



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**EFFECTO DIFERENCIAL DEPENDIENTE DE FOSFATO DE LA
VARIABILIDAD DE HONGO MICORRÍZICO SOBRE
INDICADORES BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE CALIDAD DEL
SUELO EN CULTIVO *in situ* DE YUCA EN KENIA.**

Memoria para optar al título de Bioquímica

NADYA MARÍA MARGARITA SFEIR DURÁN

Lugar de realización:

Laboratorio de Ecología y Evolución de Organismos Simbiontes,
Escuela de Biología, Universidad de Lausana, Lausana, Suiza

Profesor Patrocinante

Dra. Daniela Seelenfreund H.

Depto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile,
Santiago,
Chile

Director

Dr. Ian Sanders

Departamento de Ecología y Evolución
Escuela de Biología
Universidad de Lausana,
Lausana,
Suiza

Marzo 2021

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ecología y Evolución de Organismos Simbiontes del Departamento de Ecología y Evolución de la Universidad de Lausana, Suiza. Proyecto financiado por SNSF (Swiss National Science Foundation) CR31I3 159665/1 *A microbial revolution: improving mycorrhizal fungi to increase cassava productivity in Africa*. Proyecto en el cual participan la Universidad de Lausana en Suiza, la Universidad Nacional de Colombia y el Instituto Internacional de Agricultura Tropical en Kenia.

"Somos suelo. Somos tierra.

Estamos hechos de los mismos elementos que constituyen el universo.

Lo que hacemos al suelo, nos lo hacemos a nosotros mismos"

Vandana Shiva

AGRADECIMIENTOS

Al programa de movilidad estudiantil y a la Dirección de Escuela de Pregrado de la Universidad de Chile, a mis profesoras Daniela Seelenfreund y María Antonieta Valenzuela, quienes apoyaron desde un principio mi determinación por explorar otras fronteras, inspirándome confianza y abriendo horizontes para el intercambio de conocimientos a escala internacional. A la Universidad de Lausana, por apoyarme con el financiamiento necesario y la solícita tramitación de mi estadía. Al profesor Ian Sanders por darme la oportunidad de participar en su equipo de laboratorio y permitirme del mismo modo probar nuevas áreas del conocimiento en colaboración con un equipo internacional e interdisciplinario en la ciencia. A Diego Camilo Peña Quemba, por integrarme dentro de su proyecto de Doctorado, por el intercambio de conocimiento, la paciencia y el grato apoyo en momentos demandantes. Al Dr. Timothy Murrey por su constante apoyo en el laboratorio, imprescindible para la realización del trabajo experimental. Al profesor Van der Roeloff, que si bien no concreté mi memoria en su laboratorio, hizo todo lo necesario para que me aceptaran la solicitud de inscripción y prolongación de mi estadía en UNIL. A la familia Perret por darme facilidades y comodidades de estadía en Suiza. A mi familia y amigos por darme la confianza en mí misma y la contención emocional. Finalmente, a toda la comisión de evaluación, conformada por la directora y patrocinadora Daniela Seelenfreund, y los profesores Edwar Fuentes y Christian Wilson, por brindarme el apoyo en la redacción de mi memoria e inspirarme confianza para continuar mi carrera profesional como bioquímica.

INDICE GENERAL

Índice general	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas	III
Abreviaciones	IV
Resumen	VI
Summary	VIII
I) Introducción	1
1. Agroecología y Biología del Suelo.....	1
1.1 Agroecología.....	1
1.2 Suelo.....	4
1.3 Biología del suelo	4
1.3.1. Funciones ecosistémicas de la biología del suelo	5
1.3.2. Ciclos biogeológicos y resiliencia al cambio climático ...	6
1.3.3. Estabilización de la materia orgánica en el suelo	7
2. Salud y calidad del suelo.....	9
2.1. Salud del suelo	9
2.2. Calidad del suelo	9
2.2.1. Indicadores de calidad del suelo.....	10
2.2.2. Indicadores biológicos y bioquímicos.....	11
2.2.3. Reacciones enzimáticas del suelo	13
3. Micorrizas	15
3.1 Influencia de fosfatos en el desempeño del inóculo.....	17
3.2 Variabilidad genética de <i>Rhizophagus irregularis</i>	17
II) Metodología de la investigación	20
1. Hipótesis	20
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
2.2.1 Objetivo específico 1	20
2.2.2 Objetivo específico 2	20
2.2.3 Objetivo específico 3	20

III)	<i>Materiales y métodos</i>	21
1.	Estrategia experimental.....	21
2.	Materiales.....	22
2.1.	Materiales biológicos.....	22
2.2.	Suelo.....	22
2.3.	Reactivos.....	22
2.4.	Software.....	23
3.	Métodos.....	23
3.1.	Cultivo de especies vegetales y micorrizas.....	23
3.2.	Muestreo.....	23
3.3.	Carbono orgánico total del suelo.....	24
3.4.	Biomasa microbiana.....	24
3.5.	Respiración del suelo (liberación de CO ₂).....	26
3.6.	Actividades enzimáticas (velocidades de reacción).....	26
3.7.	Análisis estadísticos.....	28
IV)	<i>Resultados</i>	29
1.	Biomasa microbiana y carbono orgánico total.....	29
2.	Respiración del suelo.....	30
3.	Actividades enzimáticas.....	32
V)	<i>Discusión</i>	36
1.	Biomasa y carbono orgánico total del suelo.....	36
2.	Respiración y actividades enzimáticas del suelo.....	38
2.1	Respiración del suelo.....	39
2.2	Actividades enzimáticas del suelo.....	41
VI)	<i>Conclusiones</i>	48
1.	En relación con el contenido de Carbono Orgánico total y Microbiano del suelo.....	48
2.	Con respecto a la respiración del suelo.....	48
3.	Referente a las actividades enzimáticas del suelo.....	48
VII)	<i>Bibliografía</i>	50
VIII)	<i>Anexos</i>	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Manihot esculenta</i>	2
Figura 2. Esquematización de los agregados del suelo y sus componentes orgánicos, inorgánicos y bióticos.....	5
Figura 3. Ciclos biogeológicos como interfaz entre el suelo y la atmosfera	7
Figura 4. Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y beneficios para la agricultura sustentable y fijación del carbono	16
Figura 5 Intercambio de núcleos y recombinación y sus efectos en el crecimiento de plantas hospederas	18
Figura 6. Proporciones relativas de dos alelos del <i>locus</i> bg112 en la cepa C3 y líneas de su progenie (SSL)	19
Figura 7. Diseño Experimental del cultivo de yuca inoculado con líneas variables de <i>R. irregularis</i> a tres niveles de fosfato en Kenia	58
Figura 8. Colonización de hongo micorrícico arbuscular en raíz de yuca, variedad Fumba Chai.....	58
Figura 9. Variabilidad en líneas de <i>R. irregularis</i> sobre el porcentaje de carbono orgánico total (COT) y cantidad de carbono en la biomasa microbiana (Cmic) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato.....	30
Figura 10. Variabilidad en líneas de <i>R. irregularis</i> sobre la liberación de CO ₂ del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato.....	31
Figura 11. Variabilidad en líneas de <i>R. irregularis</i> sobre la velocidad de reacción de β -glucosidasa (BG) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato.....	33
Figura 12. Variabilidad en líneas de <i>R. irregularis</i> sobre la velocidad de reacción de leucina aminopeptidasa (LA) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato	34
Figura 13. Variabilidad en líneas de <i>R. irregularis</i> sobre la velocidad de reacción de fosfatasa ácida (FAc) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato.....	35
Figura 14. Efecto de cepas de <i>R. irregularis</i> y su descendencia clonal sobre la respiración del suelo en cultivos de yuca en Tanzania	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Velocidades de reacción enzimática en suelo de cultivo de yuca, bajo tratamiento de líneas de <i>R. irregularis</i> a tres niveles de fosfato	32
---	----

ABREVIACIONES

AMC: 7-amino-4-metil cumarina

BG: β -glucosidasa

C: Carbono

CFE: Fumigación con cloroformo

cm: centímetros

C_{mic} : Carbono microbiano

COS: Carbono Orgánico del Suelo

COT: Carbono Orgánico Total

cs: mg de carbono por litro

DOC: Carbono Microbiano Extraíble

DOC_{con} : Carbono de muestras no fumigadas

DOC_{fum} : Carbono de muestras fumigadas

FA: Fosfatasas

Fac: Fosfatasa ácida

g: gramos

HMA: Hongo Micorrícico Arbuscular

hrs: horas

LA: Leucina-aminopeptidasa

M: molar

mM: milimolar

mm: milímetros

ml: mililitros

MUF: 4-Metilumbelliferona

N: Nitrógeno

nm: nanómetros

P: Fósforo

PA: Proteasas

V: volumen

v/v: porcentaje volumen-volumen

W: peso

μ L: microlitros

μ M: micro molar

RESUMEN

La rizósfera comprende la zona del suelo directamente influenciada por las raíces y sus exudados (Barrios, 2007). Es un sistema interconectado muy importante en la salud y crecimiento de las plantas. Alberga toda clase de microorganismos que participan en la defensa, enriquecimiento de diversidad, biodisponibilidad de nutrientes y promoción del crecimiento de las plantas. El uso del hongo micorrícico arbuscular *Rhizophagus irregularis* en agroecología es una estrategia atractiva, dado que el hongo incrementa la biodisponibilidad del fosfato para las plantas. Esto potencialmente disminuye la necesidad de fertilización y es muy útil, especialmente en ambientes tropicales, donde los niveles de fosfato son bajos. La presencia del hongo también incrementa la productividad, lo que es muy importante en cultivos de yuca (*Manihot esculenta*), ya que alimenta a gran parte de la población, incluyendo a las de regiones que sufren recurrentes episodios de hambruna. Aunque *R. irregularis* es un organismo ubicuo, su extensa y compleja variabilidad genética podría causar diferentes efectos en el microbioma del suelo. Dado que los hongos micorrícicos también exhiben un impacto en la estructura del suelo, es posible que impacten la biodisponibilidad de materia orgánica a los microorganismos del suelo, afectando tasas de respiración o actividades enzimáticas de la comunidad microbiana del suelo. Todos estos factores son importantes indicadores de calidad del suelo, cuyo monitoreo es crucial para asegurar un sistema agroecológico sano.

Se planteó la hipótesis de que la variabilidad genética entre líneas de *R. irregularis* impacta diferentemente los indicadores de calidad del suelo como la respiración, actividades enzimáticas, carbono orgánico total y biomasa microbiana del suelo, dependiente a el nivel de fertilización fosfato empleado, en cultivos *in situ* de yuca en Kenia. A manera de dilucidar este posible impacto, se estudiaron los efectos de la aplicación de cuatro líneas de alta variabilidad de *R. irregularis* en cultivos de yuca, sobre indicadores de calidad del suelo.

El primer objetivo fue evaluar el impacto de la variabilidad entre cepas sobre la biomasa microbiana (Cmic) y carbono orgánico total (COT) del suelo. Para ello

se empleó el método de fumigación con cloroformo y análisis de carbono elemental. Los resultados sugieren que no hay una influencia asociada a la variabilidad genética de *R. irregularis* sobre el COT y el Cmic. Esto parece ser independiente al nivel de fósforo. El segundo objetivo de este trabajo fue comparar la respiración del suelo tras la inoculación de las distintas cepas. Para ello se midió la liberación de CO₂ por incubación en viales de vidrio herméticos. Se observó que el nivel de fertilización fosfatada puede acentuar o disminuir el efecto diferencial entre cepas genéticamente variables de *R. irregularis* sobre la liberación de CO₂. Sin embargo, el nivel de fósforo no influyó en el efecto de una misma cepa de manera significativa. El tercer objetivo fue evaluar el efecto de la inoculación de las diferentes líneas sobre las actividades enzimáticas de β -glucosidasa (BG), leucina-aminopeptidasa (LA) y fosfatasa ácida (FAC). Se midió la velocidad de reacción enzimática tras la administración de sustratos marcados. Se observó que el nivel de fertilización fosfatada puede determinar el efecto diferencial entre cepas genéticamente variables de *R. irregularis* sobre la velocidad de reacción de BG del suelo. Sin embargo, el nivel de fósforo no influye en el efecto de una misma cepa sobre BG, de manera significativa. No se encontraron diferencias significativas en las velocidades de reacción LA y FAC medidos, asociadas a la variabilidad genética de *R. irregularis* en el cultivo de yuca en Ukwala-Kawayo, Kenia.

Este estudio da una visión de cómo los indicadores de calidad del suelo bioquímicos contribuyen al monitoreo de hongos micorrízicos en sistemas agroecológicos para aprovechar sus servicios ecosistémicos. Se concluye que es necesario ampliar los conocimientos a través de la investigación para definir el nivel de fósforo necesario para el desempeño óptimo de cada cepa a nivel de campo. Se requiere un monitoreo más extensivo y local, para evaluar un posible impacto en el COT, así como la mejora de las técnicas de monitoreo en cuanto a capacidad de procesamiento. Esta es la primera vez que se monitorean las actividades enzimáticas de BG, LA y FAC de suelo en un campo comercial de yuca en Ukwala-Kawayo, Kenia, inoculados con *R. irregularis*, por lo que los resultados aquí reportados son antecedentes importantes de comparación para estudios posteriores.

SUMMARY. Phosphate driven impact of the genetic variability of an arbuscular mycorrhizal fungus on biological and biochemical soil quality indicators, when inoculating cassava crops in Kenya

The rhizosphere is very important in plant health and growth. As an integrated ecosystem it hosts all sorts of microorganisms that participate in plant defense, ecosystem diversity enrichment, nutrient availability, and plant growth promotion. The use of mycorrhizal fungi *Rhizophagus irregularis* in agroecology is an attractive strategy because the fungus makes phosphate more available to plants, and this potentially decreases the need to fertilize. This is very useful, especially in tropical environments where the levels of phosphate are low. The presence of mycorrhizal fungi greatly increases crop productivity. This is especially important in cassava (*Manihot esculenta*) because this crop feeds a great part of the human population, including regions with recurrent starvation episodes. Even though *R. irregularis* is a ubiquitous organism, its large and complex genomic variability could cause different effects in soil microbiome. Because mycorrhizal fungi also exhibit an impact on soil structure, it is possible that they will affect the organic matter availability to microorganisms in soils, affecting soil respiration rates or enzymatic activities of the soil microbial community. All these possible impacted factors by mycorrhizal presence are important soil quality indicators, whose monitoring is crucial to assure a healthy agroecosystem.

It was hypothesized that the genetic variability between *R. irregularis* lines impacts soil quality indicators such as soil respiration, enzymatic activities, total organic carbon, and microbial biomass, depending on the level of phosphate fertilization used, on *in situ* cassava crops in Kenya. In order to determine their impact, the effects of four highly variable *R. irregularis* strains on soil quality indicators were studied after their application in cassava crops in Kenya.

The first aim was to evaluate the impact of the variability between strains on the microbial biomass (Cmic) and total organic carbon (COT) of the soil. The fumigation method with chloroform and analysis of elemental carbon was used. Results suggested that there is no significant influence on the COT and Cmic associated to the genetic variability of *R. irregularis*. This appears to be independent

of the phosphate fertilization level. The second aim was to compare soil respiration after inoculation of the different strains. CO₂ release was measured by incubation of soil in hermetic glass vials. Measurements indicated that phosphate levels influence CO₂ release of genetically variable *R. irregularis* lines. However, phosphate level did not influence the differential effect within a single *R. irregularis* line. The third aim was to evaluate the effect of the inoculation of the different lines on enzymatic activities of β-glucosidase (BG), leucine-aminopeptidase (LA) and acid phosphatase (FAc). Enzymatic reaction rates were measured after the administration of labeled substrates to soil samples. Results obtained suggest that phosphate levels have differential effects on the enzymatic rates of BG in the different *R. irregularis* lines, but this difference was not significant within a single fungus line. No significant effects were found on enzymatic rates of LA and FAc, associated with genetic variability of *R. irregularis*. Similarly, phosphate fertilization did not influence these enzymes.

This study provides insights of how biochemical soil quality indicators contribute to monitor mycorrhizal fungal inocula on agroecosystems, in order to take advantage of their ecosystemic services. In conclusion, it is necessary to expand our research defining phosphate levels for optimal performance of each *R. irregularis* genetic line under field conditions. Extensive and local monitoring is required to evaluate possible impacts on COT, as well as an improvement of monitoring techniques in terms of processing capacity. This is the first time that the enzymatic activities of BG, LA and FAc were monitored on a commercial cassava crop inoculated with *R. irregularis* in Kenya. The results reported here provide important comparative background for further studies.

I) INTRODUCCION

1 AGROECOLOGÍA Y BIOLOGIA DEL SUELO.

1.1 AGROECOLOGÍA.

La agroecología deriva de dos disciplinas, la agronomía y la ecología. Emerge en los comienzos del siglo 20 incorporando en los inicios elementos de la fisiología vegetal y zoología, y luego integrando la biología del suelo, clima e impacto del manejo humano en problemáticas medioambientales y agrícolas. La definición ha ido evolucionando (Wezel y cols., 2009) estableciéndose como “el estudio integrativo de la ecología del sistema alimentario completo, abarcando dimensiones ecológicas, económicas y sociales” (Francis y cols., 2003). Esto incluye a la calidad del suelo como cualidad clave para un sistema de agricultura sustentable (Delate, 2002).

La biodiversidad realiza una variedad de servicios ecológicos y ecosistémicos. Entendida como el conjunto de todas las especies de plantas, animales y microorganismos interactuando en un ecosistema, más allá de la producción de alimentos, incluye el reciclaje de nutrientes, la regulación del microclima y procesos hidrológicos locales, supresión de organismos no deseados y desintoxicación de químicos nocivos. Por tanto, la biodiversidad determina el nivel de regulación interna del funcionamiento de los agroecosistemas. Los dos mayores servicios ecosistémicos son la formación de suelo y el ciclado de nutrientes (Altieri, 1999; Gianinazzi y cols., 2010).

La agroecología ha tenido gran éxito en zonas con problemáticas en el sistema de alimentación. En algunos países de África, la crisis alimentaria es generada por el cambio climático, presión demográfica y degradación de recursos (Tittonell y cols., 2012; Mousseau, 2015). En Kenia, 200,000 agricultores que alimentan alrededor de un millón de personas han optado por la agricultura bio-intensiva. Esto ha disminuido hasta un 90% el uso de agua y de 50 a 100 % el uso de fertilizantes comerciales de la agricultura convencional. Las prácticas agroecológicas proveen mayores niveles de materia orgánica en el suelo, cobertura

de suelo de cultivo casi continua y una adecuada fertilidad para la salud de raíces y plantas, contribuyendo a aminorar esta crisis (Mousseau, 2015).

Los tubérculos pueden desempeñar un papel importante para mitigar la crisis alimentaria en África. Esto debe complementarse con nuevas tecnologías y prácticas de manejo adecuadas. Así se estipuló en el tercer simposio trienal de la sociedad internacional para cultivos tropicales de raíces, en Owerri, Nigeria. La especie *Manihot esculenta*, comúnmente llamada yuca, mandioca o cassava (**figura 1**), se distingue como el tubérculo de mayor importancia en los trópicos (Terry y cols.,1987). El cultivo de yuca es muy popular en los trópicos por su gran aporte calórico (Nassar & Ortiz, 2010).



Figura 1. *Manihot esculenta*. Izquierda: ilustración de la planta de yuca con sus tubérculos prominentes y entorno ecológico (*Raíz de mandioca, serpiente y mariposa, Metamorfosis de los insectos de Surinam*, Maria Sybilla Merian, 1705). Derecha: Se muestra el cultivo de yuca en Kenia donde se realizó el experimento (fotografías de Diego Camilo Peña Quemba, DEE, UNIL).

