



Universidad
Politécnica
de Cartagena



Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica



*Máster Universitario
en Técnicas Avanzadas en Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario*

“Diversidad fúngica en suelos
de cultivos de trigo a lo largo de
Europa: interrelación con
factores climáticos, edáficos y
de manejo del suelo.”

Autora: Eliana Insolia

Directores: Dr. Raúl Zornoza Belmonte y
Dra. Eva Lloret Sevilla

Cartagena, 20 noviembre de 2020

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción.....	3
1.1 Biodiversidad del suelo	3
1.2 Efecto de los factores climáticos, edáficos y de manejo del suelo en la biodiversidad edáfica	6
1.3 Características de la agricultura convencional y ecológica y su interacción con la biodiversidad edáfica.....	8
2. Objetivos e hipótesis.....	9
3. Materiales y métodos	10
3.1 Zonas de estudio	10
3.2 Diseño experimental y muestreo	11
3.3 Análisis físico-químicos del suelo.....	14
3.4 Análisis molecular	14
3.5 Análisis de datos.....	16
4. Resultados.....	17
4.1 Propiedades físico-químicas de los suelos.....	17
4.2 Diversidad y estructura de las comunidades de fúngicas	20
4.3 Interrelaciones entre la diversidad genética fúngica y factores ambientales y edáficos.....	25
5. Discusión	26
6. Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1 Mezcla de reacción PCR.....	15
Tabla 2 Condiciones del ciclo de la PCR.....	15
Tabla 3 Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la zona pedoclimática, la práctica de manejo y su interacción sobre las propiedades físico-químicas del suelo.....	18
Tabla 4 Porcentaje de fragmentos gruesos, arcilla, humedad y cantidad de NO_3^- , NO_2^- , y NH_4^+ en las diferentes zonas y tipo de manejo.....	19
Tabla 5 Representación esquemática de los cebadores utilizados para PCR1 y PCR2.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Red alimentaria del suelo.....	4
Figura 2. Modelo esquemático que aplica el concepto de intensificación ecológica	9
Figura 3. Regiones pedoclimáticas europeas	11
Figura 4. Esquema de muestreo.....	13
Figura 5. Representación esquemática de los cebadores utilizados para PCR1 y PCR2.....	16
Figura 6. Valores de pH, concentraciones de materia orgánica, nitrógeno y distribución de agregados en las diferentes zonas y tipo de manejo.....	20
Figura 7. Curvas de rarefacción de las secuencias obtenidas por zona pedoclimática	21
Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la estructura de la comunidad fúngica entre las tres zonas pedoclimáticas obtenidas mediante la distancia Jaccard.....	22
Figura 9. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la estructura de la comunidad fúngica entre las dos prácticas de manejo diferentes (convencional y ecológico) obtenidas mediante la distancia Jaccard.....	23
Figura 10. Abundancia relativa de taxones fúngicos del suelo (órdenes) en las diferentes regiones edafoclimáticas y sistemas de manejo.....	24
Figura 11. Abundancia relativa de taxones de hongos del suelo (género) en diferentes zonas pedoclimáticas y prácticas de manejo.....	25
Figura 12. La relación entre la composición de la comunidad fúngica, las características del suelo y los factores ambientales a través del análisis de correspondencia canónica (CCA)	26

Resumen

Los efectos de las diferentes condiciones climáticas, como la variabilidad de las precipitaciones, y los métodos de gestión agrícola empleados, repercuten en el suelo, en sus condiciones geológicas, químicas y en las comunidades microbianas que allí residen. La agricultura es uno de los principales factores que influyen en la biodiversidad en Europa, y el uso del suelo y las prácticas agrícolas, pueden tener un impacto positivo o negativo en la agrobiodiversidad. Diferentes tipos de gestión agrícola, pueden alterar de diferente forma las comunidades microbianas, y en consecuencia, se pueden establecer interacciones potencialmente beneficiosas para la agricultura.

El objetivo de este estudio fue identificar la diversidad fúngica en diferentes suelos agrícolas, correlacionándola con las diferentes condiciones climáticas y edáficas presentes en las diferentes áreas europeas y con el tipo de manejo aplicado. Se analizaron diferentes muestras de suelo de fincas dedicadas a la producción de trigo en tres zonas pedoclimáticas europeas diferentes (Boreal, Atlántica Central y Mediterránea Sur), siguiendo una dirección Norte-Sur. Cada muestra consistió en 10 submuestras recolectadas a una profundidad de 0-25 cm, obteniendo así un total de 60 muestras de suelo (2 parcelas x 10 fincas x 3 regiones pedoclimáticas). Las muestras de suelo se separaron en dos alícuotas, una para análisis físico-químico (almacenada a temperatura ambiente) y la otra para análisis biológico (almacenada a -20 °C).

Tras la aplicación de los protocolos de extracción, amplificación y secuenciación, se analizó la diversidad fúngica y su relación con las áreas pedoclimáticas y con los métodos de manejo considerados (convencional y ecológico), a través del uso de herramientas estadísticas y bioinformáticas.

Los resultados obtenidos en este estudio, indicaron que la diversidad fúngica no fue estadísticamente significativa entre los dos diferentes tipos de manejo, pero que esta diversidad fue significativa entre las tres zonas pedoclimáticas, en particular fue igual o similar entre el área boreal y atlántica, mientras que resultó claramente diferente en el área mediterránea. Además, también observamos que la diversidad fúngica está estrictamente correlacionada con las zonas climáticas consideradas y mayormente afectada por la latitud, la temperatura, la humedad, el pH, la materia orgánica y el nitrógeno.

Abstract

The effects of different climatic conditions, the variability of rainfall and management methods applied have repercussions on the soil, on its biogeochemical conditions and on the resident microbial. Furthermore, agriculture is one of the main factors influencing biodiversity in Europe, and land use and agricultural practices may have a positive or negative impact on agrobiodiversity.

Agricultural management practices, may alter soil microbial communities. As a result, potentially beneficial interactions for agriculture, could be established.

The objective of this study was to identify the fungal diversity in different agricultural soils, correlating them with the different climatic and edaphic conditions present in the different European areas and the type of management applied. Different soil samples were analysed from wheat-producing farms in three different European soil and climate zones (Boreal, Central Atlantic and Southern Mediterranean) in a North-South direction. Each sample consisted of 10 subsamples collected at a depth of 0-25 cm, thus obtaining a total of 60 soil samples (2 plots x 10 farms x 3 pedoclimatic regions). The soil samples were separated into two aliquots, one for physico-chemical analysis (stored at room temperature) and the other for biological analysis (stored at -20 ° C).

After DNA extraction, amplification and sequencing, fungal diversity and its relationship with pedoclimatic areas and with the management methods considered (conventional and ecological) were analyzed by the use of statistical and bioinformatics tools.

In this study, we obtained that the fungal diversity was not statistically significant between the two different management practices, but that this diversity was significantly different between the three pedoclimatic zones. Particularly, it was the similar between the Boreal and Atlantic areas, while it was clearly different in the Mediterranean area.

In addition, we also observed that fungal diversity was strictly correlated with the climatic zones considered, mainly affected by latitude, temperature, humidity, pH, organic matter and nitrogen.

1. Introducción

1.1 Biodiversidad del suelo

El suelo es una de las principales reservas de diversidad biológica de nuestro planeta y es un hábitat formado por organismos vivos, minerales, materia orgánica, aire y agua, que realiza numerosos servicios ambientales, sociales y económicos, que son fundamentales para la vida. Entre los minerales más comunes que se encuentran en el suelo y que estimulan el crecimiento de las plantas se encuentran el fósforo, el potasio y el nitrógeno gaseoso, mientras que otros minerales menos comunes son el calcio, el magnesio y el azufre (National Geographic Society, 2020). El suelo realiza diversas funciones como suministrar agua y nutrientes a las plantas, garantizar el abastecimiento de agua mediante su almacenamiento, y la transformación de contaminantes. Normalmente, los suelos están condicionados por el clima, la altitud, el material de origen, su uso, y su biodiversidad (Tilburg 2012).

Según el Convenio de las Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica (CDB), la biodiversidad se define como la variación de la vida de genes a especies, comunidades, ecosistemas y paisajes. Por lo tanto, la biodiversidad se refiere a toda la variedad de formas de vida en la tierra tales como las plantas, los animales, los microorganismos, los genes que contienen, y el ecosistema que forman (United Nations 1992). De hecho, la biodiversidad también incluye diferencias genéticas dentro de cada especie, por ejemplo, entre cromosomas, genes y ADN que determinan la unicidad de cada individuo y cada especie. En general, la biodiversidad se considera en tres niveles principales:

- diversidad genética, o la variedad de información genética contenida dentro de una especie o población;
- diversidad de especies, es decir, la variedad de especies u organismos vivos medida en términos de riqueza de especies y se refiere al recuento total de especies en un área definida;
- abundancia de especies, que se refiere a los números relativos entre especies (Rawat y Agarwal 2016).

Esta biodiversidad oculta en el subsuelo es el motor de los procesos naturales que regulan la descomposición de la materia orgánica en el suelo, el ciclo del carbono y otros nutrientes, la regulación de enfermedades, y la formación de la estructura del suelo. Los diferentes grupos de organismos del suelo varían desde organismos microscópicos, como bacterias, hongos y protozoos, hasta meso y macrofauna, como ácaros, nemátodos y lombrices de tierra (Fig. 1) (Orgiazzi et al. 2016).

La cantidad total de organismos presentes en el suelo en una hectárea de tierra agrícola depende del tipo de suelo, de su pH, del contenido de materia orgánica, de las condiciones climáticas, del tipo de cultivo y el manejo, y, generalmente, puede variar de 2 a 5 toneladas por hectárea (Tilburg 2012). Un metro cuadrado de suelo suele albergar una población de aproximadamente 200.000 artrópodos y miles de millones de microbios. Una hectárea de suelo de alta calidad contiene por término medio 1.300 kg de gusanos, 1.000 kg de artrópodos, 3.000 kg de bacterias, 4.000 kg de hongos y una elevada biomasa y necromasa vegetal (Pimentel et al. 1995). La biomasa bacteriana puede ascender a 1-2 toneladas por hectárea en praderas

templadas, miyun metro cuadrado de pradera generalmente puede contener hasta varios kilómetros de hifas de hongos (Orgiazzi et al. 2016).

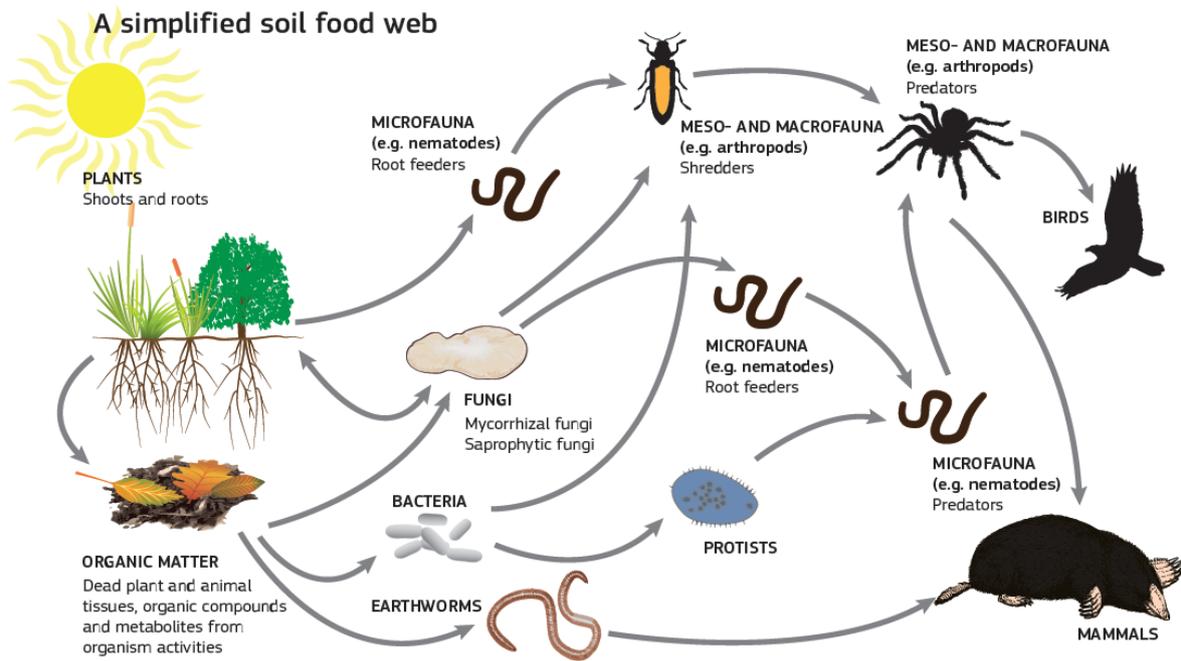


Figura 1. Red alimentaria del suelo (Orgiazzi et al. 2016).

A través de estudios basados en técnicas tradicionales de cultivo, pero también en métodos moleculares directos basados en el análisis de las librerías 16S ARNr, fue posible identificar los organismos procarióticos que normalmente se encuentran en el suelo (Garbeva y Van Elsas 2004). Estos organismos son tanto bacterias grampositivas (como por ejemplo *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Corynebacterium* spp.), y gramnegativas como diferentes subgrupos de proteobacterias (*Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Enterobacterium* spp. y *Rhizobium* spp.), y el grupo de *Cytophaga/Flavobacteria/Bacterioides* (CFB).

Respecto a los hongos, algunos taxones fúngicos, como los basidiomicetos saprófitos y las micorrizas arbusculares pertenecientes al orden de los *Glomales*, resultan difíciles de cultivar sobre sustratos artificiales, por eso, en varias investigaciones sobre la diversidad de hongos en el suelo se han adoptado técnicas moleculares basadas en el gen 18S ARNr (Marcial Gomes et al. 2003). De hecho, Gomes y sus colaboradores, mediante la utilización de bibliotecas del gen 18S ARNr, han logrado identificar diferentes tipos de hongos como *Ascomycota* (*Pleosporales*, *Hypocreales*, *Sordariales* y *Eurotiales*), *Basidiomycota* (*Filobasidiales* y *Sporidiales*) y *Zygomycota* (*Mucorales*). En particular, los hongos ocupan un reino taxonómico distinto, separados de los procariotas, plantas y animales, están presentes en la mayoría de los suelos y pueden formar la mayor parte de la biomasa subterránea, especialmente en suelos ricos en materia orgánica. Los hongos juegan un papel importante porque son altamente plásticos y adaptables a condiciones desfavorables o favorables (Sun et al. 2005). Además, tienen la capacidad de producir una amplia variedad de enzimas extracelulares y pueden descomponer todo tipo de materia orgánica y diferentes componentes del

suelo, convirtiendo la materia orgánica muerta en biomasa, dióxido de carbono y ácidos orgánicos y, por lo tanto, actúan como reguladores del balance de carbono y de otros nutrientes (Žifčáková et al. 2016), a la vez que tienen la capacidad de actuar como un biosorbente efectivo de metales tóxicos como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc (Baldrian 2003). Los hongos participan en la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas, el control biológico contra los patógenos de las raíces y en la protección contra la sequía (Jayne y Quigley 2014; Baum, El-Tohamy y Gruda 2015; El-Komy et al. 2015). Las poblaciones de hongos presentes en los diferentes tipos de suelo están estrechamente relacionadas con la diversidad y composición de la comunidad de plantas y, a su vez, influyen en el crecimiento de las plantas a través del mutualismo, la patogenicidad y sus efectos sobre la disponibilidad de nutrientes y el ciclo de nutrientes (Wardle 2013; Wagg et al. 2014; Hannula et al. 2017).

