

DIVERSIDAD FÚNGICA EN SUELOS CON DIFERENTES USOS EN LA REGIÓN PAMPEANA ARGENTINA

FUNGAL DIVERSITY IN SOILS WITH DIFFERENT USES IN THE PAMPEAN REGION OF ARGENTINA

Facundo Marcos Valle^{1*}, Virginia Moreno², Luciana Silvestro², Claudia Castellari¹, Alberto Diaz Delfino¹, Yolanda Andreoli¹, Liliana Picone¹

¹ Facultad Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata – Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Ruta Nacional 226, km 73.5, Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB), UNCPBA-CICBA, INBIOTEC-CONICET, Av. República de Italia 780, Azul, 7300 Buenos Aires, Argentina.

*Autor de contacto: marcosvalle.facundo@inta.gob.ar, fmarcosvalle@mdp.edu.ar

RESUMEN

Los hongos son relevantes en la descomposición de la materia orgánica, ciclado de nutrientes y su disponibilidad para las plantas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la comunidad fúngica de suelos con diferente uso utilizando la técnica PCR-DGGE. Se tomaron muestras de suelo (0-5 y 5-20 cm de profundidad) de agricultura continua bajo siembra directa (AC), monte de *Acacia* sp. (MA) y pastizal natural (PN), en la región pampeana Argentina. La composición de la comunidad de hongos fue analizada utilizando la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE). A partir de los perfiles de bandas de los geles DGGE se determinaron el número de bandas (S) y el coeficiente de similitud de Jaccard. Los perfiles obtenidos de la amplificación de fragmentos de ADN permitieron detectar especies únicas en los primeros 5 cm de suelo para los usos de MA, AC y PN, al igual que para MA y PN en los 5 a 20 cm de profundidad. Por otro lado, se observaron fragmentos compartidos entre los tres usos de suelo. El dendrograma identificó dos grupos, con un nivel de similitud próximo a 35%. Los perfiles moleculares determinaron que la comunidad del PN se diferenció de las de MA y AC, los cuales están más cercanos entre sí. En conclusión, la técnica PCR-DGGE permitió determinar diferencias en la composición de las comunidades fúngicas edáficas entre suelos con diferente uso en la región pampeana Argentina.

Palabras clave: micobiota edáfica, agricultura, DGGE, pastizal natural, monte.

ABSTRACT

Fungi have a key role in organic matter decomposition, nutrient cycling and nutrient availability to plants. The objective of the present study was to evaluate the fungal community of soils with different uses using the PCR-DGGE technique. Soil samples (0-5 and 5-20 cm depth) were taken from continuous agriculture under no-till (AC), *Acacia* sp. forest (MA) and prairie (PN) in the pampean region of Argentina. The fungal community was analyzed using the molecular technique polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The number of

bands (S) and Jaccard similarity coefficient were determined from band profiles of DGGE gels. The profiles obtained from amplification of DNA fragments allowed identifying unique species in the first 5 cm of the soil for MA, AC and PN uses as well as for MA and PN from 5 to 20 cm depth. On the other hand, shared fragments were observed among the three soil uses. The dendrogram identified two groups, with similarity coefficient close to 35%. The molecular profiles determined that the PN community differed from those of MA and AC, which are closer to each other. In conclusion, the PCR-DGGE technique allowed determining differences in the composition of edaphic fungal communities between soils with different use in the pampean region of Argentina.

Key words: edaphic mycobiota, agriculture, DGGE, prairie, forest.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias y los hongos del suelo son eslabones fundamentales en los ciclos biogeoquímicos (Frioni, 2011), siendo responsables del continuo ciclo de los compuestos orgánicos. En los suelos cultivados, los hongos constituyen la mayor parte de la biomasa microbiana total, aportando con más del 50% a la biomasa del suelo (Heredia Abarca et al., 2006). Pueden desarrollar asociaciones simbióticas con algas, insectos y plantas, y como fitopatógenos causan pérdidas relevantes en los cultivos. A su vez, y debido a su potencial producción de metabolitos secundarios, pueden ser utilizados en la industria para la producción de antibióticos, alcoholes y ácidos orgánicos (Méndez Zavala et al., 2007; Okafor, 2007), y en la degradación de xenobióticos y contaminantes orgánicos introducidos en el suelo (Frioni, 2011). Contribuyen a la agregación y formación de la estructura del suelo (Vázquez, 2015), condición que los posiciona como una herramienta importante para fomentar el secuestro de carbono (Zabala y Gómez, 2010), una de las prácticas aconsejada para mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero. La magnitud de las funciones desempeñadas por los hongos del suelo se puede deducir considerando su diversidad. Recientemente, Hawksworth y Lücking (2017) concluyeron que si bien la estimación citada para la comunidad fúngica es de 1,5 millones de especies existentes, el rango real es de 2,2 a 3,8 millones.

Durante las últimas dos décadas, los avances en metagenómica han permitido obtener desde perfiles metagenómicos de diferentes ambientes, sobre todo del suelo (Davenport y Tümmler, 2013) hasta secuenciación de ADN templados directamente del sustrato (Rascovan et al., 2013). De esta manera, se ha logrado identificar un gran número de especies no cultivables (Burgess et al., 2009). Una de las técnicas que permite observar y comparar perfiles metagenómicos de las comunidades microbianas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores para regiones conservadas en electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) (Giler

Mendoza, 2017). Esta metodología se utiliza para obtener perfiles de la estructura de la comunidad de hongos y otros microorganismos, y monitorear las modificaciones o impactos debidos a prácticas agrícolas o actividades industriales, entre otras (Sydorenko et al., 2012).