Entre las técnicas agroecológicas destacadas en su cultivo está la utilización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Gianinazzi y cols., 2010). Los HMA se presentan como una técnica con gran potencial para ser económicamente rentable y de gran prospectiva de mejoramiento para su aplicación en campo. Sus atractivos son su potencialidad para incrementar la productividad agrícola, gran eficacia de colonización en raíces y disminuir la necesidad de fertilización de fósforo. Lo último es importante ya que el fósforo es un elemento escaso en los trópicos, y la aplicación exógena de fosfatos genera problemas como la eutrofización (Ferreiro, 2006; Ceballos y cols., 2013). La eutrofización es la suma de los efectos del crecimiento excesivo de fitoplancton que conduce a un desequilibrio en sistemas acuáticos, causada por el enriquecimiento de nutrientes a través de escorrentías que llevan hacia abajo fertilizantes, causando la disminución de oxígeno y consecuente muerte de especies (Khan & Ansari, 2005). Sin embargo, aún se requieren estudios para definir y establecer la utilidad de los HMA, en cuanto a impacto ecológico en la calidad del suelo.

El suelo es considerado como un recurso natural, y por tanto su mantención y preservación es un problema de interés global. Esto ha llamado la atención de la comunidad científica, agrícola y de responsables políticos (Dexter, 1988; Amezketa, 1999). En la investigación agrícola internacional se ha establecido que la agricultura sustentable debe incluir el manejo exitoso de los recursos para satisfacer las necesidades humanas en constante cambio, mientras que se mantiene o se incrementa la calidad del medioambiente y la conservación de los recursos naturales (Lal & Pierce, 1991). En este contexto surge la necesidad de comprender la naturaleza del suelo, definir su rol en los ecosistemas y estandarizar su calidad, en pos de generar una agricultura sustentable (Nortcliff, 2002).

1.2 SUELO

El suelo es una matriz heterogénea. Está formado por material particulado inorgánico como silicatos y sílices, por arcillas, arenas y limo, así como agua y gases. También contiene materia orgánica, ya sea libre o acomplejada, formando humus. Según la composición y proporción de aglomeración, forma estados coloidales. Se agrupa en niveles jerárquicos dimensionales de acuerdo con el tamaño de agrupación del material. En escala ascendente, incluye los microagregados, menores de 2 μm de diámetro, consistentes en partículas de arcilla unidas a materia orgánica mediante cationes polivalentes, luego la unión entre microagregados, formando estructuras de 250 μm de diámetro y finalmente los macroagregados, que forman terrones, llegando a los centímetros de diámetro. Esta aglomeración es mediada por el carbono orgánico del suelo (COS), la biota, puentes iónicos, arcillas y carbonatos, siendo el COS el principal agente de unión. Esta matriz formada durante millones de años, por acción química, física y biológica, permite que la vida ocurra de manera dinámica, formando una capa nutritiva que permite el surgimiento de los ecosistemas y su aprovechamiento para la agricultura (Dexter, 1988; Amézketa, 1999; Bronick, 2005).

1.3 BIOLOGÍA DEL SUELO

En el suelo habitan organismos de todos los dominios. En este sustrato conviven o interactúan desde macro, meso y microfauna, hongos saprófitos, fito patogénicos y micorrícicos, hasta bacterias nodulantes de leguminosas, entre muchos otros (Moreira y cols., 2008). La biota del suelo y sus productos orgánicos contribuyen al desarrollo de la estructura del suelo, ejerciendo un control significativo sobre las dinámicas del COS como por ejemplo el tiempo de residencia y tasas de descomposición, factores claves e influyentes en la efectividad de la agregación del suelo (Bronick, 2005). Así, el suelo está formado por sus distintos componentes químicos, biológicos y estructurales (**figura 2**).

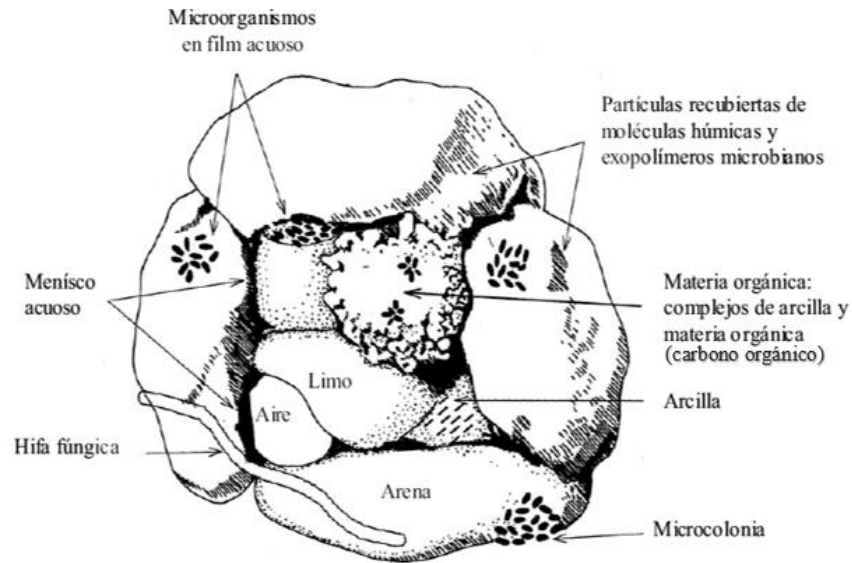


Figura 2. Esquematación de los agregados del suelo y sus componentes orgánicos, inorgánicos y bióticos. Se muestra el carbono orgánico como parte de la materia orgánica acomplejada entre los agregados (Montero, 2010).

1.3.1 FUNCIONES ECOSISTÉMICAS DE LA BIOLOGÍA DEL SUELO

La biota del suelo participa colectivamente en procesos que contribuyen a la mantención y productividad de los ecosistemas a través de su influencia en la calidad y salud del suelo. Estos procesos se agrupan en cuatro funciones. 1. Descomposición de la materia orgánica; transformación del carbono realizada por procesos enzimáticos principalmente de bacterias y hongos. 2. Ciclado de nutrientes, asociado directamente a la descomposición de la materia orgánica. 3. Bioturbación o formación de túneles, poros y agregados que determinan la estructura del suelo. 4. Control de plagas y enfermedades, dado por la diversidad y sus interacciones (Barrios, 2007; Moreira y cols., 2008). La Sociedad se beneficia de una multitud de recursos y procesos de los ecosistemas naturales y manejados, a los cuales la biología del suelo, como los HMA hacen una gran contribución (Gianinazzi y cols., 2010).

1.3.2 CICLOS BIOGEOLÓGICOS Y RESILIENCIA AL CAMBIO CLIMÁTICO

Los procesos de descomposición mediados por microorganismos en el suelo cumplen un rol predominante para completar los ciclos de vida. Mediante su actividad, los microorganismos interactúan con la atmósfera, lo que refleja su actividad biológica sobre el tiempo geológico. Reciclan y construyen los nutrientes estructurales para las plantas, mineralizando elementos en el suelo (**figura 3**). Los organismos microsimbiontes como *Rizobium* o cianobacterias fijan el nitrógeno atmosférico en el suelo. Micorrizas y rizobacterias solubilizan el fósforo. Asimismo, la actividad metabólica de la comunidad biológica del suelo también libera carbono como CO₂ a la atmósfera (Coleman y cols., 1983; Doran y cols., 1996; Barrios, 2007). Así, la delgada capa de suelo que cubre la superficie de la tierra es la mayor interfaz entre la agricultura y el medioambiente, representando la diferencia entre la extinción y la supervivencia de la vida en ella (Coleman y cols., 1983; Doran y cols., 1996).

El cultivo mecánico y la producción continua de cultivos en hileras han resultado en una pérdida física y desplazamiento por erosión del suelo. Junto con la deforestación y pastoreo se producen grandes disminuciones en el contenido de materia orgánica del suelo. Esto se asocia a la liberación de carbono orgánico como CO₂. Según análisis, ha habido una pérdida neta de carbono desde los ecosistemas terrestres alrededor del mundo desde al menos 1860 (Houghton y cols., 1983). La reforestación y crecimiento de bosques explotados, así como la elaboración de materia orgánica, resultan en almacenamiento de carbono. (Houghton y cols., 1983; Doran y cols., 1996).

Miguel Altieri plantea que la adaptación de la agricultura debe ser considerada como un factor clave que determina la severidad del cambio climático y sus impactos en la producción de alimentos. Los beneficios más grandes y duraderos serán resultado de mediciones agroecológicas radicales que fortalecerán

la resiliencia de los agricultores y comunidades rurales, tales como la diversificación de los agroecosistemas y manejo de suelos orgánicos (Altieri y cols., 2015).

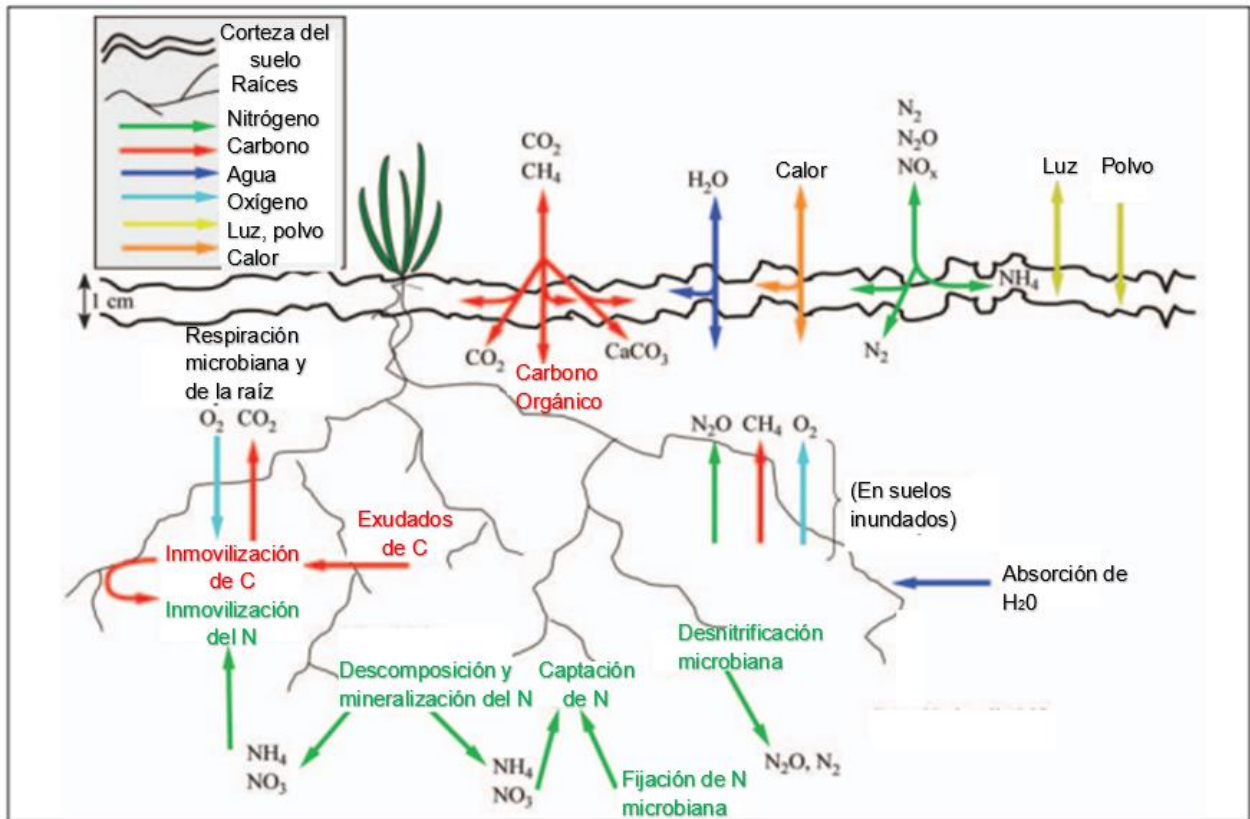


Figura 3. Ciclos biogeológicos como interfaz entre el suelo y la atmósfera. Los microorganismos del suelo y las raíces participan activamente en los ciclos de mineralización/desmineralización de elementos como N, O y C, traspasando energía entre el suelo y la atmósfera. Los microorganismos permiten dinámicas de elementos entre formas orgánicas e inorgánicas entre las interfaces suelo-atmósfera y suelo-raíz, mediante sus metabolismos. Cada elemento y energía (como luz o calor) está representado en colores (Adaptada de Belnap y cols., 2003).

1.3.3 ESTABILIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL SUELO.

La materia orgánica del suelo representa un componente polifuncional continuo de residuos descompuestos de biota, exudados, biomasa microbiana, biomoléculas y sustancias húmicas (moléculas complejas formadas por procesos de polimerización de moléculas fenólicas, resumido por Gerke, 2018). Este

componente puede tener tiempos de vida desde las horas a días o milenios. Convencionalmente se plantea que la materia orgánica consiste predominantemente de sustancias húmicas formadas durante la humificación. La humificación es el proceso por el cual el carbono de los residuos orgánicos es transformado a sustancias húmicas a través de procesos bioquímicos y abióticos (Guggenberger, 2005; Semenov y cols., 2013). La mineralización de los residuos animales y vegetales se hace de forma gradual, quedando parte de la materia orgánica en un estado modificado resistente a su descomposición. Este material resistente es llamado humus, y permite que parte de los elementos esenciales para la vida, especialmente el carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y potasio sean fijados y removidos de circulación. Esto genera que el suministro de nutrientes para el crecimiento de los vegetales sea lento y continuo. De ahí que se considera al humus como una reserva estabilizadora de la vida orgánica del planeta (Waksman, 1936).

Bajo condiciones especiales, los fragmentos orgánicos y moléculas que resultan de la destrucción y degradación de la biomasa pueden ser estabilizados de distintas maneras, omitiendo la etapa de humificación. Esto puede ocurrir tras la combinación de procesos fisicoquímicos como la cementación, carbonización, incrustación, oclusión, sedimentación, sorción, coagulación, floculación, encapsulación, complejización e intercalación, así como la encapsulación de sustancias orgánicas solubles en microporos (Semenov y cols., 2013).

Las enzimas y su localización en el suelo son factores cruciales para la durabilidad de la materia orgánica en el mismo. Las enzimas extracelulares se asocian con coloides orgánicos y son adsorbidas en minerales inorgánicos adquiriendo resistencia térmica y protección contra la degradación proteolítica (Nannipieri y cols., 2002).

2 SALUD Y CALIDAD DEL SUELO

2.1 SALUD DEL SUELO

En el contexto de agricultura sustentable, la salud del suelo es un componente esencial. Se entiende que la producción agrícola no debiese perjudicar otros servicios ecosistémicos que el ser humano requiere de los paisajes agrícolas. De esta manera un suelo agrícola saludable es aquel capaz de soportar la producción de comida y fibras a un nivel y con una calidad suficiente para cumplir con los requerimientos humanos, junto con la entrega continua de otros servicios ecosistémicos que son esenciales para el mantenimiento de la calidad de vida de los humanos y la conservación de la biodiversidad (Kibblewhite y cols., 2008).

2.2 CALIDAD DEL SUELO

La calidad del suelo se define como la capacidad del suelo para proporcionar servicios ecosistémicos deseables (Needelman, 2013). El concepto de calidad del suelo ha ido evolucionando desde fines de la década de los 80 y su definición varía de acuerdo con el interés del observador. Así, inicialmente se denotó por la Sociedad de Ciencias del Suelo de América (*Soil Science Society of America*) como la capacidad del suelo para desempeñar funciones específicas (Doran & Parkin, 1994). Posteriormente el concepto evolucionó a la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites del ecosistema para sostener la productividad biológica, mantener la calidad medioambiental y promover la salud animal y vegetal. Para administradores de tierra puede significar la capacidad del suelo para sostener o incrementar la productividad, manteniendo al mismo tiempo los recursos para el futuro. Para conservacionistas significa sostener los recursos del suelo y proteger el medioambiente. Para los consumidores es la producción de alimentos sanos y económicos. Para los medioambientalistas significa la capacidad de mantener o incrementar la biodiversidad, calidad del agua, ciclo de nutrientes y rendimiento de biomasa. Dada tal ambigüedad, se han desarrollado parámetros de medición para evaluar la condición del suelo. Estos parámetros consisten en variables que

conlleven información acerca de los cambios o tendencias de esa condición y se han denominado Indicadores de Calidad del suelo (Lal, 1998; Cruz y cols., 2004; Shukla y cols., 2006).

2.2.1 INDICADORES DE CALIDAD DEL SUELO

Los indicadores de calidad del suelo son propiedades físicas, químicas y biológicas, procesos y características que pueden ser medidas para monitorear cambios en el suelo. La utilidad del tipo de indicador depende de la función del suelo para la que se está evaluando la calidad. Dentro de estas funciones encontramos: a) proporcionar un entorno físico, químico y biológico para los organismos vivos, b) regular y particionar el flujo de agua, el almacenamiento y ciclo de nutrientes y otros elementos, c) soportar la actividad biológica y la diversidad para la productividad animal y vegetal, d) filtrar, amortiguar, degradar, inmovilizar y desintoxicar materiales orgánicos e inorgánicos y e) proveer soporte mecánico para los organismos vivos y sus estructuras (Gil-Sotres y cols., 2005).

Los indicadores de calidad del suelo han sido clasificados por el Servicio de Conservación de Recursos Naturales (USDA) en cuatro categorías principales: 1- Indicadores visuales, obtenidos desde la observación o interpretación fotográfica como la exposición del subsuelo, cambios en color o especies de malezas. 2- Indicadores físicos, relacionados al arreglo de las partículas del suelo y porosidad, como profundidad de la capa superficial del suelo, estabilidad de agregados, textura, compactación o densidad aparente. 3- Indicadores químicos incluyen mediciones de pH, salinidad, materia orgánica, concentraciones de fósforo, capacidad de intercambio iónico, ciclo de nutrientes y concentraciones de elementos necesarios/perjudiciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. 4- Indicadores biológicos, referidos a mediciones de micro y macroorganismos, su actividad, o subproductos. Ejemplos son la tasa de respiración, que detecta actividad microbiana, especialmente en cuanto a la descomposición de materia orgánica en el suelo, mediciones de número de semillas, o poblaciones de

patógenos, etc. (SQI, 1996). Debido al avance en el conocimiento sobre la biología del suelo y su implicancia en la salud del suelo, los indicadores biológicos se han ido profundizando, incluyendo a los indicadores bioquímicos, a manera de dilucidar los metabolismos presentes en el suelo, cuyo conocimiento y manejo se presenta con gran potencial para el mejoramiento de la agricultura. (Gil-Sotres y cols., 2005; Bünemann y cols., 2018).

2.2.2 INDICADORES BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Los indicadores de calidad del suelo pueden ser definidos libremente como aquellas propiedades del suelo y procesos que tienen la mayor sensibilidad a cambios en la función del suelo (Daily y cols., 1997). En general, los parámetros físicos y fisicoquímicos tienen menor utilidad al monitorear un sistema, ya que sólo se alteran cuando se someten a un cambio drástico. Por el contrario, los parámetros biológicos y bioquímicos son sensibles a pequeñas modificaciones que pueda sufrir el suelo en la presencia de cualquier agente degradante. Por esto es necesario profundizar más hacia éstos últimos (Filip, 2002; Bünemann y cols, 2018).

Los indicadores biológicos pueden englobarse en nivel individual, vale decir de poblaciones y comunidad, y en nivel ecosistémico. En el primer nivel encontramos la presencia, riqueza y abundancia de microorganismos del suelo, biomasa microbiana y biomasa fúngica, índices basados en comunidades de fauna y la composición de la comunidad. En el segundo nivel, relacionado a indicadores bioquímicos, encontramos respiración del suelo, mineralización de nitrógeno, coeficientes metabólicos y microbiales, síntesis de DNA y proteínas, actividades enzimáticas, metabolómica y metaproteómica. Dada la sensibilidad que despliegan, de los indicadores presentados destacan la biomasa microbiana y actividades enzimáticas, que además presentan buena correlación con otros indicadores de calidad importantes, y respiración del suelo por su relevancia ecológica (Bünemann y cols., 2018).