Los hongos del suelo se pueden clasificar en tres grupos funcionales:

- Controladores biológicos capaces de regular enfermedades, plagas y crecimiento de otros organismos (Bagyaraj, D. J. y Ashwin 2017);
- Reguladores de los ecosistemas responsables de la formación de la estructura del suelo y la modificación de hábitats para otros organismos, regulando la dinámica de los procesos fisiológicos del suelo;
- Descomponedores de la materia orgánica y transformadores de compuestos (Swift 2005; Gardi, C. y Jeffery 2009).

Algunos grupos de hongos o bacterias forman asociaciones íntimas con las raíces de las plantas para beneficio mutuo, en este caso satisfacen sus necesidades de energía al obtener carbohidratos de las plantas. El microorganismo involucrado ayuda a las plantas a absorber el fósforo del suelo, (hongos micorrícicos), a fijar el nitrógeno de la atmósfera (bacterias que viven en simbiosis con las raíces de las leguminosas) o a proteger las raíces de patógenos (Tilburg 2012).

Los hongos micorrícicos están muy extendidos y forman asociaciones simbióticas con las raíces de aproximadamente el 80% de las especies de plantas terrestres. Los grupos más abundantes de hongos micorrícicos son las micorrizas arbusculares (AM), las ectomicorrizas (EM) y las micorrizas ericoides (ERM). En particular, los hongos micorrícicos arbusculares (AMF) se han considerado como la clase más importante de microorganismos beneficiosos en suelos agrícolas y hortícolas (Smith y Read 2008).

En general, los efectos encontrados en la mayoría de los experimentos sobre la simbiosis de AMF incluyen: mejora del enraizamiento y desarrollo de las plantas, estimulación del ciclo nutricional, mejora de la estructura del suelo, tolerancia de las plantas al estrés, mayor absorción de iones de baja movilidad y mejora de la diversidad de las comunidades vegetales (Azcón-Aguilar y Barea 1997). Se encontró un ejemplo en un caso de estudio, en el que la inoculación de un hongo micorrízico arbuscular (AMF), influyó en la expresión de los genes relacionados con la defensa tales como β -1,3-glucanasas, quitinasas y oxalatos oxidados en trigo infectado con *Fusarium oxysporum*, detectando mejoras en el crecimiento y en el rendimiento y la expresión de las β -1,3-glucanasas (Sabbagh et al. 2017). Además, se ha descubierto que las enfermedades de las plantas cultivadas pueden ser controladas por algunos hongos antagonistas como

Glomus sp. o *Trichoderma sp.* (Dawidziuk, A. et al. 2016). Por otro lado, varios estudios han demostrado cómo la aplicación de inoculaciones de microorganismos fúngicos puede influir positivamente en la adquisición de sustancias y minerales presentes en el suelo y proteger a las plantas del estrés. Por ejemplo, la aplicación de *Trichoderma harzianum* mejora la absorción de nutrientes esenciales en la mostaza (*Brassica juncea*) afectada por el estrés salino, en la que se ha observado una alta actividad antioxidante, acumulación de osmolitos y exclusión de NaCl como mecanismos de alivio del estrés (Ahmad et al. 2015).

1.2 Efecto de los factores climáticos, edáficos y de manejo del suelo en la biodiversidad edáfica

La agricultura es uno de los principales factores que influyen en la biodiversidad en Europa ya que alrededor de la mitad del territorio de la UE está dedicada a ella. Los agricultores de la UE tienen la tarea de aumentar la producción para satisfacer la demanda mundial lo que produce que la agricultura y la conservación de la biodiversidad están a menudo en conflicto. Para resolver este conflicto, se desarrolló el concepto de agrobiodiversidad funcional (FAB) que utiliza la ciencia y diferentes estrategias para optimizar la regulación, el suministro y los servicios de los ecosistemas culturales que son esenciales para el bienestar humano (Tilburg 2012).

El uso del suelo y las prácticas agrícolas pueden tener un impacto positivo o negativo en la agrobiodiversidad. Las medidas que pueden mejorar el impacto de la agricultura en la agrobiodiversidad están relacionadas con la mejora de la calidad ambiental (en relación con el contenido de carbono en el suelo, los niveles de agua, las concentraciones de nutrientes), el uso racional de pesticidas y productos farmacéuticos veterinarios, y la lucha contra la fragmentación del hábitat. De hecho, se ha encontrado que la reducción de los tratamientos químicos aumenta la biodiversidad, lo que a su vez influye positivamente en la estructura, captura y liberación de nutrientes en el suelo (Tilburg 2012).

La biodiversidad del suelo agrícola puede interactuar con el paisaje circundante y sufrir sus efectos. Por ejemplo, se ha demostrado que el arado tiene un efecto perjudicial en las poblaciones de algunas especies de lombrices de tierra y que puede llevar varios años restablecer las poblaciones iniciales de estas especies (Capowiez et al. 2009, Ernst y Emmerling 2009). Por lo tanto, se puede deducir que la reducción del uso del arado puede tener efectos beneficiosos sobre la estructura del suelo y la dinámica de los nutrientes, siempre que haya suficiente materia orgánica como fuente de alimento para la biota del suelo (Tilburg 2012).

A partir de un estudio en el que se examinó el papel de los microorganismos del suelo en la supresión de las enfermedades de las plantas y las posibles limitaciones en la restauración de la población microbiana, se descubrió que la esterilización del suelo y la eliminación de organismos nativos puede aumentar la susceptibilidad de las plantas a las enfermedades, por lo tanto, deben evitarse las prácticas nocivas de manejo del suelo agrícola, como la fumigación y los tratamientos térmicos (Thuerig et al. 2009).

Las tasas de crecimiento y la actividad son características individuales de las comunidades microbianas y pueden variar de forma independiente, esto significa que las condiciones climáticas que favorecen un alto nivel de actividad microbiana no siempre facilitan un alto crecimiento microbiano y un aumento de la biomasa asociada. En general, un aumento en la temperatura atmosférica corresponde a un

aumento en la actividad microbiana, por lo tanto, el crecimiento y la actividad microbiana generalmente disminuyen en el período de invierno, debido a la disminución de la temperatura. Sin embargo, estas dinámicas estacionales esperadas pueden cambiar en ecosistemas específicos del suelo, por ejemplo en los suelos de la tundra, la biomasa microbiana está en su punto máximo a fines del invierno cuando la temperatura es baja (Schadt et al. 2003).

La humedad del suelo, la frecuencia de los ciclos húmedo/seco, de congelación/descongelación y el pH, pueden modificar la agregación del suelo y tener un impacto potencial en la disponibilidad de materia orgánica y, en consecuencia, en la estructura y actividad de la comunidad microbiana. De hecho, las alteraciones pueden conducir a desplazamientos de la comunidad del suelo, la alteración de la actividad metabólica en los microorganismos involucrados en el ciclo de nutrientes, y al aumento o disminución de la supervivencia y virulencia de microorganismos patógenos mediados por el suelo como *Salmonella typhimurium* (Mandal y Sathyaseelan 2012).

En este sentido, un metanálisis ha confirmado que el aumento de las precipitaciones favorece el componente fúngico del suelo, mientras que el enriquecimiento de CO₂ favorece el componente bacteriano (Blankinship, Niklaus y Hungate 2011).

Los cambios en la humedad pueden afectar la composición y función de la comunidad microbiana en el suelo debido a las diferencias en la tolerancia a la sequía entre los grupos taxonómicos y funcionales de microorganismos (Gray et al. 2011). Por ejemplo, los hongos pueden sobrevivir al estrés por sequía mejor que las bacterias gracias a su capacidad de crecer a potenciales mátricos más bajos (Schnürer et al. 1986; Nakas y Klein 1979).

Además de los parámetros mencionados anteriormente, el pH y la materia orgánica del suelo (SOM) son los dos factores más importantes para modelar la comunidad microbiana del suelo (Qi et al. 2018). Estos dos factores tienen un efecto sinérgico (Yun et al. 2016), como se demostró en una investigación en la que el valor del pH del suelo aumenta después de la adición de sustancias orgánicas pirogénicas (PyOM) (Dai et al. 2016). Específicamente, en un estudio se descubrió que con la disminución del pH, el catabolismo de sustancias orgánicas de bajo peso molecular como la cisteína y el ácido aspártico disminuye, mientras que la de la lisina y la arginina aumenta y la estructura genética de las comunidades bacterianas en el suelo está fuertemente correlacionada con el pH, mientras que el de los hongos con el pH y el porcentaje de arena (Wakelin et al. 2008). En particular, los hongos tienen una mayor resistencia a las perturbaciones ambientales que las bacterias y, por lo tanto, probablemente se adapten fácilmente a los cambios ambientales como por ejemplo, el cambio de acidez (Clark 1997).

Finalmente, los cambios en los parámetros climáticos, como la concentración de CO₂ atmosférico, temperatura y precipitación, pueden alterar la abundancia bacteriana y fúngica del suelo y se ha demostrado que la estructura de la comunidad, específicamente la abundancia de la comunidad fúngica está influenciada por la temperatura, pero no por la precipitación o el régimen de CO₂, a diferencia de las bacterias (Castro et al. 2010).

1.3 Características de la agricultura convencional y ecológica y su interacción con la biodiversidad edáfica

En todo el mundo, la biodiversidad está disminuyendo rápidamente debido a muchas presiones derivadas de las actividades humanas, esto también se aplica a la biodiversidad del subsuelo. La expansión, la intensificación y la mecanización de la agricultura se han identificado como las principales causas de la disminución de la biodiversidad del suelo en Europa. Otras amenazas relacionadas con la biodiversidad y la agricultura incluyen la erosión, la compactación, la contaminación, la impermeabilización, la salinización del suelo y el cambio climático (Creamer et al. 2010).

En Europa, la política agrícola común (PAC) ha llevado a la intensificación de la agricultura promoviendo la simplificación y especialización de los agroecosistemas al disminuir la heterogeneidad del paisaje, aumentando el uso de productos químicos por unidad de superficie y el abandono de zonas menos fértiles. Todos estos procesos han erosionado la cantidad y calidad del hábitat para muchas plantas y animales, y por lo tanto han reducido la biodiversidad y la abundancia de especies a través de una jerarquía de niveles tróficos y escalas espaciales en Europa (Emmerson et al. 2016). Esta pérdida de biodiversidad ha llevado a cambios profundos en el funcionamiento de los agroecosistemas europeos en los últimos 50 años (Emmerson et al. 2016).

En contraste, la agricultura ecológica prohíbe el uso de insecticidas, herbicidas y fertilizantes sintéticos y combina las mejores prácticas ambientales que deberían preservar un alto nivel de biodiversidad y recursos naturales, contribuyendo así al bienestar humano y también se ha encontrado que es más eficiente para preservar la diversidad de especies edáficas (Bender, Wagg y van der Heijden 2016). De hecho, a partir de un metanálisis, realizado por Tuck et al. 2014, se descubrió que la agricultura ecológica aumenta la riqueza general de la biodiversidad en aproximadamente un 30%.

Normalmente, los sistemas agrícolas convencionales se caracterizan por campos de cultivo más amplios y paisajes homogéneos, mientras que los campos ecológicos son más pequeños y se encuentran en áreas remotas con una mayor presencia de hábitats naturales a su alrededor (Bengtsson, Ahnström y Weibull 2005). Además, en la agricultura intensiva, muchas de las funciones proporcionadas por la biota del suelo han sido reemplazadas por insumos externos no renovables que en sí mismos pueden tener un impacto negativo en la biodiversidad del suelo (Hendrix et al. 1986). Por ejemplo, el uso de productos químicos puede tener un impacto negativo en los hábitats adyacentes a los campos en los que son aplicados debido a la lixiviación de agroquímicos (De Snoo y Van Der Poll 1999).

En los sistemas convencionales, los fertilizantes sintéticos han reemplazado en gran medida los aportes de materia orgánica que son la principal fuente de alimento para la biota del suelo y los pesticidas se aplican para controlar las malas hierbas, plagas y enfermedades, pero a menudo también dañan a los organismos beneficiosos (Tilburg 2012). Estos organismos deben ser preservados ya que juegan un papel beneficioso para el suelo y la agricultura en general. Estos organismos pueden ser especies fúngicas capaces de descomponer algunos compuestos orgánicos que otros organismos no pueden degradar (Edwards y Zak 2011), bacterias involucradas en la fijación de nitrógeno o en la nitrificación y hongos que ayudan a las raíces de las plantas a absorber el fósforo (Van Der Heijden y Horton 2009). Las lombrices de tierra también

son una especie muy importante, ya que ocupan un papel único en la formación de la estructura del suelo (Pulleman et al. 2003).

Por esta razón, a lo largo de los años se ha desarrollado el concepto de intensificación ecológica que combina idealmente los rasgos de ambos sistemas agrícolas (convencional y ecológico) y conduce a un sistema sostenible, caracterizado por una vida rica en el suelo y recursos moderados, una alta tasa de procesos de regulación interna, bajas pérdidas de nutrientes y alta productividad (Fig. 2) (Bommarco, Kleijn, y Potts 2013).

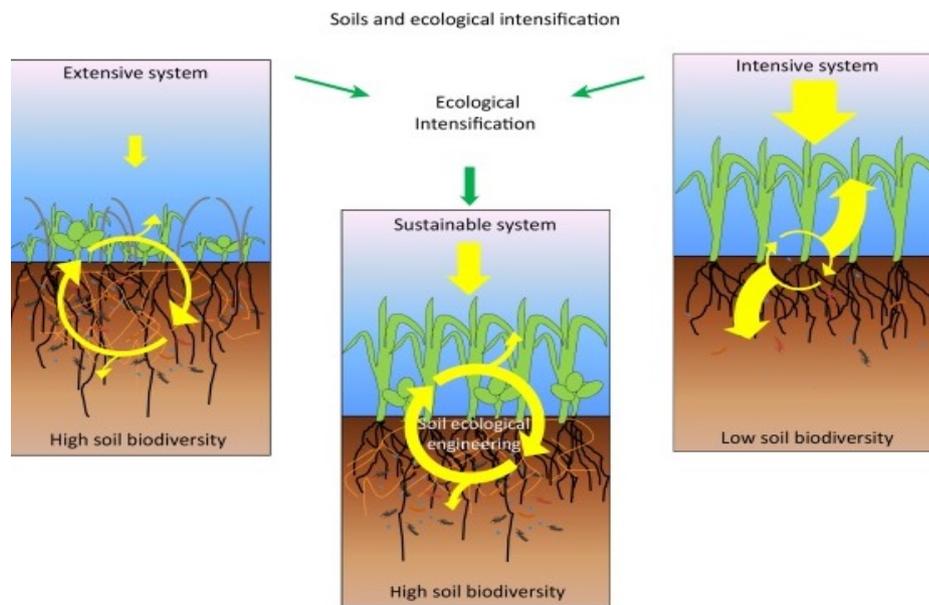


Figura 2. Modelo esquemático que aplica el concepto de intensificación ecológica (Bommarco, Kleijn y Potts 2013).