El cambio en el uso del suelo, especialmente la conversión de bosques en pastizales o campos cultivados y viceversa, es una actividad común en muchas regiones y uno de los factores fundamentales que modifica la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Arriaga, 2009). Existen evidencias que indican que las prácticas agrícolas causan más alteraciones cuantitativas que cualitativas en la comunidad de micro-hongos del suelo (Fracetto et al., 2013). El tipo de labranza como la rotación de cultivos modifican la comunidad de hongos. La reducción de las labranzas y el depósito de residuos de cultivos sobre la superficie del suelo promueven el desarrollo de los hongos (Toapanta Lema, 2016) a diferencia de la labranza convencional que estimula el crecimiento bacteriano (Pankhurst et al., 2002). Vargas Gil et al. (2011) observaron que las comunidades fúngicas estimadas por DGGE eran modificadas en su estructura debido al efecto combinado de la rotación de cultivos y las labranzas, donde el efecto de estas últimas era enmascarado por la heterogeneidad de los suelos agrícolas. Los sistemas de rotación con pasturas perennes y un cultivo por año favorecieron la diversidad fúngica, especialmente de especies potencialmente beneficiosas para el suelo y los cultivos (Silvestro et al., 2018). Kasel et al. (2008) encontraron una estrecha relación entre el uso del suelo y la composición de las comunidades fúngicas. Los suelos de sitios que tenían el mismo uso se agrupaban juntos a pesar de las distancias geográficas mientras que los diferentes usos del suelo de un mismo lugar estaban separados. Por otra parte, Lauber et al. (2008) observaron que variaciones en el nivel de nutrientes en el suelo (fósforo (P) extractable y relación C:N) pueden predecir mejor los cambios en la comunidad de hongos que el tipo de uso del suelo. Contrariamente, Lupatini et al. (2013) concluyeron que el cambio en el uso

y tipo de suelo fueron los determinantes de la estructura de la comunidad fúngica al comparar pastizal natural, bosque nativo, plantaciones de *Eucalyptus urophylla* y *Acacia mearnsii*, y cultivos de soja (*Glycine max*) y sandía (*Citrullus lanatus*).

Conocer cómo el uso del suelo afecta la estructura de la microbiota mejorará la capacidad para diseñar prácticas de manejo optimizadas, considerando que las comunidades fúngicas son un factor central en los ciclos biogeoquímicos del suelo (Bell et al., 2005), sobre todo como principales descomponedores. La conservación de la diversidad de hongos del suelo debería, por ende, favorecer una agricultura sustentable mediante el suministro de nutrientes, una mejor estructura del suelo y el desarrollo o promoción de antagonistas de los patógenos de las plantas.

En este contexto se planteó como objetivo evaluar el efecto que producen los diferentes usos del suelo sobre la diversidad de la comunidad fúngica, a partir del análisis de perfiles metagenómicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sitio experimental y toma de muestras de suelo

Las muestras de suelo se obtuvieron de un establecimiento agrícola-ganadero ubicado en el partido de Balcarce (37°75' S y 58°25' O), al sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. El suelo es un complejo de Argiudol típico fino, mixto, térmico serie Mar del Plata y Paleudol petrocálcico fino, illítico, térmico serie Balcarce (USDA, 2008). Las principales limitantes del suelo en la zona de muestreo son la susceptibilidad a la erosión hídrica y la escasa profundidad efectiva, en algunos casos menor a 50 cm, debido a la presencia de una capa de tosca cerca de la superficie (Rodríguez et al., 2015).

El clima de la región clasificado como mesotermal, húmedo-subhúmedo presenta una temperatura media anual del aire de 13°C y una precipitación mediana anual de 928 mm (promedio del período 1970-2000). El 80% de las lluvias se concentra en el período primavera-verano (INTA Balcarce, 2017).

Los muestreos de suelo se efectuaron en lotes (potreros) sujetos a usos contrastantes de suelo y cultivos, los cuales están localizados dentro de un paisaje continuo, y son clasificados como: 1) agricultura continua en siembra directa (AC) establecida a mediados de los años 90, la cual incluyó rotaciones con cultivos anuales como girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*) y soja (*Glycine max*); 2) monte de *Acacia* sp. (MA) siendo *Acacia melanoxylon* la especie dominante que se implantó

al pie de la sierra en 1940; y 3) pastizal natural (PN), un ambiente con una mínima actividad antrópica, compuesto por una flora nativa que se caracteriza por la abundancia de hierbas anuales o perennes, arbustos y gramíneas. Los lotes bajo los distintos usos se encuentran aproximadamente dentro de un radio de 2 km uno de otro.

En cada uso del suelo se seleccionó un área homogénea en base a características de relieve y pendiente en la cual se tomaron, al azar, entre 20 y 25 sub-muestras, con un barreno de 2 cm de diámetro, las cuales se mezclaron para integrar una muestra compuesta de aproximadamente 2 kg. Siguiendo este procedimiento, se extrajeron cuatro muestras compuestas por cada uso del suelo y profundidad de muestreo que fue de 0-5 y 5-20 cm, durante febrero del año 2013. En el mismo momento, primero se extrajeron las muestras de 0-5 cm y luego las del estrato de 5-20 cm. Las muestras se mantuvieron refrigeradas en un conservador para ser posteriormente transportadas al laboratorio de Microbiología de Suelos y Alimentos de la Unidad Integrada Balcarce (UIB). En el laboratorio las muestras fueron tamizadas con una malla de 2 mm de diámetro para remover raíces, restos de residuos orgánicos y piedras.