El carbono orgánico en el suelo es uno de los atributos más dominantes como indicador de calidad del suelo (Shukla y cols., 2006). El carbono orgánico del suelo consiste en residuos de células de microorganismos, plantas y animales en varias etapas de descomposición, humus estable (sintetizado a partir de los residuos) y compuestos altamente carbonizados como formas elementales del C: carbón vegetal y grafito (Nelson & Sommers, 1996). La respiración basal da cuenta de la actividad microbiana del suelo involucrada en la descomposición de la materia orgánica (Nannipieri y cols., 1990), y por tanto representa la tasa de liberación de la reserva de carbono en el suelo (Gougoulias y cols., 2014). La biomasa microbiana también está estrechamente relacionada al ciclo y descomposición de la materia orgánica, así como con la mantención de la estructura del suelo (Bünemann y cols., 2018). Se ha encontrado que el contenido de C y N en la biomasa microbiana cambia rápidamente reflejando alteraciones en el manejo del suelo mucho antes de que los cambios en el C y N total del suelo sean detectables, destacando su utilidad como indicador de calidad por su sensibilidad (Powlson y cols., 1987). Una mayor o menor disponibilidad de nutrientes, o por efecto directo de exudados de raíces, hifas u otras sustancias adicionadas, así como la práctica agrícola empleada, podrían provocar un cambio en el metabolismo de la microbiota, afectando directamente la biomasa microbiana (Helal & Sauerbeck, 1986; Toljander y cols., 2007; Lagomarsino y cols., 2011; Hartman & Richardson, 2013). Por otro lado, la actividad enzimática da cuenta de la descomposición de la materia orgánica de manera específica, ya que están involucradas en la hidrólisis de formas orgánicas de nutrientes como el N, P y S. Su presencia influye en el desarrollo, composición y actividad de la rizósfera, determinando consecuentemente el estado de salud de las plantas (Dick, 1994; Gianfreda, 2015). El aumento de la biomasa microbiana está directamente relacionado con el aumento de la actividad enzimática, puesto que los microorganismos son la mayor fuente de su síntesis y regulación (Tabatabai, 1994).

2.2.3 REACCIONES ENZIMÁTICAS DEL SUELO

Las enzimas catalizan y median las reacciones bioquímicas del suelo. Han sido consideradas como los mejores candidatos para determinar respuestas tempranas a cambios en el manejo del suelo (Dick y cols., 1997). Las hidrolasas y transferasas han sido estudiadas extensivamente debido a su rol en la descomposición de varios compuestos orgánicos. Participan así de la formación de material orgánica en el suelo y del ciclo de nutrientes. Las celulasas, amilasas, lipasas, glucosidasas e invertasas participan el ciclo del carbono. En el ciclo del nitrógeno participan proteasas, amidasas, ureasas y desaminasas. Las fosfatasas intervienen en el ciclo del fósforo y las arilsulfatasas en el del azufre (Dick, 1994).

No existe una sola enzima que represente el funcionamiento metabólico del suelo. Existen algunas enzimas más sensibles a perturbaciones. Un ejemplo es la β -glucosidasa (BG). La BG se ha presentado como un indicador temprano de cambios en el carbono orgánico del suelo, esto es, antes de que estos cambios sean reflejados en los análisis de carbono orgánico total. La BG cataliza la hidrólisis de β -D-glucopiranosidos en la etapa final y limitante de la degradación de la celulosa, el polisacárido más abundante de la tierra, y así provee azúcares simples a la población microbiana. De esta manera, un aumento en la actividad de esta enzima, que se correlaciona además con un aumento en la biomasa microbiana, se traduce como una mayor capacidad del suelo para degradar residuos vegetales y mejorar la disponibilidad de nutrientes para los siguientes cultivos (Stott y cols., 2010). Además, se han encontrado correlaciones positivas entre el aumento de la actividad de BG y el mejoramiento del suelo en términos de indicadores de calidad físicos, así como también se correlaciona positivamente con un mejoramiento del estado de agregación del suelo (Roldán y cols., 2005).

Las proteasas (PA) son enzimas que catalizan la lisis de proteínas (incluyendo a las enzimas). Los microorganismos producen proteasas para reciclar la materia orgánica y asegurar su nutrición. Pueden ser clasificadas por varios

criterios de catálisis. Las exopeptidasas catalizan la hidrólisis de aminoácidos terminales de cadenas polipeptídicas, mientras que las endopeptidasas catalizan la hidrólisis de enlaces internos de los péptidos (Landi y cols., 2011). Las muestras ambientales generalmente muestran mayor actividad en sustratos como leucina y alanina, así, la leucina aminopeptidasa es ampliamente usada como indicadora del potencial de peptidasa en suelos (Sinsabaugh y cols., 2008). La medición de PA del suelo es compleja debido a las variables que influyen en su actividad. Una de estas variables es la afinidad por sustrato; de acuerdo con su procedencia, las PA de suelo son más afines a sustratos que las provenientes de vegetales. Otra variable es el estado coloidal o tamaño de agregados del suelo (Vranova, y cols., 2013); por ejemplo, la velocidad inicial de mineralización de leucina en los agregados del suelo es mayor que la mineralización de lisina (Vieuble'Gonod y cols., 2006). Sin embargo, el estudio de las PA es importante dado que la proteólisis es considerada como la etapa limitante de la mineralización del nitrógeno en suelos (Weintraub & Schimel, 2005), elemento importante para la calidad del suelo.

Las fosfatasas (FA) median procesos para la disponibilidad del fósforo (P) en el suelo. El P es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos, sin embargo, es escaso en la mayoría de los ecosistemas. La continua lixiviación y sorción conducen a una oclusión gradual del P. La absorción del P por parte de las plantas requiere la mineralización del fósforo orgánico a ortofosfato, proceso catalizado por las FA. Las evidencias sugieren que la actividad de las FA tiene consecuencias ecológicas importantes relacionadas con la productividad de vegetales y diversidad de microbiomas, por lo que han sido ampliamente estudiadas. Se han encontrado correlaciones entre la actividad de FA y la cantidad de materia orgánica del suelo, la composición de las comunidades microbianas, profundidad del suelo, etapa de sucesión ecológica, respiración, biomasa microbiana y presencia de micorrizas (Dighton, 1983; Frankenberger & Dick, 1983; Ferreiro, 2006; Bucher, 2007; Margalef y cols., 2017).

3 MICORRIZAS

Las micorrizas corresponden a una asociación simbiótica obligada entre hongos y raíces de las plantas. Están presentes en un 80% de las familias de vegetales. Los HMA destacan por ser organismos claves en el desarrollo de la agroecología y mejoramiento de la calidad del suelo. Las micorrizas contribuyen de manera crucial en los servicios ecosistémicos de los cuales la sociedad se beneficia. (Gianinazzi y cols., 2010). Los HMA pertenecen al filo Glomeromycota, destacando en agroecología la especie *Rhizophagus irregularis*. Entre sus beneficios están facilitar la biodisponibilidad y absorción de nutrientes no lábiles para las plantas, especialmente fósforo, incrementando tanto la productividad como la calidad de los vegetales para la salud humana. Otros beneficios son prevenir la erosión del suelo a través de la estabilización de agregados del suelo, participar en la defensa contra patógenos, aliviar el estrés causado por factores bióticos y abióticos, contribuir y fomentar el enriquecimiento de la diversidad del ecosistema, contribuir al funcionamiento de la microflora y a la fijación de carbono orgánico en el suelo. En la **figura 4** se muestran las micorrizas y un esquema general con algunos de los beneficios del uso de HMA (Van der Heijden y cols., 1998; Rillig & Mummey, 2006; Richardson y cols., 2009; Gianinazzi y cols., 2010; Wahbi y cols., 2015; Ochoa-Hueso, 2017; Avio y cols., 2018; Sosa-Hernandez y cols., 2019).

Debido a la gran influencia que ejerce esta simbiosis en el suelo, impacta a la comunidad microbiana de forma directa, por medio de exudados, e indirecta por la estructuración del suelo. Se ha evidenciado un impacto de la inoculación de HMA en la población de microorganismos, a nivel de composición y viabilidad, así como también en las actividades enzimáticas o excreción de exudados en el suelo (Linderman, 1991; Filion y cols., 1999; Toljander y cols., 2007). Si bien la inoculación de HMA tiene mucho potencial para la agricultura, su influencia no siempre será beneficiosa, dada su diversidad y complejidad genética y la importancia de la coevolución de organismos para su correcto asentamiento simbiótico, en equilibrio con el ecosistema (Thrall y cols., 2007).

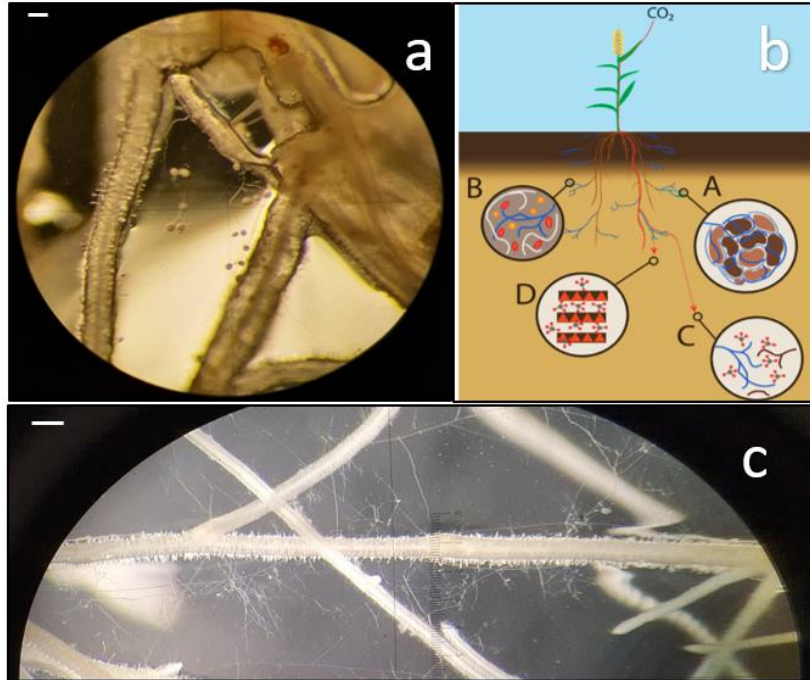


Figura 4. Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y beneficios para la agricultura sustentable y fijación del carbono. **a)** *R. irregularis* colonizando raíces de zanahoria con algunas esporas. La barra representa 100 μ m. (fotografía de William Chanz Robbins, DEE, UNIL). **b)** Se muestran algunos de los diferentes beneficios de los HMA en agricultura sustentable, que favorecen la fijación del carbono en el suelo. En azul se representan las hifas extrarradicales del HMA, y en rojo las raíces de la planta. **A)** Mejoramiento de la estructura del suelo, permitiendo la protección de materia orgánica en agregados. **B)** Competencia con microorganismos patógenos o saprófitos, reduciendo tasas de descomposición. **C)** Incremento de la entrada de carbono vía exudados miceliales. **D)** Formación de fracciones de materia orgánica asociadas a minerales, altamente estables (adaptada de Sosa-Hernandez y cols., 2019). **c)** *R. irregularis* colonizando raíces modificadas de zanahoria y red de hifas. La barra representa 500 μ m (fotografía de William Chanz Robbins, DEE, UNIL).

3.1 INFLUENCIA DE FOSFATOS EN EL DESEMPEÑO DEL INÓCULO.

Uno de los atractivos de la utilización de HMA en los trópicos es que potencialmente disminuye los requerimientos de fertilización de fósforo. La fertilización con fosfatos en cultivos de yuca influye en el desempeño de los HMA en cuanto a producción. En Colombia se observó que el inóculo de HMA en un cultivo comercial de yuca, aumentó la productividad significativamente, siendo

mayor que los controles no inoculados, al emplear solo el 50% de la cantidad de fertilizante fosfato utilizado normalmente (Ceballos y cols., 2013). Otro estudio además muestra que se requiere solo una fertilización con fosfato para modificar la microbiota del suelo, limitando sus servicios ecosistémicos. Entre los impactos están la reducción de la colonización de micorrizas y el cambio en las estructuras de las comunidades bacterianas, fúngicas y micorrícicas (Ikoyi y cols., 2018). Esto hace necesario considerar la fertilización por fosfato al estudiar el efecto de los HMA en los cultivos de yuca en zonas deficientes de fosfato, como una variable influyente en el sistema.

3.2 VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Rizophagus irregularis*

Los HMA crecen clonalmente y son cenocitos, es decir, poseen más de un núcleo en un mismo citoplasma. Esto hace que su estudio genético sea engorroso (Smith & Read, 1997). La especie *R. irregularis* presenta una genética compleja que ha requerido de técnicas sofisticadas de secuenciamiento para estudiarla. Se conocen pocas secuencias del filo Glomeromycota, y aún más escaso es el estudio de *R. irregularis*. Entre los genomas de especies aisladas de *Rhizophagus* se ha reportado un alto polimorfismo dentro de una misma cepa aislada, encontrando decenas de alelos diferentes en *loci* individuales (Boon y cols., 2015). Se ha determinado además la haploidía de la especie (Sedzielewska y cols., 2011). También, se ha descrito la capacidad de las hifas de fusionarse en un proceso llamado anastomosis. Esta fusión permite que se formen extensas redes subterráneas que conectan a las plantas, distribuyendo los recursos dentro de los ecosistemas (Jakobsen, 2004). Este proceso se ha descrito como una posible forma de intercambio genético que origine organismos dicariontes por el traspaso de núcleos como proceso reproductivo, y además ocasione mayores niveles de complejidad genética durante la formación de esporas, mediante la segregación de nucleotipos en la progenie. Esto potencialmente genera efectos diferenciales en el desarrollo de la planta hospedera, como se observa en la **figura 5** (Angelard y cols., 2010; Sanders & Croll, 2010).

El secuenciamiento de cepas aisladas en Suiza dilucidó varios *loci* en cada aislado, que contenían más de un alelo distribuidos en el genoma, reportando así la existencia de sitios poli-alélicos y un amplio grado de polimorfismo dentro de aislados en una población de *R. irregularis*. Esto quiere decir, varios haplotipos para un mismo *locus* dentro de un mismo aislado. Se encontró que la variación en regiones codificantes del genoma era tan alta como la de regiones no codificantes,

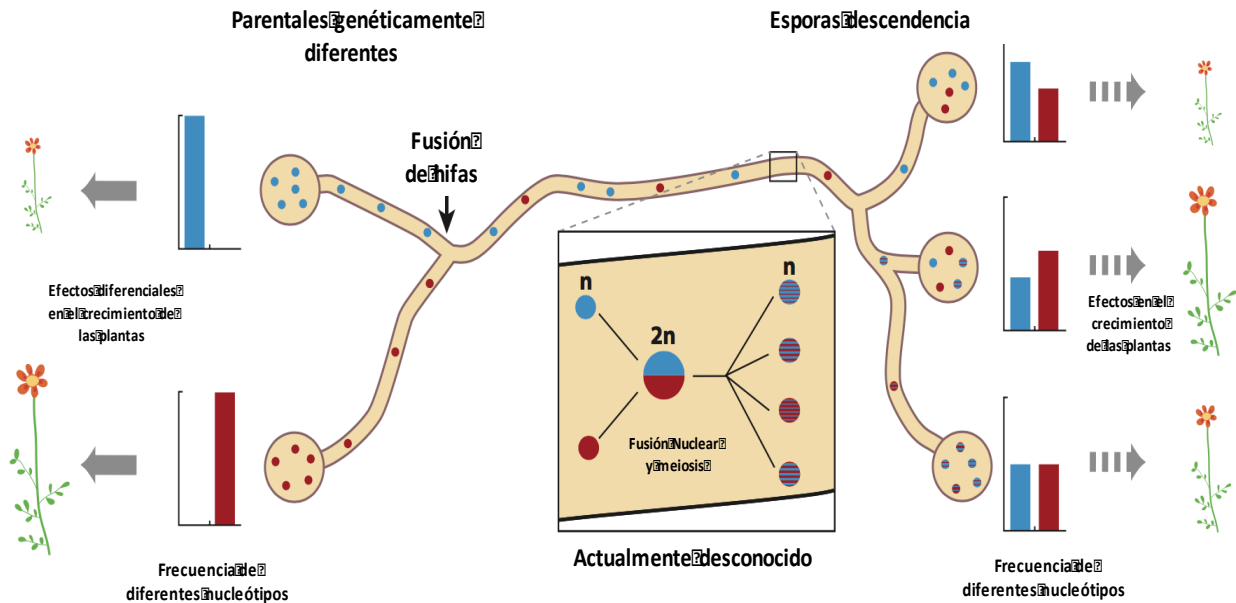


Figura 5. Intercambio de núcleos y recombinación, y sus efectos en el crecimiento de plantas hospederas. Se muestran dos cepas parentales de HMA con diferentes nucleótidos, representados con colores rojo y azul. Se muestra la frecuencia de los nucleótidos existente en cada genotipo de las esporas, representada en los gráficos en barras de cepas parentales (izquierda) y de progenies (derecha). Se propone la fusión de las hifas de las cepas parentales para generar progenie heterocariota. Se desconoce el mecanismo para producir núcleos recombinantes en la progenie (recuadro del centro), pero se postula que puede ser por fusión nuclear, recombinación y meiosis. La progenie muestra frecuencias recombinadas de ambos nucleótidos parentales, así como efectos diferenciales en el crecimiento de la planta hospedera, entre ellas y con respecto a las cepas parentales (adaptada de Sanders & Croll, 2010).

sugiriendo que el polimorfismo entre y dentro de los aislados podría ser funcionalmente relevante (Wyss y cols., 2016). Una de esas cepas estudiadas, C3, en un experimento de generaciones filiales, mostró que variaciones genéticas de la descendencia generan cambios en el crecimiento de arroz (Angelard y cols., 2010).

Otro experimento demostró cómo diferentes aislados de una misma población de *R. irregularis* alteró significativamente el crecimiento de vegetales, tanto en un sistema axénico como en invernadero. Esto sugiere que la variabilidad genética de los HMA podría afectar el estado de la asociación simbiótica y que debiese ser considerada en la investigación para el entendimiento del funcionamiento de los organismos del suelo (Koch y cols., 2005). Recientemente se demostró la variación genética en el *locus* Bg112 (**figura 6**) entre la cepa parental C3 y su descendencia (Masclaux y cols., 2018), así como el dicariotismo en la cepa (Ropars y cols., 2016). Además, estudios previos de las cepas aquí estudiadas, muestran un gran potencial de mejora en el aumento de la productividad de yuca en Kenia y Tanzania, tras inocular cepas de la progenie de una cepa parental de *R. irregularis*, C3 (Ceballos y cols., 2019). Esto invita a seguir estudiando la potencialidad de la variabilidad entre cepas de *R. irregularis* para su aplicación en agroecología, en cuanto a la productividad de yuca, teniendo cuidado de monitorear impactos a la ecología y salud del suelo.

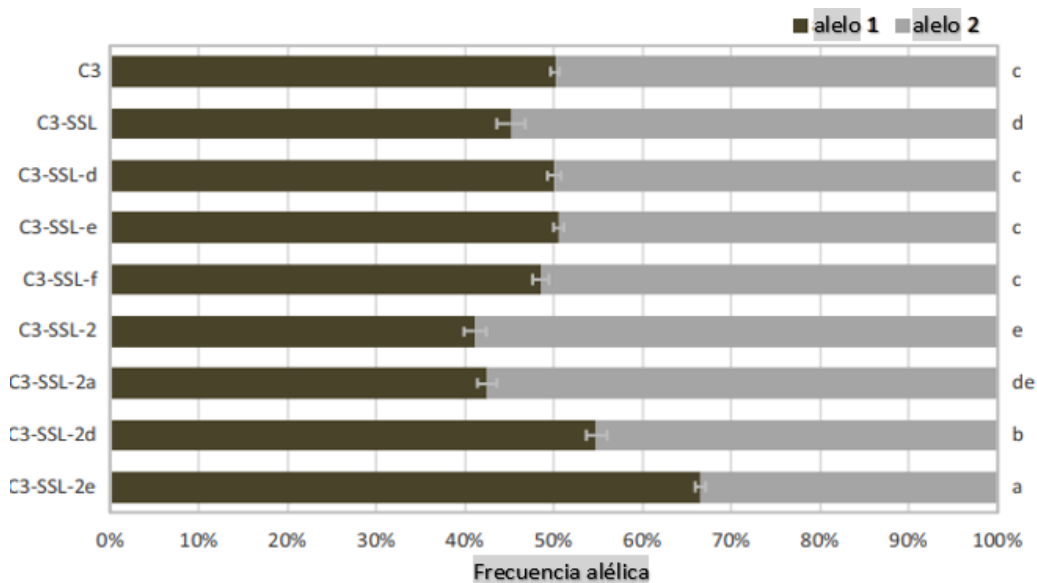


Figura 6. Proporciones relativas de dos alelos del *locus* bg112 en la cepa C3 y líneas de su progenie (SSL). Las proporciones alélicas fueron medidas por PCR seguido de electroforesis. Este método mide la altura del pico de fluorescencia para cada longitud de secuencia. Solo los dos picos predominantes correspondientes a los alelos identificados fueron retenidos para calcular las proporciones. Las barras de error representan las desviaciones estándar (n=4). Las barras marcadas con la misma letra no difieren significativamente a un $p \leq 0,001$. Test ANOVA y post hoc Tukey (adaptada de Masclaux y cols., 2018).

I) METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

1. HIPÓTESIS

La variabilidad intraespecífica de *Rhizophagus irregularis* impacta diferentemente indicadores biológicos y bioquímicos de calidad del suelo, al inocular cultivos *in situ* de *Manihot esculenta* Cranz en Kenia, con diferentes niveles de fertilización de fosfato empleado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el impacto de la variabilidad intraespecífica de *Rhizophagus irregularis* en los indicadores de calidad del suelo, tales como niveles de carbono orgánico total, biomasa microbiana, respiración y reacciones enzimáticas del suelo, al inocular cultivos *in situ* de *Manihot esculenta* Cranz en Kenia sometidos a tres niveles de fertilización con fosfato.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Establecer la biomasa microbiana y porcentaje de carbono orgánico total del suelo en el cultivo de yuca en Kenia, con relación a la variabilidad de líneas intraespecífica de *R. irregularis* inoculados a tres niveles de fertilización con fosfato.

2.2.2. Determinar el CO₂ liberado del suelo en un cultivo de yuca *M. esculenta* Cranz en Kenia tras la inoculación de diferentes líneas intra-cepa de *R. irregularis*, a tres niveles de fertilización con fosfato.

2.2.3. Evaluar el efecto de la inoculación con diferentes líneas intra-cepa de *R. irregularis* en un cultivo de yuca *M. esculenta* Cranz en Kenia, sobre la actividad enzimática de β -glucosidasa, leucina-aminopeptidasa y fosfatasa del suelo, ante tres niveles de fertilización con fosfato.

III) MATERIALES Y METODOS

1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se planteó el siguiente diseño experimental: inoculación de cuatro líneas de una cepa aislada de *R. irregularis*; una parental dicariótica C3 y tres de su progenie de alta variabilidad C3.14, C3.16 y C3.22 (Masclaux y cols., 2018), con antecedentes de influir en la productividad de yuca (Ceballos y cols., 2013; Wyss y cols., 2016; Ceballos y cols., 2019) en cultivos *in situ* de *Manihot esculenta*, en una zona tropical de Kenia. Se incluyeron dos controles, uno sin inóculo y otro con el medio portador sin HMA, y se aplicaron tres concentraciones de fertilización de fosfato P_2O_5 (P1=0 P2=50% y P3=100%, siendo 100% la cantidad utilizada normalmente en el terreno correspondiente a 40 kg/ha^{-1}) en todos los tratamientos. Se consideraron ocho réplicas por cada tratamiento, dispuestas aleatoriamente en el terreno en bloques.

Cada bloque se diseñó con 18 unidades experimentales que contemplaron todas las combinaciones de tratamientos posibles, ya sea inóculo o control y fertilización fosfatada correspondiente. Cada unidad experimental consistió en 9 plantas para cada combinación de tratamientos posibles, rodeadas de 16 plantas sin tratamientos para conseguir un efecto barrera entre los tratamientos (**figura 7**, ver anexos). Cada bloque contuvo todas las combinaciones de tratamientos, y se tomó una muestra por cada unidad experimental al azar, con el objetivo de distribuir aleatoriamente el efecto de la heterogeneidad del campo entre las muestras. El criterio de bloqueo fue la pendiente del terreno. Las micorrizas se inocularon luego del primer mes de trasplante de los esquejes, y la fertilización fosfatada se aplicó entre los 30 y 45 días desde el trasplante. El muestreo se realizó después de un año de cultivo, durante la cosecha de febrero 2019, las muestras se enviaron a Suiza para análisis de liberación de CO_2 , velocidades de reacción enzimáticas, biomasa microbiana y carbono orgánico total del suelo. En esta memoria solo se realizaron los análisis posteriores al muestreo.

2. MATERIALES

2.1. MATERIALES BIOLÓGICOS

-Yuca: *Manihot esculenta Fumba Chai*, variedad local de Kenia.

-Hongo micorrízico arbuscular: *Rhizophagus irregularis*; líneas C3 (parental), C3.14, C3.16 y C3.22 (progenie). Líneas proporcionadas por el Laboratorio de Ecología y Evolución de Organismos Simbiontes, Universidad de Lausana, Suiza.

-Medio portador del inóculo: diatomita de baja actividad (1g=1000 esporas) proporcionado por Symbiom®, Lanškroun, República Checa.

2.2. SUELO

-Suelo de taxonomía inceptisol, textura franco-arcillo-arenosa [pH 5,19 – 5,22] y baja capacidad de intercambio iónico. Porcentaje de carbono inorgánico no considerable (determinado por test con HCl). Ukwala-Kawayo, Kenia.

2.3. REACTIVOS

-Amortiguador acetato de sodio 250 mM [pH 5,5]: CH₃COONa·3H₂O 0,25 M; CH₃CO₂H glacial 0,725 % (v/v); pH ajustado con NaOH 10 M.

- 4-Metilumbelliferil β-D-glucopiranososa 4 mM; solvente 2-metoxietanol al 20%.

- 4-Metilumbelliferil fosfato 8 mM; solvente 2-metoxietanol al 20%.

- L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina 4 mM; solvente 2-metoxietanol al 20%.

- Metilumbelliferona MUF 10 mM; solvente metanol 100%.

-7-amino-4-metilcumarina AMC 10 mM; solvente metanol al 100%.

-CHCl₃ estabilizado en etanol al 0,5-1%.

-KCl 1 M.

Todos los reactivos indicados fueron proporcionados por Sigma-Aldrich® (Darmstadt, Alemania)

- Cal sodada como depurador de CO₂ del sistema comercial del analizador de gas EGM-5.

2.4. SOFTWARE

Para el procesamiento de resultados y organización de datos se utilizó Excel. Para los análisis estadísticos y gráficos, se utilizó el entorno de desarrollo integrado RStudio de PBC y JMP® de SAS (*Statistical Analysis Systems Institute*), versión 14.1.

3. MÉTODOS

3.1 CULTIVO DE ESPECIES VEGETALES Y MICORRIZAS.

La propagación de yuca, *Manihot esculenta*, se realizó por medio de esquejes de 30 cm de longitud, asegurando clonalidad. Se cultivó *in situ* en Ukwala-Kawayo, Kenia, con suelo de taxonomía inceptisol, textura franco-arcillo-arenosa [pH 5,19 – 5,22] y baja capacidad de intercambio iónico. Las micorrizas se inocularon a los 30 días de trasplante, y se aplicó la fertilización fosfatada entre los 30 a 45 días luego del trasplante. El experimento consideró 3.600 plantas de yuca en total, de las cuales 1.296 recibieron la combinación de tratamientos correspondiente. La cosecha se realizó después de un año de cultivo.

Se inocularon cuatro líneas de hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus irregularis*; C3 (parental), C3.14, C3.16 y C3.22 (progenie) proporcionadas por el Laboratorio de Ecología y Evolución de Organismos Simbiontes, Universidad de Lausana, Suiza, quienes aislaron, cruzaron y propagaron las esporas mediante cultivo en placas Petri con raíces de zanahoria modificadas (Koch y cols., 2005; Croll y cols., 2009). Posteriormente las esporas fueron enviadas a Symbiom®, Lanškroun, República Checa, quien desarrolló y proporcionó el inóculo.

3.2. MUESTREO

El muestreo se realizó tomando 200 gramos de suelo de la rizósfera de cada planta, a 20 cm de profundidad, basado en la mayor presencia de raíces, según observación en terreno, y a 30 cm de distancia desde la base de la planta. Se realizaron pruebas de colonización de micorrizas en terreno con el método de

intersección de la grilla (Giovannetti & Mosse, 1980), demostrando eficacia de colonización sin interferencia del fosfato (**figura 8**, ver anexos). Las muestras se enviaron a Suiza y se analizaron dentro de las 2 primeras semanas luego del muestreo. En esta memoria solo se realizaron los análisis posteriores al muestreo. Para el ensayo de respiración del suelo, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C). Para los otros análisis, las muestras fueron mantenidas a 4°C. Se midió peso fresco y seco para asegurar la humedad óptima del suelo antes y durante los experimentos.

3.3. CARBONO ORGÁNICO TOTAL DEL SUELO

El carbono orgánico total del suelo (COT) se cuantificó por combustión seca (Bisutti y cols., 2004). Se tamizaron 4 gramos de suelo y se secaron a 105°C durante 24 horas. Las muestras fueron pulverizadas en morteros de porcelana y se enviaron para análisis de carbono elemental con analizador Thermo Finnigan Flash EA 1112. Los resultados se obtienen en porcentaje de carbono en la muestra.

3.4. BIOMASA MICROBIANA

La biomasa microbiana se cuantificó en términos de carbono orgánico microbiano extraíble y corregido para el carbono orgánico microbiano total. Para determinar esta biomasa se empleó el método de fumigación con cloroformo (CFE) descrito por Jenkinson y cols. (2004). El CFE desintegra las membranas y desnaturaliza los sistemas enzimáticos de los microbios. El CFE no permite la cuantificación del carbono orgánico disuelto, por lo que éste se extrajo separadamente y se cuantificó. En paralelo, se determinaron los mismos componentes solubles en controles sin fumigación y los valores de los controles se restaron de los valores obtenidos de las muestras fumigadas. La diferencia representa la cantidad de carbono orgánico microbiano extraíble de la biomasa microbiana. La medición es relacionada a la biomasa microbiana utilizando un factor k_{EX} (fracción de carbono extraíble de los microbios relativo al C microbiano total) para corregir el carbono no extraíble, por ejemplo, aquellos unidos a la pared celular u

otros compuestos insolubles. La extracción se realizó con solución de KCl (Murage & Voroney, 2007). Se tamizó suelo fresco a 2 mm y se pesaron 4 g de suelo tamizado para cada muestra. Los controles no fumigados fueron extraídos inmediatamente. Para la fumigación, se llenaron vasos de vidrio con 100 mL de cloroformo y se dejaron en una cámara de disección junto a las muestras, incubando durante 15 minutos. Se evacuó el gas y se repitió la evacuación durante 10 minutos después de 30 minutos. Esto asegura la penetración total del cloroformo en los poros del suelo. Se incubó 24 horas en oscuridad y temperatura ambiente. Se retiraron las muestras del disecador asegurando la completa vaporización del cloroformo evacuando en una cámara limpia 2 veces. Se traspasaron las muestras fumigadas a tubos cónicos para centrifuga de 50 mL y se procedió con la extracción.

Para la extracción se disolvieron las muestras en 30 mL de KCl 1M mezclándolos vigorosamente en un agitador orbital a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Los extractos se filtraron con filtros de celulosa libres de ceniza. Se incluyeron 3 blancos para cada medición, tanto para fumigados como no fumigados, correspondientes a solución de extracción KCl sin suelo. Se enviaron las muestras para cuantificación en un analizador de carbono orgánico total TOC-VCPH/CPNTNM-1 Shimadzu®. Para los cálculos, se emplearon las siguientes fórmulas:

$$A) \text{ DOC} = \frac{cs \times V}{W},$$

Donde **DOC** corresponde al carbono microbiano extraíble, expresado en µg de carbono por gramo de suelo fresco, **cs** corresponde al equivalente en mg de C por litro de muestra (resultados recibidos del análisis), **V** es el volumen del extracto original en mL y **W** es el peso de la muestra de suelo en gramos.

$$B) \text{ } C_{mic} = \frac{\text{DOC}_{fum} - \text{DOC}_{con}}{k_{EC}}; k_{EC} = 0.45,$$

Donde **C_{mic}** corresponde al carbono microbiano, **DOC_{fum}** al carbono de muestras fumigadas y **DOC_{con}** al carbono de muestras no fumigadas o controles, y **k_{EC}** el factor de corrección para el carbono orgánico no extraíble (Jenkinson y cols., 2004).

3.5. RESPIRACIÓN DEL SUELO (LIBERACION DE CO₂)

La liberación de CO₂ fue medida por método de cámaras de incubación cerradas. Para esto se adaptaron metodologías descritas por Badaluco y cols. (1992) y Alef & Nannipieri (1995). Se introdujeron 5 g de suelo tamizado a 2 mm, en viales de vidrio cerrados herméticamente. El aire del interior del vial fue reemplazado con jeringas por aire libre de CO₂, obtenido por filtración en depurador. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 12 hrs iniciales a temperatura ambiente. Una vez incubadas, el CO₂ liberado se recolectó con jeringas y se cuantificó mediante un analizador de gas CO₂ portable EGM-5. Se reemplazó el aire nuevamente y se incubaron las muestras 6 veces sucesivamente para obtener una curva de respiración. La primera medición se realizó a las 12 horas, luego cada 24 horas y las últimas cada 48 horas (240 horas totales). Para los cálculos se transformaron las partes por millón de CO₂ arrojadas por el analizador de gas en ng de carbono.

Los resultados se corrigieron por el tiempo de incubación de forma acumulativa y por gramos de suelo de muestra con tal de obtener ng de carbono por hora en un gramo de suelo. Así, el valor de CO₂ total liberado corresponde a la suma acumulativa de CO₂ cuantificado durante el tiempo completo de incubación y se expresó en nanogramos de carbono liberado por gramo de suelo en una hora. Como blanco se utilizó un vial de vidrio vacío mantenido en las mismas condiciones que las muestras. Se obtuvieron los pesos iniciales y finales de cada muestra para monitorear una posible pérdida de humedad (una pérdida considerable se refiere a más del 5% del peso).

3.6. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS (VELOCIDADES DE REACCIÓN)

Las velocidades de reacción enzimática de β -glucosidasa, leucina-aminopeptidasa y fosfatasa fueron medidas por fluorescencia según protocolos descritos anteriormente (Marx y cols., 2001; Saiya-Cork y cols., 2002; Bell y cols., 2013). Se utilizaron sustratos marcados con 4-Metilumbelliferona (MUF) y 7-amino-4-metil cumarina (AMC). Durante la catálisis de reacción, se rompe la unión entre el

sustrato y el colorante fluorescente, que es utilizado como cuantificación indirecta de la formación de producto. El colorante absorbe y emite luz a diferentes longitudes de ondas, que son detectadas por un espectrofotómetro (Bell y cols., 2013). Las soluciones madre de sustratos utilizados fueron 4-Metilumbelliferil β -D-glucopiranososa 4 mM para medir β -glucosidasa EC 3.2.1.21, 4-Metilumbelliferil fosfato 8 mM para medir fosfatasa ácida EC 3.1.3.2 y L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina 4 mM para medir leucina-aminopeptidasa EC 3.4.11.1. Para las soluciones de trabajo se prepararon diluciones desde las soluciones madre a razón de 1:4, tanto para 4-Metilumbelliferil β -D-glucopiranososa como para 4-Metilumbelliferil fosfato y 1:3 para L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina.

Se trabajó en condiciones de cinética de orden cero, utilizando sustrato en exceso para obtener velocidades máximas de reacción constantes (Tabatabai, 1983). Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de sustratos estándares. Para las curvas de calibración de los ensayos enzimáticos de BG y leucina-aminopeptidasa (LA), se utilizó una solución madre de estándar Metilumbelliferona MUF 10 mM, y se realizaron 7 diluciones seriadas para la curva de 0 μ M a 100 μ M. Para los ensayos enzimáticos de fosfatasa ácida (FAC), la curva de calibración se realizó a partir de una solución madre de estándar 7-amino-4-metilcumarina AMC 10 mM, desde la cual se prepararon 7 diluciones seriadas de 0 μ M a 5 μ M. Las soluciones madre de estándares fueron preparadas con metanol al 100% y de sustratos en 2-metoxietanol al 20% en agua MilliQ. Todas las diluciones posteriores de estándares y sustratos se disolvieron en amortiguador acetato 50 mM [pH 5,5] preparado a partir de solución madre 250 mM.

Se tamizó el suelo fresco y se disolvió 1 g en 100 mL de amortiguador acetato 100 mM. Luego se homogeneizó la disolución con un homogeneizador ultrasónico BANDELIN® sonoplus HD 2070.2, durante 2 minutos con una amplitud del 10 %. La sonicación, además de homogeneizar la muestra, permite liberar enzimas inmovilizadas por las sustancias húmicas del suelo. Las suspensiones fueron filtradas y mantenidas bajo agitación constante. Sin detener la agitación, se tomaron 200 μ L de suspensión de suelo para disponerlas en platos micro-tituladores negros.

A cada suspensión de suelo de 200 μL se le adicionaron 50 μL de solución estándar o sustrato, según corresponde.

Se midieron las 3 enzimas para cada muestra con 5 réplicas para cada medición. Para cada enzima y muestra se realizó una curva de calibración específica. Se midieron 6 concentraciones de estándar para la curva de calibración. Como control para corregir el efecto de *quenching* se incluyó una suspensión de suelo en amortiguador acetato en los estándares de la curva de calibración. La primera medición se realizó a los 15 minutos luego de la adición de sustrato, y la incubación se realizó en oscuridad, a temperatura ambiente. Posteriormente se cuantificó la fluorescencia de la formación de producto cada 30 minutos en un espectrofotómetro TECAN® Infinite M200. Se empleó una longitud de onda de excitación de 365 nm y 450 nm de emisión. Se calcularon los moles de producto mediante la ecuación de la curva de calibración con un factor $r^2=0,9$ asegurándose de estar dentro de los límites máximos y mínimos de fluorescencias obtenidas para las muestras. Se corrigieron los volúmenes de alícuotas empleadas y los gramos de suelo de tal manera de obtener resultados en nmoles de producto por hora en un gramo de suelo. Para el cálculo de velocidades de reacción se empleó la pendiente de la curva de aparición de producto por hora, asegurando una pendiente constante con un coeficiente $r^2>0,8$.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para todos los análisis estadísticos se consideró un índice de confiabilidad de 0,95. Se realizaron análisis ANOVA de múltiples variables para comprobar la significancia entre grupo de tratamientos. Para la respiración de suelo se realizó ANOVA de medidas repetidas y el factor bloque se incluyó como factor aleatorio. Para ANOVA con diferencias significativas ($p<0,05$) se realizó un análisis *post hoc* Tukey (Tukey, 1953). Se realizaron pruebas de normalidad con test Shapiro Wilk (Shapiro & Wilk, 1965). Para respiración del suelo se hizo un ajuste de modelo lineal mixto box-cox (Sakia, 1992), con factor exponencial de 0.14. Los valores atípicos se eliminaron mediante diagrama de cajas. Por pérdida de plantas, se consideró un diseño desbalanceado con análisis de varianza con error del tipo 2.