Tras lo descrito anteriormente, parece claro que la combinación de enfoques biológicos con avances tecnológicos de vanguardia como por ejemplo la agricultura de precisión para el tratamiento del suelo y de las malas hierbas (Lal 2015), o la adición optimizada de nutrientes y agua (Kennedy, Suddick, y Six 2013), podría servir para minimizar el uso de recursos externos mientras que los rendimientos podrían mantenerse o incluso aumentarse (Bender, Wagg y van der Heijden 2016).

2. Objetivos e hipótesis

Este estudio se centra en la biodiversidad del suelo, en particular en la diversidad fúngica en cultivos de trigo en tres regiones climáticas de Europa. El objetivo general de este trabajo es ampliar el conocimiento sobre la diversidad genética fúngica del suelo y su dinámica en el cultivo de trigo de tres regiones climáticas de Europa en función del sistema de producción (convencional y ecológico). Todo esto proporcionará una visión general de la situación de la biodiversidad del suelo en las regiones estudiadas, en relación con su gestión agrícola y se desarrollarán las primeras perspectivas sobre posibles alternativas para proteger y / o mejorar la biodiversidad. Concretamente, a partir de este objetivo general podemos describir los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la composición diversidad genética fúngica en el suelo de tres regiones climáticas europeas sujetas al cultivo de trigo.
- Establecer si existen diferencias en la diversidad genética fúngica en cuanto al sistema de producción agrario (convencional o ecológico).
- Establecer las relaciones entre la diversidad genética fúngica del suelo, las características edáficas y factores climáticos.
- Determinar cuáles son los principales factores que condicionan la estructura y la diversidad genética fúngica en suelos de cultivos de trigo en Europa.

En este estudio nos trasladamos desde un área boreal con un clima microtérnico caracterizado por inviernos fríos y baja evapotranspiración, a áreas mesotérmicas como el área atlántica, con un clima templado frío, y al sur del Mediterráneo con clima templado cálido y con lluvias moderadas (National Geographic Society, 2017). A partir de esta información, podemos plantear la hipótesis de que, debido a la mayor aridez y alta humedad que caracteriza a la región mediterránea, así como a la abundante lluvia y al mayor contenido de humedad y carbono edáfico en el suelo en las regiones del norte de Europa (Jones et al. 2004), podemos predecir que esa diversidad genética fúngica podría aumentar siguiendo el gradiente Norte-Sur. Esta hipótesis se elaboró a partir de lo que se indicó en los párrafos anteriores, ya que la población de hongos tiene una amplia capacidad de resistencia a los estreses ambientales como la sequía y el cambio de acidez, además la abundancia de hongos parece depender de la temperatura, pero no de la precipitación o del régimen de CO₂ (Castro et al. 2010).

Además, se podría esperar una mayor abundancia y diversidad de hongos en los suelos utilizados para la agricultura orgánica en comparación con los utilizados para la agricultura convencional, ya que este último se caracteriza por el uso de pesticidas, baja heterogeneidad ambiental, manejo intensivo y explotación del suelo, que son las causas responsables de la pérdida de la diversidad genética funcional fúngica y microbiana en general.

3. Materiales y métodos

3.1 Zonas de estudio

La diversidad fúngica se ha evaluado en 30 fincas europeas dedicadas a la producción de trigo a lo largo de tres zonas pedoclimáticas (Fig. 3) en Europa: Boreal (BOR), Atlántica Central (ATC) y Mediterráneo Sur (MDS).

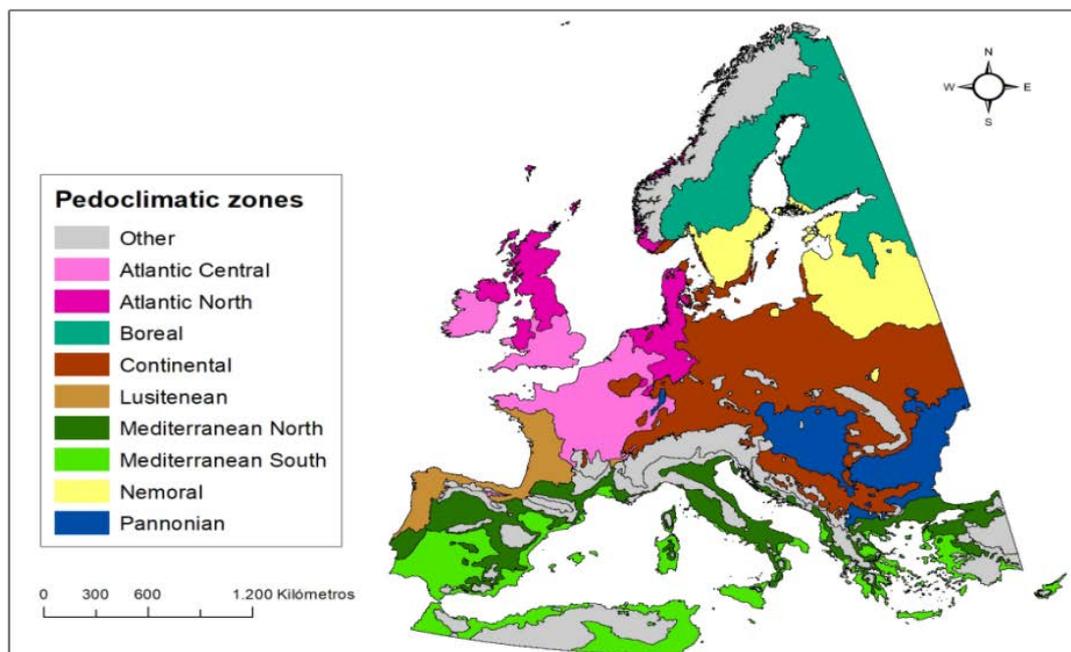


Figura 3. Regiones pedoclimáticas europeas (SoildiverAgro SFS-01-2018).

Se han evaluado las diferencias en el estado de la diversidad fúngica del suelo entre los sistemas de cultivo convencionales y ecológicos en la producción de trigo. Para ello, en cada una de las tres áreas pedoclimáticas, se seleccionaron diez fincas: cinco fincas en agricultura convencional y cinco fincas en agricultura ecológica. Se han seleccionado pares de fincas convencionales y orgánicas con características de suelo generales similares en la misma área para garantizar las mismas condiciones de suelo y clima. La temperatura media anual y la precipitación media anual para cada zona pedoclimática (BOR, ATC, MDS) son 5,32°C y 582,8 mm, 11,5°C y 798,6 mm, y 17,5 °C y 455,56 mm, respectivamente. La tabla S1 en el Anexo1 contiene información general sobre las muestras analizadas, así como el sistema de gestión, país, latitud, temperatura y precipitación medias referidas al año 2019.

3.2 Diseño experimental y muestreo

La fecha de muestreo se estableció después de la cosecha, utilizando el trigo como cultivo guía para comparar los resultados de todas las regiones. Este método de muestreo nos permitió reducir las variaciones estacionales naturales de la biodiversidad durante el año de muestreo y evitar los efectos directos de otro cultivo sobre la biodiversidad. En cada finca seleccionada, convencional o ecológica, se seleccionaron dos parcelas. Se tomó una muestra compuesta de suelo en cada una de las parcelas de estudio (dos por finca), cubriendo toda la superficie. Cada muestra consistió en 10 submuestras recolectadas a una profundidad de 0-25 cm, obteniendo así un total de 60 muestras de suelo (2 parcelas x 10 fincas x 3 regiones pedoclimáticas).

En el momento del muestreo, las muestras de suelo se separaron en dos alícuotas, una mantenida a temperatura ambiente y destinada para la mayoría de los análisis físico-químicos y la otra en una caja hermética con hielo para análisis biológicos y nitrato y amonio (Fig.4). Las muestras que llegaron al laboratorio se secaron al aire durante una semana para los análisis fisicoquímicos y se tamizaron a <2 mm,

mientras que el suelo utilizado para los análisis biológicos se almacenó a -20 °C. Por otro lado, para la determinación de la densidad aparente del suelo, se tomaron muestras de suelo mediante cilindros de acero con un diámetro de 5 cm el mismo día del muestreo, siguiendo el método de Campbell y Hensall (1991).

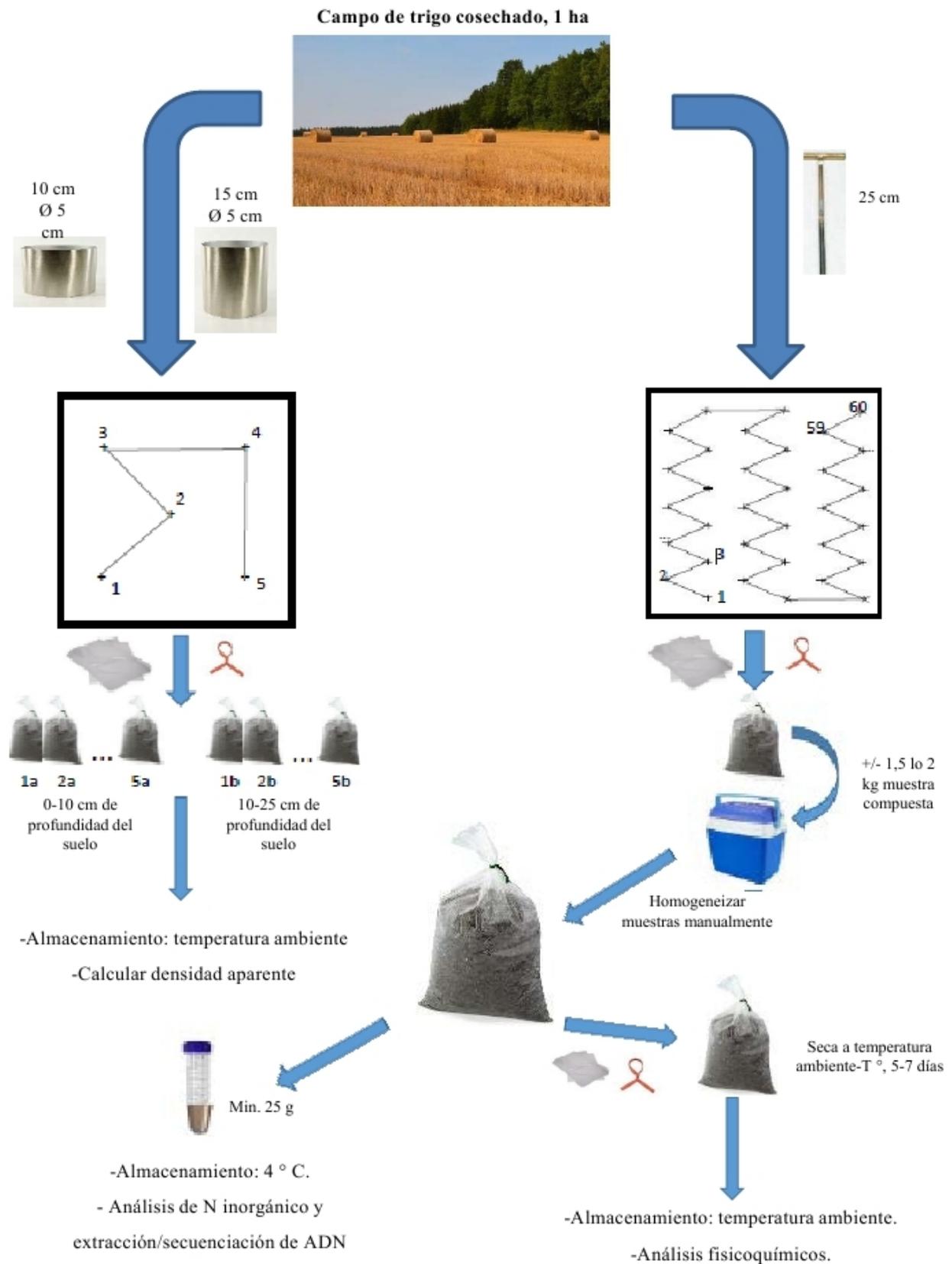


Figura 4. Esquema de muestreo (adaptado del proyecto H2020 SoildiverAgro www.soildiveragro.eu).

3.3 Análisis físico-químicos del suelo

El porcentaje de elementos gruesos y gravas (con diámetro superior a 2 mm) se determinó gravimétricamente mediante tamizado de las muestras >2 mm (Taubner y Tippkötter 2009). La distribución granulométrica del suelo se determinó mediante un analizador Mastersizer 2000LF (Malvern Instruments), tras la oxidación de la materia orgánica con H₂O₂ y dispersión de las arcillas con polifosfato sódico. La estabilidad de agregados se determinó mediante el método descrito por Elliott (1986), que analiza la estabilidad del agregado y la distribución de tamaños sobre la base de un método de tamizado de suelo húmedo y posteriormente secado al aire. Se seleccionaron las siguientes clases de agregados por tamaño: >2000 μm, 250-2000 μm, 53-250 μm y <53 μm. La humedad gravimétrica del suelo se calculó mediante el pesado de cada muestra de suelo antes y después del secado en estufa a 105°C durante 24h, según el método descrito y modificado por Porta et al. (1986). El pH real (utilizando H₂O) y el pH potencial (utilizando KCl 1N) se midieron según el método oficial español descrito por Cobertera (1993), que se realiza a partir de una relación suelo:líquido de 1:2,5. La materia orgánica del suelo (MOS) se determinó mediante calcinación en mufla a 450°C durante 4h (Hoogsteen et al. 2015). El nitrógeno total (Nt) se determinó mediante un analizador elemental CHNS-O (EA-1108, Carlo Erba). La extracción de nitratos, nitritos y amonio se realiza mediante el uso de una solución saturada de cloruro de potasio (KCl) y posterior medición de nitratos, por cromatografía iónica, y de amonio por espectrofotometría visible según los métodos modificados descritos por Kandeler y Gerber (1988), Keeney y Nelson (1982), y Sempere et al. (1993).

El efecto de la zona pedoclimática, de la práctica de manejo y de su interacción sobre las propiedades físico-químicas del suelo, se analizó realizando un análisis de varianza bidireccional (ANOVA), mientras que, cuando la interacción no fue significativa, se realizó el modelo aditivo. Cuando se obtuvieron valores F significativos por zona, se realizó un análisis adicional con el procedimiento de comparación HSD de Tukey (diferencia honestamente significativa) como una prueba post hoc ($p < 0.05$) para verificar más pruebas. Los valores de F significativos obtenidos en la práctica de manejo se evaluaron adicionalmente mediante la realización de una prueba t en pares.

El análisis estadístico se realizó en R (R Core Team 2020).

3.4 Análisis molecular

La extracción de ADN de las muestras de suelo se realizó con el kit DNeasy PowerSoil Pro Kit, de acuerdo con el protocolo propuesto por el productor. Para obtener ADN con alta pureza y libre de sustancias interferentes normalmente presentes en muestras ambientales, como suelos con alto contenido de ácido húmico, se llevó a cabo la purificación de las muestras de ADN extraídas utilizando NucleoMag NGS Clean-Up and Size Select Beads. Finalmente, para evaluar la calidad de las muestras de ADN obtenidas y al mismo tiempo calcular su concentración, se realizó un análisis espectrofotométrico, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000c y la cuantificación fluorométrica con el Qubit dsDNA HS Assay Kit.

Para la determinación de la diversidad genética de hongos por secuenciación de la región ITS es necesario secuenciar los amplicones, mediante el uso de *metabarcoding* de ADN, que permite la

amplificación y secuenciación paralela de miles regiones con diferentes códigos de barras pertenecientes a diferentes especies. Cada región, identificada con un código de barras, corresponde a un pequeño fragmento dentro del genoma de un organismo, cuya secuencia se conserva dentro de una especie, pero varía entre diferentes especies. Por tanto, se procede a la comparación de las secuencias obtenidas con las de una base de datos de referencia, con el fin de recopilar información sobre las comunidades microbianas presentes en las muestras de suelo. Las secuencias de ITS utilizadas para la identificación de hongos en este estudio fueron las ITS1 e ITS2, porque en los hongos son capaces de tolerar múltiples mutaciones en el proceso evolutivo y muestran un polimorfismo de secuencia extremadamente grande en la mayoría de eucariotas (Kim et al. 2013).

Para caracterizar la diversidad fúngica, se eligió la tecnología NGS *Illumina MiSeq* (Illumina 2015). Inicialmente, se procedió con la preparación de la biblioteca de *metabarcoding* de ADN basada en un protocolo de PCR de 2 fases descrito en el *Earth Microbiome Project* (<http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/its/>). En la primera PCR, se amplificó un fragmento de la región genómica ITS2 (aproximadamente 300 pb) utilizando los cebadores ITS1f (5 'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') (modificado por White et al. 1990) e ITS2 (5 'GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC 3') (White et al. 1990). Los cebadores incluían una extensión de oligonucleótidos en sus respectivos extremos 5', con el fin de hacer que los amplicones fueran adecuados para la secuenciación en un secuenciador *Illumina MiSeq*. La mezcla de reacción y las condiciones del ciclo de la primera PCR se describen en las Tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1. Mezcla de reacción PCR.

Reactivo	Conc. Inicial	Vol/rxn (µl)	Conc. Final
Supreme NZYTaq 2x Green Master Mix (NZYTech)	2x	12.5	1x
Forward Primer	10 uM	1.25	500 nM
Reverse Primer	10 uM	1.25	500 nM
DNA template	***	2.5	***
Sterile H2O	***	25	***
Total volume		25	

Tabla 2. Condiciones del ciclo de la PCR.

Paso	N ° de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95°C	5 min
Desnaturalización	35	95°C	30 sec
Hibridación		47°C	45sec
Extensión		72°C	30 sec
Extensión		72°C	10 min

Posteriormente, los índices de oligonucleótidos necesarios para multiplexar diferentes bibliotecas en el mismo pool de secuenciación se agregaron mediante un segundo ciclo de PCR con condiciones idénticas al primero, pero con solo 5 ciclos a 60 °C como temperatura de hibridación. La siguiente figura muestra un esquema de los cebadores utilizados para PCR1 y PCR2.

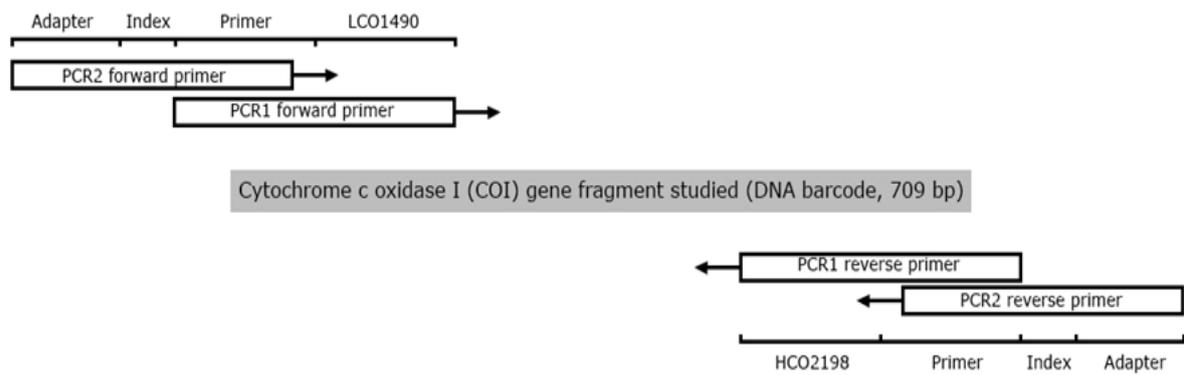


Figura 5. Representación esquemática de los cebadores utilizados para PCR1 y PCR2 (modificada por Vierna et al. 2017).

Para verificar el peligro de contaminación durante la preparación de la biblioteca (BPCR), se insertó un control negativo sin ADN en cada ciclo de PCR. A continuación, las bibliotecas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GreenSafe y se visualizaron bajo luz UV para verificar el tamaño de la biblioteca. Mediante el uso de las bolas magnéticas Mag-Bind RXNPure Plus, bajo las instrucciones proporcionadas por el productor, las bibliotecas se someten a purificación y posteriormente se agrupan en cantidades equimolares en base a los datos de cuantificación proporcionados por el Qubit dsDNA HS Assay Kit. Al final, el pool fue secuenciado mediante *Miseq PE300* (Illumina).

3.5 Análisis de datos

El efecto de la zona pedoclimática, de la práctica de manejo y de su interacción sobre las propiedades físico-químicas del suelo, se analizó realizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Cuando la interacción no fue significativa, se realizó el modelo aditivo. Cuando se obtuvieron valores F significativos por zona, se realizaron análisis post hoc ($p < 0.05$) mediante el procedimiento de comparación Tukey HSD (diferencia honestamente significativa) de . Los valores F significativos obtenidos en la práctica de manejo, se evaluaron adicionalmente mediante la realización de una prueba t por pares. Los análisis estadísticos físico-químicos se realizaron en R (R Core Team 2020).

El análisis de la composición de las comunidades fúngicas se realizó utilizando PERMANOVA para comprobar si las distancias entre las muestras dentro de un grupo son más similares entre sí que las muestras de otros grupos. Además, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Jaccard para verificar las diferencias en la composición de las comunidades de hongos. La diversidad alfa de las *features* observadas (anteriormente conocidas como OTUs) se analizó con Kruskal-Wallis.

Se utilizó el análisis de correspondencia canónica (CCA), realizado mediante el software CANOCO versión 5.0 (Lepš y Šmilauer 2003), para examinar la relación entre la composición de la comunidad fúngica, las características del suelo y el medio ambiente. Las muestras con perfiles fúngicos similares tienen puntuaciones similares y, por lo tanto, cuando se grafican, se agrupan. Se probaron las propiedades físico-químicas del suelo y los factores ambientales (latitud, precipitación total en 2019 y temperatura media en 2019) para una contribución significativa a la explicación de la variación en los datos de secuenciación de

hongos con la prueba de permutación de Monte Carlo ($P < 0,05$). Solo se incluyeron en las parcelas las variables de suelo y ambientales que se correlacionaron significativamente con el factor en el ACC. Las propiedades del suelo y los factores ambientales están representados por vectores. Los vectores de mayor magnitud y que forman ángulos más pequeños con un eje están más fuertemente correlacionados con ese eje. Los hongos que solo aparecen en unas pocas muestras suelen ser poco fiables porque tienen valores cercanos al límite de detección. Así, se omitieron aquellos hongos que estaban presentes en menos del 25% de las muestras.

El análisis bioinformático se realizó con el programa QIIME 2 2020.6 (Bolyen et al. 2019). Los datos de secuencia sin procesar se demultiplexearon y se filtraron por calidad utilizando el complemento q2-demux seguido de la eliminación de ruido con DADA2 (Callahan et al. 2016) (a través del complemento q2-dada2) para identificar todas las Variantes de Secuencia de Amplicones observadas (ASVs por sus siglas en inglés) (Callahan, McMurdie, y Holmes 2017).. Los ASV se alinearon con mafft (Katoh et al. 2002) (a través de q2-alignment) y se utilizaron para construir la filogenia con fasttree2 (Price, Dehal, y Arkin 2010) (a través de q2-phylogeny). Los índices de diversidad alfa, la diversidad beta, la distancia de Jaccard, y el análisis de coordenadas principales (PCoA) se estimaron utilizando q2-diversity una vez las muestras fueron rarificadas(submuestreo sin sustitución) a 900 secuencias por muestra. La taxonomía se asignó a las ASVs utilizando q2-feature-classifier (Bokulich et al. 2018) con el clasificador de taxonomía classify-sklearn naïve Bayes contra la base de datos UNITE (Abarenkov et al. 2020).

4. Resultados

4.1 Propiedades físico-químicas de los suelos

Los resultados obtenidos mostraron que el pH resultó ácido en la región boreal, neutro en la región atlántica y básico en la región mediterránea, con diferencias significativas entre las tres regiones ($p < 0.01$) (Fig. 6A; Tabla 3). Por tanto, se observa un aumento del pH al desplazarse hacia el sur. No obstante, no hay efecto del manejo agrícola sobre el pH, sin diferencias significativas entre los dos manejos convencional y ecológico ($p > 0.05$). En cuanto al contenido de materia orgánica en el suelo, se ha observado un valor significativamente más alto en la zona boreal ($p < 0.001$) (Fig. 6B; Tabla 3), y va disminuyendo con la latitud hacia la zona mediterránea. Aunque hay diferencias significativas entre las regiones pedoclimáticas, no hay diferencias significativas entre los diferentes manejos. La concentración de nitrógeno siguió la misma tendencia que la materia orgánica, con un patrón significantivamente decreciente norte-sur (Fig. 6C; Tabla 3). Al igual que con la materia orgánica, el sistema de manejo no afectó significativamente la concentración de nitrógeno total en los suelos.

La Fig. 6D muestra la distribución de las diferentes clases de agregados del suelo en función de la región pedoclimática y del manejo agrícola. Todas las clases de agregados presentaron diferencias significativas entre las zonas, siendo además significativo el manejo en todas ellas menos en los agregados <

53 μm (Tabla 3). Lo macroagregados ($> 250 \mu\text{m}$) predominan en la zona boreal, mientras que los agregados entre 53-250 μm predominan en la región mediterránea. El manejo ecológico incrementó significativamente la proporción de macroagregados ($> 250 \mu\text{m}$) en la región mediterránea comparado con el sistema convencional. No obstante, esta tendencia fue la inversa en la región atlántica. Los porcentajes de fragmentos gruesos, arcilla y humedad del suelo fueron significativamente mayores en la zona boreal ($p < 0.001$), sin diferencias significativas entre manejos (Tablas 3 y 4).

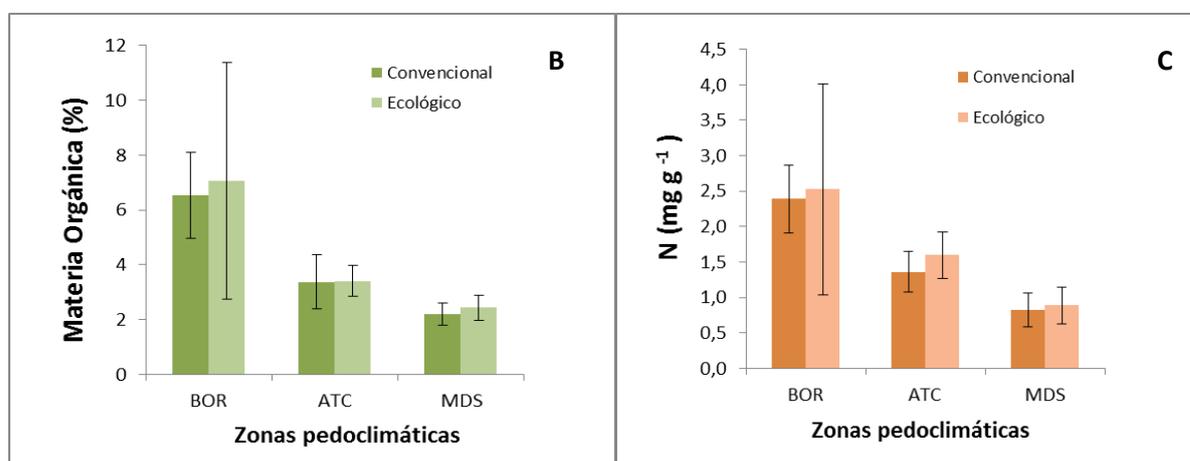
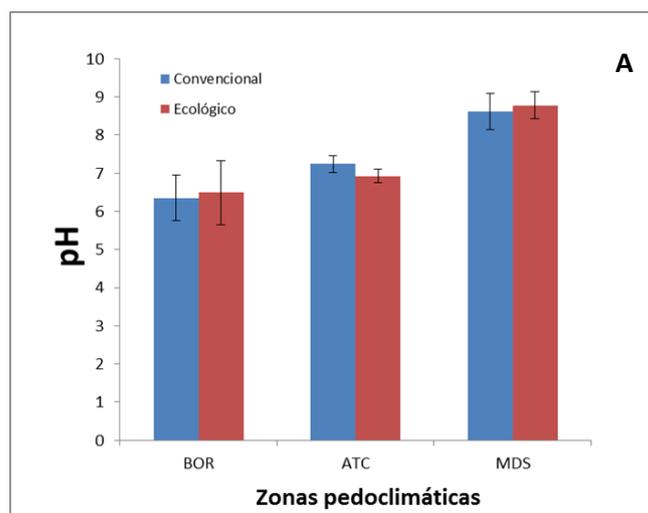
En relación al nitrógeno mineral del suelo, la mayor cantidad de nitratos y nitritos está presente en las regiones boreal y atlántica, con valores significativamente inferiores en la región mediterránea (Tablas 3 y 4). En general, se puede observar que las concentraciones de nitratos y nitritos disminuyen a lo largo del eje norte-sur. El manejo agrícola fue significativo para los niveles de nitratos y nitritos, con valores más altos en el sistema convencionales. En relación al amonio, no hay diferencias significativas entre las diferentes regiones, siendo el efecto del manejo significativo, con valores mayores en el sistema ecológico (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de la zona pedoclimática, la práctica de manejo y su interacción sobre las propiedades físico-químicas del suelo. La tabla muestra los valores F para cada parámetro físico-químico del suelo seguidos de sus niveles significativos: * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns $p > 0.05$.**

Propiedades del suelo	Zona	Manejo	Zona x manejo
Fragmentos gruesos (%)	20,997***	0.406ns	ns
Agregados $> 2000 \mu\text{m}$ (%)	4.983*	5.605*	0.794ns
Agregados 2000-250 μm (%)	60.73***	52.90***	46.51***
Agregados 250-53 μm (%)	33.79***	13.02***	15.60***
Agregados $< 53 \mu\text{m}$ (%)	5.829**	0.696ns	7.487**
Arcilla (%)	19.323***	1.608ns	ns
Humedad del campo (%)	114.63***	1.770ns	ns
pH	100.254***	0.082ns	ns
Materia orgánica (%)	32.31***	0.30ns	ns
N total (mg kg^{-1})	32***	1.000ns	ns
NO_3 (mg kg^{-1})	10.931***	8.355**	ns
NO_2 (mg kg^{-1})	3.599*	5.611*	ns
NH_4^+ (mg kg^{-1})	2.634ns	7.643**	ns

Tabla 4. Porcentaje de fragmentos gruesos, arcilla, humedad y cantidad de NO_3^- , NO_2^- , y NH_4^+ en las diferentes zonas y tipo de manejo (BOR-C: Boreal convencional; BOR-O: Boreal ecológico; ATC-C: Atlántico Central convencional; ATC-O: Atlántico Central ecológico; MDS-C: Mediterráneo Sur convencional y MDS-O: Mediterráneo Sur ecológico).