Las muestras con su contenido de humedad original fueron conservadas a -20°C (Cui et al., 2014) hasta la realización del análisis molecular, siendo descongeladas durante 24 h a 20°C (Paetz y Wilke, 2005) previamente a la extracción del ADN.

Análisis molecular Extracción del ADN

Se mezclaron las cuatro (4) muestras compuestas de cada uso del suelo y para cada profundidad por separado y, a partir de esta muestra, se tomaron dos (2) submuestras que se utilizaron en el análisis molecular.

El ADN total se extrajo a partir de 0,25 g de suelo, empleando el kit comercial MOBIO Power Soil™ DNA (MOBIO Laboratories, Carlsbad, California, USA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Posteriormente se verificó la pureza del ADN vía electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y se cuantificó usando el fluorómetro (Qubit® de Invitrogen, California USA). El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su utilización en las reacciones de amplificación.

Amplificación del ADN. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las secuencias del gen de la subunidad ribosomal 18S (rADN 18S) y la región ITS fueron amplificadas mediante PCR utilizando dos pares de cebadores específicos para hongos,

Factor de Elongación (EF) y el Espacio Interno Transcripto (ITS), EF4/ITS4 (White et al., 1990; Smith et al., 1999) e ITS1FGC/ITS2 (White et al., 1990; Gardes y Bruns 1991). El ITS del ADNr es una de las regiones del ADN más ampliamente utilizada como cebador de diseño para identificar taxones fúngicos ya que contiene dos regiones no codificantes variables que se encuentran entre la subregión pequeña altamente conservada (18S), la subunidad 5.8S y la subunidad grande (28S). Además, varias características hacen que ésta sea una región conveniente para la identificación molecular de los hongos debido a: a) es de aproximadamente 600 y 800 pares de bases y puede ser fácilmente amplificada con los cebadores complementarios a las secuencias dentro de los genes ADNr (White et al., 1990); b) al ser de copias múltiples el ADNr, hace que la región ITS sea fácil de amplificar a partir de poca cantidad de templado; y c) varios estudios han demostrado que la región ITS es variable entre las especies y poco variable intra-especies (Gardes y Bruns, 1991; Chen et al., 1992; Lee y Taylor, 1992; O'Donnell, 1992).

Se realizaron dos PCR anidadas con el objetivo de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección del fragmento de interés. La primera PCR se realizó con los cebadores EF4/ITS4 de ≈ 900 pb a un volumen total de 25 μ L, en un termociclador (XP Cyclor de Bioer Technology, Zhejiang, China.). La mezcla de reacción contenía 100 ng de ADN genómico, 0,5 μ L de dNTPs (5 mM), 0,5 μ L de cada cebador (EF4/ITS4, 50 μ M), 2,5 μ L de $MgCl_2$ (2,5 mM), 2,5 μ L de buffer 10x, 0,2 μ L de Taq 1U y 17,3 μ L de agua destilada estéril. Las condiciones de la amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 44°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Al mismo tiempo se realizó un blanco donde la muestra de ADN fue reemplazada por agua destilada estéril. Alícuotas de la amplificación se examinaron vía electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% para chequear el tamaño de los fragmentos e integridad, con un marcador de peso molecular de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Argentina). Observadas las bandas en el gel se realizó la segunda amplificación.

La segunda PCR se ejecutó utilizando los cebadores ITS1F-GC/ITS2 (≈ 300 pb) a un volumen final de 25 μ L compuesto por 1 μ L de producto de la amplificación de la primer reacción, 0,5 μ L de dNTPs (5 mM), 0,5 μ L de cada cebador (ITS1F-GC e ITS2, 50 μ M), 2,5 μ L de Cl_2Mg (2,5 mM), 2,5 μ L de buffer 10x, 0,2 μ L de Taq 1U y 17,3 μ L de agua destilada estéril. En esta segunda reacción, las condiciones fueron iguales a las de la primera

amplificación, sólo se cambió la temperatura de hibridación la cual fue de 50°C. Al mismo tiempo se realizó un blanco donde la muestra de ADN fue reemplazada por agua destilada estéril. Los productos de la PCR fueron analizados por su longitud mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% con un marcador de peso molecular de 100 pb (Genbiotech S.R.L., Argentina). Una vez que se observaron las bandas, los productos de esta segunda amplificación se conservaron a -20°C para ser posteriormente, analizados en el gel de DGGE.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Para el análisis de los diferentes fragmentos obtenidos se utilizó la técnica de DGGE, usando gel de acrilamida al 8% con un gradiente desnaturalizante de 10% a 50% de urea y formamida (w:v). Para la corrida electroforética se preparó el equipo de VS20-DGGE (Cleaver Scientific Ltd., Warwickshire, United Kingdom), siguiendo las instrucciones descriptas del fabricante. A los productos de reacción (20 μ L) se les agregó 5 μ L de bromofenol- sacarosa como buffer de carga, y se colocó un blanco. La DGGE se realizó en condiciones constantes de 60°C y 70 V durante 6 h usando como buffer de corrida TAE 1 X (Tris-acetato-EDTA) de acuerdo con Silvestro et al. (2018). Finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con tinción de plata de acuerdo al protocolo de Dinolfo (2014).