IV) RESULTADOS

1. BIOMASA MICROBIANA Y CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT)

En esta memoria se evaluaron diferentes indicadores biológicos de la calidad del suelo en un cultivo de yuca de Ukwala-Kawayo, Kenia. El carbono orgánico total (COT) es el indicador de calidad de suelo por excelencia (Shukla y cols., 2006). Es la fuente de energía para los microorganismos del suelo, quienes transformarán los nutrientes del suelo en formas lábiles para las plantas (Coleman y cols., 1983; Doran y cols., 1996; Barrios, 2007). El carbono microbiano (Cmic) es un importante indicador biológico de calidad del suelo, ya que determina la presencia y abundancia de microorganismos habitando la rizósfera, quienes descomponen la materia orgánica (Bünemann y cols., 2018). Con el objetivo de evaluar si la biomasa microbiana y el COT de la rizósfera en cultivos de yuca son afectados diferencialmente por la inoculación de distintas líneas de *R. irregularis* a tres niveles de fósforo, se midió el carbono microbiano por el método de fumigación y extracción, y se cuantificó el COT en un analizador elemental.

No se encontraron diferencias significativas en el COT o en la biomasa microbiana (Cmic) entre los tratamientos con las diferentes líneas de *R. irregularis*, ni con respecto a los controles. Tampoco se encontró un efecto significativo asociado a la fertilización con fósforo empleada (**figura 9**).

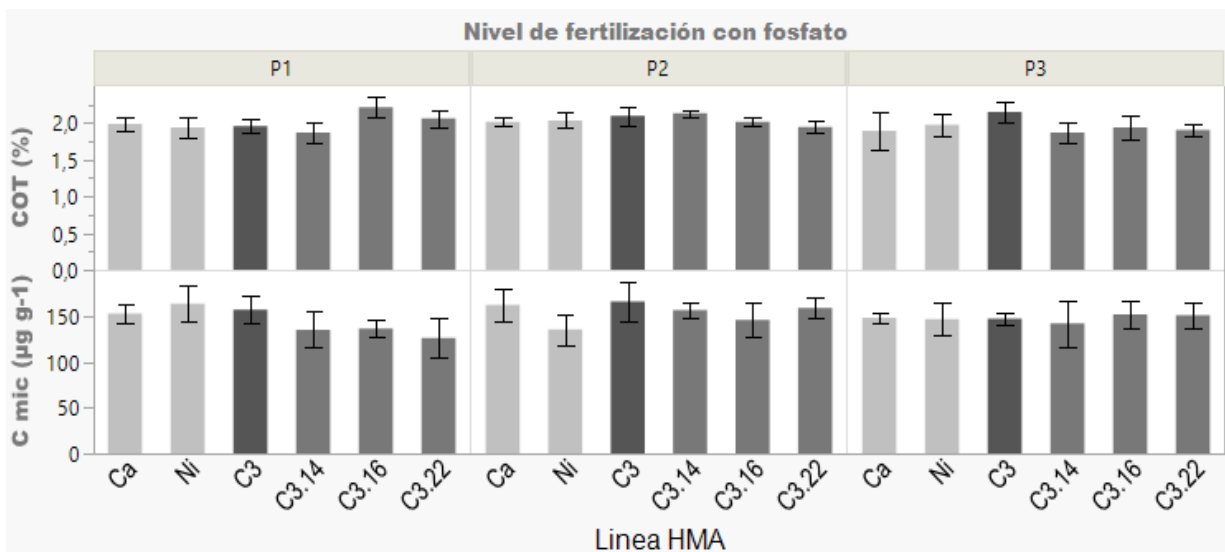


Figura 9. Variabilidad en líneas de *R. irregularis* sobre el porcentaje de carbono orgánico total (COT) y cantidad de carbono en la biomasa microbiana (Cmic) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato. Comparación del porcentaje de COT y cantidad de Cmic en mg de carbono por gramo de suelo, luego de inoculación con las diferentes líneas genéticas de HMA. Se comparó por nivel de fosfato empleado. Las barras representan la media entre réplicas de la cuantificación de carbono de las diferentes líneas genéticas del hongo. Las barras claras representan los controles; Ca es el medio portador de inóculo sin HMA y Ni corresponde a control no inoculado. C3 representa la línea de HMA parental y las C3.14, C3.16 y C3.22 corresponden a las 3 líneas de la progenie. P1, P2 y P3 representan 0, 50 y 100% de fertilización con fosfato, respectivamente. Las barras de error representan el ± 1 error estándar de las medias. Test ANOVA y análisis de normalidad con test Shapiro-Wilk ($n=80$, $p<0,05$).

2. RESPIRACIÓN DEL SUELO

La respiración del suelo es un importante indicador de calidad del suelo (Bünemann y cols., 2018). Determina la cantidad de carbono que sale del sistema en forma de CO_2 , y por otro lado, da cuenta de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo (Nannipieri y cols., 1990; Gougoulis y cols., 2014). Con el objetivo de comparar la liberación de CO_2 del suelo bajo el efecto de las distintas líneas de HMA a tres niveles de fosfato, se cuantificó la liberación de CO_2 por método de incubación en viales de vidrio sellados herméticamente. Los resultados se reportan en ng de carbono liberados por gramo de suelo en una hora de incubación (**figura 10**). Al comparar los efectos entre las líneas genéticas de *R.*

irregularis, se encontraron diferencias significativas entre la línea parental C3 a un 100% de fertilización con fósforo y las cepas C3.16 y C3.22, en todos los niveles de fósforo. La cepa C3.14 sólo difirió significativamente de C3 a un 100% de fósforo ($p < 0,05$; $n = 80$). No se encontraron diferencias significativas entre las líneas de *R. irregularis* a 0 y 50 % de fertilización con fósforo. Los tratamientos de inoculación no difirieron significativamente con los controles para estos dos niveles más bajos de fósforo, sin embargo, sí se observó un efecto significativo de la cepa C3 a un 100% de fósforo con respecto a los controles (**figura 10**).

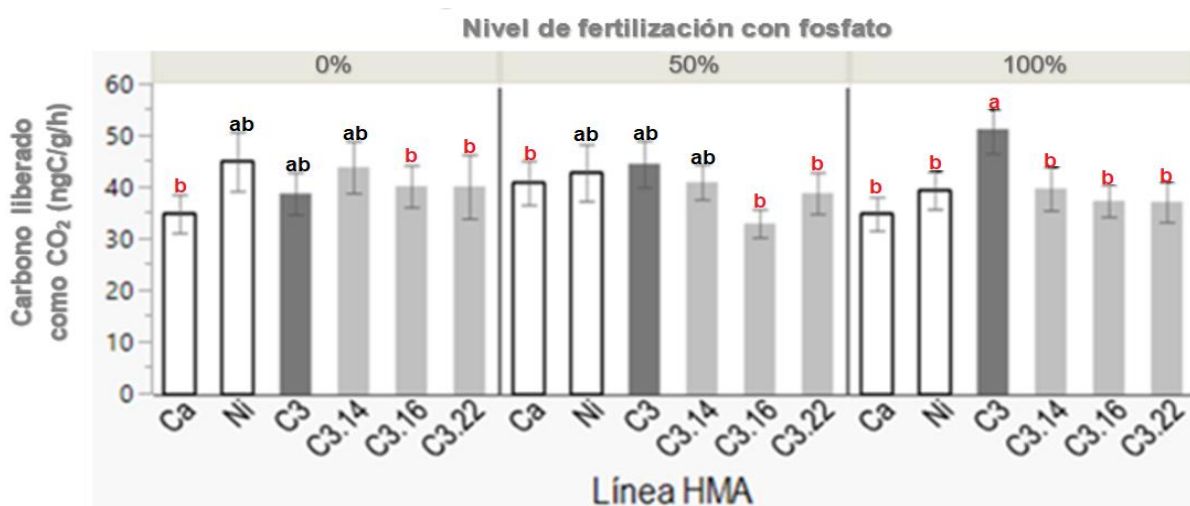


Figura 10. Variabilidad en líneas de *R. irregularis* sobre la liberación de CO₂ del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fósforo. Comparación del carbono (ng/g/h) liberado como CO₂ entre las diferentes líneas genéticas de HMA. Se muestra el efecto de las diferentes líneas de HMA sobre la liberación de carbono. Las barras representan la media entre réplicas de la cuantificación de carbono de las diferentes líneas genéticas del hongo. Las barras blancas representan los controles; Ca corresponde a medio portador de inóculo sin HMA y Ni corresponde a control no inoculado. La barra oscura representa la línea de HMA parental y las barras grises claro representan a 3 líneas de la progenie. Las barras de error representan el +/- 1 error estándar de las medias. Letras diferentes (**a** o **b**) representan diferencias significativas. Letras comunes (**ab**) representan diferencias no significativas con las barras de igual letra (**a** o **b**). ($n = 80$. Test ANOVA y post hoc Tukey, $p \leq 0,05$). Se analizó normalidad con test Shapiro-Wilk y se aplicó ajuste box-cox con un lamda de 0,14.

3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Se planteó el objetivo de evaluar si la variabilidad genética entre líneas de *R. irregularis* afecta diferencialmente las actividades de enzimas involucradas en ciclos de nutrientes del suelo. Esta pregunta se abordó en un cultivo comercial de yuca, utilizando distintas concentraciones de fosfato en la fertilización del suelo. Para esto se midieron las velocidades de reacción de enzimas β -glucosidasa (BG), involucrada en el ciclo del carbono, leucina aminopeptidasa, enzima del ciclo del nitrógeno y fosfatasa ácida, que participa en el ciclo del fósforo. Se empleó el método de fluorescencia usando sustratos marcados para la cuantificación de producto generado. Se calcularon las velocidades de reacción enzimática tras el monitoreo del producto generado en el tiempo. Las velocidades de reacción se reportan en nano moles de producto generados por hora en un gramo de suelo (tabla 1).

Tabla 1. Velocidades de reacción enzimática del suelo de yuca inoculada con diferentes líneas genéticas de *R. irregularis* a tres niveles de fosfato.

P	Linea HMA	β -glucosidasa (nmolh-1g-1)			Fosfatasa ácida (nmolh-1g-1)			Leucina aminopeptidasa (nmolh-1g-1)		
		media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV
P1	Ca	169,13	58,47	34,57	536,59	184,52	34,39	32,33	8,40	25,98
	Ni	203,38	48,35	23,77	485,98	107,65	22,15	32,91	18,08	54,92
	C3	232,45	100,80	43,37	420,16	74,63	17,76	33,04	17,47	52,89
	C3.14	130,17	25,58	19,65	503,29	220,14	43,74	24,26	7,58	31,25
	C3.16	195,81	52,03	26,57	499,77	163,80	32,78	34,44	10,42	30,26
	C3.22	179,06	37,92	21,18	343,47	72,74	21,18	31,33	11,51	36,74
P2	Ca	167,72	44,90	26,77	426,61	165,29	38,74	32,75	6,71	20,48
	Ni	167,35	54,30	32,44	423,13	199,92	47,25	34,17	9,60	28,08
	C3	192,53	51,13	26,56	454,39	189,06	41,61	43,29	10,66	24,64
	C3.14	211,37	56,73	26,84	515,76	176,34	34,19	40,10	7,81	19,46
	C3.16	177,31	42,47	23,95	404,08	187,56	46,42	31,60	14,35	45,42
	C3.22	176,49	70,69	40,05	472,05	155,58	32,96	31,54	18,44	58,48
P3	Ca	194,01	29,52	15,21	470,88	179,56	38,13	40,30	9,69	24,03
	Ni	168,68	63,22	37,48	435,77	155,26	35,63	27,22	9,38	34,47
	C3	266,16	98,97	37,19	594,09	135,79	22,86	43,32	13,67	31,55
	C3.14	186,07	55,32	29,73	534,44	199,88	37,40	29,71	2,78	9,36
	C3.16	185,07	46,81	25,29	461,19	131,42	28,50	34,98	14,84	42,44
	C3.22	188,29	47,76	25,36	398,33	182,06	45,70	35,18	11,92	33,88

σ : desviación estándar de las medias.
CV: coeficiente de variación
n=80

Controles: Ca; Ni
Inóculos HMA: C3; C3.14; C3.16; C3.22:

Niveles de fosfato: P1; P2; P3

Se midieron 5 réplicas técnicas para cada ensayo de actividad enzimática por muestra, y se consideraron 5 réplicas de cada inoculación en bloques distribuidos aleatoriamente en el campo.

Como indicador temprano de cambios en el COT, se escogió la enzima BG por su rol predominante en la degradación de la materia orgánica, estrechamente relacionada con el ciclo del carbono. La BG además, ha mostrado ser una enzima sensible a cambios en el manejo del suelo, mostrando variaciones antes de que se observen cambios en el COT (Stott y cols., 2010). Se procedió a comparar el efecto de la inoculación de las distintas cepas de HMA sobre la actividad de BG, observando también el efecto del nivel de fertilización con fosfato (**figura 11**).

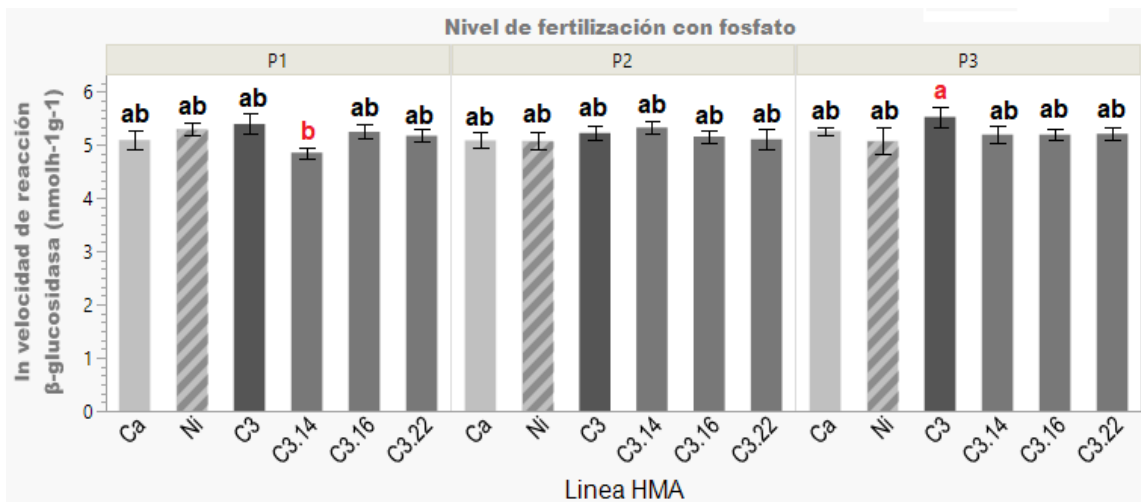


Figura 11. Efecto de la variabilidad de líneas de *R. irregularis* sobre la actividad de β -glucosidasa (BG) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato. Se reporta el logaritmo natural de las velocidades de reacción enzimática, calculadas en nanomoles de producto generados por hora por gramo de suelo. Las barras representan las medias de réplicas obtenidas de las velocidades bajo los diferentes tratamientos de HMA. C3 representa la línea HMA parental y C3.22, C2.16 y C3.14 representan las líneas de su progenie. Ca corresponde al control de inóculo de medio portador sin HMA y Ni al control no inoculado. P1, P2 y P3 representan el nivel de fertilización fosfato, correspondientes a 0%, 50% y 100%, respectivamente. Barras de error representan el ± 1 error estándar de las medias. Letras diferentes (**a** o **b**) representan diferencias significativas. Test ANOVA y post hoc Tukey, $p \leq 0,05$. Se analizó normalidad con test Shapiro-Wilk y se aplicó ajuste log-normal ($p < 0,05$). $n=80$.

Se encontraron diferencias significativas en la velocidad de reacción de BG entre la línea parental C3 a 100% de fertilización con fosfato y la línea de la progenie C3.14 a un 0% de fertilización con fosfato ($p=0,048$) con respecto a los controles. No se encontraron diferencias significativas en la velocidad de reacción luego de la inoculación con las líneas C3.16 o C3.22, con respecto a los controles. Tampoco se

detectaron diferencias significativas relacionadas al nivel de fertilización fosfato empleado (**figura 11**).

La enzima LA es importante para la mineralización del N, elemento importante para la calidad del suelo y nutrición de las plantas (Dick, 1994; Gianfreda, 2015). Con el objetivo de comparar el efecto de la inoculación de las distintas cepas de HMA sobre la actividad de LA, se midió la actividad enzimática a diferentes niveles de fertilización con fosfato. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de la peptidasa de la rizósfera inoculada con las distintas líneas genéticas de HMA. Tampoco se encontraron diferencias en la actividad de esta enzima luego de la fertilización con fosfato a diferentes niveles ($p > 0,05$; $n = 80$) (**figura 12**).

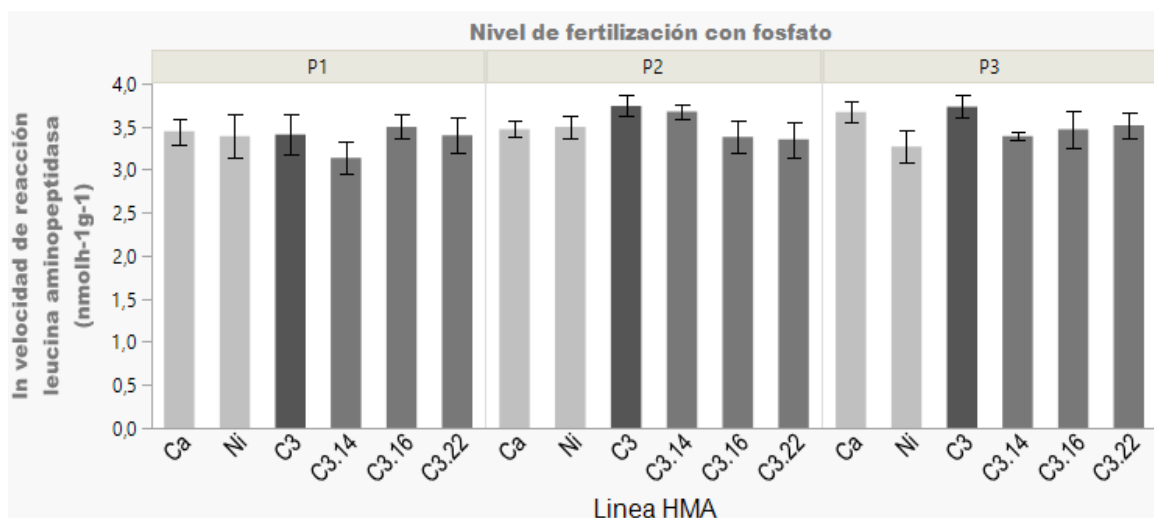


Figura 12. Variabilidad en líneas de *R. irregularis* sobre la actividad de leucina aminopeptidasa (LA) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato. Cuantificación de la velocidad de reacción de LA con respecto a líneas variables de *R. irregularis* y nivel de fertilización con fosfato. Se reporta el logaritmo natural de las velocidades de la reacción enzimática, calculada en nanomoles de producto generados por hora en un gramo de suelo. Las barras representan las medias de réplicas obtenidas de las velocidades con las diferentes líneas de HMA. C3 representa la línea HMA parental y C3.22, C2.16 y C3.14 representan las líneas de su progenie. Ca corresponde al control de inóculo de medio portador sin HMA y Ni al control no inoculado. P1, P2 y P3 representan el nivel de fertilización con fosfato, correspondientes a 0%, 50% y 100%, respectivamente. Las barras de error representan el ± 1 error estándar de las medias. Test ANOVA, $p \leq 0,05$. Se analizó normalidad con el test Shapiro-Wilk y se aplicó un ajuste log-normal ($p < 0,05$). $n = 80$.