	BOR-C	BOR-O	ATC-C	ATC-O	MDS-C	MDS-O
	Media (sd)	Media (sd)	Media (sd)	Media (sd)	Media (sd)	Media (sd)
Fragmentos gruesos (%)	22,71 (12,63)	21,69 (12,17)	6,11 (10,54)	7,30 (8,49)	3,69 (1,04)	7,96 (3,76)
Arcilla (%)	21,23 (6,25)	17,62 (7,78)	12,41 (1,40)	12,03 (1,80)	18,00 (2,69)	17,73 (1,73)
Humedad del campo (%)	25,72 (3,64)	25,30 (6,67)	15,41 (2,75)	13,89 (4,64)	7,53 (3,12)	5,58 (1,60)
NO_3^- (mg kg^{-1})	96,48 (20,58)	83,78 (24,07)	95,25 (24,16)	67,90 (25,84)	61,00(24,34)	53,30 (19,84)
NO_2^- (mg kg^{-1})	9,80 (1,83)	8,27 (2,83)	8,22 (2,23)	6,99 (2,99)	6,29 (2,28)	6,20 (2,30)
NH_4^+ (mg kg^{-1})	2,99 (1,04)	3,85 (1,50)	2,30 (0,96)	3,07 (1,96)	2,90 (0,64)	3,81 (0,78)



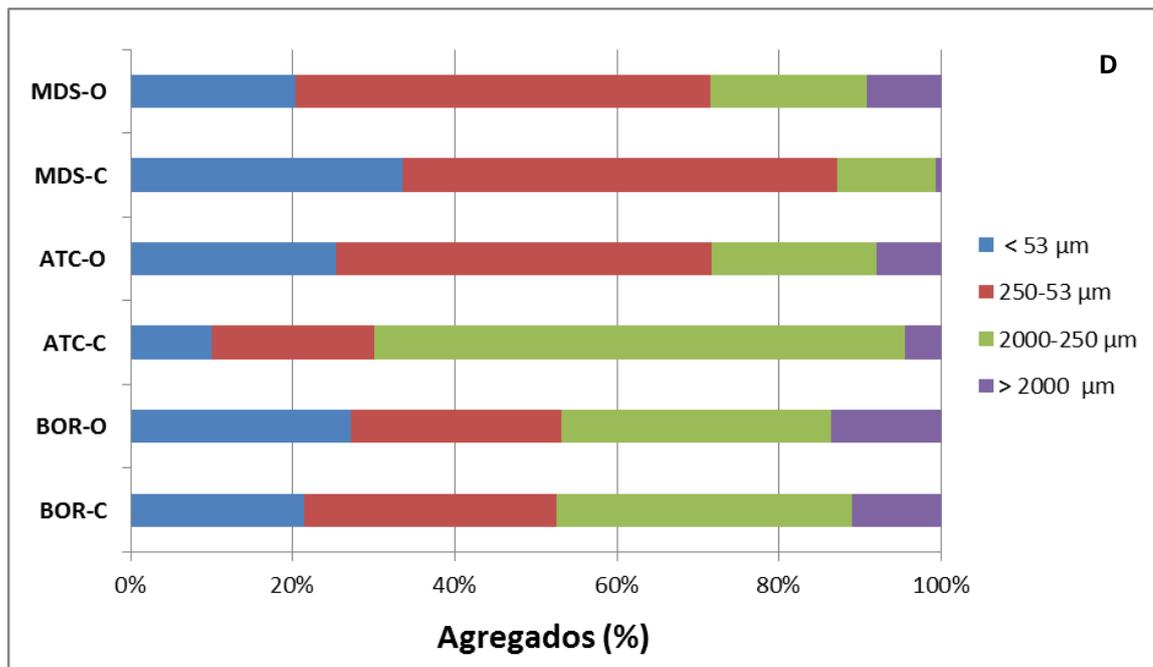


Figura 6. Valores de pH (A), concentraciones de materia orgánica (B), nitrógeno (C) y distribución de agregados (D) en las diferentes zonas y tipo de manejo (BOR-C: Boreal convencional; BOR-O: Boreal ecológico; ATC-C: Atlántico Central convencional; ATC-O: Atlántico Central ecológico; MDS-C: Mediterráneo Sur convencional y MDS-O: Mediterráneo Sur ecológico).

4.2 Diversidad y estructura de las comunidades de fúngicas

Diversidad general de las comunidades fúngicas

Tras el proceso de secuenciación se obtuvieron un total de 6.082.420 secuencias, que se filtraron por calidad, se unieron y se verificaron las quimeras, lo que dio lugar a 4.578.986 lecturas que se agruparon en 14.232 *features* (antiguas OTU). Las curvas de rarefacción, generadas en base al número medio de *features* obtenidos, mostraron un aumento exponencial y acercamiento a una asíntota horizontal en todas las zonas pedoclimáticas, indicando una secuenciación prácticamente completa, y que la obtención de secuencias adicionales más allá de esa profundidad de muestreo no resultaría en una mejora significativa de la riqueza en las muestras secuenciadas (Fig. 7).

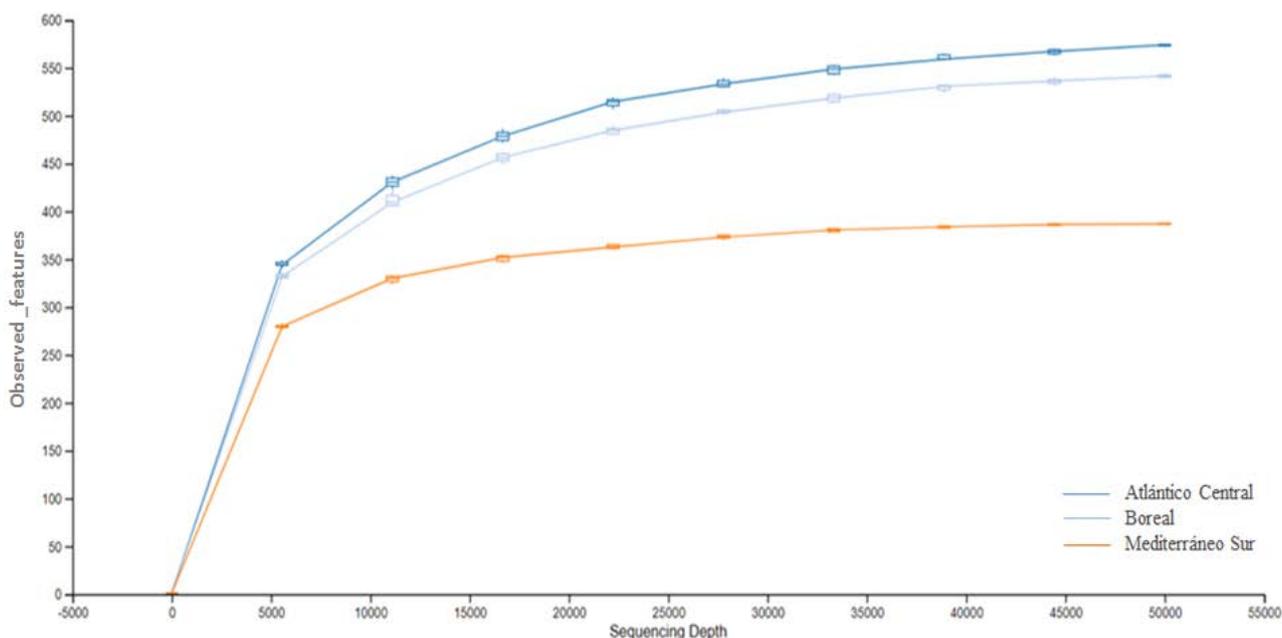


Figura 7. Curvas de rarefacción de las secuencias obtenidas por zona pedoclimática (BOR: Boreal, ATC: Atlántico Central, MDS: Mediterráneo Sur.

Los índices de diversidad alfa de las *features* obtenidas (medida cualitativa de la riqueza de la comunidad) (Tabla 5) no mostraron diferencias significativas entre el sistema de manejo (Kruskal-Wallis: $H = 0.18$ $p = 0.67$), mientras que la región pedoclimática fue significativa para todos los grupos (Kruskal-Wallis: $H = 32.10$ $p < 0.001$). Específicamente, hubo diferencias significativas entre la región Mediterránea y el resto de regiones. No hubo diferencias significativas entre las regiones Boreal y Atlántica (Kruskal-Wallis Boreal-Atlantic: $H = 0.71$ $p = 0.40$).

Tabla 5. Métricas de diversidad alfa de las *features* observadas (riqueza comunitaria por región) en BOR-C: Boreal convencional; BOR-O: Boreal ecológico; ATC-C: Atlántico Central convencional; ATC-O: Atlántico Central ecológico; MDS-C: Mediterráneo Sur convencional y MDS-O: Mediterráneo Sur ecológico.

<i>Features</i> observadas	
BOR-C	578,6
BOR-O	541,3
ATC-C	575,8
ATC-O	605,4
MED-C	325,8
MED-O	428,9

Estructura de las comunidades fúngicas

Los resultados de PERMANOVA mostraron que la estructura de la comunidad fúngica no se vio afectada significativamente por el sistema de manejo ($F = 1.25$, $p = 0.12$), mientras que sí hay diferencias en función de la región pedoclimática ($F = 8.87$, $p = 0.001$). Además, todas las zonas climáticas mostraron diferencias significativas entre sí: Boreal-Atlántico ($F = 4,24$, $p = 0,001$), Boreal-Mediterráneo ($F = 11.19$, $p = 0.001$), Atlántico-Mediterráneo ($F = 11,57$, $p = 0,001$).

Utilizando la distancia Jaccard, que es una medida cualitativa de la disimilitud de las comunidades, fue posible analizar las principales coordenadas de la estructura de la comunidad fúngica entre las tres diferentes zonas pedoclimáticas (BOR, ATC y MDS) (Fig. 8) y también entre las dos diferentes prácticas de manejo (convencional y ecológico) (Fig. 9). En la Fig. 8, los tres ejes fueron significativos para explicar la variación en la diversidad fúngica entre las tres zonas pedoclimáticas. El eje 1 separa MDS de otras zonas pedoclimáticas mostrando una variación de 11,80%. El eje 2 separa BOR con una variación de 5,986%, y el eje 3 separa ATC con una variación de 3,542%. En particular, la estructura de la comunidad fúngica entre las tres zonas pedoclimáticas resulta bastante más heterogénea para BOR y ATC, formando clusters indefinidos, mientras que para MDS se ha formado un clúster en el que la similitud entre los puntos es muy alta. Con respecto a la estructura de la comunidad fúngica entre las dos prácticas de manejo (Fig. 9), no hay separación de las muestras en BOR y ATC, mientras que en el clúster de MDS los dos sistemas de gestión están separados formando dos grupos independientes, aunque muy cercanos entre sí. Por tanto, la composición de la comunidad microbiana de hongos difirió entre los suelos MDS con manejo convencional y manejo ecológico, mientras que no existe tal separación en BOR y ATC.

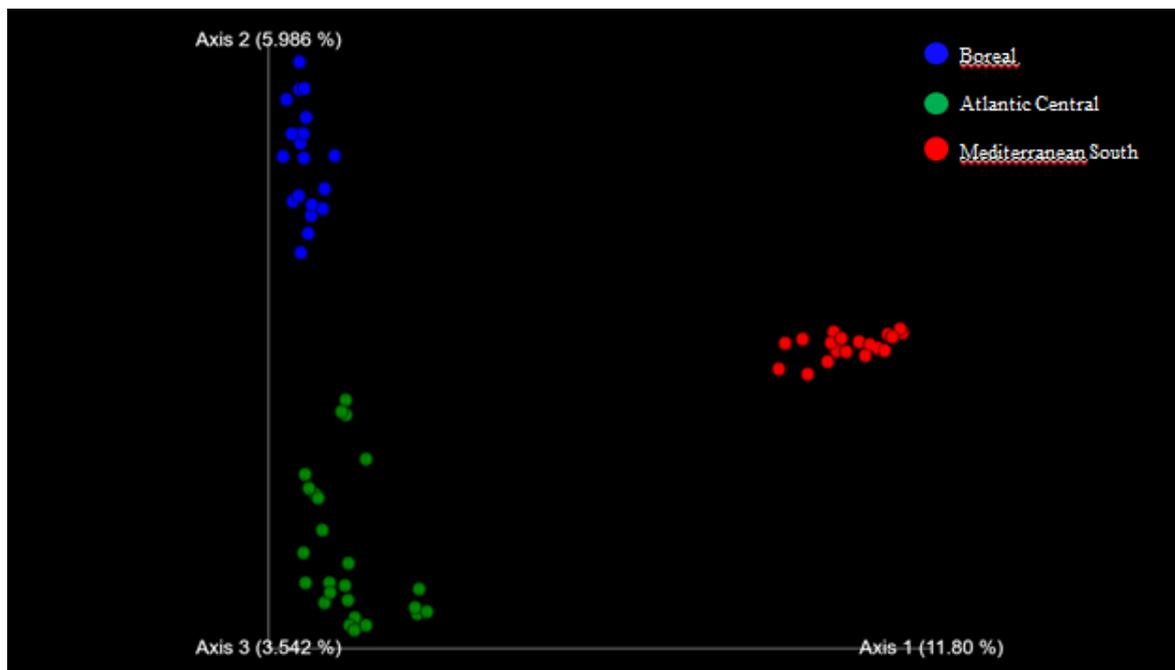


Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la estructura de la comunidad fúngica entre las tres zonas pedoclimáticas (BOR: Boreal; ATC: Atlántico Central; MDS: Mediterráneo Sur) obtenidas mediante la distancia Jaccard.