Análisis numérico del patrón de bandas y estadístico

Los patrones de bandas fueron interpretados visualmente utilizando el software TotalLab 100® (Nonlinear Dynamics, Orlando, Florida, USA). Se registraron las intensidades y posiciones relativas de todas las bandas en los geles. Se asumió que cada una de estas bandas corresponde a una unidad taxonómica operativa (OTU) presente en la comunidad microbiana (Shannon et al., 2002). A partir del análisis de los patrones de bandas de los perfiles moleculares se calculó la riqueza de especies (S) de acuerdo a Sigler y Turco (2002). Se realizó un test de Tukey (HSD, nivel de significancia del 5%) para determinar diferencias significativas en el número de bandas entre los perfiles de suelo de cada uso (R versión 3.0.0, 2013). Se construyó una matriz básica de datos (MBD) de presencia/ausencia para el análisis de los perfiles obtenidos, en la cual cada unidad se correspondió con una muestra de suelo. A partir de la MBD se estimó el coeficiente de similitud de Jaccard (Sneath y Sokal, 1973) utilizando como técnica de agrupación la media aritmética no ponderada (UPGMA), y el paquete estadístico

NTSYS 2.1 (Numerical Taxonomy System) (Rohlf, 1998; Silvestro et al., 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al considerar el uso y la profundidad del suelo, se observó que el número total de bandas osciló entre el valor mínimo de 4 en AC para 5 a 20 cm de suelo y el máximo de 23 en AC para 0 a 5 cm de profundidad (Fig. 1). Con respecto al uso, sumando las bandas presentes en ambos estratos de suelo, el mayor número de bandas se

obtuvo en AC (promedio 29) y el menor en MA (promedio 23), indicando una mayor diversidad de taxones fúngicos en el suelo agrícola. Una mayor diversidad de plantas podría promover una mayor riqueza de especies microbianas debido a la presencia de una mayor variedad de nichos y micro-nichos y/o de interacciones específicas entre plantas y microorganismos. Contrariamente, una comunidad microbiana más homogénea en su composición puede estar asociada con una baja diversidad de plantas (Brodie et al., 2003). El sistema AC incluye la

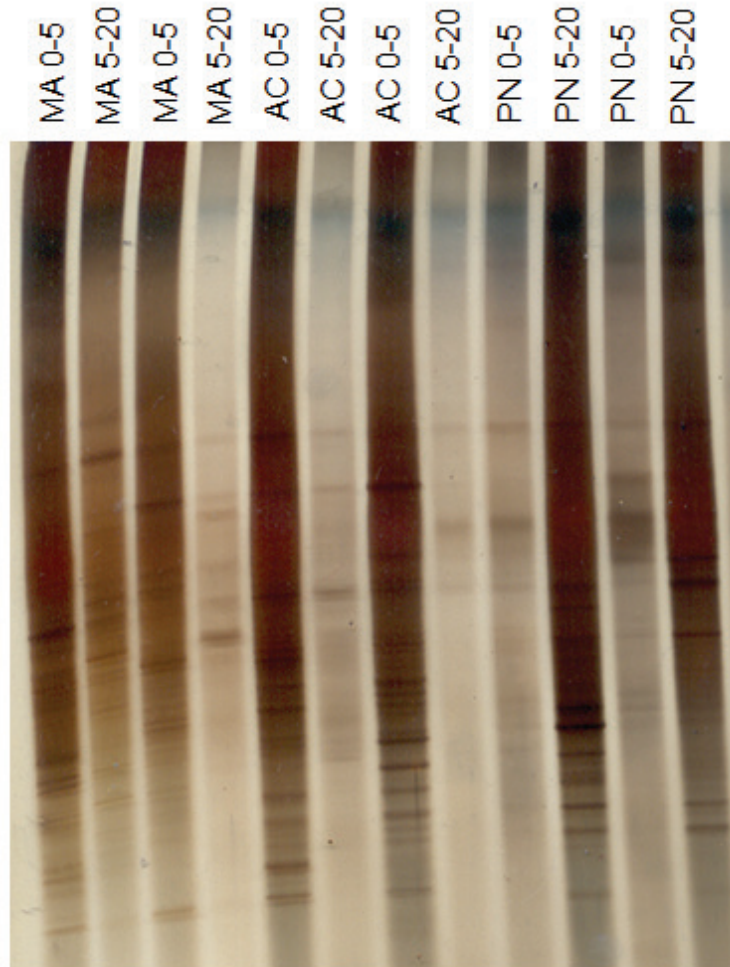


Fig. 1. Visualización del perfil de bandas generado utilizando DGGE (gel de acrilamida 8%, gradiente 10-50% de formamida:urea, 6 hs a 70 V y tinción con plata) para los productos de amplificación de las secuencias del gen 18S rDNA a partir de las amplificaciones con los cebadores EF4/ITS4 e ITS1FGC/ITS2. Arriba de cada calle del gel se indica el tratamiento, donde MA: monte de *Acacia* sp.; AC: agricultura continua; y PN: pastizal natural, a profundidades de 0-5 y 5-20 cm.