La enzima Fac está estrechamente relacionada con la disponibilidad de fósforo en el suelo, elemento determinante de la calidad del suelo. Las micorrizas han sido usadas especialmente por su capacidad de aumentar la absorción de P en las plantas y han mostrado correlaciones con la actividad de FAc (Dighton, 1983; Bucher, 2007; Gianfreda, 2015). Se comparó la actividad de FAc luego de la inoculación con las distintas líneas de HMA en el suelo fertilizado con diferentes niveles de fosfato. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de FAc de la rizósfera de yuca inoculada con distintas líneas genéticas de HMA. La actividad de FAc encontrada también resultó ser independiente del nivel de fertilización con fosfato (**figura 13**).

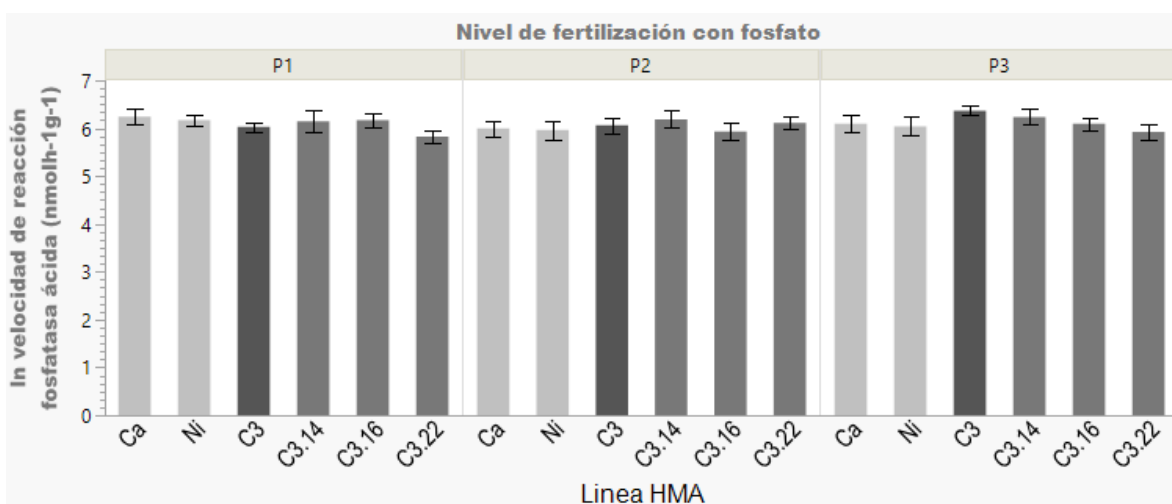


Figura 13. Variabilidad en líneas de *R. irregularis* sobre la actividad de fosfatasa ácida (Fac) del suelo tras inoculación en cultivo de yuca a tres niveles de fosfato. Cuantificación de la velocidad de reacción de Fac con respecto a líneas variables de *R. irregularis* y nivel de fertilización fosfato. Se reportada el logaritmo natural de las velocidades de reacción enzimática, calculadas en nanomoles de producto generados por hora en un gramo de suelo. Las barras representan las medias de réplicas obtenidas de las velocidades bajo los diferentes tratamientos de HMA. C3 representa la línea HMA parental y C3.22, C2.16 y C3.14 representan las líneas de su progenie. Ca corresponde al control de inóculo de medio portador sin HMA y Ni al control no inoculado. P1, P2 y P3 representan el nivel de fertilización fosfato, correspondientes a 0%, 50% y 100% respectivamente. Barras de error representan el +/- 1 error estándar de las medias. Test ANOVA, $p < 0,05$. Se analizó normalidad con test Shapiro-Wilk y se aplicó ajuste log-normal ($p < 0,05$). $n=80$.

V) DISCUSIÓN

Se postula que *R. irregularis* tiene un efecto en el metabolismo del suelo, incidiendo directamente en diversos indicadores de calidad del suelo, y en forma dependiente del tratamiento con fosfato. Se han encontrado efectos diferenciales en el resultado de las cosechas tras la inoculación de diferentes líneas genéticas de *R. irregularis*. Según esto, se planteó la hipótesis de que las diferentes líneas genéticas de *R. irregularis* afectan diferentemente al microbioma del suelo en términos de calidad del suelo. A su vez, la acción de este hongo micorrícico sería también dependiente del nivel de fosfato. Para poner a prueba esta hipótesis, se inoculó una cepa parental del hongo micorrícico arbuscular (HMA) y tres cepas de su progenie, que presentan variabilidad genética, en cultivos *in situ* de yuca (*M. esculenta* Cranz) en Kenia. Estos inóculos se aplicaron en suelos con tres niveles de fertilización con fosfato.

1. Biomasa y carbono orgánico total del suelo.

Tanto el COT como el Cmic forman parte de los 10 indicadores de calidad utilizados en el Marco de Evaluación de la Gestión del Suelo (SMAF), desarrollado por Andrews y cols. (2004). Dada la dominancia del carbono orgánico como indicador de calidad del suelo, se consideró imprescindible su determinación para monitorear el efecto de *R. irregularis*. Por otro lado, la cantidad de Cmic es un indicador temprano de alteraciones en el COT del suelo (Powlson y cols., 1987). Por lo tanto, contar con la determinación del COT y el Cmic del cultivo de yuca nos permite aportar antecedentes robustos para el monitoreo del COT ante la inoculación de *R. irregularis*.

Los HMA participan en la dinámica del carbono del suelo. Obtienen el carbono desde la planta hospedera y lo distribuyen hacia el micelio extrarradical, por lo que se postula que los HMA son fijadores de carbono en el suelo (Jones y cols., 2004, 2009). A su vez, los depósitos de productos miceliales de HMA son sustrato para bacterias. Se ha reportado que de esta manera, diferentes HMA

impactan diferencialmente en las comunidades bacterianas de su entorno, en forma cualitativa y cuantitativa (Rillig y Mummey, 2006; Richardson y cols., 2009; Monokrousos y cols., 2019). Se ha confirmado que *R. irregularis* estimula el crecimiento de diferentes microorganismos del suelo por interacción directa con exudados miceliales (Filion, 1999; Albertsen y cols., 2006; Toljander y cols., 2007). También se ha reportado que la enmienda de materia orgánica elimina (Albertsen y cols., 2006) o potencia (Caravaca y cols., 2003) este efecto del inóculo, siendo capaz de aumentar el Cmic hasta un 200%. Estos antecedentes son indicios de que *R. irregularis* puede incidir en las poblaciones microbianas dependiendo de la materia orgánica disponible en el medio. Kohler y cols. (2006), no reportan un efecto sobre Cmic tras la inoculación de *R. irregularis*. Raiesi y Ghollarata, (2006) reportaron que la inoculación de *R. irregularis* y disponibilidad de fosfato afectan la disponibilidad de carbono. Estos investigadores encontraron mayores niveles de Cmic en ausencia del HMA a un alto nivel de P y sugieren que la fertilización fosfatada estimula las actividades microbianas y el hongo micorrízico las deprime. Por otro lado, Hartman y Richardson (2013), plantean que el P es un nutriente limitante de la biomasa microbiana del suelo, dado la alta demanda de este elemento en los ribosomas, limitando la síntesis de proteínas.

Según los resultados obtenidos en esta memoria, el empleo de la cepa C3 y su progenie C3.14, C3.16 y C3.22 no alteran el COT ni presentan indicios tempranos en su alteración por medio de cambios en el Cmic. Tampoco se observó un efecto de la fertilización de fosfato sobre este parámetro de calidad del suelo. C3 tiene potencial para aumentar productividad y disminuir requerimientos de fertilización por fosfato a un 50% (Ceballos y cols., 2013). A partir de los resultados obtenidos, podemos afirmar que para este cultivo comercial, el nivel de fertilización por fosfato no conduce a cambios en el COT, si comparamos los controles entre los niveles de fosfato. Por tanto abre la posibilidad de disminuir el nivel de fertilización acompañada del uso de inóculos de micorrizas, sin comprometer este importante indicador de calidad del suelo. Más aun, así como reportan Caravaca y cols. (2003), se podría evaluar la posibilidad de aumentar la calidad del suelo complementando el inóculo de HMA con otras técnicas agroecológicas, como la adición de materia

orgánica. Las discrepancias y controversias en este tema y entre algunos de los antecedentes presentados pueden deberse a condiciones edafoclimáticas (Relativo a suelo y clima. Edafoclimático | Real Academia de Ingeniería, 2021), que se discutirán más adelante.

Los HMA de las capas superficiales del suelo difieren de los del subsuelo. Sosa-Hernandez y cols. (2019) plantean la importancia del efecto de las micorrizas en el subsuelo, debido a que sobre el 50% de la biomasa total de HMA puede encontrarse bajo los 30 cm de profundidad, alcanzando hasta los 8 metros en sistemas forestales. Zhang y cols. (2019) reportan un aumento del carbono orgánico del subsuelo tras la inoculación de *R. irregularis*, sin embargo no encontraron un efecto significativo del HMA sobre la población microbiana a los 22,5 cm de profundidad. Según esto, cabe la posibilidad de que la cepa C3 y su progenie tengan un efecto de captura de carbono en mayores profundidades, lo cual sería positivo para la calidad del suelo.

2. Respiración y actividades enzimáticas del suelo.

La respiración del suelo y la actividad enzimática como indicadores de calidad bioquímicos del suelo son de interés, dado que reflejan la actividad metabólica de los microorganismos que habitan la rizósfera. Los microorganismos dejan biodisponibles aminoácidos, nitritos, nitratos, fosfatos y sulfatos (entre otros) por medio de enzimas, favoreciendo la nutrición de especies vegetales (Moreira y cols., 2008). Los metabolismos microbianos involucran la liberación de CO₂ al ambiente como producto de respiración. Esta liberación de CO₂ es una vía importante de pérdida del carbono reservado en el suelo. Desde otro punto de vista, la liberación de CO₂ desde la rizósfera también contribuye a la absorción de la planta para su desarrollo. La planta se nutre del CO₂ liberado para realizar la fotosíntesis, y también libera CO₂ desde las raíces. En consecuencia, es necesario que se mantenga un equilibrio entre la entrada y salida de carbono, de tal manera que se genere un ecosistema que se sustente en el tiempo sin perder carbono a la atmósfera (Xu &

Shang, 2016). Esta dinámica ideal se plantea en términos de mantención de un suelo de calidad, fomentando una agroecología saludable (Altieri, 1999).

2.1 Respiración del suelo

La actividad catabólica de los microorganismos es la responsable de la liberación de CO₂ del suelo (Xu & Shang, 2016). Hay antecedentes que han demostrado un efecto en la respiración del suelo en términos de actividad catabólica, adicionando sustratos para impulsar la actividad respiratoria. Wahbi y cols. (2015) reportan que la inoculación de *R. irregularis* en cultivos de campo tiene un efecto significativo en la funcionalidad catabólica de la microbiología del suelo. Duponnois y cols. (2005) reportan efectos de la inoculación de *R. irregularis* en la respiración del suelo inducida por sustrato, bajo enmienda de P. Feng y Zhu (2019) determinaron, por medio de un metaanálisis de 102 publicaciones, que la adición de P afecta la respiración del suelo dependiendo del ecosistema. Así, se concluye que en bosques tropicales la adición de P puede aumentar la respiración del suelo en un 17,4%, y en tierra de cultivo puede aumentar en un 31,7%.

A nuestro conocimiento, no hay estudios previos publicados de la respiración del suelo en términos de liberación de CO₂, bajo efectos de inóculo de HMA utilizando el método de cámaras de incubación cerradas empleado aquí. En paralelo a este estudio en Kenia, y con la misma metodología aquí empleada, se cuantificó el efecto de las mismas cepas de *R. irregularis* (C3 y progenie) en cultivos de yuca en Tanzania. Sí se observaron efectos diferenciales intraespecíficos sobre la liberación de CO₂ para esa localidad (**figura 14**, anexos. Datos no publicados).

Se planteó el objetivo de determinar si el CO₂ liberado del suelo en un cultivo de yuca en Kenia difería tras la inoculación de diferentes líneas genéticas de *R. irregularis*, a tres niveles de fertilización con fósforo. Se encontró que la cepa C3 a un 100% de fertilización con fósforo tiene un efecto mayor en la liberación de CO₂ del suelo con respecto a los demás tratamientos. A 0% y 50 % de fertilización con

fosfato sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con HMA. El nivel de fertilización con fosfato no induce cambios significativos para un mismo tratamiento de HMA en la liberación de CO₂ del suelo, por lo que la diferencia encontrada se le atribuye a efecto del inóculo. Se observó que la cepa C3 en general presenta mayor liberación de CO₂ que las cepas de su progenie C3.16 y C3.22. Es interesante observar que el nivel de fosfato puede modular levemente el efecto diferencial en liberación de CO₂ dado por la variabilidad intraespecífica en *R. irregularis*. Así se observa que al 100% de fosfato se acentúa la liberación de CO₂ del suelo con el inóculo C3, en comparación con los demás tratamientos, y esta liberación se hace significativamente diferente con la cepa de su progenie C3.14 para ese nivel de fosfato. Se abre espacio para estudios posteriores para identificar factor que aumenta la diferencia entre tratamientos a un 100% de fosfato.

Una de las posibles respuestas es que C3 esté adaptada diferencialmente con las cepas de su progenie, al entorno microbiológico dado a altas concentraciones de fosfato. Podría ser que la fertilización fosfatada influya indirectamente en la competencia de las especies por algún metabolismo del suelo involucrado en la liberación de CO₂. Por ejemplo, la cepa C3 podría hidrolizar el fosfato de manera más eficiente (Koide & Kabir, 2002), afectando indirectamente el metabolismo de la comunidad. Peña y cols. (2020) estudiaron el efecto de C3 y su progenie en el peso fresco de raíz en cultivos de yuca en Kenia. Reportaron que la respuesta a la variabilidad intraespecífica de las cepas, relativa a los controles no inoculados, depende del nivel de fertilización fosfatada empleada, llegando a mostrar efectos totalmente opuestos entre cepas.

La mayoría de los antecedentes sobre el efecto de *R. irregularis* en la respiración del suelo han sido determinados mediante el método de respiración inducida por sustrato. Este último consiste en la adición de un sustrato, como glucosa, al suelo y posteriormente cuantificar la liberación de CO₂ (Lin & Bookes, 1999). Si bien es útil para medir la capacidad metabólica del suelo, esta técnica no

discrimina el CO₂ proveniente de la metabolización de los sustratos adicionados, de aquel proveniente de la materia orgánica en el suelo. Se consideró más pertinente la medición de respiración mediante incubación en viales para proporcionar información que permita correlacionar un posible impacto del inóculo micorrízico sobre la materia orgánica ya presente en campo.

Se ha descrito que la gran mayoría del CO₂ liberado del suelo podría atribuirse a la respiración de las raíces (Xu & Shang, 2016). En este trabajo solo se consideró la respiración del suelo en ausencia de las raíces, por lo que los resultados son reflejo del efecto del HMA sobre la comunidad microbológica del suelo. Esto último es de importancia al comparar los resultados obtenidos con mediciones de respiración mediante cámaras instaladas *in situ*.

2.2 Actividades enzimáticas del suelo.

Las actividades enzimáticas del suelo se relacionan a procesos ligados a la estabilización de la materia orgánica. Una perturbación en la actividad enzimática se relaciona con el impacto de ésta sobre las dinámicas y biodisponibilidad de nutrientes para los vegetales y comunidades microbianas del suelo (Nannipieri y cols., 2002; Stott y cols., 2010).

Uno de los objetivos de esta memoria fue evaluar el impacto de la variabilidad entre cepas de *R. irregularis* inoculadas en yuca, en la actividad de diferentes enzimas. Se evaluaron tres enzimas, correspondientes a β -glucosidasa (BG), indicadora de perturbaciones en el ciclo del carbono, leucina aminopeptidasa (LA), importante para el ciclo del nitrógeno y fosfatasa ácida (FAC), representando el ciclo del fósforo.

Las respuestas de las enzimas del suelo, tanto a la relación simbiótica como al nivel de fósforo u otras condiciones, son muy amplias. Caravaca y cols. (2003) reportaron efectos de la inoculación de *R. irregularis* sobre las actividades de FAC y BG del suelo. El inóculo de HMA disminuyó la actividad de FAC y aumentó la

actividad de BG. Además reportaron que una adición de materia orgánica en conjunto con el HMA, aumentan la actividad de FAc. Aloui y cols. (2009) realizaron un estudio proteómico del suelo tras la inoculación de *R. irregularis*, encontrando una inducción de una leucina-aminopeptidasa de origen fúngico. Raiesi y Ghollarata (2006), reportan que tanto el inóculo de HMA como la disponibilidad de P influyen en la actividad microbiana. Sus resultados muestran que la actividad de FAc es inversa al nivel de fertilización con fosfato. Por otro lado, la actividad de FAc aumentó en presencia de *R. irregularis*. Controversialmente, se ha postulado que el exceso de fosfato inhibe a los HMA en condiciones estériles (Balzergue y cols., 2010), pero que *in situ*, esto depende incluso en la planta hospedera (Peña y cols., 2020). Koide y Kabir (2002), reportaron que la hifa extrarradical de *R. irregularis* hidroliza el fosfato orgánico, y transporta el P producido por las hifas a las raíces cuando hay un exceso de fosfato. Kohler y cols. (2006) no encontraron efectos de la inoculación de *R. irregularis* en la actividad de FAc, y la fertilización con P no influyó de manera significativa en la actividad enzimática.

De todos estos antecedentes se comprende que el monitoreo enzimático debe abordarse de manera local y específica al manejo agroecológico. Así, la determinación de las actividades enzimáticas reportadas en esta memoria es de gran importancia para futuros estudios en cultivos de yuca en Ukwala-Kawayo, Kenia. Las metodologías empleadas difieren entre los distintos estudios, por lo tanto es difícil compararlos entre ellos. Se requiere una estandarización para el monitoreo de las actividades enzimáticas del suelo como indicadores de la calidad del suelo.

En el caso de la enzima BG, en este estudio se observó un efecto de la variabilidad genética entre la cepa C3 a 100% de fertilización fosfatada y la cepa de su progenie C3.14 en ausencia de fertilización con fosfato (0%). No se encontraron diferencias con respecto a los controles, ni entre las demás cepas inoculadas en los 3 niveles de fosfato. De esto se desprenden dos observaciones: Primero, el fosfato no tiene una influencia significativa sobre la actividad de BG dentro de una misma cepa para ningún tratamiento con HMA. Segundo, no hay diferencia entre cepas a

un mismo nivel de fertilización con fosfato. Si bien los resultados no muestran un patrón de comportamiento muy claro, el nivel de fertilización podría influir sobre el desempeño diferencial entre las cepas C3 y C3.14, dada la adaptabilidad diferencial al entorno generado por el nivel de P. De esta manera, la actividad de BG para C3 se ve favorecida a altos niveles de fosfato, en comparación con C3.14 en bajos niveles de fosfato.

