



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

# Microbioma y grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental asociados al cultivo de arroz (*Oryza sativa*)

Andrea Martínez Pereyra

Programa de Posgrado en Química  
Facultad de Química  
Universidad de la República

Montevideo – Uruguay  
Noviembre de 2020



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

# Microbioma y grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental asociados al cultivo de arroz (*Oryza sativa*)

Andrea Martínez Pereyra

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Química.

Director:

Prof. Adj. Dra. Lucía Ferrando Magnabosco

Montevideo – Uruguay

Noviembre de 2020

Martínez Pereyra, Andrea

Microbioma y grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental asociados al cultivo de arroz (*Oryza sativa*) / Andrea Martínez Pereyra. - Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Química, 2020.

XVII, 203 p.: il.; 29, 7cm.

Director:

Lucía Ferrando Magnabosco

Tesis de Maestría – Universidad de la República, Programa en Química, 2020.

Referencias bibliográficas: p. 153 – 174.

1. microbioma, 2. rizósfera, 3. endósfera, 4. bacterias reductoras de sulfato, 5. bacterias desnitrificantes, 6. arroz. I. Ferrando Magnabosco, Lucía, . II. Universidad de la República, Programa de Posgrado en Química. III. Título.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

---

Dra. Carolina Leoni

---

Dr. Sebastián Martínez

---

Prof. Agr. Dra. Silvana Vero

Montevideo – Uruguay  
Noviembre de 2020

# Agradecimientos

## *Apoyo Financiero*

Quisiera agradecer a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) de la Udelar por otorgarme una beca de apoyo a docentes para estudios de maestría. Asimismo, agradezco a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Udelar por financiar un proyecto de Iniciación a la Investigación (Modalidad 2 - 2015, ID: 44) del cual fui responsable, así como también por otorgar apoyo financiero al grupo de investigación “Biogeoquímica bacteriana en suelos agrícolas”, del cual formo parte, mediante el Programa de apoyo a Grupos de Investigación 2014 (ID del Grupo: 978). Ambos apoyos permitieron solventar los gastos de este trabajo. También quisiera agradecer al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por el apoyo económico brindado como estudiante de maestría del Programa.

## *Apoyo Académico*

Agradezco a los miembros del tribunal por su disposición para leer esta tesis, corregirla y realizar sus aportes.

Gracias a Lucía, mi tutora, por haberme recibido en su grupo de trabajo y aceptarme como su estudiante. Gracias por su paciencia y dedicación, por brindarme todas las oportunidades a su alcance, orientar y estimular mi desarrollo académico.

Gracias a Ana, por su apoyo y aliento durante estos años, y por siempre estar dispuesta a compartir sus conocimientos y experiencias.

## *Apoyo técnico*

Muchas gracias a todos los que aportaron para que este trabajo haya sido posible. Gracias a Cecilia Ghiazza por ayudarme con las extracciones de ADN de raíces. A Luciana Pereira, por realizar la cuantificación de genes *mcrA* en las muestras de suelo, rizósfera y raíces, y por su gran ayuda con los análisis bioinformáticos de los datos de secuenciación masiva. También a Sabrina Magallanes que participó en las amplificaciones del gen *nirK* para el T-RFLP, en el marco de su trabajo experimental.

Agradezco a Lucía Salvo y Marcelo Ferrando por orientarme en las determinaciones de los parámetros químicos de los suelos que realicé en Facultad de Agronomía.

Gracias a INIA Treinta y Tres, y en particular al grupo de investigación en arroz

dirigido por José Terra, por poner a disposición el ensayo de campo y los datos de textura del suelo, y por su colaboración con los muestreos realizados en la Unidad Experimental Paso de la Laguna.

*Apoyo personal*

Muchas gracias a todos los que formaron parte del Área de Microbiología durante estos años, por la integración, el compañerismo y el excelente ambiente de trabajo generado siempre.

El particular, quiero agradecer a todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental, los actuales y los que estuvieron durante estos años. Gracias por hacer de “el tercero”, un lugar donde el trabajo diario es un verdadero disfrute, donde siempre lo colectivo está por encima de lo individual. Gracias a todos por las charlas y los momentos compartidos: Lucía, Ana, Silvana, Javier, Inés, Gastón, Laura, Nadia, Daniela, Mariana, Lupe, Ceci, Vale, Sofi, Diego y David.

Un agradecimiento especial a Silvana, por su energía y su sensibilidad. Gracias por hacer de los viajes y muestreos recuerdos únicos.

Gracias a mi familia y amigas, por estar siempre, en las buenas y en las no tan buenas, y por alentarme siempre a realizar mis sueños.

A Ernesto, mi compañero, por su apoyo incondicional, por ayudarme a desenchufar la mente cuando estaba a punto de colapsar y enseñarme a disfrutar las cosas simples de la vida.

## RESUMEN

El microbioma asociado a las plantas de interés agrícola, especialmente a nivel de las raíces, juega un papel fundamental en el reciclado de nutrientes y contribuye mediante distintos mecanismos al crecimiento y salud de la planta. En el cultivo de arroz irrigado, la inundación ocasiona una disminución en el potencial redox, generándose rápidamente condiciones anaerobias en el sistema. Mientras el suelo se mantiene en condiciones anóxicas, la entrada de oxígeno a través del aerénquima a nivel de la rizósfera de la planta de arroz crea un ambiente parcialmente óxico en donde conviven procesos anaerobios y aerobios. En este sistema, las bacterias desnitrificantes y las bacterias reductoras de sulfato (BRS) presentan gran relevancia ambiental, ya que participan en el reciclado de nutrientes como el carbono y el nitrógeno e intervienen en los procesos microbianos de producción y consumo de gases de efecto invernadero y de intermediarios metabólicos implicados en la emisión de estos gases.

En Uruguay, el arroz es uno de los principales rubros de exportación. El sistema de producción utilizado tradicionalmente en nuestro país que se basa en la rotación del cultivo de arroz con varios años de pasturas es considerado de baja intensidad y reducido impacto ambiental, y se cree que éste ha sido la base para la obtención de los excelentes rendimientos alcanzados. La reciente intensificación en los sistemas de producción arroceros puede modificar la disponibilidad de nutrientes y, por lo tanto, la composición de las poblaciones microbianas presentes tanto en suelo como asociadas a la planta.

En esta tesis se llevó a cabo el estudio de las comunidades microbianas de suelo y asociadas a plantas de arroz provenientes de un ensayo de campo, utilizando distintas herramientas moleculares. Se seleccionaron tres sistemas de rotación arroceros con diferente grado de intensificación y se tomaron muestras en dos etapas del desarrollo de la planta y manejo de agua. Mediante secuenciación masiva de genes 16S rRNA, se estudió la dinámica del microbioma bacteriano de suelo, rizósfera y raíces de arroz en los distintos sistemas de rotación a lo largo del ciclo de cultivo, y se evaluó el efecto de la intensificación sobre estas comunidades.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el microbioma asociado al cultivo de arroz se vio determinado principalmente por el nivel de influencia de la planta sobre los distintos nichos asociados a las raíces (suelo, rizósfera y endósfera) y en segundo lugar por las condiciones redox del suelo establecidas luego de la inundación. Los distintos compartimientos presentaron comunidades claramente diferentes, presentando diferentes phyla dominantes. Mientras las comunidades del suelo se vieron dominadas por bacte-

rias de los phyla *Acidobacteria* (23%), *Proteobacteria* (23%) y *Actinobacteria* (14%), el microbioma rizosférico se vio marcadamente enriquecido en proteobacterias (37%), principalmente *Beta* y *Deltaproteobacteria*, y *Bacteroidetes* (9%). La comunidad rizosférica resultó significativamente más diversa que la de suelo y endósfera de raíces, presentando la mayor abundancia relativa de la clase *Deltaproteobacteria*, conocida por comprender una gran variedad de bacterias anaerobias, muchas de ellas reductoras de sulfato. Por su parte, el microbioma endófito de raíces se vio ampliamente enriquecido en proteobacterias (66%), principalmente por las clases *Alpha*, *Beta* y *Gammaproteobacteria*, y también *Firmicutes*, mayormente afiliados al orden *Clostridiales*. Diversas bacterias anaerobias fueron capaces de establecer interacciones fuertes y estables con la planta de arroz a lo largo del ciclo del cultivo (*Bacteroidales*, *Clostridium*, *Anaeromyxobacter*, *Geobacter*, *Desulfovibrio*, entre otras), algunos inclusive en etapas tempranas del cultivo previo a la inundación.

Mediante un análisis de especies indicadoras (IndVal) se identificaron varias OTUs fuertemente asociadas a alguna de las rotaciones arroceras, tanto en rizósfera como en el interior de las raíces. Estos resultados sugieren que el microbioma asociado a las raíces de arroz podría ser susceptible a la intensificación agrícola, particularmente en taxones que no se encuentran entre los dominantes de estas comunidades.

Por otra parte, se optimizaron metodologías dirigidas a genes funcionales para estudiar la abundancia (qPCR) y diversidad (T-RFLP) de BRS y bacterias desnitrificantes asociados a la planta de arroz en el sistema estudiado. Tanto las BRS como las bacterias desnitrificantes fueron detectadas y cuantificadas en suelo y asociadas a las raíces de arroz como rizosféricos y endófitos, y su abundancia y distribución en los distintos nichos se vio afectadas por el manejo del cultivo y el sistema de rotación empleado. Las comunidades de BRS y arqueas metanogénicas asociadas al cultivo se vieron fuertemente impactadas por la inundación, incrementando significativamente su abundancia (qPCR de genes *dsrA* y *mcrA*, respectivamente) en rizósfera y endósfera para las BRS, y en suelo y rizósfera para el caso de las metanogénicas. De acuerdo con el análisis de secuenciación masiva del gen 16S rRNA, varios grupos taxonómicos conocidos como BRS fueron encontrados formando parte del microbioma de rizósfera de la etapa inundada del cultivo, mientras que el género *Desulfovibrio* fue el taxón dominante en el microbioma endófito de raíces de arroz. Las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* y *nirS* presentaron distinta dinámica a lo largo del ciclo y frente a las distintas rotaciones. De acuerdo a la cuantificación de genes *nirK* y *nirS* realizada por qPCR, las poblaciones tipo *nirK* dominaron en todos los nichos estudiados frente a las tipo *nirS*, y su abundancia se vio afectada tanto por los cambios que se dan durante el ciclo del cultivo como por las distintas rotaciones evaluadas. Por el contrario, la abundancia de las poblaciones tipo *nirS* se mantuvo constante en cada uno de los nichos a lo largo del ciclo y en los diferentes sistemas de rotación. Aunque



la comunidad tipo *nirS* endófito presentó la menor abundancia, su diversidad (evaluada mediante T-RFLP de este gen) resultó significativamente mayor a la presente en rizósfera.

Esta tesis aporta información relevante sobre la ecología de las comunidades bacterianas asociadas al cultivo de arroz, y en particular, de grupos fisiológicos anaerobios fundamentales en las transformaciones biogeoquímicas de nutrientes esenciales en este ecosistema. Los resultados obtenidos sugieren que los microorganismos anaerobios rizosféricos y endófitos constituyen una parte importante del microbioma asociado a la planta de arroz y podrían desempeñar un rol relevante a lo largo del ciclo de cultivo.

Palabras claves:

microbioma, rizósfera, endósfera, bacterias reductoras de sulfato, bacterias desnitrificantes, arroz.

# Lista de figuras

1	Distribución de la producción de arroz en Uruguay . . . . .	3
2	Micronichos conformados en la interfase suelo-raíz de la planta de arroz. . .	5
3	Diferencias entre la reducción de sulfato desasimilativa y asimilativa. . . .	11
4	Etapas del proceso de desnitrificación. . . . .	13
1.1	Mecanismo propuesto para la reducción desasimilativa de sulfato. . . . .	23
1.2	Árbol filogenético consenso de las secuencias de DsrAB reductivas y oxidativas. . . . .	26
1.3	Sitios de unión y cobertura <i>in silico</i> de los primers dirigidos al gen <i>dsrAB</i> bacteriano reductivo. . . . .	27
1.4	Curva de cuantificación del gen <i>dsrA</i> por qPCR . . . . .	39
1.5	Curva estándar obtenida para qPCR del gen <i>dsrA</i> . . . . .	39
1.6	Curva de temperatura de melting obtenida para qPCR del gen <i>dsrA</i> . . . .	40
1.7	Productos de la amplificación por nested-PCR del gen <i>dsrAB</i> en gel de agarosa antes y después de la purificación a partir de ADN de rizósfera. . .	41
1.8	Tamaños teóricos de los T-RFs obtenidos para diferentes secuencias del gen <i>dsrAB</i> con las enzimas de restricción Sau3AI y Taq $\alpha$ 1. . . . .	43
2.1	Sistemas de rotación utilizados. . . . .	55
2.2	Esquema anual del cultivo y muestreos realizados. . . . .	56
2.3	Esquema del flujo de trabajo utilizado en el análisis de las comunidades bacterianas mediante <i>Phyloseq</i> . . . . .	62
2.4	Curvas de rarefacción para las comunidades bacterianas de las muestras de suelo, rizósfera y raíces. . . . .	65
2.5	Riqueza ( <i>observed</i> ) e índices de diversidad calculados para las distintas muestras de suelo, rizósfera y raíces. . . . .	66
2.6	Análisis NMDS (a) y PERMANOVA (b) realizados sobre la abundancia relativa de OTUs en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. . . . .	68

2.7	Análisis NMDS (a) y PERMANOVA (b) realizados sobre la abundancia relativa de OTUs en las muestras de suelo y rizósfera en las dos etapas del cultivo, a partir del análisis alternativo de los datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. . . . .	69
2.8	Diagramas de Venn de las OTUs compartidas entre los distintos materiales y entre las dos etapas del cultivo estudiadas, seca e inundada (diciembre y febrero). . . . .	70
2.9	Composición taxonómica a nivel de phylum de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. . . . .	72
2.10	Composición taxonómica de la clase <i>Betaproteobacteria</i> a nivel de orden (a) y a nivel de familia (b), obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. . . . .	73
2.11	Composición taxonómica de la clase <i>Alphaproteobacteria</i> a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. . . . .	74
2.12	Composición taxonómica de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. . . . .	74
2.13	Composición taxonómica de la clase <i>Deltaproteobacteria</i> a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. . . . .	75
2.14	Composición taxonómica del phylum <i>Firmicutes</i> a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. . . . .	76
2.15	Composición taxonómica del phylum <i>Chloroflexi</i> a nivel de clase, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. . . . .	76
2.16	Composición taxonómica del phylum <i>Bacteroidetes</i> a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. . . . .	77

2.17	Heatmap con los 50 géneros (o el máximo nivel taxonómico alcanzado) más abundantes en suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo	81
2.18	Composición taxonómica de la clase <i>Deltaproteobacteria</i> a nivel de género (o máximo nivel taxonómico alcanzado), presente en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. . . . .	82
2.19	Composición taxonómica del phylum <i>Firmicutes</i> a nivel de género (o máximo nivel taxonómico alcanzado), presente en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. . . . .	83
2.20	Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R1 en rizósfera. . . . .	86
2.21	Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R4 en rizósfera. . . . .	87
2.22	Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R5 en rizósfera. . . . .	88
2.23	Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R1 en raíz. . . . .	89
2.24	Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R5 en raíz. . . . .	90
3.1	Abundancia de genes <i>dsrA</i> en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero), y p-valores obtenidos en los ANOVAs factoriales. . . . .	114
3.2	Abundancia de genes <i>mcrA</i> en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero), y p-valores obtenidos en los ANOVAs factoriales. . . . .	115
3.3	Abundancia de genes <i>nirS</i> (a) y <i>nirK</i> (b) en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero), y p-valores obtenidos en los ANOVAs factoriales. . . . .	117
3.4	Análisis de Componentes Principales (PCA) para las raíces, rizósferas y suelos provenientes de las tres rotaciones (R1, R4 y R5) en la etapa seca (diciembre) (a) y en la etapa inundada (febrero) (b), según la abundancia de genes marcadores funcionales. . . . .	119

3.5	Análisis de Componentes Principales (a) y matriz de correlaciones de Pearson (b) para los suelos de las 3 rotaciones evaluadas (R1, R4 y R5), los 2 muestreos (diciembre y febrero) y los 3 bloques, según parámetros físico-químicos de los suelos y las abundancias de genes marcadores funcionales. .	121
3.6	Composición y diversidad de las comunidades sulfato reductoras de rizósfera en los dos muestreos (diciembre y febrero), a partir de los perfiles de T-RFLP del gen <i>dsrAB</i> . . . . .	124
3.7	Abundancia relativa de géneros bacterianos (o máximo nivel taxonómico alcanzado) con capacidad potencial de reducir sulfato, presentes en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. .	126
3.8	Composición y diversidad de las comunidades desnitrificantes tipo <i>nirS</i> de raíz y rizósfera en los dos muestreos (diciembre y febrero), a partir de los perfiles de T-RFLP de este gen. . . . .	130
3.9	Diagrama de Venn de los T-RFs obtenidos en el análisis de T-RFLP del gen <i>nirS</i> de raíz y rizósfera en las dos etapas del cultivo, seca e inundada (diciembre y febrero). . . . .	130
3.10	Composición y diversidad de las comunidades desnitrificantes tipo <i>nirK</i> de rizósfera en el muestreo de febrero, a partir de los perfiles de T-RFLP de este gen . . . . .	132

# Lista de tablas

1.1	Secuencias de los primers utilizados en las amplificaciones por nested-PCR del gen <i>dsrAB</i> para el T-RFLP. . . . .	35
1.2	Condiciones ensayadas en la primera amplificación (PCR1) de la nested-PCR del gen <i>dsrAB</i> para el T-RFLP. . . . .	36
1.3	Condiciones ensayadas en la segunda amplificación (PCR2) de la nested-PCR del gen <i>dsrAB</i> para el T-RFLP. . . . .	36
1.4	Primers utilizados para qPCR del gen <i>dsrA</i> y condiciones de corrida optimizadas. . . . .	39
1.5	Concentraciones de reactivos y ciclos de temperatura utilizados en las amplificaciones por nested-PCR del gen <i>dsrAB</i> para el T-RFLP. . . . .	41
2.1	Textura de los suelos provenientes de las rotaciones en estudio. . . . .	57
2.2	Código de las muestras de suelo, rizósfera y raíces utilizadas según los diferentes factores. . . . .	59
2.3	Análisis químicos de los suelos provenientes de las distintas rotaciones arroceras (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero) . . . . .	64
2.4	Número de OTUs indicadoras encontradas para las distintas rotaciones en rizósfera y raíz. . . . .	84
3.1	Información sobre los primers utilizados en las cuantificaciones por qPCR de los genes <i>dsrA</i> , <i>mcrA</i> , <i>nirS</i> y <i>nirK</i> , y sobre los estándares usados en las respectivas curvas de calibración. . . . .	108
3.2	Especies bacterianas que presentan fragmentos terminales (T-RFs) correspondientes a los obtenidos mediante T-RFLP del gen <i>nirK</i> en muestras de rizósfera del muestreo de febrero. . . . .	133

# Tabla de contenidos

Lista de figuras	x
Lista de tablas	xiv
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
El cultivo de arroz en el mundo . . . . .	1
Características de la producción de arroz en Uruguay: importancia económica y sustentabilidad del cultivo . . . . .	2
Bacterias asociadas a las raíces de las plantas y su rol en la agricultura . . . . .	4
Biogeoquímica bacteriana del sistema de arroz irrigado y su impacto ambiental . . . . .	7
Reducción desasimilativa de sulfato . . . . .	9
Ecología y flexibilidad metabólica de las bacterias reductoras de sulfato . . . . .	10
La desnitrificación como proceso clave en el ciclo del nitrógeno . . . . .	12
Bacterias desnitrificantes y su importancia en sistemas agrícolas . . . . .	15
Metodologías para el estudio de comunidades microbianas asociadas a plantas . . . . .	16
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
Objetivo general . . . . .	19
Objetivos específicos . . . . .	19
Trabajo de tesis . . . . .	19
<b>1 OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE COMUNIDADES REDUCTORAS DE SULFATO ASOCIADAS A RAÍCES DE ARROZ</b>	<b>21</b>
1.1 INTRODUCCIÓN . . . . .	22
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	30
1.2.1 Optimización de la técnica qPCR para cuantificación de genes <i>dsrA</i> . . . . .	30
1.2.2 Optimización de la técnica de T-RFLP para el gen <i>dsrAB</i> . . . . .	33
1.3 RESULTADOS . . . . .	38
1.3.1 Optimización de la técnica qPCR para cuantificación de genes <i>dsrA</i> . . . . .	38

1.3.2	Optimización de la técnica de T-RFLP para el gen <i>dsrAB</i> . . . . .	40
1.4	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES . . . . .	44
<b>2</b>	<b>MICROBIOMA BACTERIANO DE SUELO, RIZÓSFERA Y RAÍCES DE ARROZ CULTIVADO BAJO DIFERENTES SISTEMAS DE ROTACIÓN DE CULTIVOS</b>	<b>49</b>
2.1	INTRODUCCIÓN . . . . .	50
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	55
2.2.1	Ensayo de campo y rotaciones arroceras estudiadas . . . . .	55
2.2.2	Muestreos y acondicionamiento de las muestras . . . . .	56
2.2.3	Caracterización de los suelos . . . . .	57
2.2.4	Extracción y cuantificación del ADN de suelos, rizósferas y raíces .	58
2.2.5	Secuenciación masiva de genes 16S rRNA de suelo, rizósfera y raíces de arroz . . . . .	60
2.3	RESULTADOS . . . . .	64
2.3.1	Caracterización de los suelos . . . . .	64
2.3.2	Estructura de las comunidades bacterianas de suelo y asociadas a raíces de arroz mediante secuenciación masiva de genes 16S rRNA .	64
2.4	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES . . . . .	91
<b>3</b>	<b>DINÁMICA DE GRUPOS MICROBIANOS ANAEROBIOS DE RELEVANCIA AMBIENTAL ASOCIADOS AL CULTIVO DE ARROZ</b>	<b>101</b>
3.1	INTRODUCCIÓN . . . . .	102
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	106
3.2.1	Muestras de suelos y raíces de arroz provenientes de ensayo de rotaciones a campo . . . . .	106
3.2.2	Cuantificación de genes marcadores funcionales en suelos, rizósferas y raíces mediante qPCR . . . . .	106
3.2.3	Diversidad de comunidades sulfato reductoras y desnitrificantes en rizósfera y raíces mediante T-RFLP de los genes <i>dsrAB</i> , <i>nirS</i> y <i>ynirK</i>	109
3.2.4	Estudio de grupos taxonómicos con capacidad potencial de reducir sulfato a partir de datos de secuenciación masiva de genes 16S rRNA	111
3.3	RESULTADOS . . . . .	112
3.3.1	Abundancia de grupos microbianos de relevancia ambiental en suelos, rizósferas y raíces de arroz mediante qPCR de genes marcadores funcionales . . . . .	112



3.3.2	Abundancia de microorganismos reductores de sulfato, metanogénicos y desnitrificantes y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo . . . . .	120
3.3.3	Composición y diversidad de las comunidades sulfato reductoras asociadas al cultivo de arroz bajo diferentes sistemas de rotación . .	122
3.3.4	Composición y diversidad de las comunidades desnitrificantes asociadas al cultivo de arroz bajo diferentes sistemas de rotación . . . .	126
3.4	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES . . . . .	134
<b>CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS</b>		<b>147</b>
<b>Bibliografía</b>		<b>153</b>
<b>Anexos</b>		<b>175</b>
Anexo 1	Parámetros de rendimiento vegetal . . . . .	176
Anexo 2	Concentración del ADN extraído de suelo, rizósfera y raíces de arroz .	178
Anexo 3	Calidad de las secuencias crudas obtenidas mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA de suelo, rizósfera y raíces de arroz . . . . .	180
Anexo 4	Resultados del análisis <i>Phyloseq</i> alternativo realizado sobre los datos de secuenciación masiva de genes 16S rRNA: estructura de las comunidades bacterianas de suelo y rizósfera.. . . . .	184
Anexo 5	Curvas de cuantificación, estándar y de temperatura de melting obtenidas en las qPCR de genes <i>mcrA</i> , <i>nirS</i> y <i>nirK</i> . . . . .	188
Anexo 6	Cuantificación de genes marcadores funcionales en suelos, rizósferas y raíces mediante qPCR: valores de abundancia y comparaciones estadísticas . . .	193
Anexo 7	Composición y diversidad de las comunidades sulfato reductoras y desnitrificantes: comparaciones de medias de los índices de diversidad calculados a partir de de los T-RFLP de los genes <i>dsrAB</i> y <i>nirS</i> , y total de fragmentos obtenidos mediante T-RFLP del gen <i>nirK</i> . . . . .	201

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## El cultivo de arroz en el mundo

El arroz es el alimento más importante del mundo para unos 4 billones de personas, y se estima que la demanda de este alimento aumentará entre 2010 y 2030 cerca de un 25 % (IRRI, 2019). Debido a esto, el cultivo de arroz (*Oryza sativa*) constituye una de las actividades agrícolas de mayor relevancia a nivel mundial. En el año 2018, la producción mundial de arroz fue de unos 728 millones de toneladas, con el 50 % producido en dos países: China e India (IRRI, 2018). La mayor parte del cultivo de arroz en el mundo se realiza en tierras inundables y con abundancia de fuentes de agua cercanas, ya que el cultivo se mantiene inundado casi la totalidad del ciclo. La forma tradicional de cultivar arroz en gran parte de Asia implica el trasplante de plantas crecidas previamente hacia un suelo sumergido, que se mantiene cubierto de agua hasta cerca de la cosecha (Kögelknabner et al. 2010). En algunas regiones de China, especialmente en el sudeste, las altas temperaturas y las lluvias abundantes proporcionan condiciones favorables para realizar hasta dos cultivos de arroz al año, mientras que en otras regiones de este país se realiza típicamente un solo cultivo anual o rotación de arroz con otros cultivos de invierno, principalmente trigo (Jiang et al. 2016).

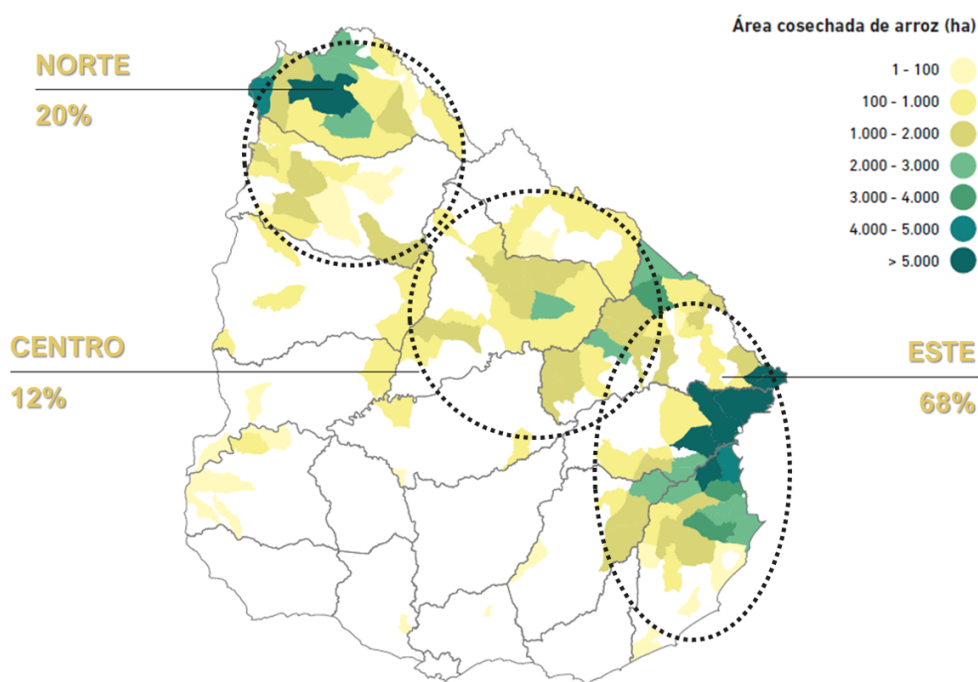
El cultivo de arroz tiene una duración de 3 a 6 meses desde la germinación hasta la madurez, dependiendo la variedad y el ambiente donde se cultive. Durante este período, la planta atraviesa diferentes estadios fisiológicos comunes para todas las variedades, que se pueden resumir en 3 etapas principales: una etapa vegetativa que involucra la germinación y crecimiento del material verde de la planta, una etapa reproductiva que se extiende desde el inicio de la diferenciación floral hasta la emergencia de la panoja (floración), y por último la etapa de maduración del grano hasta el momento de la cosecha (S. Yoshida, 1981). Los requerimientos nutricionales, así como la producción de metabolitos y otros cambios fisiológicos, varían según la etapa del crecimiento en la que se encuentre la planta. Debido a esto, a lo largo del ciclo del cultivo se requieren distintas aplicaciones de fertilizantes y agroquímicos, y diferentes condiciones de irrigación.

## **Características de la producción de arroz en Uruguay: importancia económica y sustentabilidad del cultivo**

En Uruguay, el 95 % del arroz producido se exporta, mientras que el consumo interno no supera los 13kg por persona por año. Debido a esto, la producción de arroz presenta gran relevancia económica para nuestro país, generando más de 430 millones de dólares anuales, posicionándose desde hace varios años entre los 10 mayores exportadores de este cereal a nivel mundial. El área sembrada ocupa más de 160.000 há en 13 departamentos y se realiza principalmente en tres zonas del país: Este, Centro- Oeste y Norte. La zona Este, que involucra a los departamentos de Rocha, Treinta y Tres, Lavalleja y parte de Cerro Largo, representa más de la mitad del área total sembrada siendo la principal región arrocerera del país (Figura 1) (ACA, 2018; Zorrilla, 2018). En más del 85 % del área sembrada se utilizan cultivares nacionales surgidos del programa de investigación en producción de arroz del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), siendo las variedades Merín y Olimar (ambas subespecie índica) las más sembradas en la última zafra 2019/2020, con más del 40 % del área total sembrada (DIEA - MGAP, 2020). El cultivar Parao (subespecie japónica) es otra de las variedades nacionales surgidas de este programa en el año 2012, y aunque actualmente ocupa un área sembrada muy reducida concentrada en la zona Este del país (1390há; DIEA - MGAP, 2020), se destaca por su alto potencial de rendimiento, resistencia a bajas temperaturas y buena resistencia a enfermedades (Molina et al. 2011).

Si bien a nivel nacional el arroz presenta gran importancia económica, la exportación de arroz uruguayo representa una baja proporción del total exportado en el mundo, cercana al 1.5 % en el año 2018 (IRRI, 2018). El mercado internacional exige cada día mayores garantías de que hayan sido respetados estándares de sustentabilidad ambiental en su producción y que los productos obtenidos aseguren la inocuidad para los consumidores. En este contexto, Uruguay apunta a mantener y diversificar los mercados que valoran la alta calidad reconocida de su producto.

El sector arrocerero en nuestro país se caracteriza por alcanzar altos niveles productivos utilizando prácticas de manejo agronómico con bajo impacto ambiental y uso moderado de insumos químicos por unidad de producto (ACA, 2018; Deambrosi, 2007; Pittelkow et al. 2016). El rendimiento promedio del país es de 8500kg/há sembrada, y se encuentra entre los tres mejores a nivel mundial, junto con Australia y el sur de EEUU (IRRI, 2018). En general el cultivo de arroz en Uruguay se basa en un sistema de producción en rotaciones con pasturas y cultivos alternativos, integrado con la producción ganadera, buscando asegurar el equilibrio económico de los productores al diversificar los rubros. La complementación agronómica y económica del cultivo de arroz con la producción de pasturas forrajeras para alimentación del ganado y otros cultivos alternativos, evita la siembra



**Figura 1:** Distribución de la producción de arroz en Uruguay. Zafra 2016-2017. Figura modificada de ACA, 2018

de arroz como cultivo continuo y define un sistema de producción estable, económica y ambientalmente sustentable. Se cree que este sistema productivo arroz-pastura, que generalmente alterna dos años consecutivos de arroz y tres o cuatro años de pasturas, ha sido la base de los excelentes rendimientos obtenidos y son una característica distintiva del arroz uruguayo.

El sistema de producción de arroz utilizado en nuestro país posee además otras características particulares que permiten considerarlo de baja intensidad y reducido impacto ambiental. La fijación simbiótica de nitrógeno proveniente de las leguminosas sembradas en la fase de pasturas (por ejemplo, Trébol, Lotus), así como también la fijación libre, estarían aportando nitrógeno al sistema, permitiendo alcanzar altos rendimientos con bajos niveles de fertilización nitrogenada (entre 45 y 70 kg/há de N), por debajo de los utilizados en otros sistemas productivos a nivel internacional. Por otro lado, las condiciones del cultivo se caracterizan por una siembra en condiciones de secano (siembra convencional 67%, siembra directa 23%), con inundación continua desde los 15 a 30 días posteriores a la emergencia y hasta completar la madurez fisiológica, unos 15-20 días previos a la cosecha (ACA, 2018). Durante los 4-5 meses que insume la zafra de arroz, el suelo permanece inundado entre un 60-70% del tiempo, lo cual disminuye los problemas ambientales con respecto a la inundación durante la totalidad del ciclo utilizada frecuentemente en otros países.

En los últimos años, el techo alcanzado en términos de productividad y el fuerte incremento reportado en los costos de producción han disminuido los márgenes de rentabilidad del sector arrocero, provocando una caída en el número de productores y un descenso en el área sembrada. Según la Encuesta de Arroz 2020 (MGAP-DIEA), el rendimiento promedio para todo el país se estimó en 8620kg/há sembrada, siendo éste el segundo rendimiento más alto registrado en nuestro país. Sin embargo, la superficie sembrada en esta última zafra fue estimada en poco más de 140.000há, el menor registro de los últimos 20 años. Por lo tanto, el país enfrenta actualmente el desafío de intensificar su producción de arroz asegurando la sostenibilidad de los sistemas productivos, es decir, mantener o incrementar su productividad, mejorando la eficiencia del uso de insumos y conservando los recursos naturales como el agua y el suelo. Se presenta entonces la necesidad de evaluar distintas alternativas de intensificación en el uso del suelo, ya sea aumentando la frecuencia de arroz en la rotación como también incluyendo otros cultivos y/o pasturas más cortas que permitan optimizar costos.

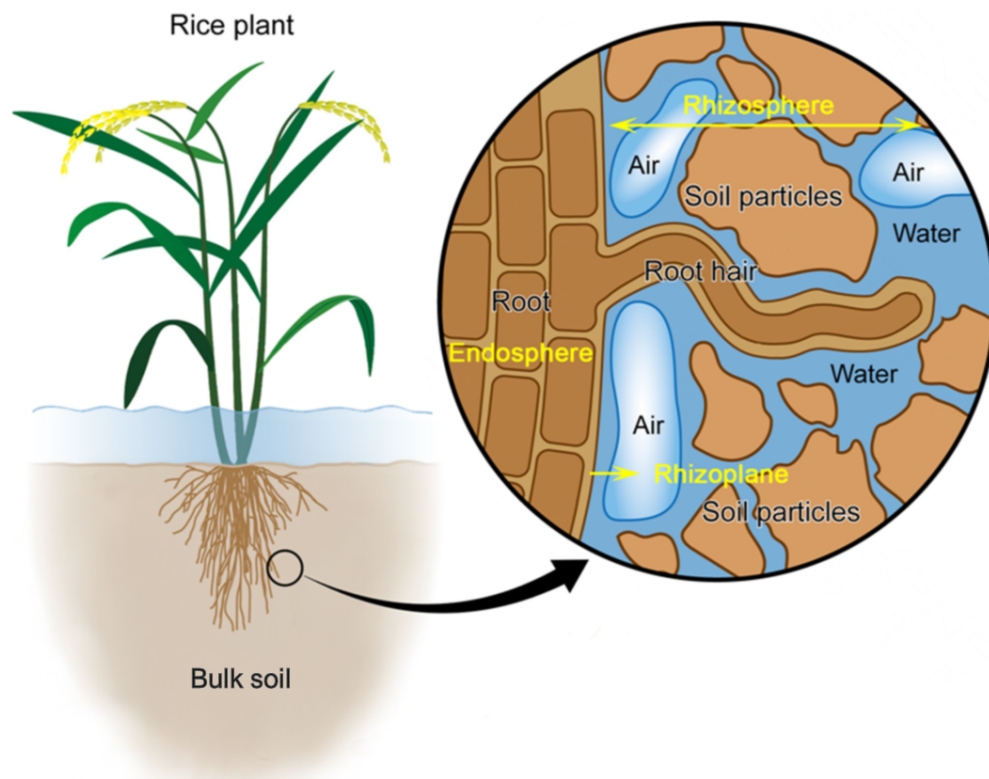
## **Bacterias asociadas a las raíces de las plantas y su rol en la agricultura**

Desde hace mucho tiempo se conoce que existen microorganismos que se asocian naturalmente a las plantas, ya que éstas ofrecen una gran diversidad de nichos no solo en la superficie exterior de los distintos tejidos, sino también en el interior de los tejidos vegetales. A través de las raíces, las plantas están íntimamente ligadas a las comunidades microbianas que habitan el suelo, por lo tanto, las raíces representan el primer sitio donde se establecen fuertes interacciones entre la planta y los microorganismos del suelo. Los exudados radiculares secretados por las plantas contienen una amplia variedad de compuestos carbonados como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y vitaminas, lo que genera en la raíz un nicho rico en nutrientes y altamente atractivo para los microorganismos (Bacilio-Jiménez et al. 2003; Philippot et al. 2013; Reinhold-Hurek et al. 2015).

Es ampliamente conocido el hecho de que muchos de los microorganismos que establecen fuertes interacciones con las plantas, especialmente a nivel de las raíces, contribuyen mediante distintos mecanismos al crecimiento y salud de la planta (Ding et al. 2019; Haroim et al. 2015; Pérez-Montaña et al. 2014; Philippot et al. 2013). Sin embargo, aún se desconoce tanto la identidad como el rol ecológico y microbiológico que desempeñan la gran mayoría de estos microorganismos, así como también los beneficios mutuos que sustentan la interacción con la planta.

Las raíces proporcionan diferentes micronichos en la interfase suelo-raíz (Figura 2). Originalmente, el término rizósfera fue definido como el área alrededor de la raíz de la planta la cual está habitada por una población única de microorganismos influida por las sustancias químicas emitidas por la raíz (Hiltner, 1904). Actualmente, el término

correcto para referirse a este concepto es suelo rizosférico, aunque frecuentemente ambos términos se utilizan indistintamente. La rizósfera está compuesta por el suelo rizosférico y el rizoplano, éste último definido como la superficie de las raíces donde habita una comunidad bacteriana específica. Finalmente, la endósfera hace referencia a los tejidos internos de la planta, y este término se utiliza comúnmente relativo a las raíces para definir el compartimiento interno de la raíz (Berg et al. 2016; J. Edwards et al. 2015; Reinhold-Hurek et al. 2015).



**Figura 2:** Micronichos conformados en la interfase suelo-raíz de la planta de arroz. Se muestra la rizósfera (suelo rizosférico), el rizoplano y la endósfera de la raíz. El suelo desnudo (*bulk soil*) es aquel que se encuentra por fuera de la rizósfera, es decir, menos influenciado por las raíces. (Figura obtenida de Ding et al. 2019)

Las bacterias endófitas, detectadas en plantas desinfectadas superficialmente o recuperadas del interior de los tejidos vegetales (Hallmann et al. 1997; Mano y Morisaki, 2008), normalmente no causan daño ni provocan síntomas de enfermedad en sus plantas huésped, y muchas de ellas son conocidas por su gran aporte a la promoción del crecimiento vegetal (Baldani et al. 1997; Olivares et al. 1996; Peng et al. 2009; Rariz et al. 2013).

A cambio de utilizar sustratos provenientes de la planta, los microorganismos rizosféricos y endófitos benefician a las plantas al proporcionar nutrientes y fitohormonas, suprimir

fitopatógenos o aumentar la resistencia al estrés abiótico, como el calor, la sequía, o las altas concentraciones de sal (Haney et al. 2015; Mendes et al. 2011; Nihorimbere et al. 2011; Van Der Heijden et al. 2008; Yang et al. 2009). Además de representar una importante fuente de nutrientes, se sabe que los exudados radiculares participan en la colonización temprana de la raíz e inducción de respuestas quimiotácticas de bacterias rizosféricas, induciendo mayores repuestas sobre bacterias endófitas que sobre otras presentes en la rizósfera (Bacilio-Jiménez et al. 2003).

Debido a que la disponibilidad de nutrientes es mayor en la rizósfera que en el interior de la planta, el número de microorganismos endófitos es menor que los rizosféricos, por lo tanto, se cree que las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas frente a las rizosféricas (James, 2000). La principal fuente de bacterias endófitas es el suelo (Hallmann et al. 1997) a partir del cual sólo algunas bacterias tienen la capacidad de colonizar las raíces produciendo enzimas que degradan la pared celular, como la celulasa y la pectinasa, y así penetrar los tejidos de la raíz y dispersarse a través del xilema a otros tejidos de la planta. Algunas bacterias que habitan en el suelo podrían convertirse en endófitas accidentalmente ingresando a través de heridas de la raíz o raíces laterales emergentes (Hardoim et al. 2015). De esta forma se establece una comunidad de bacterias dentro de los tejidos vegetales diferente a las presentes en suelo y rizósfera, observándose estas diferencias tanto para la abundancia de ciertos grupos fisiológicos (Collavino et al. 2020; Ferrando y Fernández Scavino, 2015; Loaces et al. 2011) como para la identidad y funcionalidad de los principales grupos microbianos presentes (Ding et al. 2019; J. Edwards et al. 2015; Hardoim et al. 2015). Además, varios estudios han señalado que tanto la variedad o tipo de cultivar como la etapa fisiológica de la planta, pueden afectar a las comunidades bacterianas, detectándose endófitas específicas de ciertas variedades o capaces de colonizar las raíces en distintas etapas del desarrollo (J. Edwards et al. 2015; J. A. Edwards et al. 2018; Ferrando et al. 2012; Sessitsch et al. 2012).

Las bacterias endófitas que presentan propiedades promotoras del crecimiento vegetal han sido de las principales temáticas abordadas en el área de la microbiología agrícola, debido a que su potencial uso como inoculantes para los cultivos constituye una alternativa al uso de fertilizantes y agroquímicos. Sin embargo, para lograr que las bacterias utilizadas como inoculantes establezcan una interacción estable con la planta, resulta de gran importancia conocer las comunidades endófitas nativas establecidas en las distintas etapas y condiciones que atraviesa el cultivo, ya que estas bacterias nativas representan una competencia directa para los microorganismos inoculados (Rariz, 2016).

## Biogeoquímica bacteriana del sistema de arroz irrigado y su impacto ambiental

Los arrozales constituyen los humedales artificiales más grandes del mundo. La sucesión de etapas óxicas y anóxicas que se producen por efecto de la inundación, conforman un ambiente similar al de otros humedales naturales de agua dulce que se inundan periódicamente, donde los procesos microbianos involucran transformaciones biogeoquímicas fundamentales en el reciclado de carbono (C), nitrógeno (N) y otros nutrientes esenciales como el fósforo (P), el hierro (Fe), el manganeso (Mn) y el azufre (S). La inundación del cultivo de arroz provoca cambios fisicoquímicos a nivel del suelo, generando un gradiente de potencial redox que hace que la comunidad microbiana que habita ese ecosistema se modifique, generándose micronichos con diferentes condiciones de potencial redox aptos para distintos tipos de microorganismos (Kögel-knabner et al. 2010). El principal factor que determina las estrategias metabólicas de colonización de un determinado nicho ecológico es la disponibilidad de oxígeno (Voroney, 2007). Con la inundación, se corta el suministro de oxígeno en el suelo y las actividades microbianas cambian de aerobias a facultativas o anaerobias, donde se utilizan aceptores externos de electrones alternativos al oxígeno y también ocurren procesos fermentativos. La secuencia de aceptores de electrones que sustituye al oxígeno está determinada por la termodinámica y el potencial redox. Los procesos microbianos que suceden, de mayor a menor potencial redox, son: respiración aeróbica, nitrificación (oxidación aeróbica de  $\text{NH}_4^+$  para dar  $\text{NO}_2^-$  y luego  $\text{NO}_3^-$ ), desnitrificación (reducción de  $\text{NO}_3^-$  y luego a productos gaseosos,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ ), reducción de  $\text{Mn}^{4+}$ , reducción de  $\text{Fe}^{3+}$ , reducción de  $\text{SO}_4^{2-}$ , y finalmente, cuando no están disponibles otros oxidantes, ocurre la metanogénesis (producción de  $\text{CH}_4$ ) (Kögel-knabner et al. 2010).

Debido a estas características redox, el cultivo de arroz irrigado contribuye significativamente a la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), como el metano ( $\text{CH}_4$ ) y el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). El cambio climático es un importante problema ambiental del siglo XXI causado principalmente por el aumento en las emisiones de GEI antropogénicas, siendo los principales gases el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el  $\text{CH}_4$  y el  $\text{N}_2\text{O}$ . A diferencia del  $\text{CO}_2$ , las emisiones de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  son producto principalmente de procesos microbianos en suelo y son los dos GEI más importantes provenientes de la agricultura, con potenciales de calentamiento global (GWP) de 28 y 265 relativo al  $\text{CO}_2$ , respectivamente, en un período de 100 años (Myhre et al. 2013). Además de su potente efecto invernadero, el  $\text{N}_2\text{O}$  está involucrado en la disminución de la capa de ozono. A nivel global, la principal fuente antropogénica de este gas son los suelos cultivados (22 % del total de  $\text{N}_2\text{O}$  emitido a la atmósfera), que producen  $\text{N}_2\text{O}$  a una tasa de 1,7-4,8 Tg  $\text{N}_2\text{O}\cdot\text{año}^{-1}$  (Ciais et al. 2013). Se estima que las fuentes antropogénicas de  $\text{CH}_4$  representan entre el 50 % y 65 % de las emisiones globales, provenientes en su gran mayoría de actividades agrícolas. Los arrozales son considerados como una de las principales fuentes de  $\text{CH}_4$  provenientes de actividades



humanas, y representan cerca del 12% (33-40 Tg CH<sub>4</sub>.año<sup>-1</sup>) de las emisiones globales antropogénicas de CH<sub>4</sub> (Ciais et al. 2013). En respuesta a la creciente demanda de arroz a nivel mundial, el aumento en su producción puede conducir a incrementar considerablemente las emisiones de estos GEI. Profundizar en el conocimiento sobre las comunidades microbianas que regulan estas emisiones puede contribuir al desarrollo de estrategias que permitan mantener eficientemente los nutrientes en el suelo y mitigar las emisiones de GEI.

Varios trabajos han abordado mediante enfoques genómicos el estudio de las comunidades microbianas asociadas al cultivo de arroz, tanto en el suelo inundado y la rizósfera (Breidenbach y Conrad, 2015; Breidenbach, Pump et al. 2016; Lee et al. 2015; H. Li et al. 2019; Yuan et al. 2019), como también establecidas en el rizoplano y endósfera de la raíz (J. Edwards et al. 2015; J. A. Edwards et al. 2018; Santos-Medellín et al. 2017; J. Zhang et al. 2019). Sin embargo, pocos estudios han evaluado el impacto de la inundación o el uso de diferentes prácticas de manejo de agua sobre las comunidades microbianas asociadas a este cultivo. Hardoim et al. 2012, en ensayos con suelo de diversidad restringida, demostraron que las comunidades endófitas de raíz estarían influenciadas principalmente por el tipo de suelo y luego por la inundación. Algunos estudios más recientes realizados en arrozales de China e Italia han comparado el régimen de inundación continua vs. inundación intermitente en suelos contaminados con metales pesados, encontrando cambios sustanciales en las comunidades microbianas de suelo y rizósfera, particularmente en aquellas poblaciones bacterianas involucradas en los ciclos biogeoquímicos del hierro y el azufre (H. L. Li et al. 2019; Zecchin et al. 2017). El sistema de cultivo de arroz utilizado en nuestro país donde se establecen dos etapas claras dentro del ciclo, una etapa inicial de secano donde el suelo se encuentra bajo condiciones aeróbicas, y una siguiente etapa inundada donde se establecen condiciones de anaerobiosis en el suelo, resulta un modelo útil para estudiar la influencia de la inundación sobre las comunidades microbianas asociadas al cultivo.

Los estudios previos realizados por nuestro grupo en arrozales uruguayos mostraron que tanto la comunidad diazótropa de suelo (Paolino, 2006) como la comunidad diazótropa endófitas de raíces (Ferrando y Fernández Scavino, 2015) se vieron fuertemente afectadas por la inundación, observándose un aumento en la abundancia de diazótrofos anaerobios luego de la inundación. A nivel del suelo, se observaron cambios tanto en la actividad diazótropa potencial como en la estructura de la comunidad bacteriana establecida. Lo mismo se observó en el caso de las comunidades diazótropas endófitas luego de la inundación, tornándose significativamente más abundante y diversa que antes de inundar. Mediante genotecas de genes *nifH* (marcador funcional del proceso de fijación de nitrógeno) de raíces de arroz desinfectadas, se encontró que casi el 30% de las secuencias

de *nifH* obtenidas correspondían a bacterias diazótrofes anaerobias (*Spirochaetes*, *Chlorobi*, *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y secuencias relacionadas a fotótrofos anoxigénicos, entre otras), principalmente bacterias desnitrificantes y sulfato reductoras. Estos hallazgos sugieren que los microorganismos anaerobios juegan un rol fundamental en la fijación de nitrógeno en este ecosistema cuando se instalan condiciones de anaerobiosis producto de la inundación. Asimismo, resulta particularmente interesante que, según los análisis filogenéticos realizados por Gaby y Buckley, 2015 sobre las secuencias de *nifH* caracterizadas, el grupo compuesto por fijadores de nitrógeno anaerobios estrictos es el más diverso (cluster III), a pesar de contar con una menor cantidad de secuencias conocidas.

A pesar del gran número de estudios realizados sobre la biogeoquímica de los arrozales, estamos apenas en el comienzo de comprender la complejidad de las comunidades microbianas asociadas al cultivo de arroz y el rol que juegan los distintos grupos de microorganismos en el reciclado de nutrientes en el sistema. Esto hace que resulte interesante profundizar en el estudio de la estructura de estas comunidades y su dinámica en el ciclo de cultivo. Asimismo, deben diseñarse nuevos abordajes para estudiar ciertos grupos microbianos anaerobios involucrados en estos procesos, lo cual resulta fundamental para explorar su relevancia en el ecosistema arrocero.

## Reducción desasimilativa de sulfato

El ciclo biogeoquímico del azufre es complejo debido a que el azufre tiene un amplio rango de estados de oxidación (desde +6 a -2), y también por el hecho de que varias transformaciones del azufre pueden ocurrir tanto química (espontáneamente de forma abiótica) como biológicamente. Aunque el azufre puede presentar varios estados de oxidación, solo tres de ellos son significativos en la naturaleza: -2 como sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ , la forma más reducida), 0 como azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) y +6 como sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ , la forma más oxidada) (Madigan et al. 2019). Además, este ciclo está estrechamente vinculado a los ciclos biogeoquímicos de otros elementos tales como los ciclos del carbono y del nitrógeno.

El proceso de reducción del sulfato a sulfuro puede ser llevado a cabo por microorganismos perteneciente tanto al dominio *Bacteria* como al dominio *Archaea* (Rabus et al. 2015), sin embargo, es común utilizar el término bacterias reductoras de sulfato (BRS) para referirse a miembros de ambos dominios. Es necesario distinguir este proceso desasimilativo de reducción de sulfato que llevan a cabo las BRS, de la reducción asimilativa de sulfato, mediante la cual muchos microorganismos pueden incorporar sulfato para la biosíntesis de cisteína, metionina y otros compuestos organosulfurados (Figura 3). Por el contrario, la habilidad de utilizar sulfato como fuente de electrones acoplada a la con-

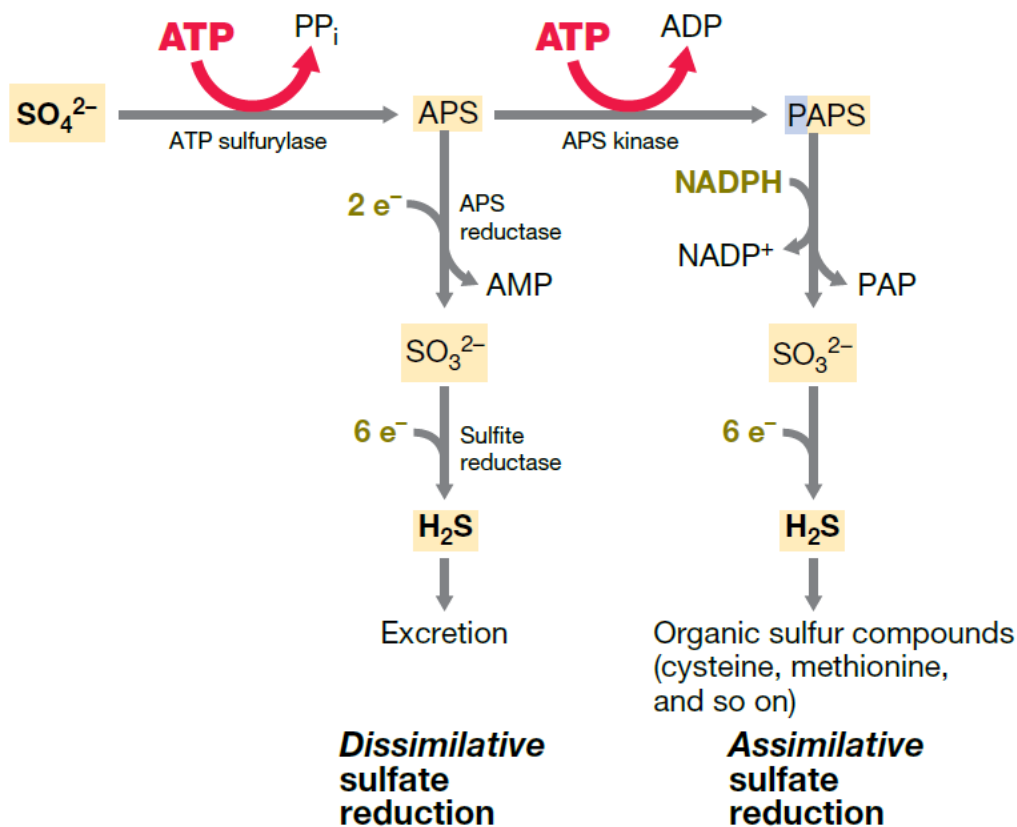
servación de energía está restringida a las BRS, donde el transporte de los electrones que resultan de la oxidación de  $H_2$  (proveniente del exterior o producto del catabolismo de compuestos orgánicos) genera una fuerza protón-motriz que dirige la síntesis de ATP (Madigan et al. 2019).

La reducción de sulfato implica un primer paso que consiste en la activación del sulfato con ATP formando adenosina-5'-fosfosulfato (APS) llevado a cabo por la enzima sulfato adeniltransferasa (Sat), también conocida como ATP sulfurilasa (Figura 3). La enzima Sat está presente no solo en las BRS, sino también en microorganismos oxidantes de sulfato, y además se encuentra ampliamente distribuida en otros organismos que reducen sulfato en procesos asimilativos, incluyendo plantas, algas, hongos, y una gran cantidad de bacterias. Mientras que en la reducción asimilativa de sulfato es necesario la adición de un segundo fosfato para formar PAPS (fosfoadenosina-5'-fosfosulfato) antes de la reducción a sulfito, en la reducción desasimilativa el APS es reducido directamente a sulfito por la enzima APS reductasa (AprBA). Finalmente, en las BRS la reducción de sulfito a sulfuro es llevada a cabo por la enzima sulfito reductasa desasimilativa (DsrAB), perteneciente a la misma familia que la enzima sulfito reductasa asimilativa, pero estructuralmente diferente (Rabus et al. 2015).

## **Ecología y flexibilidad metabólica de las bacterias reductoras de sulfato**

Las BRS son ubicuas en ambientes anóxicos, donde tienen un papel importante en el reciclado de azufre y carbono. Los sedimentos marinos se consideran los principales hábitats de las BRS. Las altas concentraciones de sulfato (hasta 28mM), las condiciones anóxicas y la gran extensión de superficie que presentan hacen que la reducción de sulfato sea el principal proceso de mineralización de carbono en estos ambientes (Jørgensen, 1982), y se estima que entre el 12 y el 29 % del flujo de carbono del fondo marino oceánico mundial es canalizado a través de este proceso (Bowles et al. 2014). Numerosos trabajos han abordado el estudio de las comunidades de BRS en ambientes marinos, y como consecuencia de esto, muchas de las BRS han sido detectadas o aisladas de estos ambientes (Leloup et al. 2009; Mußmann et al. 2005). Asimismo, se sabe que las BRS están presentes en otros ambientes anóxicos con altos contenidos de sulfato, tanto naturales como antropogénicos, incluyendo fuentes hidrotermales, sitios contaminados con hidrocarburos, fumarolas volcánicas y aguas residuales (Ben-Dov et al. 2007; Brune et al. 2000; Frank et al. 2013; Muyzer y Stams, 2008; Rabus et al. 2015; Stauffert et al. 2014).

A pesar de las bajas concentraciones de sulfato que presentan los ecosistemas de agua dulce (en el orden de micromoles por litro), por ejemplo, los sedimentos de lagos y ríos, distintos tipos de humedales naturales y arrozales inundados, se ha demostrado que la reducción de sulfato ocurre durante largos períodos de tiempo en estos ambientes alcanzando



**Figura 3:** Diferencias entre la reducción de sulfato desasimilativa y asimilativa. Etapas, intermediarios y productos. (Figura obtenida de Madigan et al. 2019)

tasas de reducción de sulfato similares a las observadas en ambientes marinos (Kondo et al. 2007; Pester et al. 2012; Wind y Conrad, 1997). En el caso de los arrozales uruguayos, los niveles de sulfato en suelo se encuentran en el orden de 80 a 200  $\mu\text{M}$  (Fernández Scavino et al. 2013) y en estudios realizados por Wind y Conrad, 1997 se encontraron en el orden de 13 a 99  $\mu\text{M}$  a nivel de la rizósfera de arroz, concentraciones al menos 10 veces menores a las presentes en sedimentos marinos.

Las BRS se caracterizan por utilizar el sulfato como aceptor final de electrones para la degradación de compuestos orgánicos, produciendo sulfuro. Sin embargo, estas bacterias pueden utilizar muchos otros aceptores de electrones para el crecimiento (tiosulfato, sulfito, nitrato, hierro, selenio, arsénico, fumarato, entre otros) y pueden fermentar una amplia variedad de sustratos en ausencia de aceptores de electrones inorgánicos, por lo tanto, la presencia de un alto número de BRS en un ambiente no refleja necesariamente la ocurrencia de la reducción de sulfato (Muyzer y Stams, 2008; Plugge et al. 2011). La fermentación de algunos compuestos, como el lactato y el etanol, a  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y acetato, no permite el crecimiento de las BRS a menos que esté acoplada al crecimiento de microorganismos capaces de utilizar estos productos, como las arqueas metanogénicas (Plugge et al.

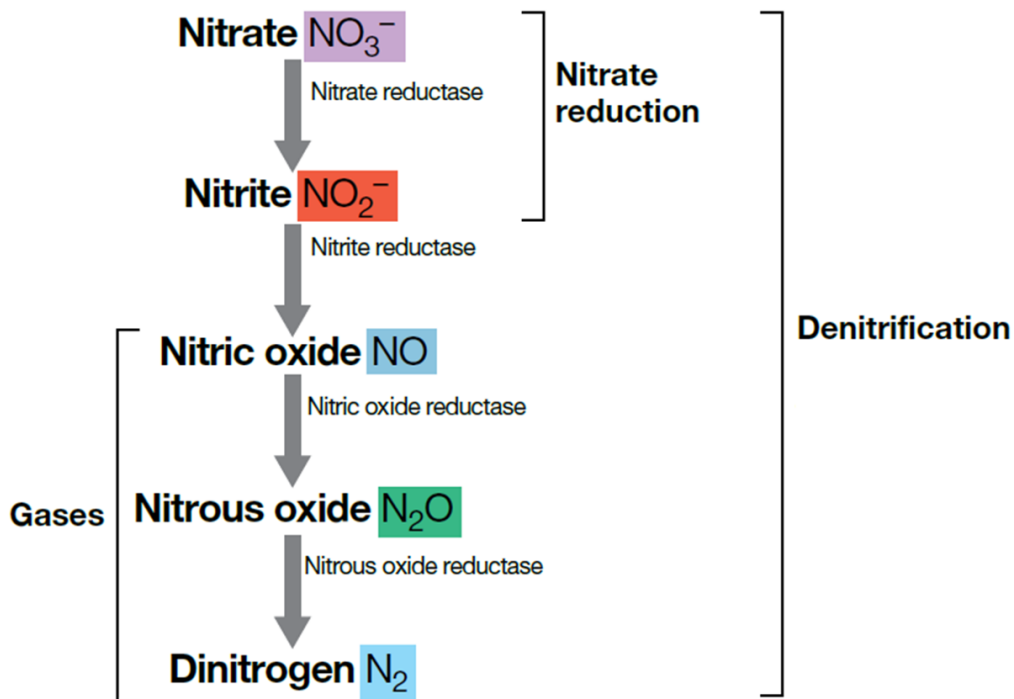
2011). Asimismo, varias especies de BRS pueden cambiar entre un metabolismo respiratorio sulfurogénico y uno sintrófico (acetogénico e hidrogenogénico), según las condiciones ambientales (Plugge et al. 2011; Rabus et al. 2015), lo cual representa una ventaja que aumenta las posibilidades de sobrevivir en un ambiente anóxico cuando los aceptores de electrones se agotan.

En ambientes con bajo potencial redox y en presencia de sulfato, las BRS pueden competir con las arqueas metanogénicas por los mismos sustratos,  $H_2$  y acetato. Además, debido a su capacidad de utilizar otros aceptores de electrones diferentes al sulfato y fermentar diversos sustratos carbonados, pueden competir con otros microorganismos anaerobios incluyendo bacterias fermentadoras, acetogénicas y homoacetogénicas. El proceso de reducción de sulfato es energéticamente favorable frente a los procesos fermentativos y a la metanogénesis, por lo tanto, las BRS podrían contribuir a disminuir la producción bruta de metano y por ende a mitigar la emisión de este gas de efecto invernadero a la atmósfera. Sin embargo, en ausencia de sulfato, es posible que los reductores de sulfato se encuentren metabólicamente activos viviendo en asociación sintrófica con los metanogénicos, fermentando sustratos tales como lactato, propionato y butirato, para formar productos utilizables por los metanogénicos ( $H_2$ ,  $CO_2$  y acetato) (Muyzer y Stams, 2008). Por lo tanto, las pérdidas de carbono que se producen en los suelos inundables son consecuencia de la acción de diferentes microorganismos bajo ciertas condiciones ambientales, cuya competencia por dadores de electrones y cooperación sintrófica determina cuánto carbono se pierde del sistema a través de la emisión de dióxido de carbono y cuánto a través de la emisión de metano.

## La desnitrificación como proceso clave en el ciclo del nitrógeno

La desnitrificación es uno de los procesos biogeoquímicos del ciclo del nitrógeno. Consiste en la reducción desasimilativa de nitrato ( $NO_3^-$ ) a nitrito ( $NO_2^-$ ) y luego a productos gaseosos, óxido nitroso ( $N_2O$ ) y nitrógeno molecular ( $N_2$ ), y ocurre bajo condiciones predominantemente anóxicas cuando bacterias anaerobias facultativas utilizan  $NO_3^-$  o  $NO_2^-$  como aceptor final de electrones en la respiración (Figura 4).

En el proceso se reduce de forma secuencial el  $NO_3^-$  hasta  $N_2$ , pasando por los intermediarios  $NO_2^-$ , óxido nítrico (NO) y  $N_2O$ . El primer paso, la reducción de  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$ , es llevado a cabo por las enzimas nitrato reductasas (Nar y Nap), y a pesar de ser un paso clave, no es exclusivo de la desnitrificación (Shapleigh, 2013; Zumft, 1997). Debido a esto, el estudio de esta etapa no es de utilidad en la evaluación del proceso de respiración de  $NO_3^-$  y en el estudio de las poblaciones desnitrificantes en diferentes ecosistemas. Por el contrario, la siguiente reducción de  $NO_2^-$  a NO se considera el paso clave de la desnitrificación ya que sólo lo pueden llevar a cabo microorganismos desnitrificantes. Se conocen dos



**Figura 4:** Etapas del proceso de desnitrificación. Se muestran los intermediarios y productos, así como también las enzimas responsables de cada etapa. (Figura obtenida de Madigan et al. 2019)

tipos de nitrito reductasas presentes en estos microorganismos, NirS y NirK, las cuales parecen ser mutuamente excluyentes en un mismo genoma (Jones et al. 2008), aunque recientemente se han reportado unos pocos genomas que presentan ambas variantes (Graf et al. 2014). Las dos enzimas llevan a cabo la misma función en el proceso de desnitrificación, pero son estructuralmente diferentes: la enzima NirS contiene un citocromo cd1 en su sitio activo mientras que la enzima NirK es dependiente de Cu (Shapleigh, 2013; Zumft, 1997).

Los genes que codifican para estas dos enzimas, *nirS* y *nirK*, son los genes funcionales de elección como marcadores genéticos de abundancia y diversidad de las poblaciones desnitrificantes, y han sido utilizados para estudiar estos microorganismos en diversos ambientes (Hallin et al. 2007). Además, se ha demostrado que la filogenia de los genes *nir* no es congruente con la del gen 16S rRNA (Jones et al. 2008) lo cual limita la utilidad de estudios moleculares basados en el gen 16S rRNA para abordar el estudio de las poblaciones desnitrificantes.

El óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) es altamente tóxico para la célula por lo que es rápidamente reducido a  $\text{N}_2\text{O}$ . Han sido descritas dos variantes de las enzimas óxido nítrico reductasas (Nor) que realizan este paso en el proceso de desnitrificación, cNor y qNor (Zumft, 1997).

Sin embargo, también ha sido encontrada qNor en microorganismos no desnitrificantes y se cree que participa en procesos de desintoxicación celular (Philippot, 2005) y dismutación de NO a N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Ettwig et al. 2010).

El último paso de la desnitrificación es la reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>, reacción que es llevada a cabo únicamente por la enzima oxido nitroso reductasa (NosZ). Esta enzima presenta gran relevancia en el ciclo del nitrógeno ya que permite completar el proceso de desnitrificación hasta N<sub>2</sub>, que luego puede ser transformado a amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) por los microorganismos fijadores de nitrógeno. Se han descrito dos variantes de esta enzima, NosZI y NosZII, o típica y atípica respectivamente (Jones et al. 2013; Sanford et al. 2012). Aunque el producto final de la desnitrificación es el N<sub>2</sub>, en algunas circunstancias puede acumularse N<sub>2</sub>O a causa de la desnitrificación incompleta. Varios organismos desnitrificantes carecen de la enzima NosZ. Un ejemplo de esto son los hongos desnitrificantes, que no poseen la habilidad de reducir el N<sub>2</sub>O (Maeda et al. 2015), pero también se ha reportado la ausencia de genes *nosZ* en varias especies de bacterias desnitrificantes como aquellas afiliadas al phylum *Actinobacteria* (Graf et al. 2014; Hallin et al. 2018). Análisis recientes realizados sobre genomas han estudiado los patrones de co-ocurrencia entre estas dos variantes de genes *nosZ* con otros genes de la desnitrificación, encontrando que cerca del 40% de todos los genomas que poseen genes *nir* carecen de genes *nosZ* (Graf et al. 2014; Hallin et al. 2018). Además, estos estudios encontraron un alto porcentaje de genomas con *nosZI* que también poseen alguna de las variantes del gen *nir* (*nirS* o *nirK*), lo que significa que los microorganismos con el gen *nosZI* presentan mayor probabilidad de realizar el proceso de desnitrificación completa hasta N<sub>2</sub>. Por otro lado, de acuerdo a estos análisis los microorganismos desnitrificantes tipo *nirK* tienen una menor probabilidad de realizar la desnitrificación completa, ya que solo una baja proporción de los genomas con *nirK* poseen alguna variante del gen *nosZ*. Estas observaciones resultan de gran utilidad cuando se aplican exclusivamente técnicas independientes del cultivo basadas en los genes *nir* y *nosZ* para estudiar estas poblaciones, a la hora de inferir su contribución a las emisiones o al consumo de N<sub>2</sub>O.

La desnitrificación es llevada a cabo por una amplia diversidad de microorganismos, incluyendo miembros de los tres dominios, aunque la gran mayoría de los estudios sobre este proceso se han realizado sobre en el dominio *Bacteria*. Dentro de este dominio, la habilidad de desnitrificar se encuentra distribuida tanto dentro como entre diferentes géneros bacterianos afiliados a un gran número de phyla y no puede ser asociada a ningún grupo taxonómico específico (Hallin et al. 2007). Por lo tanto, las bacterias desnitrificantes pueden presentar capacidades fisiológicas completamente diferentes. Entre estas capacidades fisiológicas, es interesante destacar que varias bacterias desnitrificantes también son capaces de llevar a cabo otros procesos claves en el ciclo del nitrógeno, como la oxidación

de amonio o la fijación de nitrógeno (Philippot y Hallin, 2006; Philippot et al. 2007).

Con algunas pocas excepciones, los desnitrificantes también son capaces de respirar oxígeno y, debido a que éste generalmente está disponible en alta concentración y su reducción proporciona más energía a la célula, se utiliza preferentemente frente a otros aceptores de electrones. No se conocen bacterias en las que la desnitrificación sea el único mecanismo para producir ATP, lo que significa que la desnitrificación no es un rasgo fisiológico esencial (Shapleigh, 2013). Las fuentes de energía de las bacterias desnitrificantes incluyen compuestos orgánicos e inorgánicos, así como también la luz, aunque los más comunes son los sustratos orgánicos. Asimismo, son capaces de utilizar como dadores de electrones desde compuestos orgánicos simples (por ejemplo, metanol, acetato y etanol), hasta compuestos inorgánicos como hidrógeno ( $H_2$ ) y compuestos reducidos de azufre (Hallin et al. 2007; Philippot y Hallin, 2006; Shapleigh, 2013). Estas características hacen que los desnitrificantes puedan encontrarse en una amplia variedad de ambientes, incluyendo en suelos agrícolas donde el proceso de desnitrificación representa una pérdida importante de nitrógeno en el sistema (Philippot et al. 2007).

## **Bacterias desnitrificantes y su importancia en sistemas agrícolas**

El nitrógeno es frecuentemente el nutriente limitante del suelo en los sistemas agrícolas. Por esta razón, las pérdidas de nitrógeno por lixiviación o generadas a través de procesos microbianos como la volatilización de amonio y la desnitrificación, son factores importantes a considerar al momento de desarrollar estrategias de manejo de este nutriente en los cultivos. En particular, la desnitrificación no solo conduce a la pérdida de nitrógeno del suelo sino también a la liberación de  $N_2O$  al ambiente, un potente GEI. Esto determina que la desnitrificación sea el principal proceso responsable de la pérdida de nitrógeno a la atmósfera y la mayor fuente de emisiones de  $N_2O$  en suelos agrícolas (Butterbach-Bahl et al. 2013).

Además de los microorganismos desnitrificantes, otras poblaciones microbianas también pueden contribuir a las emisiones de  $N_2O$  en suelos como parte de las transformaciones de compuestos inorgánicos de nitrógeno. En la nitrificación, el  $N_2O$  se produce por la oxidación de la hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) durante la oxidación de  $NH_4^+$  a  $NO_2^-$ . Por otro lado, en la desnitrificación nitrificante la oxidación de  $NH_4^+$  a  $NO_2^-$  es seguida de la reducción de  $NO_2^-$  a  $N_2$  vía  $N_2O$  (Wrage et al. 2004). Durante la amonificación respiratoria o reducción desasimilativa de nitrato a amonio (DNRA),  $NO_3^-/NO_2^-$  se reduce a  $NH_4^+$  con la formación concomitante de pequeñas cantidades de  $N_2O$  como producto de la detoxificación de NO celular (Rütting et al. 2011). Aunque se desconoce la magnitud de la contribución de este proceso a las emisiones de  $N_2O$ , se cree que contribuye mínimamente en comparación con la desnitrificación y la oxidación de amonio. El  $N_2O$  también puede



formarse en procesos microbianos acoplados a reacciones químicas abióticas (quimionitrificación) (Coby y Picardal, 2005). Además, la producción de NO y N<sub>2</sub>O ha sido reportada en bacterias oxidantes de nitrito, bacterias anaerobias oxidantes de amonio (anammox) y bacterias anaerobias oxidantes de metano dependientes de nitrito. Sin embargo, hay muy poca información disponible sobre las condiciones y la cantidad de NO y N<sub>2</sub>O producido por estas bacterias (Butterbach-Bahl et al. 2013; Schreiber et al. 2012).

Las altas cantidades de fertilizantes nitrogenados utilizados en la actualidad pueden incrementar considerablemente las pérdidas de nitrógeno del suelo. Hofstra y Bouwman, 2005 demostraron que el tipo de cultivo, el tipo de fertilización y la tasa de aplicación de nitrógeno son los factores más importantes relacionados a las prácticas de manejo que influyen en la desnitrificación en suelos agrícolas. Estos autores encontraron que las mayores tasas de desnitrificación se alcanzaron en suelos con pobre capacidad de drenaje cuando se aplicaron altas cantidades de nitrógeno.

En el cultivo de arroz, el nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes y es fundamental durante todo el ciclo del cultivo. En comparación con otros cultivos de secano, los arrozales inundados pueden presentar una fuerte actividad nitrificante-desnitrificante estimulada por la alternancia de condiciones óxicas y anóxicas en el sistema. Esta sucesión de etapas de inundación y secano combinadas con altas aplicaciones de nitrógeno pueden causar importantes pérdidas por desnitrificación (Hofstra y Bouwman, 2005). Además, se ha visto que las emisiones de N<sub>2</sub>O en arrozales presentan una gran variación espacio-temporal (Pittelkow et al. 2013; Tarlera et al. 2016) y que los principales factores que determinan estas emisiones son las condiciones de manejo de agua y las prácticas de fertilización (Guo y Zhou, 2007). Sin embargo, las bajas emisiones de N<sub>2</sub>O reportadas durante el cultivo de arroz inundado en comparación con otros cultivos de secano, indican que el N<sub>2</sub> es el principal gas producto de la desnitrificación en el cultivo de arroz (Ishii et al. 2011; Nishimura et al. 2005), lo cual indicaría una importante actividad de microorganismos reductores de N<sub>2</sub>O, ya sea desnitrificantes o no desnitrificantes.

## **Metodologías para el estudio de comunidades microbianas asociadas a plantas**

Las metodologías dependientes del cultivo son fundamentales para definir y caracterizar nuevas especies. Las principales ventajas que presentan son su bajo costo y la posibilidad de contar con los microorganismos en el laboratorio para futuros estudios. A pesar de estas ventajas, es bien conocido que solo una pequeña fracción de los microorganismos presentes en una comunidad son posibles de ser recuperados mediante métodos dependientes del cultivo. En el caso de las bacterias que se asocian fuertemente a las plantas, en particular aquellas que viven como endófitas, no resulta para nada sencillo reproducir en el laboratorio condiciones aptas para el desarrollo de todas las bacterias ya

que aún existe un gran desconocimiento de todos los factores que la planta aporta para su crecimiento. En el cultivo de arroz, el estudio de microorganismos cultivables asociados a la planta ha estado focalizado en la recuperación principalmente de especies aerobias o microaerófilas que presentan propiedades promotoras del crecimiento vegetal (Hardoim et al. 2015; Loaces et al. 2011; Rariz et al. 2013; Yousefi y Hasanzadeh, 2019), mayoritariamente en la búsqueda de cepas con potencial biotecnológico que permitan aumentar la productividad de los cultivos o minimizar el uso de agroquímicos. Han sido aisladas bacterias endófitas a partir de diferentes partes de la planta incluyendo la raíz, el tallo, las hojas e incluso a partir de la semilla (Hardoim et al. 2012; Mano y Morisaki, 2008; Yousefi y Hasanzadeh, 2019). Para el estudio de los microorganismos anaerobios asociados a plantas, el uso de métodos dependientes del cultivo resulta aún más difícil debido a la complejidad asociada a su cultivo en el laboratorio bajo condiciones anóxicas.

Debido a estas dificultades, el uso de metodologías moleculares independientes del cultivo para abordar el estudio de las comunidades microbianas asociadas a las plantas se ha extendido ampliamente, a pesar de sus sesgos. Los métodos moleculares permiten estudiar la composición de una comunidad de bacterias en cualquier ambiente sin necesidad de cultivarlas en el laboratorio, empleando marcadores moleculares, principalmente los ácidos nucleicos. La mayoría de las técnicas moleculares utilizadas en estudios de comunidades microbianas están basadas en la amplificación de genes marcadores que brindan información muy valiosa como el gen 16S rRNA o los genes funcionales cuya presencia determina una capacidad metabólica particular.

En las últimas décadas, los métodos moleculares más utilizados para determinar la composición de las comunidades bacterianas han sido métodos de fingerprinting como DGGE (*Denaturant Gradient Gel Electrophoresis*) y T-RFLP (*Terminal Restriction Length Polymorphism*) o el clonado y análisis de bibliotecas, y han sido aplicados exitosamente para el estudio de las comunidades asociadas a las plantas (Ferrando et al. 2012; Hardoim et al. 2012; Prakamhang et al. 2009; Scheid et al. 2004; Sun et al. 2008). Los análisis de diversidad de comunidades realizados mediante clonado y análisis de clones mediante secuenciación, implican un alto costo que limita el análisis a unos cientos de clones en unas pocas muestras. A pesar de ser menos costosa que el clonado, la técnica de DGGE continúa siendo poco útil para analizar un gran número de muestras, requiere equipamiento específico y su optimización es trabajosa. Por su parte, la técnica de T-RFLP es un método ya clásico en ecología microbiana, sencillo y de bajo costo que permite realizar un screening de la diversidad de comunidades microbianas en un gran número de muestras. Esta técnica ha sido aplicada para determinar la composición de comunidades bacterianas endófitas, tanto dirigida al gen 16S rRNA para estudiar la comunidad total (Ferrando et al. 2012; Sun et al. 2008) como también dirigida a genes funcionales para estudiar grupos

microbianos específicos (Ferrando y Fernández Scavino, 2015; Wu et al. 2009).

Más recientemente se han comenzado a aplicar otras metodologías moleculares más modernas que permiten determinar con mayor sensibilidad y una alta profundidad de análisis la abundancia y la composición de las comunidades microbianas. La PCR cuantitativa (qPCR o PCR en tiempo real) es una técnica muy útil para determinar la abundancia de poblaciones microbianas y ha sido ampliamente utilizada para cuantificar grupos fisiológicos asociados a plantas, por ejemplo, desnitrificantes (Jin et al. 2020), metanogénicos y reductores de sulfato rizosféricos (Y. Liu et al. 2019), y diazótrofos endófitos (Ferrando y Fernández Scavino, 2015).

Las herramientas de análisis genómico y metagenómico aplicadas al estudio de la estructura de comunidades microbianas han cobrado relevancia en los últimos años, ya que permiten obtener un gran volumen de información y detectar integrantes minoritarios de las comunidades. La secuenciación masiva de genes 16S rRNA se ha convertido en una técnica fundamental para estudiar la composición y diversidad de comunidades microbianas complejas y dinámicas en diversos ambientes. Esta técnica permite obtener para una sola muestra del orden de miles de secuencias de un fragmento del gen, y mediante comparación de estas secuencias con las depositadas en bases de datos, es posible obtener información sobre el microorganismo al que pertenece cada secuencia. Varios estudios recientes han utilizado enfoques genómicos y metagenómicos para profundizar en el conocimiento sobre la composición y organización de los microbiomas asociados a distintas plantas, incluyendo la planta de arroz (Breidenbach, Pump et al. 2016; J. Edwards et al. 2015; Knief et al. 2012; Sessitsch et al. 2012). Sin embargo, el principal desafío continúa siendo elucidar el vínculo entre la estructura de estas comunidades y las funciones que pueden estar cumpliendo en el sistema.

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Estudiar el microbioma y grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental asociados al cultivo de arroz.

## Objetivos específicos

1. Estudiar la estructura y dinámica del microbioma bacteriano de suelo, rizósfera y raíces de arroz, en dos etapas del ciclo de cultivo.
2. Evaluar el impacto de la utilización de sistemas de rotación de cultivos con distinto grado de intensificación sobre el microbioma asociado a la planta de arroz.
3. Optimizar técnicas moleculares para estudiar grupos fisiológicos anaerobios de relevancia ambiental asociados a raíces de arroz.
4. Estudiar la abundancia, diversidad y composición de las comunidades de bacterias reductoras de sulfato (BRS) y bacterias desnitrificantes asociadas al cultivo de arroz.

## Trabajo de tesis

En esta tesis se realizó el estudio de las comunidades microbianas establecidas en suelo, rizósfera y raíces de plantas de arroz a partir de un ensayo de campo, utilizando distintas herramientas moleculares (qPCR, T-RFLP y secuenciación masiva de amplicones). Por un lado, se evaluó la dinámica del microbioma bacteriano a lo largo del ciclo de cultivo de arroz y cómo se vio impactado por la utilización de distintos sistemas de rotación de cultivos con diferente grado de intensificación. Por otra parte, se optimizaron metodologías moleculares que permitieron estudiar grupos fisiológicos de relevancia ambiental abordando su abundancia y diversidad en distintas etapas del ciclo de cultivo.

La tesis se encuentra estructurada en tres capítulos que responden a los objetivos específicos mencionados. En el *Capítulo 1* se presentan los resultados de la optimización de dos técnicas moleculares utilizadas para estudiar la abundancia (qPCR), diversidad y estructura (nested-PCR T-RFLP) de las comunidades reductoras de sulfato asociadas al

cultivo de arroz, abordando de esta forma el objetivo específico 3. El estudio del microbioma bacteriano establecido en los distintos nichos (suelo, rizósfera y endósfera de raíces) a lo largo del ciclo de cultivo se abordó en el *Capítulo 2*, y se realizó la identificación de taxones bacterianos rizosféricos y endófitos fuertemente asociados a los distintos sistemas de rotación evaluados (objetivos específicos 1 y 2). En el *Capítulo 3* se describen los resultados referentes a la estructura de las comunidades de bacterias reductoras de sulfato y bacterias desnitrificantes (objetivo específico 4), así como también la abundancia de arqueas metanogénicas. Finalmente, se presentan las principales conclusiones y perspectivas de este trabajo.

## Capítulo 1

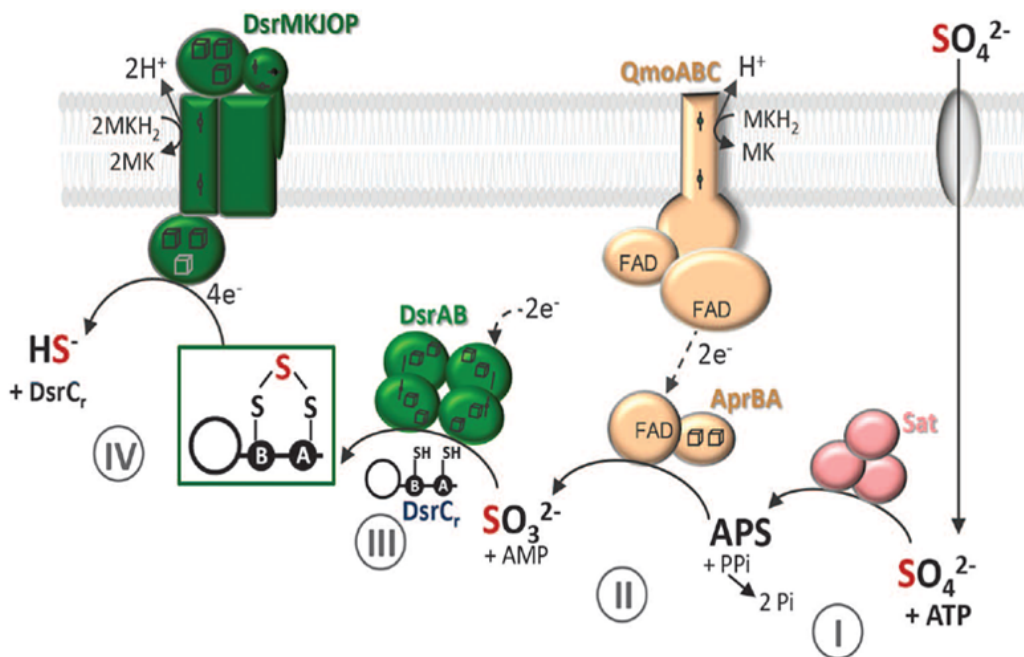
# OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE COMUNIDADES REDUCTORAS DE SULFATO ASOCIADAS A RAÍCES DE ARROZ

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Las metodologías moleculares utilizadas para estudiar las bacterias reductoras de sulfato (BRS) dentro de comunidades complejas se basaron inicialmente en el análisis comparativo de secuencias del gen marcador 16S rRNA. Se han descrito diferentes conjuntos de primers para la amplificación específica de fragmentos del gen 16S rRNA de diferentes grupos de BRS, algunos dirigidos a géneros específicos, como *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter*, y otros a grupos de géneros como *Desulfonema* – *Desulfosarcina* – *Desulfococcus* y *Desulfovibrio*- *Desulfomicrobium* (Benaiges-Fernandez y Urmeneta, 2018; Daly et al. 2000). Sin embargo, la detección de todos los miembros mediante el uso de un solo par de primers dirigido a este gen se ve restringida debido a que son grupos filogenéticamente diversos, además de limitar la identificación de nuevos linajes. Asimismo, el análisis basado en el gen 16S rRNA no proporciona información que permita vincular la identidad genética de un microorganismo no cultivado con sus características fisiológicas o metabólicas. Por esta razón, los estudios moleculares más recientes se han enfocado en el uso de genes marcadores funcionales que codifican enzimas claves de la vía de reducción de sulfato.

Como se explicó en detalle en la *Introducción general* de esta tesis, la reducción desasimilativa de sulfato implica la reducción inicial de sulfato a sulfito por una combinación de dos enzimas, sulfato adeniltransferasa (Sat) y adenosina-5' fosfosulfato (APS) reductasa (AprBA), seguida de la reducción de sulfito a sulfuro por la sulfito reductasa (DsrAB). Las reductasas, codificadas por los genes *aprBA* y *dsrAB* respectivamente, catalizan los pasos limitantes del ciclo global del azufre ya que les confieren a ciertas bacterias y arqueas la capacidad de crecer mediante la reducción de sulfato (Leavitt et al. 2015; Rabus et al. 2015). Un estudio genómico comparativo de procariotas reductores de sulfato reveló que tanto estos genes como aquellos que codifican para la ferredoxina y tres complejos asociados a la membrana (QrcABCD, QmoABC y DsrMKJOP) se encuentran ampliamente conservados y son fundamentales en el mecanismo de reducción de sulfato (Pereira et al. 2011) (Figura 1.1). Además, varios estudios han mostrado el importante rol de la proteína plasmática DsrC, la cual forma un complejo con la DsrAB que permite la reducción de sulfito a sulfuro a través de la formación de DsrC-trisulfuro (Santos et al. 2015; Venceslau et al. 2014) (Figura 1.1). Sin embargo, aunque existen algunos avances recientes sobre el papel fundamental del complejo QrcABCD en el mecanismo por el cual estos microorganismos conservan la energía (Duarte et al. 2018), aún no está completamente elucidado.

Los genes *aprA* y *aprB* que codifican las subunidades alfa y beta de la reductasa AprBA, se encuentran altamente conservados entre los procariotas reductores de sulfato



**Figura 1.1:** Mecanismo propuesto para la reducción desasimilativa de sulfato. Este mecanismo implica la reducción de sulfato a adenosina-5'-fosfosulfato (APS) por la enzima Sat (I), la reducción de APS a sulfito por la enzima AprBA (II), la reducción de sulfito a DsrC-trisulfuro por el complejo DsrAB/DsrC (III), y finalmente la reducción del trisulfuro a sulfuro y la reducción de DsrC por el complejo DsrMKJOP (IV). (Figura obtenida de Santos et al. 2015)

y oxidantes de azufre, por lo tanto, son los más adecuados para estudiar la estructura de toda la comunidad microbiana involucrada en el ciclo del azufre. Sin embargo, una desventaja que presentan estos genes para ser utilizados como marcadores funcionales es que su historia evolutiva ha sido influenciada por múltiples eventos de transferencia lateral de genes que involucran linajes de procariontes sulfato reductores y oxidantes de azufre (Meyer y Kuever, 2007a, 2007b).

Las enzimas sulfito reductasas tipo DsrAB son claves tanto en las etapas reductivas como oxidativas del ciclo biogeoquímico del azufre. La alta similitud de las DsrAB de los dominios *Bacteria* y *Archaea* reflejan un origen común, por lo que su existencia se propone con anterioridad a la división de ambos dominios y podrían haber sido fundamentales en el metabolismo microbiano primitivo (Wagner et al. 1998). Son proteínas heterotetraméricas con una estructura cuaternaria  $\alpha_2\beta_2$  y grupos prostéticos sirohemo, cuyas subunidades están codificadas por los genes vecinos *dsrA* y *dsrB*, respectivamente, organizados en un operón de copia única (Dahl et al. 1993; Wagner et al. 1998). Estas enzimas catalizan la reducción de sulfito a sulfuro durante la respiración microbiana anaerobia utilizando sulfato, sulfito o compuestos organosulfurados como aceptores finales de electrones (Simon y Kroneck, 2013). También se ha reportado la presencia y transcripción de genes



*dsrAB* en bacterias del género *Pelotomaculum*, anaerobias sintróficas estrictas incapaces de reducir sulfato, sulfito u organosulfurados, lo que sugiere que estos microorganismos pueden haber perdido su capacidad para reducir sulfato y/o sulfito (Imachi et al. 2007; Imachi et al. 2006). Además, algunas bacterias oxidantes de azufre poseen una enzima DsrAB que funciona de forma inversa a la presente en las reductoras de sulfato, homóloga pero filogenéticamente distinguible de la que cataliza la reducción de sulfito a sulfuro (Loy et al. 2009).

Asimismo, diversos estudios han mostrado mediante análisis comparativos de las secuencias del 16S rRNA y las enzimas DsrAB, árboles filogenéticos con topologías consistentes, aunque existen excepciones que indican eventos de transferencia lateral de genes entre algunos taxones (Müller et al. 2015; Zverlov et al. 2005). A pesar de estas limitaciones, los genes *dsrAB* continúan siendo útiles como marcadores filogenéticos ya que permiten asignar nuevas secuencias a taxones ya descritos.

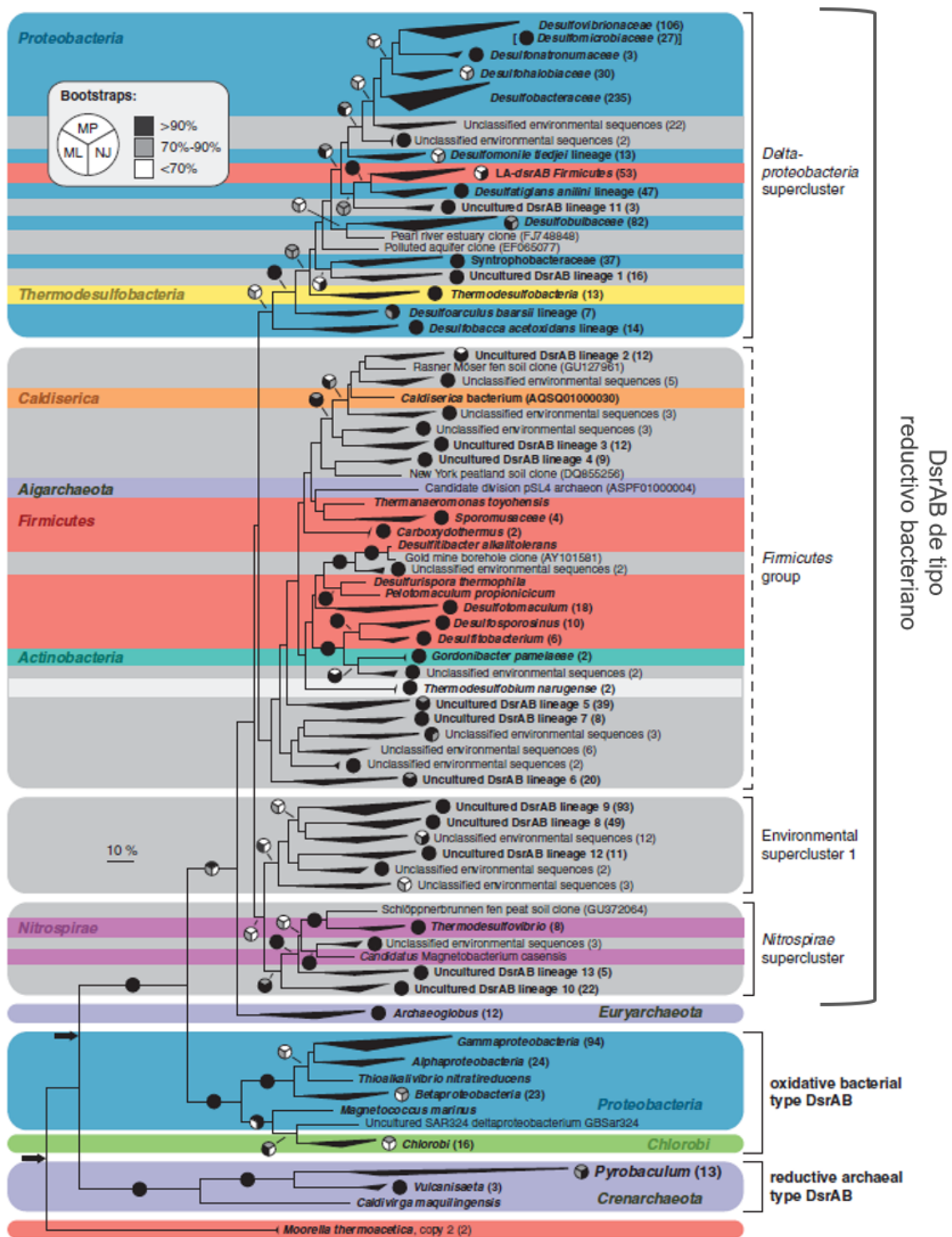
Debido a esto, en los últimos años se han diseñado diferentes conjuntos de primers dirigidos a los genes *dsrAB*, tanto del tipo reductivo como oxidativo, con el objetivo de estudiar la diversidad y abundancia de los microorganismos del ciclo del azufre en diferentes ambientes. En este sentido, el trabajo publicado por Müller et al. 2015 significó una herramienta fundamental para abordar la ecología de estos microorganismos. Este trabajo implicó la construcción de una base de datos de *dsrAB*/DsrAB completa y curada manualmente, conteniendo todas las secuencias *dsrAB* reductivas y oxidativas disponibles en la base de datos de NCBI, la cual luego fue utilizada para evaluar la diversidad desconocida de *dsrAB* en diferentes ambientes y evaluar *in silico* la cobertura de todos los primers dirigidos a estos genes publicados hasta ese momento. En la Figura 1.2 se puede observar el árbol filogenético consenso obtenido en este estudio utilizando las secuencias DsrAB reductivas y oxidativas de su base de datos, considerando una región de 530 aminoácidos (97% de similitud en la secuencia de aminoácidos). La mayoría de las secuencias DsrAB reductivas pueden ser divididas en cuatro grupos ya descritos anteriormente (Pester et al. 2012), denominados supercluster *Deltaprotebacteria*, supercluster *Nitrospirae*, supercluster ambiental 1 y el grupo *Firmicutes*; cada uno de ellos comprende al menos dos linajes y/o familias no cultivados. No obstante, cerca del 20% de las secuencias ambientales de la base de datos que cubren completamente la región de 1.9kb amplificada por los primers más utilizados (DSR1F y DSR4R; Wagner et al. 1998), no fueron afiliadas a miembros de las familias ya descritas, asignándose a 13 linajes no cultivados. Asimismo, resulta relevante que una alta proporción de las secuencias asignadas a estos linajes no cultivados pertenecen a secuencias provenientes de suelo, en particular los linajes no cultivados 1, 5, 6, 8 y 10 (Figura 1.2). Esto revela una extensa diversidad de microorganismos potencialmente reductores de sulfato aún no caracterizados en distintos ambientes, incluidos los

suelos, que podrían estar jugando un rol importante en sistemas como los estudiados en esta tesis.

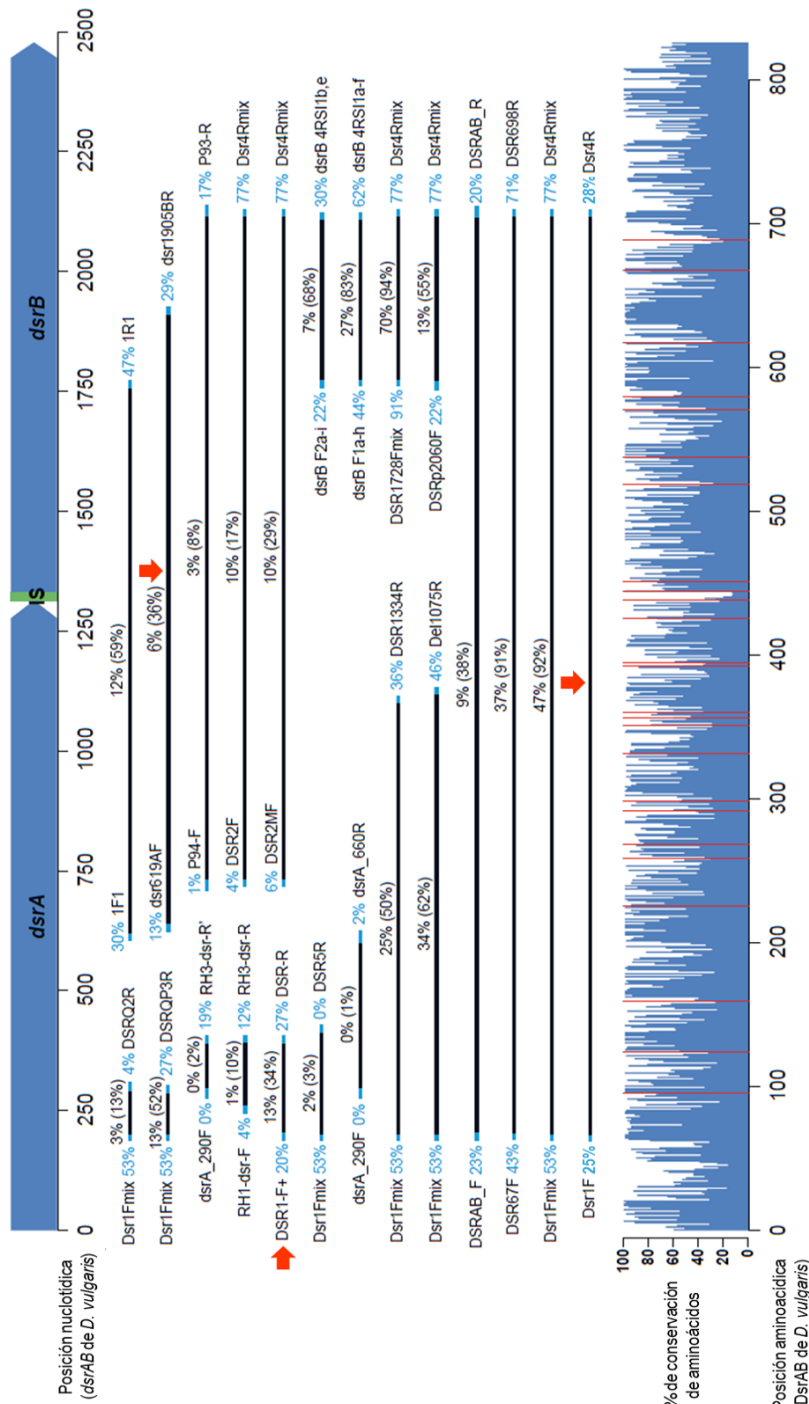
Hace más de 20 años se publicó la primera versión del par de primers DSR1F/DSR4R (Wagner et al. 1998) dirigido al gen *dsrAB* reductivo, ampliamente utilizado hasta la actualidad. Estos primers degenerados están dirigidos a regiones altamente conservadas del gen y amplifican un fragmento de aproximadamente 1.9kb que cubre el 85 % de *dsrA*, 70 % de *dsrB* y la región intergénica entre los dos genes (Figura 1.3). Varios estudios han actualizado estos primers mediante la introducción de nuevas variantes u otras modificaciones con el objetivo de ampliar su cobertura o mejorar la eficiencia de la amplificación (Kondo et al. 2004; Lever et al. 2013; Pester et al. 2010; Zverlov et al. 2005). La mayoría de estos primers son altamente específicos para este gen, pero sólo unos pocos primers o mezclas de primers alcanzan una cobertura mayor al 90 % de las secuencias disponibles en la base de datos de Müller et al. 2015 (Figura 1.3). El par de primers original DSR1F/DSR4R aún es utilizado para relevar la diversidad de microorganismos reductores de sulfato, a pesar de presentar un sesgo hacia la amplificación de secuencias del supercluster *Deltaproteobacteria*. Las mezclas de variantes de estos primers amplían significativamente su cobertura incluyendo secuencias del supercluster *Nitrospirae* y del grupo *Firmicutes* (Müller et al. 2015). Sin embargo, continúa siendo necesario diseñar nuevas variantes de primers para mejorar la cobertura, principalmente de secuencias ambientales pertenecientes a los linajes no cultivados.

Por otra parte se han diseñado, distintos primers que se unen a secuencias internas a la región DSR1F/DSR4R que permiten la amplificación de fragmentos más cortos de los genes *dsrA* y *dsrB* para ser aplicados en técnicas de PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificación de genes (Ben-Dov et al. 2007; Blazejak y Schippers, 2011; Christophersen et al. 2011; Kondo et al. 2008), clonado molecular (Moreau et al. 2010; Steger et al. 2011) y técnicas de fingerprinting como DGGE (Geets et al. 2006) y T-RFLP (Colin et al. 2017; Giloteaux et al. 2010; Santillano et al. 2010). La cobertura de estos primers fue evaluada *in silico* por Müller et al. 2015 sobre un total de 1110 secuencias de *dsrAB* que cubren completamente la región DSR1F/DSR4R, presentando la mayoría de ellos valores de cobertura menores al 50 % (Figura 1.3) y sesgos en la amplificación hacia las secuencias del supercluster *Deltaproteobacteria* y del grupo *Firmicutes*.

La técnica de qPCR de genes *dsrA* y *dsrB* ha sido utilizada para determinar la abundancia de BRS en muy diversos ambientes como sedimentos marinos (Blazejak y Schippers, 2011) agua de lago (Kondo et al. 2008), aguas residuales (Ben-Dov et al. 2007), ambientes contaminados (An et al. 2016; Stauffert et al. 2014) y también en suelos de arroz (X. Z. Liu et al. 2009; Lu et al. 2018). Asimismo, Y. Liu et al. 2019 utilizaron esta técnica en un estudio reciente para evaluar la abundancia de estas comunidades asociadas



**Figura 1.2:** Árbol filogenético consenso de las secuencias de DsrAB reductivas y oxidativas de la base de datos de Müller et al. 2015. Construido utilizando una región de 530 aminoácidos, comprendida dentro de la región amplificada por los primers DSR1F/DSR4R (97 % de similitud en la secuencia de aminoácidos). Los linajes sin representantes cultivados cercanos se muestran en fondo gris. (Figura modificada de Müller et al. 2015)



**Figura 1.3:** Sitios de unión y cobertura *in silico* de los primers dirigidos al gen *dsrAB* bacteriano reductivo. Los porcentajes de cobertura para primers individuales con 100% de homología se muestran en azul y para los pares de primers en negro. Los porcentajes de cobertura de los pares de primers considerando un *mismatch* se indican entre paréntesis. Las flechas rojas indican los pares de primers utilizados en esta tesis. No se cuenta con el valor de cobertura para el par DSR1F/DSR4R (Wagner et al. 1998) pero sí para los primers individuales. El gráfico de barras muestra la variabilidad en la secuencia de aminoácidos en DsrAB y regiones con deleciones/inserciones (barras rojas). (Figura modificada de Müller et al. 2015 información suplementaria)

a plantas en marismas. Aunque hace mucho tiempo se conoce la presencia de BRS fuertemente asociadas a la planta de arroz (Wind y Conrad, 1995; Wind et al. 1999), estos estudios implicaron técnicas de cultivo, pero no se han utilizado abordajes que apunten a estudiar la abundancia y diversidad de la comunidad total de reductores de sulfato (cultivables y no cultivables) a nivel de la rizósfera ni en los tejidos internos de plantas de arroz.

La técnica de T-RFLP, una herramienta molecular ampliamente utilizada en el área de la ecología microbiana para evaluar la diversidad de comunidades microbianas, ha sido aplicada para el seguimiento de comunidades sulfato reductoras en el tiempo, en el espacio o en diferentes tratamientos experimentales (Colin et al. 2017; Giloteaux et al. 2013; Mori et al. 2018). En particular, Giloteaux et al. 2010 desarrollaron una estrategia de nested-PCR con primers internos a la región DSR1F/DSR4R (primers 619AF/1905BR, ver Figura 1.3) para estudiar la diversidad de las comunidades reductoras de sulfato en ambientes con baja abundancia de estos microorganismos mediante T-RFLP, y demostraron que este abordaje no disminuyó la diversidad obtenida en comparación con la PCR directa en muestras de agua y sedimentos marinos. Por lo tanto, esta estrategia podría ser útil para abordar el estudio de la diversidad de estas comunidades en ambientes que posiblemente presentan una baja cantidad de copias del gen *dsrAB* como la rizósfera y las raíces de arroz, a pesar de su baja cobertura (36 % según Müller et al. 2015).

Como fue mencionado antes, en los últimos años las técnicas de secuenciación masiva de genes han resultado una herramienta muy importante para profundizar en el estudio de las comunidades microbianas de diferentes ambientes. Aunque el gen 16S rRNA ha sido el gen de elección en la inmensa mayoría de estos estudios, esta técnica se aplica cada vez más a genes marcadores funcionales que son específicos de grupos microbianos de particular interés, como el gen *nifH* para fijadores de nitrógeno (Ferrando y Fernández Scavino, 2015), los genes *nirS* y *nirK* para desnitrificantes (Bellini et al. 2018) y el gen *mcrA* para metanogénicos (Zelege et al. 2013), entre otros. Sin embargo, la detección e identificación eficiente de secuencias de genes funcionales en muestras ambientales mediante estas tecnologías depende fuertemente de la base de datos que se utilice y del uso de primers que permitan la amplificación de fragmentos cortos, pero con un alto porcentaje de cobertura de la diversidad del grupo microbiano de interés. Debido a esto y a la complejidad del procesamiento bioinformático de los resultados, hasta el momento existen solo unos pocos trabajos que han abordado el estudio de la estructura de comunidades reductoras de sulfato a partir de muestras ambientales mediante secuenciación masiva del gen *dsrB* (Lu et al. 2018; Zelege et al. 2013; Y. Zhang et al. 2017) o ambos genes *dsrA* y *dsrB* simultáneamente (Pelikan et al. 2016).

En este capítulo se describe la optimización de dos técnicas moleculares dirigidas al gen

funcional *dsrAB* utilizadas en el trabajo de tesis para abordar el estudio de la abundancia (qPCR gen *dsrA*), diversidad y estructura (nested-PCR T-RFLP del gen *dsrAB*) de las comunidades de BRS en suelo y asociadas a raíces de arroz.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Optimización de la técnica qPCR para cuantificación de genes *dsrA*

#### 1.2.1.1. Preparación del estándar

**Cultivo y extracción de ADN de cepa patrón.** Para la cuantificación del gen *dsrA* mediante la técnica de qPCR, se preparó un estándar del gen a partir de una cepa de colección *Desulfovibrio desulfuricans* (DSMZ 642). La cepa se cultivó en medio líquido (API) - RST (Tanner, 1989) por 7 días a 30°C en oscuridad. El crecimiento de la cepa se verificó por la presencia de un precipitado negro que se forma como consecuencia de la producción de sulfuro en presencia de una sal de hierro. Las células se obtuvieron mediante centrifugación de 5ml del medio líquido durante 10min a 13000rpm. Luego, el pellet se resuspendió en 200µl de agua milli-Q estéril y se extrajo el ADN utilizando el Fast DNA® SPIN Kit (MP Biomedicals) siguiendo las especificaciones del fabricante con la excepción de que se utilizó el Mini-BeadBeater (BioSpec Products) para la ruptura mecánica de las células con un único ciclo a 2500rpm durante 1min. La calidad del ADN extraído fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en TBE 0.5X durante 30min, utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Fermentas).

**Amplificación por PCR del gen *dsrA*.** Se amplificó mediante PCR el gen *dsrA* utilizando los primers DSR1F+/DSR-R (Kondo et al. 2004). La reacción de PCR fue llevada a cabo en 25µl conteniendo dNTPs 0.2mM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 3.5mM, BSA 0.2 mg.ml<sup>-1</sup> (Amresco), 0.4µM de cada primer, buffer para la Taq polimerasa 1X, Taq DNA polimerasa 1.25U (Thermo Scientific) y aprox. 10ng de ADN extraído. Se utilizó un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) con el siguiente programa de temperatura: un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 4min, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30s, 60°C durante 30s y 72°C durante 60s, con un paso de extensión final a 72°C durante 7min. Se verificó el tamaño del amplicón de interés en gel de agarosa 1.5 % (221pb), utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 50pb (Fermentas).

**Clonado del gen *dsrA* y verificación del inserto mediante PCR y secuenciación.** El producto amplificado fue clonado y transformado mediante electroporación en células electrocompetentes (*Escherichia coli* TOP10) utilizando el kit TOPO® TA® Cloning Kit (Invitrogen) con el vector de clonado pCR 4-TOPO. Para favorecer la ligación del producto en el sitio de clonado del vector, se adicionó una cola poliA-3' incubando el producto de PCR con 2µl de dATP (25mM, Invitrogen) y 1U de Taq polimerasa (Invitrogen) durante

10 minutos a 72°C. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 6µl conteniendo NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, 1µl del vector pCR 4-TOPO y aprox. 100ng de producto de PCR, incubando 5min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 3µl de la reacción de ligación (vector de clonado más inserto de interés) a un eppendorf conteniendo células electrocompetentes *Escherichia coli* TOP10, se agitó suavemente y se mantuvo en hielo durante 1min. Para realizar la transformación de las células, se transfirió esta mezcla a una celda de electroporación de 0.2cm y se electroporó a 2.48kV durante 4.6ms. Inmediatamente después, se adicionó a la celda 250µl de medio de cultivo SOC (suministrado con el kit) recomendado para la recuperación de las células luego de la electroporación. A continuación, se transfirió todo el contenido de la celda a un eppendorf y se agitó durante 1h a 37°C para permitir la expresión de la resistencia a los antibióticos en las células transformadas. Finalmente, esta suspensión de células transformadas se sembró en medio LB agar (Luria-Bertani) con ampicilina (100µg/ml) y kanamicina (50µg/ml). Para asegurarse de obtener colonias aisladas, se sembraron dos placas, una con 50µl de la suspensión de células (sin diluir) y otra con 50µl de una dilución 1:10. Las placas se incubaron a 37°C durante 24hs. A partir de las colonias aisladas obtenidas, se seleccionaron 6 clones al azar y se reaislaron en placas de LB agar con ampicilina y kanamicina. Se verificó la presencia del inserto en estos clones mediante la amplificación directamente desde las colonias con los primers específicos para el gen de interés (DSR1F+/ DSR-R) y con los primers correspondientes al vector T3/T7 (5'- ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3' / 5'- TAATACGACTCACTATAGGG- 3'), y posterior electroforesis en gel de agarosa. La reacción de PCR con los primers DSR1F+/ DSR-R se realizó según las condiciones descriptas anteriormente. La PCR con los primers T3/T7 se llevó a cabo en un volumen final de 25µl conteniendo dNTPs 0.2mM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 0.12mM, BSA 0.4 mg.ml<sup>-1</sup> (Amresco), 0.1µM de cada primer, buffer para la Taq polimerasa 1X y Taq DNA polimerasa 1U (Thermo Scientific). El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: 7min a 94°C, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1min, 55°C durante 1min y 72°C durante 1min, con un paso de extensión final a 72°C durante 10min. Luego, se secuenciaron dos de estos clones con el primer T7 en el servicio de secuenciación de Macrogen (Corea del Sur) se analizaron las secuencias con el software libre Chromas 2.5.1 y se verificó su identidad mediante la comparación con la base de datos de NCBI mediante el algoritmo BLASTx.

**Extracción del plásmido, obtención del fragmento del gen *dsrA* y cuantificación del estándar.** Ambos clones se cultivaron en tubos con 5ml de caldo LB con ampicilina, se extrajo el plásmido mediante el kit comercial PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante, y se amplificó por triplicado el inserto con los primers T3/T7 utilizando las mismas condiciones descriptas anteriormente



para estos primers. Se hizo un pool de los triplicados de ambos clones, se verificó nuevamente el tamaño del amplicón por electroforesis (325pb en total, 221pb del fragmento del gen *dsrA* amplificado más 104pb de la región que flanquea la posición de inserción T3/T7 del vector de clonado). Se purificó y concentró el producto mediante columna MICROCON100 (Millipore) y se cuantificó con el kit Qubit® dsDNA HS Assay en fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen). El número de copias del gen *dsrA* se calculó teniendo en cuenta el largo total del fragmento (325pb), el peso molecular promedio del ADN y la constante de Avogadro, según el cálculo 1.1. El estándar preparado fue alicuotado por 2µl y congelado a -20°C para ser usado en todas las corridas de qPCR del gen *dsrA* realizadas posteriormente.

$$\text{copias } dsrA \cdot \mu\text{l}^{-1} = \frac{N_A (\text{copias/mol}) \times \text{concentración amplicón (g/ml)}}{\text{tamaño amplicón (pb)} \times \text{PM ADN (g/mol/pb)}} \times 1000 \quad (1.1)$$

Donde  $N_A$  = Constante de Avogadro; PM = Peso Molecular.

### 1.2.1.2. Optimización de la qPCR de genes *dsrA* para suelos y raíces

Para la optimización de la reacción se evaluaron distintos parámetros como la concentración de primers, la presencia de inhibidores en la matriz, la especificidad y eficiencia de la reacción, así como el rango dinámico.

Se optimizaron las condiciones de corrida de la qPCR del gen *dsrA* utilizando ADN de suelos y raíces de arroz proveniente de estudios anteriores. Para esto se trabajó con la mezcla de reacción comercial Rotor Gene SYBR Green PCR Kit® (QIAGEN) y el termociclador Rotor Gene® 600 para Real Time PCR de QIAGEN. El ciclo de temperatura se basó en el recomendado por el fabricante de la mezcla de reacción y consistió en un primer paso a 95°C durante 5min, seguido de 40 ciclos de 5s a 95°C, 10s a 60°C annealing y extensión y 1s a 80°C (adquisición de fluorescencia). Se programó esta última etapa adicional a 80°C para la adquisición de la señal de fluorescencia con el objetivo de evitar la interferencia de la señal con los dímeros de primers que se observaron entre 60 y 70°C en las curvas de melting. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 10µl, conteniendo 5µl de la mezcla de reacción comercial mencionada, 2µl de cada primer (DSR1F+/ DSR-R; Kondo et al. 2004) y 1µl del estándar o de la muestra de ADN (concentrado o diluido). Se probaron diferentes concentraciones finales de los primers (0.5, 0.7 y 1 µM) y diluciones al décimo de las muestras (0, 1:10, 1:100) para verificar ausencia de inhibición en la amplificación. Las cuantificaciones se realizaron utilizando duplicados técnicos y controles de amplificación sin ADN por triplicado. En cada corrida se realizó una curva de calibración utilizando triplicados técnicos de cada dilución del estándar (di-

luciones decimales sucesivas desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-10}$ , correspondientes a  $3.9 \times 10^5$  hasta 3.9 copias del gen *dsrA* ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) y se evaluó la linealidad ( $r^2$ ) y la eficiencia de la reacción. Se realizó la curva de melting en todas las corridas incrementando la temperatura de a  $1^\circ\text{C}$  desde  $60^\circ\text{C}$  hasta  $95^\circ\text{C}$  para verificar la especificidad del producto de amplificación obtenido y la ausencia de dímeros de primers. Se consideró como específico un producto de amplificación en el rango de  $87\text{-}93^\circ\text{C}$ . Asimismo, algunos de los productos de amplificación obtenidos tanto en las curvas de calibración como a partir de las muestras se corrieron en geles de agarosa 1.5% para confirmar el tamaño del fragmento (221pb) y la ausencia de bandas inespecíficas. Estos productos se verificaron por secuenciación (servicio de Macro-gen, Corea del Sur), análisis de las secuencias (software Chromas 2.5.1) y su identificación mediante comparación con la base de datos de NCBI con la herramienta BLASTx.

### 1.2.2. Optimización de la técnica de T-RFLP para el gen *dsrAB*

Para el estudio de la estructura y diversidad de las comunidades BRS, se optimizó la técnica nested-PCR T-RFLP para el gen *dsrAB* utilizando como referencia el trabajo de Giloteaux et al. 2010 .

#### 1.2.2.1. Nested PCR para el gen *dsrAB* en rizósfera y raíces de arroz

La estrategia nested PCR implica dos amplificaciones consecutivas. Para la amplificación del gen *dsrAB* se utilizaron los primers DSR1F/4R (Wagner et al. 1998) en la primera amplificación (PCR1) y los primers DSR619AF/1905BR (Giloteaux et al. 2013; Giloteaux et al. 2010) en la segunda (PCR2), con el primer forward DSR619AF marcado en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (Tabla 1.1).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) en un volumen total de  $25\mu\text{L}$  conteniendo 1.5U de Taq Polimerasa (Invitrogen), buffer Taq 1X (Invitrogen), y variando la concentración de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen), dNTPs (Thermo Scientific) y primers en ambas amplificaciones. Las diferentes combinaciones de condiciones ensayadas en cada amplificación se describen en detalle en las Tablas 1.2 y 1.3.

En la Tabla 1.2 se muestran las condiciones A-I ensayadas en la PCR1. En esta primera amplificación se probaron las siguientes concentraciones de reactivos:  $\text{MgCl}_2$  1.5, 2, 3, 3.5, 4 y  $5\mu\text{M}$ ; dNTPs 0.2 y  $0.4\mu\text{M}$ ; primers DSR1F/4R 0.2, 0.4, 0.5 y  $1\mu\text{M}$ . Asimismo, en cada reacción se utilizó  $2\mu\text{l}$  de ADN de muestras de rizósferas y raíces, concentradas y diluidas al décimo ( $10\text{-}100\text{ng. } \mu\text{l}^{-1}$ ). Para la PCR2 se probaron las condiciones A-F descritas en la Tabla 1.3. Las concentraciones de reactivos ensayadas en la PCR2 fueron las siguientes:  $\text{MgCl}_2$  1.5 y  $2.5\mu\text{M}$ ; dNTPs 0.2 y  $0.4\mu\text{M}$ ; primers DSR619AF/1905BR 0.2, 0.4 y  $0.5\mu\text{M}$ . En

esta segunda PCR, se utilizó como molde el producto de PCR de la primera amplificación concentrado y diluido (1:10 y 1:100). