Redecker, D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecol.* 15(8): 2277-2289.
- Hill, G., Mitkowski, N., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L., Jurkonie, D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S., Nelson, E. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* 15, 25-36.
- Hirsch, P.R., Gilliam, L.M., Sohi, S.P., Williams, J.K., Clark, I.M., Murray, P.J., 2009. Starving the soil of plant inputs for 50 years reduces abundance but not diversity of soil bacterial communities. *Soil Biol. Biochem.* 41: 2021-2024.
- Houx, J.H., Wiebold, W.J., Fritschi, F.B. 2011. Long-term tillage and crop rotation determines the mineral nutrient distributions of some elements in a Vertic Epiaqualf. *Soil Till. Res.* 112: 27-35.
- Huber, V., Neher, I., Bodirsky, B.L., Höfner, K., Schellnhuber, H.J. 2014. Will the world run out of land? A Kaya-type decomposition to study past trends of cropland expansion. *Environ. Res. Lett.* 9(2): 024011.
- Huggins, D.R., Allmaras, R.R., Clapp, C.E., Lamb, J.A., Randall, G.W. 2007. Corn-soybean sequence and tillage effects on soil carbon dynamics and storage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71:145-154.
- Insam, H., Haselwandter, K. 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia.* 79(2): 174-178.
- Insam, H., Mitchell, C.C., Dormaar, J.F. 1991. Relationship of soil microbial biomass and activity with fertilization practice and crop yield of three ultisols. *Soil Biol. Biochem.* 23(5): 459-464.
- Islam, K.R., Weil, R.R. 2000b. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. *Agric. Ecosys. Environ.* 79: 9-16.
- Islam, K.R., Weil, R.R., 2000a. Soil quality indicator properties in mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. *J. Soil Water Conserv.* 55: 69-78.
- Iturri, L., Buschiazzi, D., Díaz-Zorita, M. 2011. Acidification evidences of no-tilled soils of the central region of Argentina. *Ci. Suelo.* 29: 13-19.

- Iturri, L.A., Buschiazzi, D.E. 2016. Light acidification in N-fertilized loess soils along a climosequence affected chemical and mineralogical properties in the short-term. *Catena*: 139, 92-98.
- Ivancovich, A., Botta, G., Annone, J. 1992. Síndrome de la muerte repentina en cultivos de soja en el área de la EEA Pergamino, Carpeta de Producción Vegetal. Información N° 94. Tomo XI, Soja.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Maitelle, T., Steinberg, C., 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biol. Biochem.* 39: 1-23.
- Jenkinson, D.S., Ladd, J.N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. En: Paul, E.A., Ladd, J.N. (eds.). *Soil Biochemistry*. Pp: 415-471. Marcel Dekker: New York.
- Johnson, N.C., Copeland, P.J., Crookston, R.K., Pflieger, F.L. 1992. Mycorrhizae: possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. *Agron. J.* 84(3): 387-390.
- Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R., Kaushik, R. 2005. Phospholipid fatty acid—a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Curr. Sci.* 89(7): 1103-1112.
- Kautz, T., Amelung, W., Ewert, F., Gaiser, T., Horn, R., Jahn, R., Javaux, M., Kemna, A., Kuzyakov, Y., Munch, J., Pätzold, S., Peth, S., Scherer, H., Schloter, M., Schneider, H., Vanderborght, J., Vetterlein, D., Walter, A., Wiesenberg, G., Köpke, U. 2013. Nutrient acquisition from arable subsoils in temperate climates: a review. *Soil Biol. Biochem.* 57: 1003-1022.
- Kelley, K., Long, J., Todd, T. 2003. Long-term crop rotations affect soybean yield, seed weight, and soil chemical properties. *Field Crops Res.*, 83(1): 41-50.
- Kennedy, A.C., Papendick, R.I., 1995. Microbial characteristics of soil quality. *J. Soil Water Conserv.* 50: 243-248.
- King, A.E., Hofmockel, K.S. 2017. Diversified cropping systems support greater microbial cycling and retention of carbon and nitrogen. *Agric. Ecosyst. Environ.* 240: 66-76.
- Klein, E., Katan, J., Gamliel, A. 2012. Soil suppressiveness to *Meloidogyne javanica* as induced by organic amendments and solarization in greenhouse crops. *Crop Prot.* 39: 26-32.
- Kolander, T.M., Bienapfl, J.C., Kurle, J.E., and Malvick, D.K. 2012. Symptomatic and asymptomatic host range of *Fusarium virguliforme*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Dis.* 96: 1148-1153.
- Kruger, H., Quiroga, A. 2012. La "interfase suelo-atmósfera" y su valor estratégico en regiones semiáridas. En: Álvarez, C., Quiroga, A.R. Santos, D., Bodrero, M. (eds.). *Contribuciones de los cultivos de cobertura a la sostenibilidad de los sistemas de producción*. 1a edn. INTA. La Pampa, Argentina. 170 pp.
- Kujur, M., Patel, A.K. 2014. PLFA Profiling of soil microbial community structure and diversity in different dry tropical ecosystems of Jharkhand. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3: 556-575.