Fig. 1. Visualization of the band profile generated using DGGE (8% acrylamide gel, 10-50% gradient of formamide: urea, 6 h at 70 V and silver staining) for the amplification products of the 18S rDNA gene sequences from the amplifications with the EF4 / ITS4 and ITS1FGC / ITS2 primers. The treatment is indicated above each lane of the gel, where MA: *Acacia* sp. forest; AC: continuous agriculture; and PN: prairie, at depths of 0-5 and 5-20 cm.

alternancia de distintos cultivos anuales en la rotación, lo que contribuiría a la diversidad de plantas y, por ende, a la diversidad de la comunidad fúngica, a diferencia de los sistemas MA y PN caracterizados por poseer una menor variación de especies vegetales, ya sea *Acacia* y gramíneas, respectivamente. Si bien las especies vegetales dominantes en el pastizal pueden cambiar en abundancia relativa en el tiempo, la composición de la comunidad vegetal sigue siendo similar, sin sucesión hacia un tipo de comunidad diferente (Altesor, Ayala y Paruelo, 2010). Asimismo, Pérez Brandán et al. (2010) registraron más especies fúngicas en muestras superficiales de suelo provenientes de una rotación de soja, poroto y maíz, que en aquellas correspondientes a los respectivos monocultivos. Dependiendo de los cultivos que se alternen en la rotación, se modificará la diversidad y actividad de los microorganismos del suelo, debido a diferencias en la cantidad y calidad de exudados, y compuestos orgánicos aportados por el sistema radical y el residuo de los cultivos (Vargas Gil et al., 2009). En el presente trabajo se observó que la mayor riqueza de taxones fúngicos correspondió al uso de AC, no concordando con lo determinado por Silvestro et al. (2018) quienes concluyeron que los suelos con pasturas reunían las condiciones óptimas para el desarrollo de especies fúngicas

respecto a aquellas registradas bajo agricultura continua.

En cuanto a la profundidad de suelo, se observaron más bandas ($p < 0,05$) en los primeros 5 cm de suelo respecto a los 5 a 20 cm para AC, no así para MA y PN en los cuales no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el número de bandas entre ambas profundidades (Fig. 2). Estos resultados constituyen evidencias que contribuirían a explicar que la diversidad microbiana varía considerablemente a través del espacio y esta variación está ligada a cambios en factores abióticos y bióticos (Martiny et al., 2006; Green et al., 2008). Por otro lado, en los sistemas agrícolas conservacionistas la acumulación de residuos en superficie (Kladivko, 2001), la estratificación de la materia orgánica y la distribución de nutrientes (Kandeler et al., 1999), podrían afectar la diversidad fúngica. Según Buckling et al. (2000), las alteraciones asociadas con las labranzas pueden promover determinados patrones de diversidad microbiana en el suelo, al favorecer especies que son más tolerantes a la perturbación a expensas de las mejores competidoras. Aunque éstos y otros factores como la porosidad o compactación del suelo asociada a diferentes usos del mismo pueden influir en las variables estudiadas, los mismos no fueron determinados en la presente investigación.

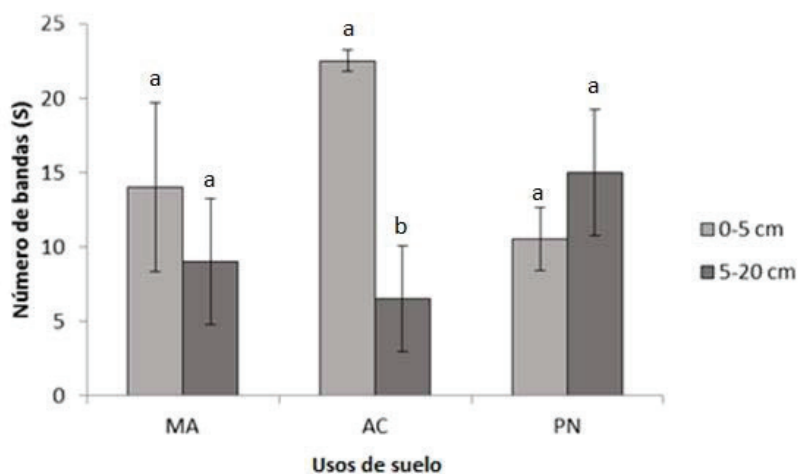


Fig. 2. Diversidad fúngica edáfica expresada por su riqueza específica (número de bandas, S) para los distintos usos (MA: monte de *Acacia* sp.; AC: agricultura continua; PN: pastizal natural) y profundidades de suelo (0 a 5 y 5 a 20 cm). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre profundidades dentro de un mismo uso de suelo. Las barras en cada columna representan el desvío estándar de la media.

Fig. 2. Edaphic fungal diversity expressed by its specific richness (number of bands, S) for different soil uses (MA: *Acacia* sp. forest; AC: continuous agriculture; PN: prairie) and depths (0 to 5, and 5 to 20 cm). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between depths within the same soil use. Bars in each column represent the standard deviation of the mean.

Los perfiles de amplificación permitieron identificar secuencias únicas de ácidos nucleicos en las muestras de suelo correspondientes a los primeros 5 cm del estrato para MA, AC y PN. Asimismo, en los 5 a 20 cm de profundidad para MA y PN, a diferencia de AC donde no se observaron secuencias únicas en el gel y además coincidió con la menor riqueza de grupos o taxones fúngicos (Fig. 2). Deacon et al. (2006) mencionaron que los hongos pertenecientes al grupo Basidiomicetes eran los descomponedores principales de la materia orgánica en suelos de pradera a diferencia de los suelos agrícolas donde dominaban los Ascomycetes.