La BG es sensible a cambios en la gestión de residuos orgánicos del suelo. Así es un indicador temprano de cambios en carbono orgánico del suelo, antes que éstos se vean reflejados en el COT. Una actividad creciente de BG refleja la habilidad del suelo para catabolizar residuos orgánicos y mejorar la disponibilidad de nutrientes. Esta actividad se relaciona con diferentes funciones del suelo como el ciclado de nutrientes para el crecimiento vegetal, la biodiversidad y hábitat, el filtrado y tampón de exceso de nutrientes y elementos tóxicos, y la estabilidad y soporte estructural del suelo (Stott y cols., 2010). La cepa C3 presentó la mayor actividad BG al 100% de fosfato, lo cual puede ser positivo para la calidad del suelo. Por otro lado, *R. irregularis* tiene el potencial de mejorar la estructura del suelo, lo cual se correlaciona positivamente con una alta actividad de BG (Stott y cols., 2010).

Tanto la enzima BG como la liberación de CO₂ se relacionan estrechamente con el ciclo del carbono. Dado que la cepa C3 presentó una mayor liberación de CO₂ a 100% de fertilización con fosfato, sería interesante evaluar correlaciones entre la liberación de CO₂, actividad BG y el carbono orgánico del suelo. Se propone evaluar algunas nuevas variables involucradas en los resultados obtenidos, como por ejemplo, el estado de agregación del suelo. Ahora bien, no hubo diferencias significativas en BG con respecto a los controles no inoculados. Esto da información del impacto de la actividad BG sobre el COT. Podríamos decir que el impacto diferencial en BG encontrado entre C3 y C3.14 está dentro de una dinámica normal que no llega a impactar el COT del suelo en este campo. De todas maneras, Stott y cols. (2010) recomiendan el estudio de la actividad de BG durante varios años para predecir tendencias en la captura del carbono.

Con respecto a las enzimas FAc y LA, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con HMA, ni los controles. El nivel de fertilización fosfatada no presentó efectos significativos sobre las actividades enzimáticas entre las líneas genéticas diferentes. Jøner y Jakobsen (1995) estudiaron una especie distinta a *R. irregularis*, reportando una reducción en la cantidad de enzima exudada, aunque no atribuyen la alteración de la actividad de fosfatasa al HMA.

Se han reportado interacciones inhibitorias entre las micorrizas y la actividad microbiana del suelo, al competir por los nutrientes del suelo (Leigh y cols., 2011) y disminuir la descomposición de la materia orgánica (Gadgil & Gadgil, 1975). Los resultados reportados aquí descartan indicios de que la cepa C3 y su progenie compitan de manera inhibitoria con la microbiología preexistente del suelo en metabolismos de nutrientes como el C, N y P, para este cultivo comercial de yuca, ya que no hubo diferencias con los controles no inoculados, lo cual puede ser positivo para fomentar la reserva de carbono y nutrientes en el suelo (Averill y cols., 2014). Ahora bien, no se puede descartar que la microbiología local preexistente está compitiendo de manera supresora con el inóculo de *R. irregularis* empleado, para los parámetros medidos. De todas maneras esto último podría ser beneficioso como mecanismo regulatorio intraespecífico en términos de mantención de la calidad del suelo y no implica que otros beneficios sean también suprimidos. Peña y cols. (2020) reportan que tanto la identidad del HMA y de la planta hospedera determinan la inhibición de la colonización y respuesta a la inoculación con niveles crecientes de fosfato. Por tanto, nuevamente se plantea que la localidad y especificidad son factores altamente influyentes.

Las discrepancias y/o concordancias entre los resultados aquí reportados y los antecedentes puede explicarse por la gran cantidad de variables y dinámicas que surgen desde las distintas condiciones edafoclimáticas. Las características del suelo son determinantes de la actividad de los microorganismos que lo habitan, incluso dentro de un mismo ecosistema. Entre estos factores se incluyen: **A.** Sustratos, **B.** Nutrientes, **C.** Factores de crecimiento, **D.** Composición Iónica, **E.**

Agua, **F.** Temperatura **G.** Radiación, **H.** Composición atmosférica, **I.** pH, **J.** Potencial oxido-reducción, **K.** Relaciones espaciales, **L.** Tamaño de partículas y **M.** Características e interacciones entre microorganismos (Stotzky & Pramer, 1972). De esta manera, la comparación de resultados entre estudios de condiciones edafoclimáticas diferentes requiere de un manejo extensivo de muchas variables que pueden determinar/afectar los resultados. Se hace necesario el monitoreo local, para lo cual hay que contar con puntos comparativos ante fluctuaciones entre temporadas, cambios en el manejo del suelo, ciclo de la planta, o comparar entre sitios de condiciones edafoclimáticas similares.

Para corregir la heterogeneidad del medio en experimentos de campo, se hace necesaria la utilización de un alto tamaño muestral, así como réplicas, dada además la probabilidad de eliminación de muestras tales como la muerte de algunos individuos. Para reducir la variabilidad espacial a menos del 10%, Fliessbach y Widmer (2005) aconsejan utilizar cuatro réplicas por unidad experimental, cada una con al menos 15 núcleos individuales (entiéndase una unidad experimental como una combinación de tratamientos, por ejemplo, un HMA más 0% de fosfato en el bloque 1, replicado en 4 bloques en total, y un núcleo correspondiente a una de las réplicas de la combinación de tratamientos, por ejemplo, 15 individuos de yuca con una combinación de tratamientos, HMA más un nivel fosfato). Sin embargo, la cantidad de muestras también determina la capacidad de procesamiento posterior en el laboratorio.

Una alta cantidad de muestras requiere de mayor trabajo que no es posible abordar dado el requerimiento de inmediatez de la metodología empleada y la falta de tecnología para el procesamiento rápido de muestras. Debido a lo anterior, si bien nuestro diseño experimental sí considero un tamaño muestral adecuado, no se pudo abarcar a nivel de laboratorio para que cumpliera las condiciones recomendadas por Fliessbach y Widmer. De todas maneras, el diseño experimental de este trabajo se abordó considerando la relevancia del monitoreo de la aplicación de micorrizas en un campo comercial de extensión y densidad utilizadas normalmente en agricultura. Para ello se diseñó el experimento en bloques, con el

objetivo de reducir la contribución de las variables discutidas, y considerándolas como efecto aleatorio en el análisis de datos. Hay evidencia de que los comportamientos observados en condiciones estériles no aplican en condiciones de campo, donde las plantas son colonizadas naturalmente por diversos microorganismos típicamente presentes en el suelo, y la respuesta esperada del inóculo variará de acuerdo con el sitio (Rodríguez & Sanders, 2015; Peña y cols., 2020). Se requiere la implementación de nuevas tecnologías e inversión en investigación para cubrir la falta de información y capacidad de procesamiento de muestras, especialmente en países en vías de desarrollo (Xu & Shang, 2016). Esto facilitaría la comprensión de los resultados, comparando entre regiones similares, a manera de encontrar patrones útiles de guía para una agroecología eficiente.

Se ha cuestionado el rol de los HMA de acuerdo con su distribución vertical. Vale decir, en relación con su localización en capas superficiales del suelo o en profundidad. Se ha entendido a las micorrizas como una extensión de las raíces de las plantas, ayudando a sobrepasar las dificultades de la heterogeneidad del medio, que resulta en una menor biodisponibilidad de elementos, en especial el fósforo (Semenov y cols., 2010). Si bien en los cultivos de yuca no se observó un impacto sobre el COT, Cmic, ni actividades enzimáticas de LA y FAc atribuible a la variabilidad de cepas de *R. irregularis*, sería interesante evaluar si ocurre lo mismo en capas más profundas o subsuelo.

La temporada de cultivo parece ser otro factor importante para considerar. Wahbi y cols. (2015), reportaron que el inóculo de *R. irregularis* no tenía impactos en la funcionalidad catabólica de microorganismos tras un año de cultivo, pero sí mejoraba significativamente tras dos temporadas de cultivo, al comparar con el control no inoculado. El aumento de la actividad catabólica tras la segunda temporada de cultivo se relacionaría con un aumento en la colonización del HMA. Además se discute que el efecto beneficioso del HMA sobre el rendimiento de cultivos de trigo esté relacionado más a la abundancia de micorriza que a la introducción de nuevas cepas fúngicas *per se*. Sería interesante entonces

determinar si el tiempo de cultivo influye en un desarrollo óptimo de la micorriza, a manera de aumentar su capacidad de alcance a zonas remotas a la raíz, provocando algún impacto en la biología y calidad del suelo. Se recomienda un monitoreo constante a lo largo de la temporada de cultivo para abarcar ampliamente los posibles beneficios del HMA.

Los indicadores de calidad biológicos y bioquímicos como las actividades enzimáticas, biomasa y respiración microbiana, son indicadores tempranos de perturbaciones del suelo. Sería interesante obtener información sobre el impacto de las HMA sobre la estabilización de la materia orgánica *in situ*, pero aparentemente en este caso, el HMA no está ejerciendo un impacto sobre la materia orgánica del suelo. Nuevamente sería de interés entender estas variables, con el objetivo de potenciar el efecto beneficioso de la aplicación de HMA en cultivos agroecológicos o convencionales. Entre estos beneficios están la potencialidad de *R. irregularis* para incrementar el contenido de fenoles y nutrientes, otorgar resistencia al estrés o plagas, favorecer la diversidad, así como también la formación de agregados del suelo, entre muchos otros atributos. Se podrían implementar varias técnicas agroecológicas en conjunto, con la finalidad de potenciar los beneficios de la microbiología del suelo para una alimentación saludable y sostenible.

VI) CONCLUSIONES

1. En relación con el contenido de Carbono Orgánico Total y Microbiano del suelo

- La variabilidad intraespecífica en *R. irregularis* no impacta diferentemente el COT a 20 cm del suelo en cultivo de yuca en Ukwala-Kawayo, Kenia, ni presenta indicios tempranos de su alteración al observar el efecto de los inóculos sobre el Cmic, a ningún nivel de fosfato.
- Los inóculos micorrícicos empleados no afectan cuantitativamente a las poblaciones microbianas a 20 cm del suelo en cultivo de yuca en la misma localidad, a ningún nivel de fosfato empleado.

2. Con respecto a la respiración del suelo

- Los niveles de fosfato empleados en el cultivo de yuca en Ukwala-Kawayo, Kenia pueden acentuar o disminuir el efecto diferencial entre los inóculos de las distintas cepas de *R. irregularis* sobre la liberación de CO₂ del suelo, especialmente entre la cepa C3.14 y C3, pero no afecta de manera significativa el desempeño de una misma cepa, a los 20 cm del suelo.
- La cepa C3 induce una mayor liberación de CO₂ a 20 cm del suelo del cultivo de yuca, a un 100% de fertilización fosfatada con respecto a su progenie y controles.

3. Referente a las actividades enzimáticas del suelo

- El nivel de fertilización fosfatada determina el efecto diferencial en la actividad BG a los 20 cm del suelo entre los inóculos C3 y C3.14, probablemente por diferencias en la adaptabilidad al entorno generado por el nivel de P en el cultivo de yuca de Ukwala-Kawayo, Kenia.
- El efecto diferencial en BG encontrado entre C3 y C3.14 está dentro de una dinámica normal que no llega a impactar diferentemente el COT del suelo a 20 cm, sin embargo cabe evaluar su potencial impacto a largo plazo.
- El inóculo de *R. irregularis* en el cultivo de yuca de Ukwala-Kawayo no altera las actividad enzimáticas importantes para los ciclos de N y P a 20 cm. Este

efecto es independiente al nivel de fertilización fosfatada empleada y a la variabilidad intraespecífica en el HMA.

El efecto diferencial intraespecífico atribuido al nivel de fertilización fosfatada, en la respiración del suelo y actividad BG podrían considerarse dentro de fluctuaciones favorables para un suelo metabólicamente activo, sin comprometer las reservas de carbono del suelo en el cultivo de yuca en Ukwala-Kawayo, Kenia. De todas maneras se aconseja un monitoreo a largo plazo.

Esta es la primera vez que se monitorean las actividades enzimáticas de β -glucosidasa, leucina-aminopeptidasa y fosfatasa ácida de suelo en cultivos *in situ* de yuca inoculados con *R. irregularis* en Kenia, por lo que los resultados presentados son antecedentes importantes de comparación para estudios de monitoreo posteriores.

Los resultados encontrados son positivos, ya que muestran que la inocuidad del inóculo de HMA sobre la calidad del suelo puede depender de la combinación entre la cepa de *R. irregularis* y el nivel de fósforo empleados. Así pueden existir amplias posibilidades y la combinación empleada puede ser evaluada según el servicio ecosistémico de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertsen, A., Ravnskov, S., Green, H., Jensen, D. F., & Larsen, J. (2006). Interactions between the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and other soil microorganisms as affected by organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 1008-1014.
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (No. 631.46 M592ma). Academic Press.
- Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi-Pearson, V., ... & Dumas-Gaudot, E. (2009). On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics*, 9(2), 420-433.
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes. *Elsevier*.19-31.
- Altieri, M. A., Nicholls, C. I., Henao, A., & Lana, M. A. (2015). Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agronomy for sustainable development*, 35(3), 869-890.
- Amezketta, E. (1999). Soil aggregate stability: a review. *Journal of sustainable agriculture*, 14(2-3), 83-151.
- Andrews, S. S., Karlen, D. L., & Cambardella, C. A. (2004). The soil management assessment framework: a quantitative soil quality evaluation method. *Soil Science Society of America Journal*, 68(6), 1945-1962.
- Angelard C, Colard A, Niculita-Hirzel H, Croll D & Sanders IR. 2010. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. *Current Biology*, 20:1216–1221
- Avio, L., Turrini, A., Giovannetti, M., & Sbrana, C. (2018). Designing the ideotype mycorrhizal symbionts for the production of healthy food. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1089.
- Averill, C., Turner, B. L., & Finzi, A. C. (2014). Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. *Nature*, 505(7484), 543-545.
- Badalucco, L., Grego, S., Dell'Orco, S., & Nannipieri, P. (1992). Effect of liming on some chemical, biochemical, and microbiological properties of acid soils under spruce (*Picea abies* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 14(2), 76-83.
- Balzerque, C., Puech-Pagès, V., Bécard, G., Rochange, S. F. (2010). The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J. Exp. Bot.* 62, 1049–1060. doi: 10.1093/jxb/erq335
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological economics*, 64(2), 269-285.
- Bell, C. W., Fricks, B. E., Rocca, J. D., Steinweg, J. M., McMahon, S. K., & Wallenstein, M. D. (2013). High throughput fluorometric measurement of potential soil extracellular enzyme activities. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (81), e50961.
- Belnap, J., Hawkes, C. V., & Firestone, M. K. (2003). Boundaries in miniature: two examples from soil. *BioScience*, 53(8), 739-749.

- Bisutti, I., Hilke, I., & Raessler, M. (2004). Determination of total organic carbon—an overview of current methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10-11), 716-726.
- Boon, E., Halary, S., Baptiste, E., & Hijri, M. (2015). Studying genome heterogeneity within the arbuscular mycorrhizal fungal cytoplasm. *Genome Biology and Evolution*, 7(2), 505-521.
- Bronick, C. J., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124(1-2), 3-22.
- Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, 173(1), 11-26.
- Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., de Goede, R., ... & Pulleman, M. (2018). Soil quality—A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105-125.
- Caravaca, F., Figueroa, D., Roldá, A., & Azcon-Aguilar, C. (2003). Alteration in rhizosphere soil properties of afforested *Rhamnus lycioides* seedlings in short-term response to mycorrhizal inoculation with *Glomus intraradices* and organic amendment. *Environmental Management*, 31(3), 0412-0420.
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernández, C., Peña, R., Rodríguez, A., & Sanders, I. R. (2013). The *in vitro* mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *PLoS One*, 8(8). e70633.
- Ceballos, I., Mateus, I. D., Peña, R., Peña-Quemba, D. C., Robbins, C., Ordoñez, Y. M., ... & Masso, C. (2019). Using variation in arbuscular mycorrhizal fungi to drive the productivity of the food security crop cassava. *bioRxiv*, 830547
- Coleman, D. C., Reid, C. P. P., & Cole, C. V. (1983). Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. In *Advances in Ecological Research* (Vol. 13, pp. 1-55). Academic Press.
- Croll, D., Giovannetti, M., Koch, A. M., Sbrana, C., Ehinger, M., Lammers, P. J., & Sanders, I. R. (2009). Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 181(4), 924-937.
- Cruz, A. B., Barra, J. E., del Castillo, R. F., & Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Revista Ecosistemas*, 13(2).
- Daily, G.C., P.A Matson, and P.M. Vitousek. 1997. Ecosystem services supplied by soil. p. 113–132 In G.C. Daily (ed.) *Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems*. Island Press, Washington, DC.
- Delate, K. (2002). Using an agroecological approach to farming systems research. *HortTechnology*, 12(3), 345-354.
- Dexter, A. R. (1988). Advances in characterization of soil structure. *Soil and Tillage Research*, 11(3-4), 199-238.
- Diccionario.raing.es. 2021. *edafoclimático* | *Real Academia de Ingeniería*. [en línea] disponible en: <<http://diccionario.raing.es/es/lema/edafoclim%C3%A1tico>> [Acceso el 11 de marzo del 2021].
- Dick, R. P. (1994). Soil enzyme activities as indicators of soil quality. *Defining soil quality for a sustainable environment*, 35, 107-124 1994 - Wiley Online Library.

- Dick, R. P., Breakwell, D. P., & Turco, R. F. (1997). Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. *Methods for Assessing Soil Quality*, 49, 247-271
- Dighton, J. (1983). Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 71(1-3), 455-462.
- Doran, J.W., & Parkin, B.T. (1994). Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. Soil Science Society of America, Inc. Special Publication. Number 35. Madison, Wisconsin, USA
- Doran, J.W., Sarrantonio, M., Liebig, M., (1996). Soil health and sustainability. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*, Vol. 56, Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 1–54.
- Duponnois, R., Colombet, A., Hien, V., & Thioulouse, J. (2005). The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. *Soil biology and Biochemistry*, 37(8), 1460-1468.
- Feng, J., & Zhu, B. (2019). A global meta-analysis of soil respiration and its components in response to phosphorus addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 135, 38-47.
- Ferreiro, J. P. (2006). *Propiedades bioquímicas de suelos de prado de Galicia*. Univ Santiago de Compostela.
- Filion, M., St-Arnaud, M., & Fortin, J. A. (1999). Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist*, 141(3), 525-533.
- Filip, Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 169-174.
- Fliessbach, A., & Widmer, F. (2005). Microbial Biomass and Numbers. In *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality* (pp. 73-76). CAB International.
- Francis, C., Lieblein, G., Gliessman, S., Breland, T. A., Creamer, N., Harwood, R., ... & Wiedenhoef, M. (2003). Agroecology: The ecology of food systems. *Journal of Sustainable Agriculture*, 22(3), 99-118.
- Frankenberger, W.T., Jr., and W.A. Dick. 1983. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47:945-951.
- Gadgil, P. D., & Gadgil, R. L. (1975). Suppression of litter decomposition by mycorrhizal roots of *Pinus radiata*. New Zealand Forest Service. 33–41
- Gerke, J. (2018). Concepts and misconceptions of humic substances as the stable part of soil organic matter: A review. *Agronomy*, 8(5), 76.
- Gianfreda, L. (2015). Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 283-306.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., & Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 877–887. doi:10.1016/j.soilbio.2004.10.003

- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 489-500.
- Gougoulas, C., Clark, J. M., & Shaw, L. J. (2014). The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2362-2371.
- Guggenberger, G. (2005). Humification and mineralization in soils. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin, Heidelberg.85-106
- Hartman, W. H., & Richardson, C. J. (2013). Differential nutrient limitation of soil microbial biomass and metabolic quotients (qCO₂): is there a biological stoichiometry of soil microbes? *PLoS One*, 8(3): e57127.
- Helal, H. M., & Sauerbeck, D. (1986). Effect of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 149(2), 181-188.
- Houghton, R. A., Hobbie, J. E., Melillo, J. M., Moore, B., Peterson, B. J., Shaver, G. R., & Woodwell, G. M. (1983). Changes in the Carbon Content of Terrestrial Biota and Soils between 1860 and 1980: A Net Release of CO₂ to the Atmosphere. *Ecological Monographs*, 53(3), 235-262.
- Ikoyi, I., Fowler, A., & Schmalenberger, A. (2018). One-time phosphate fertilizer application to grassland columns modifies the soil microbiota and limits its role in ecosystem services. *Science of The Total Environment*, 630, 849-858.
- Jakobsen I. 2004. Hyphal fusion to plant species connections—giant mycelia and community nutrient flow. *New Phytologist*. 164:4–7
- Jenkinson, D. S., Brookes, P. C., & Powlson, D. S. (2004). Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(1), 5-7.
- Joner, E. J., & Jakobsen, I. (1995). Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(9), 1153-1159.
- Jones, H. E., West, H. M., Chamberlain, P. M., Parekh, N. R., Beresford, N. A., & Crout, N. M. (2004). Effects of gamma irradiation on *Holcus lanatus* (Yorkshire fog grass) and associated soil microorganisms. *Journal of Environmental Radioactivity*, 74(1-3), 57-71.
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil*, 321(1-2), 5-33.
- Khan, F. A., & Ansari, A. A. (2005). Eutrophication: an ecological vision. *The botanical review*, 71(4), 449-482.
- Koch, A. M., Croll, D., & Sanders, I. R. (2005). Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology Letters*, 9(2), 103–110.
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., & Roldan, A. (2006). Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use and Management*, 22(3), 298-304.
- Koide, R. T., & Kabir, Z. (2000). Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist*, 148(3), 511-517.