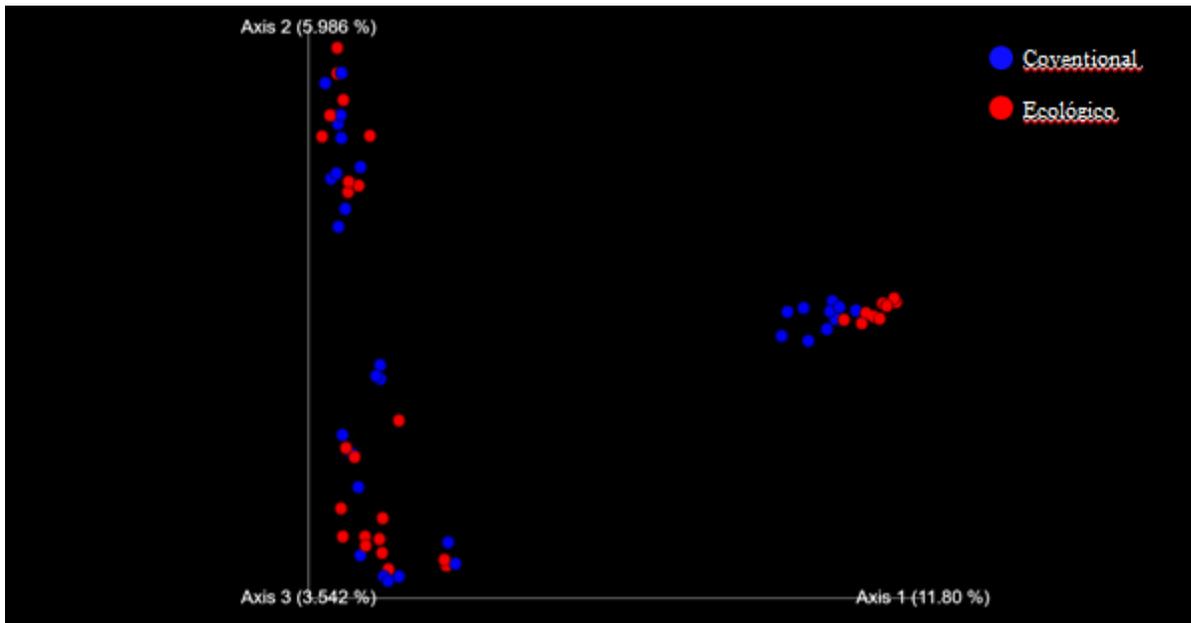


Figura 9. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la estructura de la comunidad fúngica entre las dos prácticas de manejo diferentes (convencional y ecológico) obtenidas mediante la distancia Jaccard.

Como se muestra en la Fig. 10, el orden predominante de hongos es el de Hypocreales para todos los tratamientos, con 17,74% en BOR-C, 21,56% en BOR-O, 35,90% en ATC-C, 33,80% en ATC-O, 35,66% en MDS-C y 24,25% MDS-O. Los órdenes presentes en minoría (< 1) pertenecen al orden de los Chaetothyriales, Xylariales, Cystofilobasidiales y Zoopagales. La excepción es el orden Saccharomycetales, presente en porcentajes < 1 en todos los tratamientos excepto en BOR-C donde está presente en 4,36%, lo que sugiere que este hongo está muy relacionado con la zona climática, pero también con el manejo convencional. En particular, en BOR-C se detectaron mayores porcentajes de Tremellales (9,49%) y Trichosporonales (7,49%), mientras que en BOR-O de Filobasidiales (10,41%), además en el caso de los hongos del orden Mortierellales, se observaron el 13,72% en BOR-C y el 13,78% en BOR-O. En ATC-C y ATC-O los órdenes Helotiales, Thelebolales, Glomerellales, Hypocreales, Microascales están presentes en porcentajes más altos, pero con un porcentaje ligeramente mayor en ATC-C a excepción del orden de Thelebolales (ATC-C= 4,17% y ATC-O= 4,70%).

En MDS-C y MDS-O los órdenes Pleosporales, Eurotiales, Onygenales, Pezizales y Sordariales están presentes en porcentajes más altos en comparación con las otras muestras y específicamente se observa que el orden Pleosporales está presente en MDS-O (15,97%) en un porcentaje superior al MDS-C (12,81%). El orden Trichosporonales está completamente ausente en MDS-C y MDS-O. El orden Zoopagales es muy minoritario en MDS con una abundancia relativa de 0,01% y 0,02% respectivamente. Finalmente, de los datos obtenidos se desprende que el orden Capnodiales está presente en porcentajes muchos mayores en BOR-O (7,98%), ATC-O (7,10%) y MDS-O (13,59%) sometidos a tratamiento ecológico.

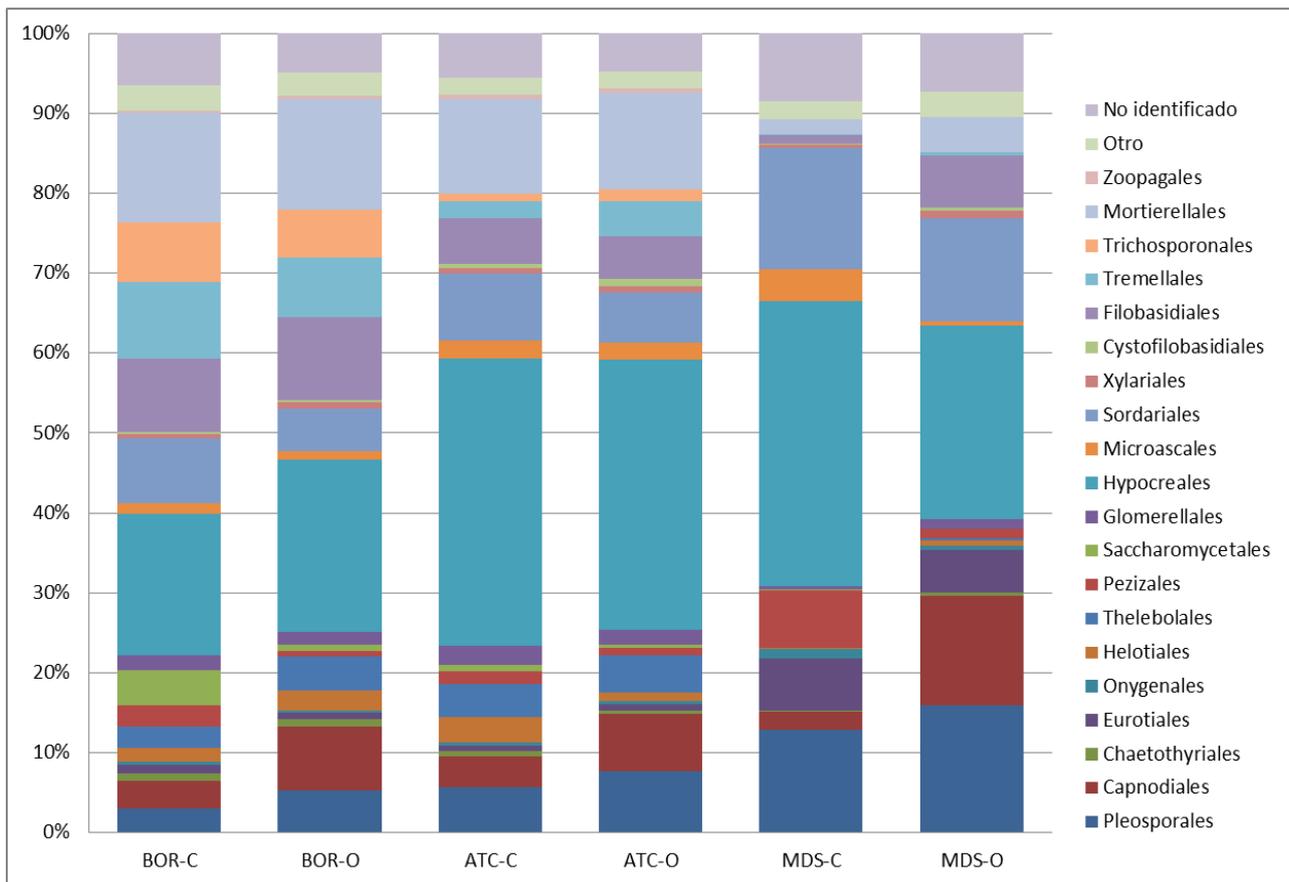


Figura 10. Abundancia relativa de taxones fúngicos del suelo (órdenes) en las diferentes regiones edafoclimáticas y sistemas de manejo. Se indican con "Otro" los pedidos encontrados en abundancia inferior al 0,5%, mientras que con "no identificado" las secuencias valoradas con tasas más elevadas (BOR-C: Boreal convencional; BOR-O: Boreal ecológico; ATC-C: Atlántico Central convencional; ATC-O: Atlántico Central ecológico; MDS-C: Mediterráneo Sur convencional y MDS-O: Mediterráneo Sur ecológico).

Los resultados obtenidos a abundancia de los géneros de hongos presentes en las muestras analizadas (Fig. 11) mostraron que, en general, la el número de géneros presentes disminuyó de norte a sur, y que MSD-C y MDS-O contienen un porcentaje abundante de géneros no identificados en comparación con otras áreas pedoclimáticas (45,60% y 27,43%, respectivamente). Los mayores porcentajes para BOR se encontraron para los géneros *Mortierella* (13,52% y 13,63%), *Apiotrichum* (6,88% y 5,59%), *Saitozyma* (8,43% y 3,32%) y *Solicoccozyma* (8,92% y 9,92%). *Cladorrhinum* y *Fusicolla* mostraron mayor abundancia en BOR-C y ATC-C, mientras *Vishniacozyma* presentó una mayor abundancia en BOR-O y ATC-O (4,11% y 2,16%, respectivamente). El género *Acremonium* fue más abundante en ATC-C (23,01%) que en ATC-O (19,94%). El género *Humicola* estuvo mayoritariamente presente en BOR-C (1,83%) y en ATC-O (1,27%), por lo que su presencia está poco influenciada por el tipo de manejo aplicado.

Otro caso particular se encontró para *Mycochlamys*, más abundante en ATC-C (1,93%), ATC-O (1,88%) y MDS-C (2,42%), como se puede apreciar en los porcentajes reportados para la zona atlántica. Este género de hongos no se vio por tanto afectado por el sistema de gestión en ATC, mientras que en MDS su abundancia fue mucho mayor bajo de manejo convencional que bajo manejo ecológico (MDS-O = 0,19%). Del mismo modo ocurre para el género *Gibberella* que está presente tanto en ATC como en MDS, pero con un porcentaje mayor en MDS-O (3,40%).

Alternaria se encontró en porcentajes bastante altos en el área mediterránea (MDS-C = 3,52%; MDS-O = 10,08%) disminuyendo hacia el norte (BOR-C= 0,29%; BOR-O= 0,31%; ATC-C= 2,52%; ATC-O= 2,42%).

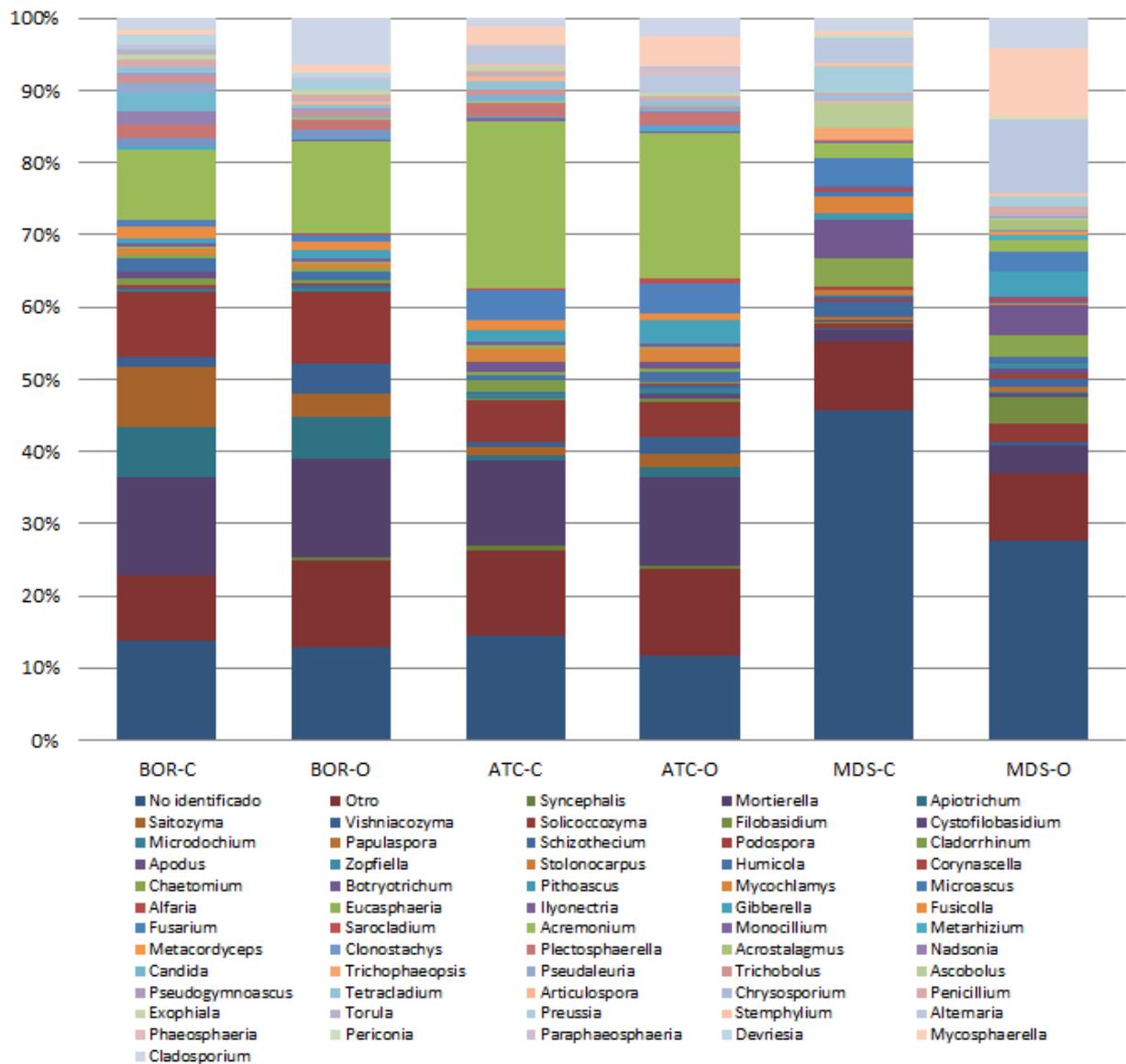


Figura 11. Abundancia relativa de taxones de hongos del suelo (género) en diferentes zonas pedoclimáticas y prácticas de manejo. Se indican con "Otro" los pedidos encontrados en abundancia inferior al 0,5%, mientras que con "no identificado" las secuencias valoradas con tasas más elevadas (BOR-C: Boreal convencional; BOR-O: Boreal ecológico; ATC-C: Atlántico Central convencional; ATC-O: Atlántico Central ecológico; MDS-C: Mediterráneo Sur convencional y MDS-O: Mediterráneo Sur ecológico).