El índice de similitud de Jaccard presenta, por lo general, valores inferiores a 40% denotando la heterogeneidad fúngica entre los usos y entre las profundidades del suelo. Al analizar el dendrograma obtenido se identificaron dos grupos que incluyeron a todas las muestras de suelo. Estos grupos se definieron en cuatro conglomerados (Fig. 3). El primer conglomerado (inferior en la Fig. 3) se compone de dos observaciones, correspondientes a las dos muestras de suelo PN para 5 a 20 cm de profundidad, con un índice de similitud del 40% entre muestras. El segundo conglomerado está integrado por tres observaciones que incluyen una muestra de suelo AC para la profundidad de 5-20 cm y las dos

muestras de suelo PN para 0-5 cm, mostrando una similitud cercana a 35% entre ellas. El tercer conglomerado se compone de tres observaciones que representan las dos muestras de suelo MA de 5 a 20 cm y una muestra de una repetición del uso AC para la profundidad de 5 a 20 cm, exhibiendo un nivel de similitud del 35%. El cuarto conglomerado (superior en la Fig. 3) está formado por cuatro observaciones. En éste, se agrupan los cuatro perfiles moleculares provenientes de las muestras de suelo MA y AC para la profundidad de 0 a 5 cm (dos observaciones de cada uso), con niveles de similitud del 35%. El dendrograma pone en evidencia que los perfiles moleculares del suelo con PN se diferenciaron de aquéllos con usos MA y AC los cuales están más cercanos entre sí, indicando diferencias entre las comunidades fúngicas presentes en cada uso del suelo. Fracetto et al. (2013) observaron un efecto similar de la vegetación sobre la comunidad de hongos, donde las muestras de suelo bajo pastura se separaban de aquellas de suelos agrícolas y forestales, las cuales estaban más cerca entre sí. La diferenciación en cuanto a la composición de hongos en PN con respecto a los restantes usos podría atribuirse al tipo de vegetación con predominio de gramíneas. La alta productividad, la densa acumulación de raíces en los 10 cm superiores del suelo con disponibilidad de exudados radicales, y la

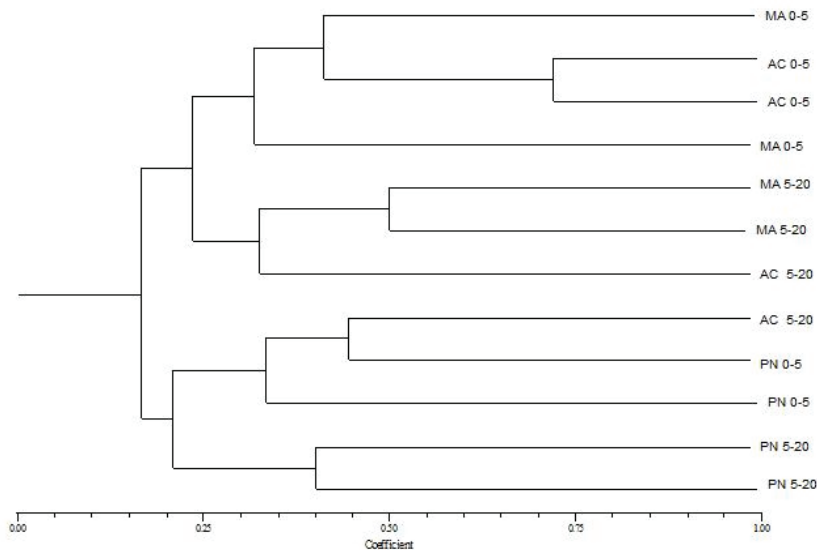


Fig. 3. Dendrograma basado en el análisis estadístico (UPGMA) y coeficiente de Jaccard, de los perfiles obtenidos mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de muestras de suelo bajo monte de *Acacia* sp. (MA), agricultura continua (AC), y pastizal natural (PN), para profundidades de 0 a 5 y 5 a 20 cm.

Fig. 3. Dendrogram based on statistical analysis (UPGMA) and Jaccard coefficient of profiles obtained by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil samples under *Acacia* sp. forest (MA), continuous agriculture (AC) and prairie (PN), for depths of 0 to 5 and 5 to 20 cm.

muerte completa de plantas de cada año que deja sus residuos, conducen a la formación de un gran pool de materia orgánica activa en comparación con los sitios cultivados (Espinoza, 2010). El pastizal anual es una comunidad de plantas con menos de una docena de especies dominantes de fenología similar pero con sectores que contienen miles de plantas por metro cuadrado (Altesor, et al., 2010). Varios estudios señalan el efecto de la vegetación en la estructura de la comunidad fúngica (Brodie et al., 2003; Kasel et al., 2008; Urcelay, et al., 2010).