- Kibblewhite, M. G., Ritz, K., & Swift, M. J. (2008). Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 685-701.
- Lagomarsino, A., Benedetti, A., Marinari, S., Pompili, L., Moscatelli, M. C., Roggero, P. P., ... & Grego, S. (2011). Soil organic C variability and microbial functions in a Mediterranean agro-forest ecosystem. *Biology and Fertility of Soils*, 47(3), 283-291.
- Lal, R. & J. Pierce. 1991. The vanishing resource. pp. 1-5. In Lal, R. & F.J. Pierce (eds.). Soil management for sustainability. Soil and Water Conservation Society. Ankeny, Iowa
- Lal, R. (1998). *Soil quality and agricultural sustainability*. CRC Press, 9-12.
- Landi, L., Renella, G., Giagnoni, L., & Nannipieri, P. (2011). Activities of proteolytic enzymes. *Methods of Soil Enzymology*, 9, 247-260.
- Leigh, J., Fitter, A. H., & Hodge, A. (2011). Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in organic matter in competition with soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(3), 428-438.
- Lin, Q., & Brookes, P. C. (1999). An evaluation of the substrate-induced respiration method. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(14), 1969-1983.
- Linderman, R. G. (1991). Mycorrhizal interactions in the rhizosphere. In *The Rhizosphere and Plant Growth* (pp. 343-348). Springer, Dordrecht.
- Margalef, O., Sardans, J., Fernández-Martínez, M., Molowny-Horas, R., Janssens, I. A., Ciais, P., ... & Peñuelas, J. (2017). Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Marx, M. C., Wood, M., & Jarvis, S. C. (2001). A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1633-1640.
- Masclaux, F. G., Wyss, T., Mateus-Gonzalez, I. D., Aletti, C., & Sanders, I. R. (2018). Variation in allele frequencies at the bg112 locus reveals unequal inheritance of nuclei in a dikaryotic isolate of the fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza*, 28(4), 369-377.
- Monokrousos, N., Papatheodorou, E. M., Orfanoudakis, M., Jones, D. G., Scullion, J., & Stamou, G. P. (2020). The effects of plant type, AMF inoculation and water regime on rhizosphere microbial communities. *European Journal of Soil Science*, 71(2), 265-278.
- Montero, J. (2010). Constituyentes reactivos del suelo [Mensaje de un blog]. Mi blog. Recuperado de <http://monterosaiz.blogspot.com/2010/11/constituyentes-reactivos-del-suelo.html>
- Moore, J. A., Jiang, J., Patterson, C. M., Mayes, M. A., Wang, G., & Classen, A. T. (2015). Interactions among roots, mycorrhizas and free-living microbial communities differentially impact soil carbon processes. *Journal of Ecology*, 103(6), 1442-1453.
- Moreira, f., Huising, E. & Bignell, D., 2008. *A Handbook of Tropical Soil Biology*. 1st ed. London. New York: Earthscan, pp.1-144.
- Mousseau, F. (2015). The untold success story of agroecology in Africa. *Development*, 58(2-3), 341-345.

- Murage, E. W., & Voroney, P. R. (2007). Modification of the original chloroform fumigation extraction technique to allow measurement of $\delta^{13}\text{C}$ of soil microbial biomass carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1724-1729.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Grego, S. (1990). Ecological significance of biological activity in soil, in: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, vol. 6. Marcel Dekker, New York, pp. 293–355.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., & Ruggiero, P. (2002). Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, New York, 1-33.
- Nassar, N. and Ortiz, R. (2010). *Breeding Cassava to Feed the Poor*. [online] www.scientificamerican.com. Available at: <https://www.scientificamerican.com/article/breeding-cassava/> [Accessed 9 Mar. 2019].
- Needelman, B. A. (2013). What are soils. *Nature Education Knowledge*, 4(3), 2.
- Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1996). Total carbon, organic carbon, and organic matter. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods*, 5, 961-1010.
- Nortcliff, S. (2002). Standardisation of soil quality attributes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 161-168.
- Ochoa-Hueso, R. (2017). Global change and the soil microbiome: a human-health perspective. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5, 71.
- Peña, R., Lee, S., Thuita, M., Mlay, D.P., Masso, C., Vanlauwe, B., Rodriguez, A., Sanders, I.R.(2020) Breaking of a paradigm: host and fungal identity determine inhibition of arbuscular mycorrhizal fungal colonization and responsiveness to inoculation with increasing phosphorus supply. (Doctoral Thesis) University of Lausanne, Switzerland.116-156.
- Powlson, D. S., Prookes, P. C., & Christensen, B. T. (1987). Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(2), 159-164.
- Raiesi, F., & Ghollarata, M. (2006). Interactions between phosphorus availability and an AM fungus (*Glomus intraradices*) and their effects on soil microbial respiration, biomass and enzyme activities in a calcareous soil. *Pedobiologia*, 50(5), 413-425.
- Real Academia de Ingeniería. (s.f.). En *Diccionario de la lengua española*. Recuperado el 11 de marzo del 2021, de <http://diccionario.raing.es/>
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 305-339.
- Rillig, M. C., & Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171(1), 41-53.
- Rodriguez, A., & Sanders, I. R. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *The ISME journal*, 9(5), 1053-1061.
- Roldán, A., Salinas-García, J. R., Alguacil, M. M., & Caravaca, F. (2005). Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Applied Soil Ecology*, 30(1), 11-20.

- Ropars, J., Toro, K. S., Noel, J., Pelin, A., Charron, P., Farinelli, L., ... & Corradi, N. (2016). Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Microbiology*, 1(6), 1-9.
- Saiya-Cork, K. R., Sinsabaugh, R. L., & Zak, D. R. (2002). The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(9), 1309-1315.
- Sakia, R. M. (1992). The Box-Cox transformation technique: a review. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)*, 41(2), 169-178.
- Sanders, I. R., & Croll, D. (2010). Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annual Review of Genetics*, 44, 271-292.
- Sędziewska, K. A., Fuchs, J., Temsch, E. M., Baronian, K., Watzke, R., & Kunze, G. (2011). Estimation of the *Glomus intraradices* nuclear DNA content. *New Phytologist*, 192(4), 794-797.
- Semenov, V. M., Tulina, A. S., Semenova, N. A., & Ivannikova, L. A. (2013). Humification and nonhumification pathways of the organic matter stabilization in soil: A review. *Eurasian Soil Science*, 46(4), 355-368.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Shukla, M. K., Lal, R., & Ebinger, M. (2006). Determining soil quality indicators by factor analysis. *Soil and Tillage Research*, 87(2), 194-204.
- Sinsabaugh, R. L., Lauber, C. L., Weintraub, M. N., Ahmed, B., Allison, S. D., Crenshaw, C., ... & Gartner, T. B. (2008). Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 11(11), 1252-1264.
- Smil, V. (2000). Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. *Annual review of energy and the environment*, 25(1), 53-88.
- Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, UK.
- Sosa-Hernández, M. A., Leifheit, E. F., Ingraffia, R., & Rillig, M. C. (2019). Subsoil Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Sustainability and Climate-Smart Agriculture: A solution right under our feet? *Frontiers in Microbiology*, 10, 744.
- SQI-Soil Quality Institute. 1996. Indicators for Soil Quality Evaluation. USDA Natural Resources Conservation Service. Prepared by the National Soil Survey Center in cooperation with The Soil Quality Institute, NRCS, USDA, and the National Soil Tilth Laboratory, Agricultural Research Service. USA.
- Stott, D. E., Andrews, S. S., Liebig, M. A., Wienhold, B. J., & Karlen, D. L. (2010). Evaluation of β -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. *Soil Science Society of America Journal*, 74(1), 107-119.
- Stotzky, G., & Pramer, D. (1972). Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 2(1), 59-137.
- Sybilla Merian, M. (1705). *Raíz de mandioca, serpiente y mariposa*. Göttinger Digitalisierungszentrum.: Lámina 5 de "Metamorphosis insectorum Surinamensium.
- Tabatabai, M. A. (1983). Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 903-947.
- Tabatabai, M.A. 1994. Soil enzymes. p. 835–864. In R.W. Weaver et al. (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI.

- Terry, E. R., Akoroda, M. O., & Arene, O. B. (1987). Tropical root crops: root crops and the African food crisis; *Proceedings of the Third Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops-Africa Branch, held in Owerri, Nigeria 17-23 Aug. 1986*. IDRC, Ottawa, ON, CA.
- Thrall, P. H., Hochberg, M. E., Burdon, J. J., & Bever, J. D. (2007). Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 120-126.
- Tittonell, P., Scopel, E., Andrieu, N., Posthumus, H., Mapfumo, P., Corbeels, M., ... & Mtambanengwe, F. (2012). Agroecology-based aggradation-conservation agriculture (ABACO): Targeting innovations to combat soil degradation and food insecurity in semi-arid Africa. *Field Crops Research*, 132, 168-174.
- Toljander, J. F., Lindahl, B. D., Paul, L. R., Elfstrand, M., & Finlay, R. D. (2007). Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2), 295-304.
- Tukey, J. (1953). Multiple comparisons. *Journal of the American Statistical Association*, 48(264), 624-25.
- Van der Heijden, M. G., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., ... & Sanders, I. R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), 69
- Vieublé Gonod, L., Jones, D. L., & Chenu, C. (2006). Sorption regulates the fate of the amino acids lysine and leucine in soil aggregates. *European Journal of Soil Science*, 57(3), 320-329.
- Vranova, V., Rejsek, K., & Formanek, P. (2013). Proteolytic activity in soil: a review. *Applied Soil Ecology*, 70, 23-32.
- Wahbi, S., Prin, Y., Maghraoui, T., Sanguin, H., Thioulouse, J., Oufdou, K., ... & Duponnois, R. (2015). Field application of the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* increases the yield of wheat crop and affects soil microbial functionalities. *American Journal of Plant Sciences* 06(19):3205-3215
- Waksman, S. A. (1936). *Humus* (No. 631.4/W149). London, UK: Baillière, Tindall & Cox.
- Weintraub, M. N., & Schimel, J. P. (2005). Seasonal protein dynamics in Alaskan arctic tundra soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8), 1469-1475.
- Wezel, A., Bellon, S., Doré, T., Francis, C., Vallod, D., & David, C. (2009). Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(4), 503-515.
- Wyss, T., Masclaux, F. G., Rosikiewicz, P., Pagni, M., & Sanders, I. R. (2016). Population genomics reveals that within-fungus polymorphism is common and maintained in populations of the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *The ISME Journal*, 10(10), 2514-2526.
- Xu, M., & Shang, H. (2016). Contribution of soil respiration to the global carbon equation. *Journal of Plant Physiology*, 203, 16-28.
- Zhang, H., Liu, T., Wang, Y., & Tang, M. (2019). Exogenous arbuscular mycorrhizal fungi increase soil organic carbon and change microbial community in poplar rhizosphere. *Plant, Soil and Environment*, 65(3), 152-158.

ANEXOS

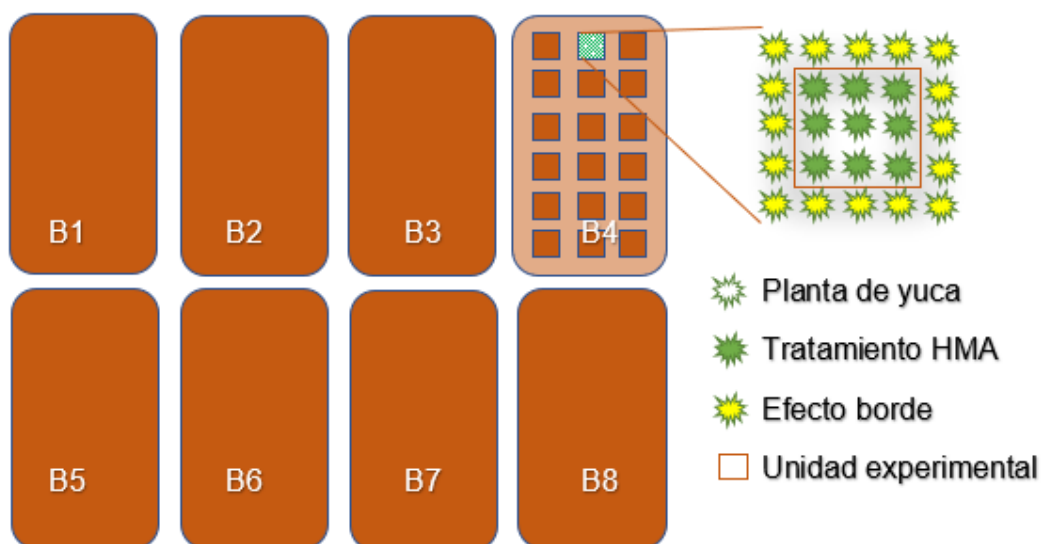


Figura 7. Diseño Experimental del cultivo de yuca inoculado con líneas variables de *R. irregularis* a tres niveles de fosfato en Kenia. Se consideraron 8 bloques con 18 unidades experimentales cada uno, correspondientes a cada una de las combinaciones de tratamientos posibles (inóculo de HMA o controles, y nivel de fertilización fosfatada correspondiente). Cada unidad experimental contuvo 9 plantas que recibieron una combinación de tratamiento (una cepa más un nivel de fertilización fosfatada), rodeada de 16 plantas para lograr un efecto barrera que impidiera interferencia entre los tratamientos. Para el muestreo se tomó aleatoriamente una de las 9 plantas por tratamiento, representando a cada unidad experimental.

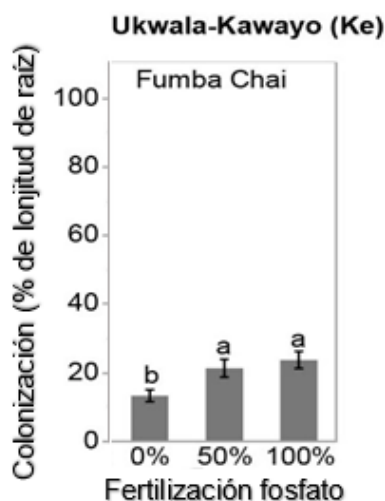


Figura 8. Colonización de hongo micorrícico arbuscular en raíz de yuca, variedad Fumba Chai. Se verificó la colonización de HMA en las raíces de yuca

cultivadas en Kenia a tres niveles de fósforo, por medio del método de intersección de la grilla (Giovannetti & Mosse, 1980). Barras representan las medias de los promedios de los porcentajes de colonización relativos a la longitud de la raíz. Las barras de error representan el error estándar. Letras minúsculas indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. $N=80$.

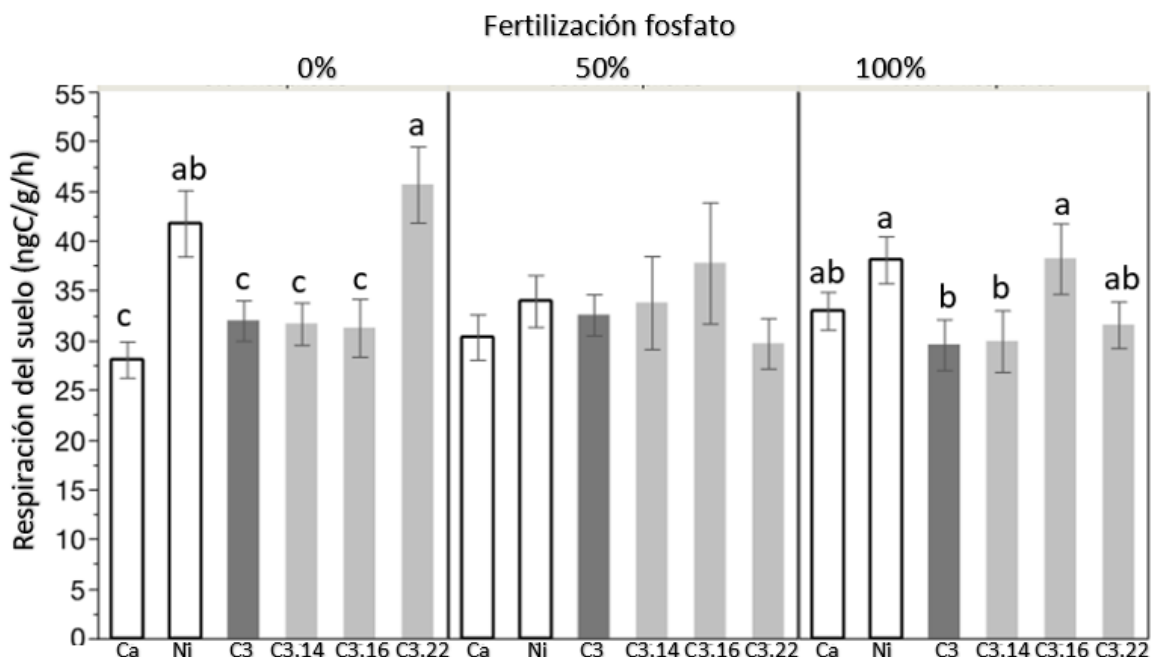


Figura 14. Efecto de cepas de *R. irregularis* y su descendencia clonal sobre la respiración del suelo en cultivos de yuca en Tanzania. Se inocularon diferentes cepas de *R. irregularis*, una parental, C3 y su descendencia clonal, C3.14, C3.16 y C3.22. Se aplicaron tres fertilizaciones de fósforo diferentes. La liberación de CO_2 se muestra en nanogramos de carbono liberado, por gramos de suelo cada hora. En barras blancas se muestran los controles, Ca corresponde a medio portador sin HMA, y Ni, a no inoculado. Barra oscura representa la línea parental y barras claras a la progenie. Barras de error representan el error estándar y letras minúsculas denotan diferencias significativas con un valor $p < 0,005$. Test ANOVA y post hoc Tukey, $n=80$ (Peña-Quemba, no publicado).