La Tabla S2 del Anexo1 describe el porcentaje de abundancias relativas (%) de los géneros más abundantes en las diversas zonas pedoclimáticas bajo manejo convencional y ecológico.

4.3 Interrelaciones entre la diversidad genética fúngica y factores ambientales y edáficos

Del análisis de las interrelaciones entre la diversidad genética fúngica y los factores ambientales y edáficos (Fig.12), se desprende que las variables que diferencian las tres zonas pedoclimáticas son básicamente latitud, humedad, temperatura y pH, seguidas de nitrógeno y materia orgánica. Por tanto, los factores climáticos y el pH son los que más condicionan las poblaciones fúngicas.

En concreto, a partir de la tendencia de las flechas vectoriales descritas en la figura, la comunidad fúngica mediterránea se asocia a variables elevadas de temperatura y pH, mientras que en la zona atlántica a las lluvias abundantes y finalmente, en la zona boreal, a variables como materia orgánica, nitrógeno, latitud y humedad. En cambio, centrándose principalmente en BOR y ATC, que son áreas que mostraron una diversidad fúngica similar y bastante heterogénea en comparación con MDS, las diferencias se deben principalmente a la latitud, el abundante contenido de arcilla en BOR y los valores más altos de materia orgánica, nitrógeno y humedad del suelo.

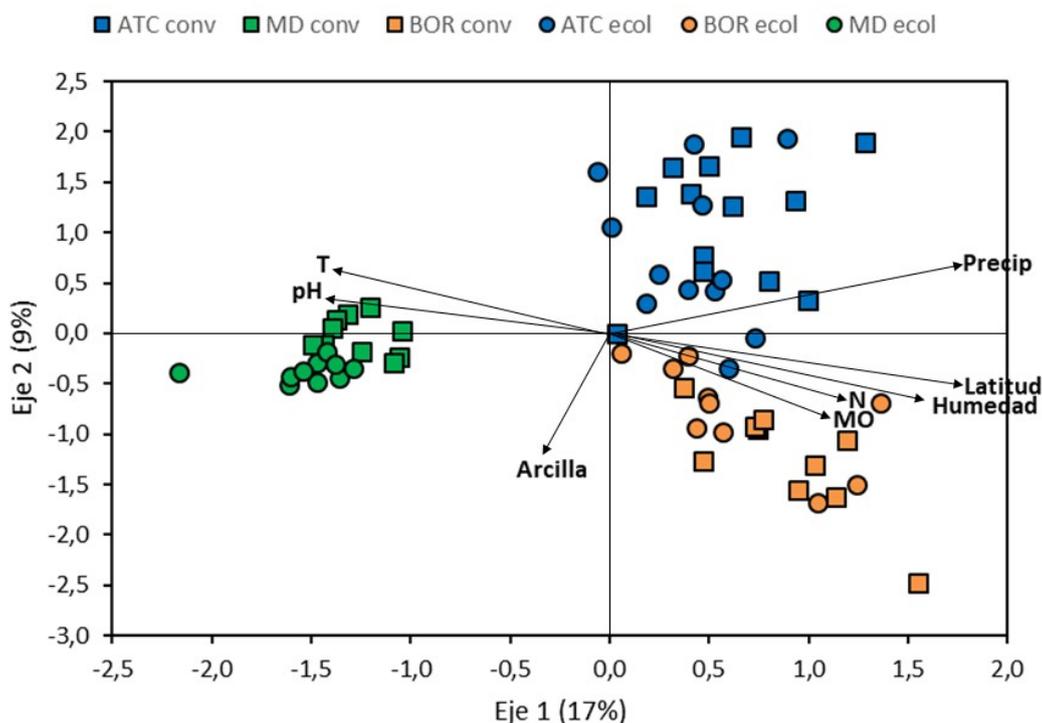


Figura 22. La relación entre la composición de la comunidad fúngica, las características del suelo y los factores ambientales a través del análisis de correspondencia canónica (CCA) (BOR conv: Boreal convencional; BOR ecol: Boreal ecológico; ATC conv: Atlántico Central convencional; ATC ecol: Atlántico Central ecológico; MD conv: Mediterráneo Sur convencional y MD ecol: Mediterráneo Sur ecológico).

5. Discusión

Este estudio busca comprender las diferencias de la diversidad y estructura entre las comunidades de hongos presentes en diferentes áreas europeas bajo manejo ecológico y convencional.

Los niveles de pH fueron más básicos en la región mediterránea, estos son suelos normalmente sometidos a climas áridos y semiáridos, con lluvias anuales insuficientes para filtrar las sales en las capas más profundas del suelo, lo cual forma suelos salinos. También la alta evaporación en estas zonas contribuye a la acumulación de grandes cantidades de sales y a la hidrólisis de iones Na^+ o compuestos de Na_2CO_3 produciendo iones OH^- que aumentan el pH del suelo (Choudhary, O. P. 2018). Además, no se encontraron

diferencias entre tratamientos ecológicos y convencionales, excepto en MDS. Esto último, coincide con lo encontrado en un estudio realizado por Bulluck et al. 2002, donde los suelos con aplicaciones alternativas de fertilizantes típicos de los tratamientos orgánicos inicialmente tenían un pH del suelo más bajo que los suelos con fertilizantes sintéticos usados en los tratamientos convencionales, pero con el tiempo el pH aumentó en los suelos con fertilizaciones alternativas alcanzando los niveles de los suelos con fertilizantes sintéticos.

Tanto la materia orgánica como el nitrógeno se comportan de la misma manera en las tres áreas probablemente porque las transformaciones del nitrógeno en el suelo están muy relacionadas con el contenido de carbono y viceversa, ya que ambos son fundamentales para la actividad de los microorganismos en el suelo (Holub et al. 2005). En particular, estos dos parámetros tuvieron mayores concentraciones en la zona boreal, disminuyendo hacia el sur, lo que probablemente esté relacionado con la composición de los suelos boreales, que representan un importante reservorio terrestre de carbono orgánico (Pan et al. 2011). Además, la acumulación de stock subterránea también tiene una gran capacidad para secuestrar nitrógeno, con una potencial retroalimentación sobre la productividad del ecosistema (Wardle et al. 2003; Wardle et al. 2012).

Muchos investigadores consideran que la estabilidad de los agregados está estrechamente relacionada con la estructura y la salud del suelo y depende de un equilibrio integrado de factores químicos, físicos y biológicos (Brevik et al. 2015). En este estudio se encontró que los agregados muestran una diferencia significativa entre las áreas y también entre los dos manejos, con una mayor estabilidad de macroagregados (> 250 μm) en la zona boreal y mediterránea en tratamientos ecológicos, mientras que en la zona atlántica ocurre una situación inversa. Esto se puede correlacionar con la diferente composición química de los suelos de las diferentes zonas y las reacciones de estos últimos con las dos modalidades de tratamiento. Se sabe que la labranza continua disminuye la estabilidad del agregado y aumenta los efectos negativos de la alternancia de secado/humedecimiento y congelación/descongelación, lo que hace que la estructura del suelo sea más susceptible a su destrucción (Beare et al. 1994; Mikha y Rice 2004). Tanto la labranza reducida como la no labranza, típicas del manejo ecológico, mejora las condiciones físicas (Huang et al. 2012), químicas (Andruschkewitsch et al. 2013) y biológicas (Helgason, Walley, y Germida 2010), que podrían acelerar la macroagregación en la superficie del suelo. Además, la labranza intensiva puede causar grandes pérdidas de carbono orgánico del suelo, provocando un aumento de la erosión del suelo y la ruptura de la estructura de macroagregados (Melero et al. 2009), mientras que la poca o ninguna labranza tiene efectos positivos sobre la macroagregación y sobre agentes aglutinantes (Melero et al. 2009; Curaqueo et al. 2011).

Se encontró una mayor cantidad de nitratos y nitritos en los tratamientos convencionales, esto puede deberse a que el nitrato es más propenso a la lixiviación y los niveles de lixiviación de nitratos en suelos sometidos con cultivos similares, son similares o ligeramente superiores en manejos convencionales (Stopes et al. 2002). Esto está en consonancia con la investigación realizada por Poudel et al. 2002 donde encontraron mayores tasas de mineralización de N en suelos convencionales y un menor riesgo potencial de lixiviación de N en suelos orgánicos. Por el contrario, el ión amonio se ha encontrado en mayores concentraciones en manejos ecológicos.

En cuanto a los resultados obtenidos de las comunidades fúngicas, existen diferencias significativas solo entre las tres zonas pedoclimáticas consideradas (Fig. 8), en particular en BOR y ATC con respecto a MDS. Todo esto concuerda con los resultados de Fierer y Jackson 2006, y Fierer 2017 que mostraron que las propiedades climáticas y edáficas son las principales impulsoras de la composición microbiana del suelo. Por el contrario, no se encontró diferencia significativa entre los dos diferentes manejo en las tres áreas consideradas. Esto se opone a estudios anteriores en el que encontraron diferencias significativas entre el manejo ecológico y convencional, ya que la adición de fertilizantes orgánicos en lugar de fertilizantes artificiales generó diferencias en la composición microbiana de los hongos (Lalande et al. 2005; Ghimire et al. 2014), principalmente en tierras arables. Esto se podría explicar por el hecho de que en el estudio mencionado anteriormente se refiere a muestras pertenecientes a áreas con la misma latitud, por lo tanto sujetas a condiciones climáticas similares, mientras que en este estudio los factores climáticos tienen una mayor influencia, ya que difieren mucho entre las tres zonas climáticas consideradas que tienen diferentes latitudes.

Además, se han detectado varios tipos de hongos pertenecientes a diferentes géneros, algunos de los cuales deben controlarse porque se consideran una amenaza para la agricultura, como la *Alternaria*, ya que provoca amarilleo y oscurecimiento de las hojas inferiores, progresando hacia arriba en condiciones de elevada humedad y causando herrumbre foliar en los casos más graves (Akhtar et al. 2004). En general, este hongo se ha detectado en mayores porcentajes en manejo ecológico en BOR y MDS, mientras que en ATC en manejo convencional. Del análisis de las interrelaciones entre la diversidad genética fúngica y los factores ambientales y edáficos (Fig.12), se desprende que las variables que diferencian las tres zonas pedoclimáticas son básicamente latitud, humedad, T y pH, seguidas de N y MO. En particular, los factores climáticos y el pH son los que más condicionan las poblaciones fúngicas. Los resultados del estudio realizado por Shi et al. 2014, mostraron que la temperatura y la latitud fue lo que más influyó en la composición de la comunidad fúngica de los suelos estudiados. En particular, la temperatura media anual (mat) y la precipitación media anual (map) se han definido como buenos predictores de la diversidad de plantas y animales a escala continental (Hawkins et al. 2003). Esta afirmación coincide con los resultados obtenidos, que muestran que la diversidad de hongos estuvo fuertemente influenciada por las variaciones de temperatura, mientras que las precipitaciones jugaron un papel menor en la diversidad de hongos del suelo. Contrariamente a los resultados de este estudio, en el estudio realizado por Shi et al. 2014, no hubo una fuerte correlación entre el pH y la diversidad de hongos, en particular en lo que respecta a la diversidad de grupos de hongos micorrízicos, esto puede depender de la actividad enzimática en la descomposición de hongos, que se limita a escalas de pH específico (Leprince e Quiquampoix 1996). Sin embargo, surgieron estudios contradictorios con respecto al pH en la diversidad de hongos, de hecho en un estudio realizado por Rousk et al. 2010 se encontró que el pH tiene un efecto débil sobre la diversidad de hongos, mientras que Bååth E. 2003 encontraron una fuerte correlación entre la diversidad de hongos y bacterias y un gradiente de pH creciente.

En general, se encontró una mayor riqueza fúngica en BOR y ATC en comparación con MDS. Todo esto concuerda con la investigación realizada por Tedersoo et al. 2014 en la que demostraron que los factores climáticos, seguidos de los patrones edáficos y espaciales, son los mejores predictores de la riqueza fúngica

del suelo y la composición de las comunidades a escala global. Específicamente, a partir de su análisis de Metabarcoding, se encontró que la distancia al ecuador y la precipitación media anual habían tenido mayores efectos sobre la riqueza de hongos, incluyendo la mayoría de los grupos taxonómicos y funcionales. La diversidad de la mayoría de los grupos de hongos alcanzó su punto máximo en los ecosistemas tropicales, pero la diversidad de hongos ectomicorrízicos y otras clases de hongos fue más variable en los ecosistemas templados o boreales. Además, muchos grupos de hongos han mostrado diferentes preferencias por condiciones edáficas específicas (como pH, calcio o fósforo) y se observó que el rango geográfico de taxones de hongos ha aumentado hacia los polos (Tedersoo et al. 2014).

6. Conclusiones

Como resultado de este estudio cabe destacar que la estructura de las comunidades de hongos fue diferente en cada una de las diferentes regiones de estudio. Sin embargo, estas comunidades no se vieron afectadas por el tipo de manejo aplicado. Respecto a su diversidad, y contrariamente a nuestra hipótesis que postulaba que la diversidad genética fúngica podría aumentar siguiendo el gradiente Norte-Sur, se obtuvo que la diversidad de la comunidad fúngica fue mayor en las zonas BOR y ATC respecto MDS. Por otro lado, y también contrariamente a la hipótesis inicial, en este estudio, no se encontraron diferencias significativas entre las comunidades fúngicas de los suelos sometidos a los dos diferentes métodos de manejo (convencional y ecológico). Además, se encontró que la diversidad y estructura de las comunidades fúngicas estuvo significativamente influenciada por las diferentes condiciones climáticas, edáficas y físico-químicas, siendo los parámetros que más afectaron a estas comunidades la latitud, la humedad, el pH, la temperatura y, en menor medida, el contenido de materia orgánica y nitrógeno.

Bibliografia

- Abarenkov K., Zirk A., Piirmann T., Pöhönen R., Ivanov F., Nilsson R.H, Kõljalg U. 2020. «UNITE QIIME release for Fungi». *UNITE Community*. <https://doi.org/10.15156/BIO/786385>.
- Ahmad, Parvaiz et al. 2015. «Role of Trichoderma harzianum in mitigating NaCl stress in Indian mustard (Brassica juncea L) through antioxidative defense system». *Frontiers in Plant Science*.
- Akhtar, K. P., M. Y. Saleem, M. Asghar, e M. A. Haq. 2004. «New report of Alternaria alternaria causing leaf blight of tomato in Pakistan». *Plant Pathology*.
- Andruschkewitsch, Rouven, Daniel Geisseler, Heinz Josef Koch, e Bernard Ludwig. 2013. «Effects of tillage on contents of organic carbon, nitrogen, water-stable aggregates and light fraction for four different long-term trials». *Geoderma*.
- Azcón-Aguilar, C., e J. M. Barea. 1997. «Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials». *Scientia Horticulturae*.
- Bååth E, Anderson TH. 2003. «Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques.» *Soil Biol Biochem* 35: 955–963.
- Bagyaraj, D. J., and Ashwin, R. 2017. «Soil biodiversity: role in sustainable horticulture». *Biodivers. Hortic.* (5): 1–18.
- Baldrian, Petr. 2003. «Interactions of heavy metals with white-rot fungi». *Enzyme and Microbial Technology*.
- Baum, C., W. El-Tohamy, e N. Gruda. 2015. «Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review». *Scientia Horticulturae*.
- Beare, M. H., P. F. Hendrix, M. L. Cabrera, e D. C. Coleman. 1994. «Aggregate-Protected and Unprotected Organic Matter Pools in Conventional- and No-Tillage Soils». *Soil Science Society of America Journal*.
- Bender, S. Franz, Cameron Wagg, e Marcel G.A. van der Heijden. 2016. «An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability». *Trends in Ecology and Evolution*.
- Bengtsson, Janne, Johan Ahnström, e Ann Christin Weibull. 2005. «The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: A meta-analysis». *Journal of Applied Ecology*.
- Blankinship, Joseph C., Pascal A. Niklaus, e Bruce A. Hungate. 2011. «A meta-analysis of responses of soil biota to global change». *Oecologia*.
- Bokulich, Nicholas A. et al. 2018. «Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin». *Microbiome*.
- Bolyen, Evan et al. 2019. «Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2». *Nature Biotechnology*.
- Bommarco, Riccardo, David Kleijn, e Simon G. Potts. 2013. «Ecological intensification: Harnessing ecosystem services for food security». *Trends in Ecology and Evolution*.
- Brevik, E. C. et al. 2015. «The interdisciplinary nature of SOIL». *SOIL*.
- Bulluck, L. R., M. Brosius, G. K. Evanylo, e J. B. Ristaino. 2002. «Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms». *Applied Soil Ecology*.
- Callahan, Benjamin J. et al. 2016. «DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data». *Nature Methods*.
- Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, e Susan P. Holmes. 2017. «Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis». *ISME Journal*.
- Campbell, D.J., e J.K. Hensall. 1991. «Bulk density». In *Soil analysis*, a c. di K.A. Smith e Ch.E. Mullis. New York, 329–66.
- Capowiez, Yvan et al. 2009. «The effect of tillage type and cropping system on earthworm communities,

macroporosity and water infiltration». *Soil and Tillage Research*.

Castro, Hector F. et al. 2010. «Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers». *Applied and Environmental Microbiology* 76(4): 999–1007.

Choudhary, O. P., Vilas K Kharche. 2018. *Soil Salinity and Sodicyty*. https://www.researchgate.net/publication/327824188_Soil_Salinity_and_Sodicyty.

Clark, R. B. 1997. «Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH». *Plant and Soil*.

Creamer, R. E. et al. 2010. «Implications of the proposed Soil Framework Directive on agricultural systems in Atlantic Europe - a review». *Soil Use and Management*.

Curaqueo, Gustavo et al. 2011. «Effects of different tillage system on arbuscular mycorrhizal fungal propagules and physical properties in a Mediterranean agroecosystem in central Chile». *Soil and Tillage Research*.

Dai, Zhongmin et al. 2016. «Sensitive responders among bacterial and fungal microbiome to pyrogenic organic matter (biochar) addition differed greatly between rhizosphere and bulk soils». *Scientific Reports*.

Dawidziuk, A., Popiel, D., Kaczmarek, J., Strakowska, J., and Jedryczka, M. 2016. «Morphological and molecular properties of *Trichoderma* species help to control stem canker of oilseed rape.» *BioControl* (61): 755–768.

Edwards, Ivan P., e Donald R. Zak. 2011. «Fungal community composition and function after long-term exposure of northern forests to elevated atmospheric CO₂ and tropospheric O₃». *Global Change Biology*.

El-Komy, Mahmoud H., Amgad A. Saleh, Anas Eranthodi, e Younes Y. Molan. 2015. «Characterization of novel trichoderma asperellum isolates to select effective biocontrol agents against tomato fusarium wilt». *Plant Pathology Journal*.

Elliott, E. T. 1986. «Aggregate Structure and Carbon, Nitrogen, and Phosphorus in Native and Cultivated Soils». *Soil Science Society of America Journal*.

Emmerson, M. et al. 2016. «How Agricultural Intensification Affects Biodiversity and Ecosystem Services». In *Advances in Ecological Research*.

Ernst, Gregor, e Christoph Emmerling. 2009. «Impact of five different tillage systems on soil organic carbon content and the density, biomass, and community composition of earthworms after a ten year period». *European Journal of Soil Biology*.

Fierer, Noah. 2017. «Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome». *Nature Reviews Microbiology*.

Fierer, Noah, e Robert B. Jackson. 2006. «The diversity and biogeography of soil bacterial communities». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Garbeva, Paolina, Johannes Antonie Van Veen, e Jan Dirk Van Elsas. 2004. «Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes». *FEMS Microbiology Ecology*.

Gardi, C., and Jeffery, S. 2009. «Soil Biodiversity. Brussels: European Commission». (27).

Ghimire, Rajan, Jay B. Norton, Peter D. Stahl, e Urszula Norton. 2014. «Soil microbial substrate properties and microbial community responses under irrigated organic and reduced-tillage crop and forage production systems». *PLoS ONE*.

Gray, Sharon B. et al. 2011. «Multiple Climate Change Factors Interact to Alter Soil Microbial Community Structure in an Old-Field Ecosystem». *Soil Science Society of America Journal*.

Hannula, S. Emilia et al. 2017. «Shifts in rhizosphere fungal community during secondary succession following abandonment from agriculture». *ISME Journal*.

Hawkins, Bradford A. et al. 2003. «Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness». *Ecology*.

- Van Der Heijden, Marcel G.A., e Thomas R. Horton. 2009. «Socialism in soil? the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems». *Journal of Ecology*.
- Helgason, B. L., F. L. Walley, e J. J. Germida. 2010. «No-till soil management increases microbial biomass and alters community profiles in soil aggregates». *Applied Soil Ecology*.
- Hendrix, Paul F. et al. 1986. «Detritus Food Webs in Conventional and No-Tillage Agroecosystems». *BioScience*.
- Holub, Scott M. et al. 2005. «Organic matter manipulations have little effect on gross and net nitrogen transformations in two temperate forest mineral soils in the USA and central Europe». *Forest Ecology and Management*.
- Hoogsteen, M. J.J. et al. 2015. «Estimating soil organic carbon through loss on ignition: Effects of ignition conditions and structural water loss». *European Journal of Soil Science*.
- Huang, Gao Bao, Qiang Chai, Fu Xue Feng, e Ai Zhong Yu. 2012. «Effects of Different Tillage Systems on Soil Properties, Root Growth, Grain Yield, and Water Use Efficiency of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Arid Northwest China». *Journal of Integrative Agriculture*.
- Jayne, Benjamin, e Martin Quigley. 2014. «Influence of arbuscular mycorrhiza on growth and reproductive response of plants under water deficit: a meta-analysis.» *Mycorrhiza*.
- Jones, Robert J A et al. 2004. European Soil Bureau Research Report No. 17 *THE MAP OF ORGANIC CARBON IN TOPSOILS IN EUROPE: Version 1.2 September 2003*.
- Kandeler, E., e H. Gerber. 1988. «Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium». *Biology and Fertility of Soils*.
- Katoh, Kazutaka, Kazuharu Misawa, Kei Ichi Kuma, e Takashi Miyata. 2002. «MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform». *Nucleic Acids Research*.
- Keeney, D.R., e D. W. Nelson. 1982. «Nitrogen-inorganic forms. In A. L. Page, D. R. Keeney, D.E. Baker, R. H. Miller, R. J. Ellis and J. D. Rhoades (Eds.), *Methods of Soil Analysis*». In *Methods of Soil Analysis Part 2*.
- Kennedy, Taryn L., Emma C. Suddick, e Johan Six. 2013. «Reduced nitrous oxide emissions and increased yields in California tomato cropping systems under drip irrigation and fertigation». *Agriculture, Ecosystems and Environment*.
- Kim, Mincheol et al. 2013. «Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era». *Genomics & Informatics*.
- Lal, Rattan. 2015. «Challenges and Opportunities in Precision Agriculture».
- Lalande, R., B. Gagnon, R. A. Chapman, e G. M. Barnett. 2005. «Soil microbial populations, activity, and community structure in continuous corn or forage systems under organic or inorganic fertilization in eastern Canada». *Canadian Journal of Soil Science*.
- Leprince, F., e H. Quiquampoix. 1996. «Extracellular enzyme activity in soil: Effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*». *European Journal of Soil Science*.
- Lepš, Jan, e Petr Šmilauer. 2003. *Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO*.
- Mandal, Asit, e Neenu Sathyaseelan. 2012. «Impact of Climate Change on Soil Biodiversity - a Review». *Agricultural Reviews* 33(4): 283–92.
- Marcial Gomes, Newton C. et al. 2003. «Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics». *Applied and Environmental Microbiology*.
- Melero, Sebastiana, Rosa López-Garrido, José Manuel Murillo, e Félix Moreno. 2009. «Conservation tillage: Short- and long-term effects on soil carbon fractions and enzymatic activities under Mediterranean conditions». *Soil and Tillage Research*.
- Mikha, Maysoon M., e Charles W. Rice. 2004. «Tillage and Manure Effects on Soil and Aggregate-Associated Carbon and Nitrogen». *Soil Science Society of America Journal*.

- Nakas, J. P., e D. A. Klein. 1979. «Decomposition of Microbial Cell Components in a Semi-Arid Grassland Soil». *Applied and Environmental Microbiology*.
- National Geographic Society. «No Title». 2020. <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/soil-composition/>.
- Orgiazzi, A., Bardgett, R.D., Barrios, E., Behan-Pelletier, V., Briones, M.J.I., Chotte, J-L., De Deyn, G.B., Eggleton, P., Fierer, N., Fraser, T., Hedlund, K., Jeffery, S., Johnson, N.C., Jones, A., Kandeler, E., Kaneko, N., Lavelle, P., Lemanceau, P., M, D.H. 2016. European Commission, Publications *Global Soil Biodiversity Atlas*.
- Pan, Yude et al. 2011. «A large and persistent carbon sink in the world's forests». *Science*.
- Pimentel, David et al. 1995. «Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits». *Science*.
- Porta, Jaime. 1986. Col.Legi Oficial D'enginyers Aronoms de Catalunya *TECNICAS Y EXPERIMENTOS EN EDAFOLOGIA*.
- Poudel, D. D. et al. 2002. «Comparison of soil N availability and leaching potential, crop yields and weeds in organic, low-input and conventional farming systems in northern California». *Agriculture, Ecosystems and Environment*.
- Price, Morgan N., Paramvir S. Dehal, e Adam P. Arkin. 2010. «FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments». *PLoS ONE*.
- Pulleman, M., A. Jongmans, J. Marinissen, e J. Bouma. 2003. «Effects of organic versus conventional arable farming on soil structure and organic matter dynamics in a marine loam in the Netherlands». *Soil Use and Management*.
- Qi, Daihua et al. 2018. «Soil pH is the primary factor correlating with soil microbiome in karst rocky desertification regions in the Wushan County, Chongqing, China». *Frontiers in Microbiology*.
- R Core Team. 2020. «R: A language and environment for statistical computing.» *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
- Rawat, U S, e N K Agarwal. 2016. «Biodiversity : Concept , Threats and Conservation Biodiversity : Concept , threats and conservation». (December 2015): 18–28.
- Rousk, Johannes et al. 2010. «Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil». *ISME Journal*.
- Sabbagh, S. K., A. Poorabdollah, A. Sirousmehr, e A. Gholamalizadeh-Ahangar. 2017. «Bio-fertilizers and systemic acquired resistance in fusarium infected wheat». *Journal of Agricultural Science and Technology*.
- Schadt, Christopher W., Andrew P. Martin, David A. Lipson, e Steven K. Schmidt. 2003. «Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils». *Science*.
- Schnürer, Johan, Marianne Clarholm, Sven Boström, e Thomas Rosswall. 1986. «Effects of moisture on soil microorganisms and nematodes: A field experiment». *Microbial Ecology*.
- SEMPERE, A., J. OLIVER, e C. RAMOS. 1993. «Simple determination of nitrate in soils by second-derivative spectroscopy». *Journal of Soil Science*.
- Shi, Ling Ling et al. 2014. «Variation in forest soil fungal diversity along a latitudinal gradient». *Fungal Diversity*.
- Smith, S E, e D J Read. 2008. «Mycorrhizal Symbiosis 3rd edn Academic Press: San Diego». *Academic Press: San Diego*.
- De Snoo, G. R., e R. J. Van Der Poll. 1999. «Effect of herbicide drift on adjacent boundary vegetation». *Agriculture, Ecosystems and Environment*.
- Stopes, C., E.I. Lord, Philipps L.*, e L. Woodward. 2002. «Nitrate leaching from organic farms and conventional farms following best practice». *Soil Use and Management*.
- Sun, Jun Ming, Witold Irzykowski, Malgorzata Jedryczka, e Fen Xia Han. 2005. «Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified

polymorphic DNA markers». *Journal of Integrative Plant Biology*.

Swift, M. J. 2005. «Human impacts on biodiversity and ecosystem services: an overview» in *The Fungal Community its Organization and Role in Ecosystems*. : 627–641.

Taubner, Heidi, Birgit Roth, e Rolf Tippkötter. 2009. «Determination of soil texture: Comparison of the sedimentation method and the laser-diffraction analysis». *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*.

Tedersoo, Leho et al. 2014. «Global diversity and geography of soil fungi». *Science*.

Thuerig, Barbara et al. 2009. «Re-establishment of suppressiveness to soil- and air-borne diseases by re-inoculation of soil microbial communities». *Soil Biology and Biochemistry*.

Tilburg, the Netherlands: ECNC-European Centre for Nature Conservation. 2012. *Functional agrobiodiversity: Nature serving Europe's farmers*.

Tuck, Sean L. et al. 2014. «Land-use intensity and the effects of organic farming on biodiversity: A hierarchical meta-analysis». *Journal of Applied Ecology*.

United Nations. 1992. «CBD 1992». *Diversity*.

Vierna, J. et al. 2017. «PCR cycles above routine numbers do not compromise high-throughput DNA barcoding results». *Genome*.

Wagg, Cameron, S. Franz Bender, Franco Widmer, e Marcel G.A. Van Der Heijden. 2014. «Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(14): 5266–70.

Wakelin, S. A. et al. 2008. «Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils». *Soil Biology and Biochemistry*.

Wardle, David A. et al. 2003. «Long-term effects of wildfire on ecosystem properties across an island area gradient». *Science*.

———. 2012. «Linking vegetation change, carbon sequestration and biodiversity: Insights from island ecosystems in a long-term natural experiment». *Journal of Ecology*.

———. 2013. *Communities and Ecosystems: Linking the Aboveground and Belowground Components* *Communities and ecosystems: Linking the aboveground and belowground components*.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, e J. Taylor. 1990. «AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS». In *PCR Protocols*.

Yun, Yuan et al. 2016. «The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification». *Frontiers in Microbiology*.

Žifčáková, Lucia, Tomáš Větrovský, Adina Howe, e Petr Baldrian. 2016. «Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter». *Environmental Microbiology*.