- Kulmatiski, A., Beard, K.H., 2011. Long-term plant growth legacies overwhelm short-term plant growth effects on soil microbial community structure. *Soil Biol. Biochem.* 43: 823-830.
- Kwabiah, A.B., Palm, C.A., Stoskopf, N.C., Voroney, R.P. 2003. Response of soil microbial biomass dynamics to quality of plant materials with emphasis on P availability. *Soil Biol. Biochem.* 35(2): 207-216.
- Lal, R. 1978. Influence of within-and between-row mulching on soil temperature, soil moisture, root development and yield of maize (*Zea mays* L.) in a tropical soil. *Field Crops Res.* 1: 127-139.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123: 1-22.

- Lampurlanés, J., Cantero-Martinez, C. 2003. Soil bulk density and penetration resistance under different tillage and crop management systems and their relationship with barley root growth. *Agron. J.* 95(3): 526-536.
- Larkin, R.P., 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biol. Biochem.* 35: 1451-1466.
- Le´vesque, C.A., Rahe, J.E., 1992. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 579-602.
- Leandro, L.F., Robertson, A.E., Mueller, D.S., Yang, X.B. 2013. Climatic and environmental trends observed during epidemic and non-epidemic years of soybean sudden death syndrome in Iowa. *J Plant Pathol Microbiol.* 237.
- Lenc, L., Kwaśna, H., Sadowski, C., Grabowski, A. 2015. Microbiota in wheat roots, rhizosphere and soil in crops grown in organic and other production systems. *J. Phytopathol.* 163: 245-263.
- Lenzi, L., Salines, L., Distéfano, S., Ferreira, C. Supertino, M. 2010. Evaluación de cultivares de soja argentinos y exóticos frente al síndrome de la muerte súbita (*Fusarium tucumaniae*) en condiciones de campo.. Informe de Actualización Técnica N° 21: 59-62. INTA EEA Marcos Juárez.
- Lenzi, L; Masiero, B; Fuentes, F; Distéfano, S; Salines, L. 2013. Comportamiento de cultivares de soja frente al síndrome de la muerte repentina. Campañas 2006/07 a 2009/10. Informe de Actualización Técnica N°29: 31-40. INTA EEA Marcos Juárez.
- Li, S., Hartman, G.L., Lee, B.S., Widholm, J.W. 2000. Identification of a stress-induced protein in stem exudates of soybean seedlings root-infected with *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Physiol. Biochem.* 38(10): 803-809.
- Liu, B.R., Jia, G.M., Chen, J., Wang, G., 2006. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere.* 16: 18-24.
- Liu, X.Z., Zhang, L.M., Prosser, J.I., He, J.Z. 2009. Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Soil Biol. Biochem.* 41(4): 687-694.
- Lopes de Farias Neto, A., de Campos Dianese, A., Rollemberg Santin, M., do Couto, B.C. 2013. Caracterização de genótipos de soja na região dos Cerrados quanto à reação à podridão vermelha da raiz, causada pelos fungos *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium brasiliense*. *Revista Ceres*, 60(2):215-220.
- Lopes de Farias Neto, A., Hartman, G.L., Pedersen, W.L., Li, S., Bollero, G.A., Diers, B.W. 2006. Irrigation and inoculation treatments that increase the severity of soybean sudden death syndrome in the field. *Crop Sci.* 46: 2547-2554.
- López-Fando, C., Pardo, M. 2011. Soil carbon storage and stratification under different tillage systems in a semi-arid region. *Soil Till. Res.* 111: 224-230.
- Lupwayi, N.Z., Rice, W.A., Clayton, G.W. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.*30(13): 1733-1741.
- Luters, A., Salazar, J.C. 1999. USDA Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, Departamento de Agricultura, Servicio de Investigación Universidad Manuela Beltrán Agrícola Servicio de Conservación de Recursos Naturales e Instituto de Calidad de Suelos. Pp. 14-15, 33, 59-6.
- Madejón E., Murillo J., Moreno F., López M., Arrue J., Alvaro-Fuentes J., Cantero C. 2009. Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil Till. Res.* 105: 55-62.

- Maia, S.M.F., Xavier, F.A.S., Oliveira, T.S., Mendonça, E.S., Araújo Filho, J.A. 2007. Organic carbon pools in a Luvisol under agroforestry and conventional farming systems in the semi-arid region of Ceará, Brazil. *Agroforest. Syst.* 71(2): 127-138.
- Maire, N., Borcard, D., Laczkó, E., Matthey, W. 1999. Organic matter cycling in grassland soils of Swiss Jura Mountains: biodiversity and strategies of the living communities. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1281-1293.
- Marburger, D., Conley, S., Esker, P., MacGuidwin, A., Smith, D. 2013. Relationship between *Fusarium virguliforme* and *Heterodera glycines* in commercial soybean fields in Wisconsin. *Plant Health Prog.* <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-RS-13e0107>.
- Martínez, I., Chervet, A., Weisskopf, P., Sturny, W. G., Etana, A., Stettler, M., Forkman, J., Keller, T. 2016. Two decades of no-till in the Oberacker long-term field experiment: Part I. Crop yield, soil organic carbon and nutrient distribution in the soil profile. *Soil Till. Res.* 163: 141-151.