Si bien los valores de similitud no superaron el 50%, los usos MA y AC se agruparon juntos lo cual indicaría que los usos de suelo mencionados presentan grupos o taxones fúngicos en común, donde ocho bandas fueron observadas en MA y AC, y no se identificaron en PN. Posiblemente sean grupos fúngicos celulíticos ya que son dos ambientes donde la deposición de materia orgánica es estacional, ya sea por la caída de flores o frutos de las *Acacias* en primavera, o por la acumulación de los restos vegetales de los cultivos anuales en el caso del suelo con uso agrícola. Una manera de completar esta hipótesis sería poder tipificar las bandas en común para estos dos usos del suelo. No obstante, aunque el uso del suelo sea MA o AC, puede no afectarse la diversidad de la comunidad de hongos pero la funcionalidad de esta comunidad puede sufrir alteraciones ya que la abundancia relativa de las especies puede cambiar.

CONCLUSIONES

La técnica PCR-DGGE permitió obtener patrones de la diversidad fúngica asociada al uso del suelo y la profundidad del perfil en suelos del sudeste bonaerense, Argentina. Se determinó que los perfiles moleculares provenientes del suelo con PN se diferenciaron de aquéllos con MA y AC. Además, el suelo bajo AC y en el estrato 0-5 cm fue el que presentó mayor número de perfiles moleculares diferenciados por la técnica utilizada. Respecto de la profundidad, la técnica empleada detectó secuencias únicas de ácidos nucleicos para los usos MA, AC y PN, en los primeros 5 cm y para MA y PN en los 5 a 20 cm de profundidad. Estos resultados evidenciarían diferencias en la composición de las comunidades fúngicas entre diferentes usos del suelo, aunque un abordaje integral complementando los presentes resultados con metodologías de identificación fúngica específica brindaría información relevante que permitiría obtener conclusiones de interés en el área de la ecología microbiana del suelo.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Mar del Plata dentro del Proyecto de Investigación denominado "Evaluación de comunidades microbianas como indicadores biológicos del uso del suelo" Código AGR 429/14 y por el Proyecto PIP-CONICET 2014-2016 COD: 112-20130100280.

LITERATURA CITADA

- Altesor, A., W. Ayala, y J.M. Paruelo. 2010. Bases ecológicas y tecnológicas para el manejo de pastizales. 234 p. ISBN: 978-9974. Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA, Andes 1365, Montevideo, Uruguay.
- Arriaga, L. 2009. Implicaciones del cambio de uso de suelo en la biodiversidad de los matorrales xerófilos: un enfoque multiescalar. *Investigación Ambiental* 1(1):6-16
- Bell, T., J.A. Newman, B.W. Silverman, S.L. Turner, and A.K. Lilley. 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436:1157-1160.
- Brodie, E., S. Edwards, and N. Clipson. 2003. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology* 45:105-114.
- Buckling, A., R. Kassen, G. Bell, and P.B. Rainey. 2000. Disturbance and diversity in experimental microcosms. *Nature* 408:961-964.
- Burgess, T., W. Bihon, M.J. Wingfield, and B.D. Wingfield. 2009. Newsletter of the Mycological Society of America. *Inoculum* 60:1-10.
- Chen, W., J.W. Hoy, and R.W. Schneider. 1992. Species specific polymorphism in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Exp. Mycology* 16:22-34.
- Cui, H., C. Wang, Z. Gu, H. Zhu, S. Fu, and Q. Yao. 2014. Evaluation of soil storage methods for soil microbial community using genetic and metabolic fingerprintings. *European Journal of Soil Biology* 63:55-63.
- Davenport, C.F., and B. Tümmler. 2013. Advances in computational analysis of metagenome sequences. *Environmental Microbiology* 15(1):1-5.
- Deacon, L.J., E.J. Pryce-Miller, J.C. Frankland, B.W. Bainbridge, P.D. Moore, and C.H. Robinson. 2006. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38:7-20.

- Dinolfo, M.I. 2014. Caracterización de *Fusarium poae* mediante metodologías moleculares y su potencial producción de toxinas. p. 1-128. Tesis Doctor en Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Espinoza, Y. 2010. Efecto de la labranza sobre la materia orgánica y tamaño de agregados en un suelo cultivado con maíz en condiciones tropicales. *Bioagro* 22 (3):177-184.
- Fracetto, G.G.M., L.C.B. Azevedo, F.J.C. Fracetto, F.D. Andreote, M.R. Lambais, and L.H. Pfenning. 2013. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)* 70(2):59-67.
- Frioni, L. 2011. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. 1a ed. 768 p. ISBN 978-987-9260-85-2. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina.
- Gardes, M., and T.D. Bruns. 1991. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2):113-118.
- Giler Mendoza, J.E. 2017. Caracterización de las comunidades microbianas en suelos cultivados con banano bajo sistemas de manejo orgánico y convencional. 104 p. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Green, J.L., B.J.M. Bohannan, and R.J. Whitaker. 2008. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* 320:1039-1043.
- Hawksworth, D.L., and R. Lucking. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species DOI: 10.1128/microbiolspec. *Microbiology Spectrum* 5(4).
- Heredia Abarca, G., R.M. Arias Mota, J. Mena-Portale, y A. Mercado-Sierra. 2006. Adiciones al conocimiento de la diversidad de los hongos conidiales del bosque mesófilo de montaña del estado de Veracruz. *Acta Botánica Mexicana* 77:15-30.
- INTA Balcarce. 2017. Estación Agrometeorológica. Disponible en <https://inta.gob.ar/paginas/agrometeorologia-balcarce> (Consulta 22 diciembre 2017).
- Kandeler, E., D. Tschirko, and H. Spiegel. 1999. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a chernozem under different tillage management. *Biology and Fertility of Soils* 28:343-351.
- Kasel, S., L.T. Bennett, and J. Tibbits. 2008. Land use influences soil fungal community composition across central Victoria, south-eastern Australia. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1724-1732.
- Kladivko, E.J. 2001. Tillage systems and soil ecology. *Soil Tillage Res* 61:61-76
- Lauber, C.L., M.S. Strickland, M.A. Bradford, and N. Fierer. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry* 40:2407-2415.
- Lee, S.B., and J.W. Taylor. 1992. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9(4):636-653.
- Lupatini, M., R.J.S. Jacques, Z.I. Antonioli, A.K.A. Suleiman, R.R. Fulthorpe, and L.F.W. Roesch. 2013. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29:223-33.
- Martiny, J.B.H., B.J.M. Bohannan, J.H. Brown, R.K. Colwell, J.A. Fuhrman, J.L. Green, et al. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4:102-112.
- Méndez-Zavala, A., J. C. Contreras-Esquivel, F. Lara-Victoriano, R. Rodríguez-Herrera, y C. N. Aguilar. 2007. Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerófila *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6:267-273.
- O'Donnell, K.L. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22(3):213-220.
- Okafor, N. 2007. Modern industrial microbiology and biotechnology. p. 1-523. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA.
- Paetz, A., and B.M. Wilke. 2005. Soil sampling and storage. p. 1-45. En Margesin, R. and F. Schinner (eds.). *Manual of soil analysis: Monitoring and assessing soil bioremediation*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.
- Pankhurst, C.E., C.A. Kirkby, B.G. Hawke, and B.D. Harch. 2002. Impact of a change in tillage and crop residue management practice on soil chemical and microbiological properties in a cereal-producing red duplex soil in NSW Australia. *Biology and Fertility of Soils* 35:189-19.