- Martínez, P.J., Barbieri, P.A., Sainz Rozas, H.R., Echeverría, H.E. 2013. Inclusion of cover crops in cropping sequences with soybean predominance in the southeast of the humid Argentine pampa. *Open Agric. J.* 7(1): 3-10.
- Massenssini, A.M., Bonduki, V.H.A., Melo, C.A.D., Tótola, M.R., Ferreira, F.A., Costa, M.D. 2015. Relative importance of soil physico-chemical characteristics and plant species identity to the determination of soil microbial community structure. *Appl. Soil Ecol.* 91: 8-15.
- Masto, E.R., Chhonkar, P., Singh, D., Patra, A. 2006. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. *Soil Biol. Biochem.* 38: 1577-1582.
- May, L.A., Smiley, B., Schmidt, M.G. 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can. J. Microbiol.* 47(9): 829-841.
- Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Ann. Rev. Phytopathology* 42: 35-59.
- Mbuthia, L.W., Acosta-Martínez, V., DeBruyn, 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 Biol. Biochem.* 89: 24-34.
- 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. *Ecol. Appl.* 24(3): 560-570.
- McLean, K.S., Lawrence, G.W. 1993. Interrelationship of *Heterodera glycines* and *Fusarium solani* in sudden death syndrome of soybean. *Journal of nematology.* 25(3): 434.
- Meese, B.G., Carter, P.R., Oplinger, E.S., Pendleton, J.W. 1991. Corn/soybean rotation effect as influenced by tillage, nitrogen, and hybrid/cultivar. *J. Prod. Agric.* 4(1): 74-80
- Meidute, S., Demoling, F., Bååth, E. 2008. Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2334-2343.
- Mercante, F.M., Silva, R.F., Francelino, C.S.F., Cavalheiro, J.C.T., Otsubo, A.A. 2008. Biomassa microbiana em um Argissolo Vermelho, em diferentes coberturas vegetais, em área cultivada com mandioca. *Acta Sci. Agron.* 34: 479-485.
- Meriles, J. M., Vargas Gil, S., Conforto, C., Figoni, G., Lovera, E., March, G.J., Guzmán, C.A. 2009. Soil microbial communities under different soybean cropping systems: Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil Till. Res.* 103(2): 271-281.

- Miller, R.M., Jastrow, J.D. 2000. Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biol. Biochem.* 22(5): 579-584.
- Miller, R.O., Kissel, D.E. 2010. Comparison of soil pH methods on soils of North America. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 74(1): 310-316.
- Montecchia, M.S., Correa, O.S., Soria, M.A., Frey, S.D., García, A.F. Garland, J.L. 2011. Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 47: 176-183.
- Mtambanengwe, F., Mapfumo, P., Vanlauwe, B. 2006. Comparative short-term effects of different quality organic resources on maize productivity under two different environments in Zimbabwe. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 76: 271-284.
- Murphy, J., Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-36.
- Mutiro, J., Makurira, H., Senzanje, A., Mul, M.L. 2006. Water productivity analysis for smallholder rainfed systems: a case study of Makanya catchment, Tanzania. *Phys. Chem. Earth* 31: 901-909.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nahas, E. 2002. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia.* 61: 267-275.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54: 655-670.
- Nannipieri, P., Badalucco, L. 2003. Processes in the soil-plant system: modelling concepts and applications. *Eur. J. Soil Sci.* 54: 655-670.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., Renella, G. 2011 Role of phosphatase enzymes in soil. En: Bunemann, E.K., Obreson, A., Frossard, E. (eds.). *Phosphorus in action. Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling.* Pp. 215-243. Springer, Berlin.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P. 2002. Enzymes activities and microbiological and biochemical processes in soil. En: Burns, R.G., Dick, R.P. (eds.). *Enzymes in the environment. Activity, ecology and applications.* Pp. 1-33. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Navarro-Noya, Y.E., Gómez-Acata, S., Montoya-Ciriaco, N., Rojas-Valdez, A., Suárez-Arriaga, M.C., Valenzuela-Encinas, C., Jiménez-Bueno, N., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L. 2013. Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 65: 86-95.
- Navi, S.S., Yang, X.B. 2008. Foliar symptom expression in association with early infection and xylem colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani* f. sp. *glycines*), the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Health Progress.*
- Nelson, D., Sommers, L. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. *Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties.* Page et al. (eds.). Am. Soc. Agron. Pp. 539-577. Madison, WI, USA.
- Nguyen, T.T., Marschner, P. 2017. Soil respiration, microbial biomass and nutrient availability in soil after addition of residues with adjusted N and P concentrations. *Pedosphere.* 27(1): 76-85.
- Nickel, S.E., Crookston, R.K., Russelle, M.P., 1995. Root growth and distribution are affected by corn-soybean cropping sequence. *Agron. J.* 87: 895-902.
- Nie, S., Lei, X., Zhao, L., Brookes, P. C., Wang, F., Chen, C., Yang, W., Xing, S. 2018. Fungal communities and functions response to long-term fertilization in paddy soils. *Appl. Soil Ecol.* 130: 251-258.

- Nilsson, M.-C., Wardle, D.A., DeLuca, T.H. 2008. Belowground and aboveground consequences of interactions between live plant species mixtures and dead organic substrate mixtures. *Oikos* 117: 439-449.
- Nivelle, E., Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., Lacouxa, J., Duclercq, J., Spichera, F., Nava-Saucedo, J-E., Catterou, M., Dubois, F., Tetu, T. 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Appl. Soil Ecol.* 108: 147-155.
- Novelli, L.E., Caviglia, O.P., Melchiori, R.J.M. 2011. Impact of soybean cropping frequency on soil carbon storage in Mollisols and Vertisols. *Geoderma* 167-168: 254-260.
- Nuruzzaman, M., Lambers, H., Bolland, M.D.A., Veneklaas, E.J. 2005. Phosphorus uptake by grain legumes and subsequently grown wheat at different levels of residual phosphorus fertilizer. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 1041-1047.
- O'Donnell, A.G., Seasman, M., Macrae, A., Waite, I., Davies, J.T., 2001. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil* 232: 135-145.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Sarver, B.A.J., Balajee, S.A., Schroers, H-J., Summerbell, R.C., Robert, VARG., Crous, P.W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y-H., Kang, S., Park, B., Geiser, D.M. 2010. An internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J Clin Microbiol.* 48: 3708-3718
- Oehl, F., Laczko, E., Bogenrieder, A., Stahr, K., Bösch, R., van der Heijden, M., Sieverding, E. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biol. Biochem.* 42(5): 724-738.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mader, P., Boller, T., Wiemken, A. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2816-2824.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Maeder, P., Wiemken, A., Boller, T. 2009. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agric. Ecosyst. Environment.* 134(3-4): 257-268.
- Orio, A.G.A., Brücher, E., Ducasse, D.A. 2016. Switching between monocot and dicot crops in rotation schemes of Argentinean productive fields results in an increment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity. *Appl. Soil Ecol.* 98: 121-131.
- Pankhurst, C.E., Magarey, R.C., Stirling, G.R., Blair, B.L., Bell, M.J. and Garside, A.L. 2003. Management practices to improve soil health and reduce the effects of detrimental soil biota associated with yield decline of sugarcane in Queensland, Australia. *Soil Till. Res.* 72: 125-137.
- Papendick, R.I., Parr, J., 1992. Soil quality - the key to a sustainable agriculture. *Am. J. Altern. Agric.* 7, 2-3.
- Parr, J.F., Papendick, R.I., Hornick, S.B., Meyer, R.E., 1992. Soil quality: attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *Am. J. Altern. Agric.* 7, 5-11.
- Paruelo, J., Guerschman, J., Piñeiro, G., Jobbagy, E.G., Veron, S., Baldi, G., Baeza, S. 2006. Cambios en el uso de la tierra en Argentina y Uruguay: marcos conceptuales para su análisis. *Agrociencia X*, 47-61.
- Paulitz, T.C. 2006. Low input no-till cereal production in the Pacific Northwest of the US: The challenges of root diseases. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 271-281.
- Pedraza, R.O., Teixeira, K.R., Scavino, A.F., de Salamone, I.G., Baca, B.E., Azcón, R., Baldani, V.L.D., Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 11(2): 155-164.

- Penton, C.R., Gupta, V.V.S.R., Tiedje, J.M., Neate, S.M., Ophel-Keller, K., Gillings, M., Harvey, P., Pham, A., Roget, D.K. 2014. Fungal community structure in disease suppressive soils assessed by 28S LSU gene sequencing. *PLoS one*, 9(4): e93893.
- Pérez Brandan, C., Arzeno, J.L., Huidobro, J., Conforto, C., Grümberg, B., Hilton, S., Bending, G.D., Meriles, J.M., Vargas-Gil, S. 2014b. The effect of crop sequences on soil microbial, chemical and physical indicators and its relationship with soybean sudden death syndrome (complex of *Fusarium* species). *Span J. Agric. Res.* 12(1): 252-264.
- Pérez Brandan, C., Arzeno, J.L., Huidobro, J., Grümberg, B., Conforto, C., Hilton, S., Bending, G., Meriles, J., Vargas Gil, S. 2012. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Prot.* 40: 73-82.
- Pérez Brandan, C., Chavarría, D., Huidobro, J., Meriles, J.M., Brandan, C.P., Vargas Gil, S. 2017. Influence of a tropical grass (*Brachiaria brizantha* cv. Mulato) as cover crop on soil biochemical properties in a degraded agricultural soil. *Eur. J. Soil Biol.* 83: 84-90.
- Pérez Brandan, C., Huidobro, J., Grümberg, B., Scandiani, M.M., Luque, A.G., Meriles, J.M. and Vargas-Gil, S. 2014a. Soybean fungal soil-borne diseases: a parameter for measuring the effect of agricultural intensification on soil health. *Can. J. Microbiology* 60: 73-84.
- Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C. 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biol. Biochem.* 38(3): 460-470.
- Pierzynski, G.M., Sims, J.T., Vance, G., 1994. *Soils and Environmental Quality*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Pioli, R., Porfiri, A., Díaz, C., Incremona, M., Morata, M. 1993. Determination of fungic diseases in soybean (*Glycine max*), previous study to evaluation of management methods. *Comunicaciones Biológicas*. 11(2): 212.
- Piotrowska, A., Wilczewski, E. 2012. Effects of catch crops cultivated for green manure and mineral nitrogen fertilization on soil enzyme activities and chemical properties. *Geoderma*. 189-190(0): 72-80.
- Pittelkow, C.M., Liang, X., Linquist, B.A., Van Groenigen, K.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(7534): 365.
- Plassart, P., Akpa Vincelas, M., Gangneux, C., Mercier, A., Barray, S., Laval, K., 2008. Molecular and functional responses of soil microbial communities under grassland restoration. *Agric. Ecosyst. Environ.* 127: 286-293.
- Ploper, L.D. 1993. Síndrome de la muerte súbita: nueva enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial* 13: 5-9.
- Postma, J., Montanari, M., van den Boogert, P.H.J.F. 2003. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity. *Eur. J. Soil Biol.* 39: 157-163.
- Preger, A.C., Rillig, M.C., Johns, A.R., Du Preez, C.C., Lobe, I., Amelung, W. 2007. Losses of glomalin-related soil protein under prolonged arable cropping: A chronosequence study in sandy soils of the South African Highveld. *Soil Biol. Biochem.* 39(2): 445-453.
- Qiao, Y., Miao, S., Han, X., Yue, S., Tang C. 2017. Improving soil nutrient availability increases carbon rhizodeposition under maize and soybean in Mollisols. *Sci. Total Environ.* 603: 416-424.
- Quilchano, C., Haneklaus, S., Gallardo, J.F., Schnug, E., Moreno, G. 2002. Sulphur balance in a broadleaf, non-polluted, forest ecosystem (central-western Spain). *Forest Ecol. Manag.* 161(1-3): 205-214.

- Quiquampoix, H., Mousain, D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. En: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (eds.). *Organic phosphorus in the environment*. Pp. 89-112. CABI, Wallingford.
- R Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponible en: <http://www.R-project.org>
- Ramos Vásquez, E., Zúñiga Dávila, D. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecol. apl.* 7(1-2): 123-130.
- Reeves, D.W., 1994. Cover crops and rotations. In: Hatfield, J.L., Stewart, B.A. (Eds.), *Crops Residue Management. Advances in Soil Science*. Pp. 125-172. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- 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 Crop. Res.* 128: 62-70.
- Rillig, M., Ramsey, P., Morris, S., Paul, E. 2003. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant Soil.* 253(2): 293-299.
- Rillig, M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.* 84: 355-363.
- Rillig, M.C., Lehmann, A. 2016. Soil microbes and community coalescence. *Pedobiologia* 59(1-2): 37-40.
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Eviner, V. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil.* 238: 325-333.
- Rincón, L.E.C., Muñoz, L.M.M. 2005. Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana.* 10(1): 5.
- Roget, D.K. 1995. Decline in root rot (*Rhizoctonia solani* AG-8) in wheat in a tillage and rotation experiment at Avon, South Australia. *Aust. J. Exp. Agr.* 35: 85-89.
- Romero, M.P., Santamaría, D.M., Zafra, C.A. 2009. Bioingeniería y suelo: abundancia microbológica, pH y conductividad eléctrica bajo tres estratos de erosión. *Umbral Científico.* 15: 67-74.
- Rose, T.J., Hardiputra, B., Rengel, Z. 2010. Wheat, canola and grain legume access to soil phosphorus fractions differs in soils with contrasting phosphorus dynamics. *Plant Soil.* 326: 159-170.
- Rotolo, G.C., Guglielmo P. 2018. Sistema integrado de cultivos, una contribución ecológica para producir con sostenibilidad. Artículo de divulgación. Disponible en: <https://inta.gov.ar/documentos/sistema-integrado-de-cultivos-una-contribucion-ecologica-para-producir-con-sostenibilidad>. Consultado 23/10/2018.
- Roy, K.W., Rupe, J.C., Hershman, D.E., Abney, T.S. 1997 Sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis.* 81: 1100-1111.
- Rozas, H.S., Echeverría, H.E., Angelini, H. 2012. Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región Pampeana y Extra-Pampeana argentina. *RIA.* 38(1): 33-39.
- Ruffo, M.L., Bullock, D.G., Bollero, G.A. 2004. Soybean yield as affected by biomass and nitrogen uptake of cereal rye in winter cover crop rotations. *Agron. J.* 96(3): 800-805.
- Ruiz, D.E., Montecchia, M.S., Correa, O.S., Pucheu, N.L., Soria, M.A., García, A.F. 2008. Characterization of pristine and agricultural soils by catabolic profiling of microbial communities. En: *Actas del XLIV Annual Meeting-Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research*. Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 102 pp.
- Rupe, J.C., Hartman, G.L. 1999. Sudden death syndrome. En: Hartman, G.L., Sinclair, J.B., Rupe, J.C. (eds.). *Compendium of soybean diseases*. Pp. 37-39. St. Paul, APS Press.

- Rupe, J.C., Robbins, R.T., Gbur, Jr. E.E. 1997. Effect of crop rotation on soil population densities of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* and on the development of sudden death syndrome of soybean. *Crop Prot.* 16: 575-580.
- Sakschewski, B., von Bloh, W., Huber, V., Müller, C., Bondeau, A. 2014. Feeding 10 billion people under climate change: How large is the production gap of current agricultural systems? *Ecol. Modell.* 288: 103-111.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Leemans, R. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science.* 287(5459): 1770-1774.
- Salado-Navarro, L.R., Sinclair, T.R. 2009. Crop rotations in Argentina: Analysis of water balance and yield using crop models. *Agr. Syst.* 102: 11-16.
- Samarappuli, D., Johnson, B., Kandel, H., Berti, M. 2014. Biomass yield and nitrogen content of annual energy/forage crops preceded by cover crops. *Field Crops Res.* 167: 31-39.
- Samarappuli, D., Johnson, B., Kandel, H., Berti, M. 2014. Biomass yield and nitrogen content of annual energy/forage crops preceded by cover crops. *Field Crops Res.* 167: 31-39.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., Gopalakrishnan, S. 2016. Soil Microbes: The Invisible Managers of Soil Fertility. En: Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (eds.). *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity.* Pp. 1-16. Springer, New Delhi.
- Satorre, E.H. 2012. Recent changes in Pampean agriculture: possible new avenues to cope global change challenges. En: Araus, J.L., Slafer, G.A (eds.). *Crop Stress Management and Climate Change.* Pp. 47-57. CABI Series Nº 2.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Riffaldi, R. 2001. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant soil.* 233(2): 251-259.
- Scandiani, M., Serri, D., Oberto, R., Chavarría, D., Vargas Gil, S., Coronel, N., Martínez, C., González, V., Carracedo, C., Carmona, M., Lenzi, L., Distéfano, S., Formento, A.N., O'Donnell, K., Benzi, M., Luque, A. 2014. Relevamiento de agentes causales del síndrome de muerte súbita de la soja. 3º Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán.
- Scandiani, M.M., Carmona, M.A., Luque, A.G., Matos, K.d.S., Lenzi, L., Formento, Á.N., Martínez, C.V., Ferri, M.R., Lo Piccolo, M., Tartabini, M., Alvarez, D., Sautua, F. 2012. Aislamiento, identificación y daños asociados al síndrome de la muerte súbita en el cultivo de soja en Argentina. *Trop. Plant Pathol.* 37: 358-362.
- Scandiani, M.M., Luque, A.G., Razori, M.V., Ciancio Casalini, L., Aoki, T., O'Donnell, K., Spampinato, C. P. 2014. Metabolic profiles of soybean roots during early stages of *Fusarium tucumaniae* infection. *J. Exp. Bot.* 66(1): 391-402.
- Scandiani, M.M., Ruberti D., O'Donnell K., Aoki T., Pioli R., Giorda L., Luque A., Biasoli M. 2004. Recent Outbreak of Soybean Sudden Death Syndrome caused by *Fusarium virguliforme* and *Fusarium tucumaniae* in Argentina. *Plant Dis.* 88(9): 1044.
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98(1-3): 255-262.
- Sennoi, R., Singkham, N., Jogloy, S., Boonlue, S., Saksirirat, W., Kesmala, T. and Patanothai, A. 2013. Biological control of southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* using *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *Crop Prot.* 54: 148-153.
- Serri, D., Chavarría, D., Oberto, R., Vargas Gil, S., Coronel, N., Martínez, C., González, V., Carracedo, C., Carmona, M., Lenzi, L., Distéfano, S., Formento, N., Luque, A., Scandiani, M. 2014. Relación entre parámetros del suelo y la ocurrencia del síndrome de muerte súbita de la soja. 3º Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán.

- Serri, D.L., Chavarría, D., Lago, M.E., Salvagiotti, F., Bacigaluppo, S., Scandiani, M., Luque, A., Meriles, J., Vargas Gil, S. 2015. Actividad microbiana e incidencia del síndrome de muerte súbita en soja, en respuesta a la intensificación de sistemas agrícolas. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas.
- Serri, D.L., Meriles, J., Conforto, C. Pérez Brandan, C., Pastor, S., Grümberg, B., Luna, C., Lorenzon, C., Arce, J., Marelli, H., Vargas Gil, S. 2018. Incorporación de trigo en la rotación agrícola: Una herramienta para potenciar el funcionamiento del agroecosistema. *Ci. Suelo*. 36(1): 74-87.
- Shahzad, T., Chenu, C., Genet, P., Barot, S., Perveen, N., Mougín, C., Fontaine, S. 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biol. Biochem.* 80: 146-155.
- Shen, J.P., Peng C., Hang-Wei H. and Ji-Zheng H. 2013. Differential response of archaeal groups to land use change in an acidic red soil. *Sci. Total Environ.* 461-462: 742-749.
- Shen, J.P., Zhang, L.M., Guo, J.F., Ray, J.L. and He, J.Z. 2008. Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China. *Appl. Soil Ecol.* 46(1): 119-124.
- Si, G., Peng, C., Yuan, J., Xu, X., Zhao, S., Xu, D., Wu, J. 2017. Changes in soil microbial community composition and organic carbon fractions in an integrated rice-crayfish farming system in subtropical China. *Sci. Rep.* 2856: 1-10.
- Singer, J.W., Kohler, K.A. 2005. Rye cover crop management affects grain yield in a soybean-corn rotation. *Crop Managem.* 4(1).
- Singh, B.K., Millard, P., Whiteley, A.S. Murrell, J.C. 2004. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends Microbiol.* 12(8): 386-393.
- Singh, P.K. 2012. Role of glomalin related soil protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Agric. Sci. Res. J.* 2(3): 119-125.
- Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E. 1991. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agric. Ecosyst. Environ.* 34: 43-54.
- Smith, S.E., Read, D.J. 2010. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press. 800 pp.
- Soane, B.D., Ball, B.C., Arvidsson, J., Basch, G., Moreno, F., Roger-Estrade, J. 2012. No-till in northern, western and south-western Europe: a review of problems and opportunities for crop production and the environment. *Soil Till. Res.* 118: 66-87.
- Sparling, G.P. 1997. Soil microbial biomass, activity, and nutrient cycling as indicators of soil health. En: Pankhurst, C., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (eds.). *Biological Indicators of Soil Health*. Pp. 97-119. CAB International, NY.
- Srour, A.Y., Gibson, D.J., Leandro, L.F., Malvick, D.K., Bond, J.P., Fakhoury, A.M. 2017. Unraveling microbial and edaphic factors affecting the development of sudden death syndrome in soybean. *Phytobiomes*. 1(2). 91-101.
- Stirling, G., Hayden, H., Pattison, T., Stirling, M. 2016. *Soil health, soil biology, soilborne diseases and sustainable agriculture: A Guide*. Csiro Publishing. 257 pp.
- Stone, J.K. Putnam, M.L. 2004. Pathology: Leaf and Needle Diseases. En: Burle, J., Evans, J. (eds.). *Encyclopedia of Forest Sciences*. Pp. 777-785. Oxford, UK.
- Strickland, M.S., Rousk, J. 2010. Considering fungal:bacterial dominance in soils methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biol. Biochem.* 42(9): 1385-1395.
- Sydorenko, O., Tosi, M., Martinez, A., Orłowski, J., Barraco, M., Díaz-Zorita, M., Correa, O., Montecchia, M., Soria, M. 2011. Relevamiento de la diversidad microbiana en suelos agrícolas del noroeste bonaerense. *Memoria técnica 2011-2012*. Pp. EEA General Villegas.

- Tabatabai, M.A. 1982. Soil Enzymes. En: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (eds.). *Methods of analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. Pp. 903-948. American Society of Agronomy, Madison.
- Tabatabai, M.A., 1994. Enzymes. En: Weaver, R.W., Augle, S., Bottomly, P.J., Bezdicsek, D., Smith, S., Tabatabai, A., Wollum, A. (eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbial and Biochemical Properties*. Pp. 775-833. SSSA, Madison, WI.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301-307.
- Thiet, R.K., Frey, S.D., Six, J. 2006. Do growth yield efficiencies differ between soil microbial communities differing in fungal: bacterial ratios? Reality check and methodological issues. *Soil Biol. Biochem.* 38(4): 837-844.
- Tian, J., Fan, M., Guo, J., Marschner, P., Li, X., Kuzyakov, Y. 2012. Effects of land use intensity on dissolved organic carbon properties and microbial community structure. *Eur. J. Soil Biol.* 52: 67-72.
- Tiedje, J., Fernandez, A., Hashsham, S., Dollhop, S., Dazzo, F., Dickey, R., Criddle, C. 2001. Stability, persistence and resilience in anaerobic reactors: a community unveiled. En: Satoh T.M.H.T. (ed.). *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology*. Pp. 13-20. Amsterdam. Elsevier Science B.V.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- Tosi, M., Correa, O.S., Soria, M.A., Vogrig, J.A., Sydorenko, O., Montecchia, M.S. 2016. Land-use change affects the functionality of soil microbial communities: A chronosequence approach in the Argentinian Yungas. *Appl. Soil Ecol.* 108: 118-127.
- USDA, 1993. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. En: Richards. L.A. (ed.). Riverside. California.
- Valkama, E., Lemola, R., Känkänen, R., Turtola, E. 2015. Meta-analysis of the effects of undersown catch crops on nitrogen leaching loss and grain yields in the Nordic countries. *Agric. Ecosys. Environm.* 203: 93-101.
- van Bruggen, A.H.C., Semenov, A.M., 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Appl. Soil Ecol.* 15: 13-24.
- Van Der Heijden, M.G., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11(3): 296-310.
- Vance, E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707.
- 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 Till. Res.* 143(0): 59-66.
- Vargas Gil, S., Becker, A., Oddino, C., Zuza, M., Marinelli, A., March, G. 2009a. Field trial assessment of biological, chemical, and physical responses of soil to tillage intensity, fertilization, and grazing. *Environ. Manage.* 44(2): 378-386.
- Vargas Gil, S., Haro, R., Oddino, C., Kearney, M., Zuza, M., Marinelli, A., March, G.J. 2008b. Crop management practices in the control of peanut diseases caused by soilborne fungi. *Crop Prot.* 27 (1): 1-9.
- Vargas Gil, S., Meriles, J., Conforto, C., Basanta, M., Radl, V., Hagn, A., Schloter, M., March, G.J. 2011. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *Eur. J. Soil Biol.* 47: 55-60.

- Vargas Gil, S., Pastor, S., March, G.J. 2009b. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and *Actinomyces* from soil with culture media. *Microbiol. Res.* 164: 196-205.
- Vargas Gil, S., Pedelini, R., Oddino, C., Zuza, M., Marinelli, A., March, G. 2008a. The role of potential biocontrol agents in the management of peanut root rot in Argentina. *J. Plant Pathol.* 90(1): 35-41.
- Velmourougane, K., Venugopalan, M.V., Bhattacharyya, T., Sarkar, D., Pal, D.K., Sahu, A., Ray, S.K., Nair, K.M., Prasad, J., Singh, R.S. 2013. Soil dehydrogenase activity in agro-ecological sub regions of black soil regions in India. *Geoderma* 197-198: 186-192.
- Venter, Z.S., Jacobs, K., Hawkins, H-J. 2016. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. *Pedobiologia - J. Soil Ecol.* 59(4): 215-223.
- Ventimiglia, L.A., Richmond, P., Carta, H., Rillo, S. 2003. Efecto del nitrógeno mineral sobre la nodulación y el rendimiento de soja. En: Experimentación en campos de productores. Resultados campaña 2002/2003. Pp. 115-120. UEEA 9 de julio, INTA.
- Verdenelli, R.A., Chavarría, D., Dominichin, M.F. Rovea, A., Vargas Gil, S., Meriles, J.M., 2018. Influence of 12-years of NPS fertilization on soil quality, microbial community profile and activity under conservation agricultural management. *Ci. Suelo.* 36(1): 99-109.
- Verdenelli, R.A., Conforto, C.B., Pérez Brandan, C., Chavarría, D., Rovea, A., Vargas-Gil, S., Meriles, J.M. 2013. Integrated multivariate analysis of selected soil microbial properties and their relationships with mineral fertilization management in a conservation agriculture system. *Acta Agric. Scand. B Soil Plant Sci.* 63(7): 623-632.
- Viglizzo, E. 1997. Climate and land-use change in field-crop ecosystems of Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 66: 61-70.
- Viglizzo, E., Frank, F., Bernardos, J., Buschiazzo, D., Cabo, S. 2006. A rapid method for assessing the environmental performance of commercial farms in the Pampas of Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 117: 109-134.
- Viglizzo, E.F., Roberto, Z.E., Filippin, M., Pordomingo, A.J. 1995. Climate variability and agroecological change in the Central Pampas of Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 55: 7-16.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1-10.
- Wagger, M.G. 1989. Cover crop management and nitrogen rate in relation to growth and yield of no-till corn. *Agron. J.* 81(3): 533-538.
- Walkley, A., Black, I.A. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37: 29-37.
- Wang, E., Bell, M., Luo, Z., Moody, P., Probert, M.E. 2014. Modelling crop response to phosphorus inputs and phosphorus use efficiency in a crop rotation. *Field Crops Res.* 155: 120-132.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H., Wall, D.H., 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304: 1629-1633.
- Westphal, A., Abney, T.S., Xing, L.J., Shaner, G.E. 2008. Sudden Death Syndrome of Soybean. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0102-01
- Whiting, K.R., Crookston, R.K. 1993. Host-specific pathogens do not account for the corn-soybean rotation effect. *Crop Sci.* 33(3): 539-543.
- Wrather, J.A., Anderson, T.R., Arsyad, D.M., Gai, J., Ploper, L.D., Porta Puglia, A., Ram, H., Yorinori, J.T. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean production countries in 1998. *Plant Pathol.* 23:115-121

- Wright, S.F., Anderson, R.L. 2000. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central great plains. *Biol. Fertil. Soil.* 31: 249-253.
- Wright, S.F., Starr, J.L., Paltineanu, I.C. 1999. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Sci Soc. Am. J.*, 63: 1825-1829.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 161: 575-586.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198: 97-107.
- Xing, L., Westphal, A. 2009. Effects of crop rotation of soybean with corn on severity of sudden death syndrome and population densities of *Heterodera glycines* in naturally infested soil. *Field Crops Res.* 112(1): 107-117.
- Yang, X.B., Navi, S. 2010. Good harvest in corn should help manage soybean SDS. *Integr. Pest Manag. News Ser. Internet.* Disponible en: URL: <http://www.extension.iastate.edu/CropNews/2010/0910yang.htm>.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil Soils.* 29(2): 111-129.
- Zhang, N., He, X.D., Gao, Y.B., Li, Y.H., Wang, H.T., Ma, D., Zhang, R., Yang, S. 2010. Pedogenic Carbonate and Soil Dehydrogenase Activity in Response to Soil Organic Matter in *Artemisia ordosica* Community. *Pedosphere.* 20(2): 229-235.
- Zhong, W., Gu, T., Wang, W., Zhang, B., Lin, X., Huang, Q., Shen, W. 2010. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant Soil.* 326: 511-522.