- Pérez Brandán, C., J. Huidobro, C. Conforto, J. L. Arzeno, G. March, J. Meriles, et al. 2010. Efecto de la rotación de cultivos sobre la diversidad de las comunidades microbianas del suelo cuantificado mediante PCR-TRFLP. XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. 31 de mayo al 4 junio de 2010. Bolsa de Comercio de Rosario, Rosario, Santa Fé, Argentina.
- R versión 3.0.0. 2013. The R foundation for statistical computing. Institute for Statistics and Mathematics. Wirtschaftsuniversität Wien Welthandelsplatz 1 1020, Vienna, Austria.
- Rascovan, N., B. Carbonetto, S. Revale, M. Reinert, R. Alvarez, A.M. Godeas, et al. 2013. The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils. *Microbiome* 1:21.
- Rodríguez, S., C. Videla, E.C. Zamuner, L.I. Picone, N.N. Pose, y N.O. Maceira. 2015. Cambios en propiedades químicas de un suelo molisol de la región pampeana Argentina con diferente historia de manejo. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Science, ex Agro-Ciencia* 31:137-14.
- Rohlf, F. 1998. NTSYS-PC. Software versión 2.0. Exeter software. Setauket, New York, USA.
- Shannon, D., A.M. Sen, and D.B. Johnson. 2002. A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. *Soil Use and Management* 18:274-283.
- Sigler, W.V., and R.F. Turco. 2002. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Soil Ecology* 21:107-118.
- Silvestro, L.B., F. Biganzoli, S.A. Stenglein, H. Forjan, L. Manso, and M.V. Moreno. 2018. Mixed cropping regime promote the soil fungal community under zero tillage. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 111(7):1055-1064.
- Smith, E., P. Leeflang, B. Glandorf, J.D. van Elsas, and K. Wernars. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2614-2621.
- Sneath, P.H.A., and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy – the principles and practice of numerical classification. WH Freeman, San Francisco, USA.
- Sydorenko, O., M. Tosi, A. Martinez, J. Orlowski, M. Barraco, M. Díaz-Zorita, et al. 2012. Relevamiento de la diversidad microbiana en suelos agrícolas de la Región Pampeana. XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Toapanta Lema, O.F. 2016. Efecto de labranza convencional y siembra directa en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y en la producción de tres cultivos de la sierra. 81 p. Trabajo de grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Urcelay, C., G. Grilli, y S. Longo. 2010. Efectos de los cambios ambientales sobre las comunidades de hongos micorrícicos en bosques nativos de la Provincia de Córdoba. Disponible en <http://www.corciencia.org.ar/4976/> (Consulta 27 septiembre 2018).
- Vargas Gil, S., J. Meriles, C. Conforto, G. Figoni, M. Basanta, E. Lovera, et al. 2009. Field assessment of soil biological and chemical quality in response to crop management practices. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25:439-44.
- Vargas Gil, S., J. Meriles, C. Conforto, M. Basanta, V. Radl, A. Hagn, et al. 2011. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology* 47:55-60.
- Vázquez, M.B. 2015. Estudio de las comunidades fúngicas en un suelo del SO bonaerense tratado con glifosato y 2,4-D. 158 p. Tesis para optar al grado de Dr. en Biología. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. and T.J. White (eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA.
- USDA. 2008. Soil Classification. Official Soil Series Descriptions. Soil Survey Staff, Natural Resources. Conservation Service, United States Department of Agriculture, Washington DC, USA.
- Zabala, M., y Y. Gómez. 2010. Biomasa fúngica y bacteriana como indicadoras del secuestro de C en suelos de sabanas sustituidos por pinares en Uverito, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 58 (3):977-989.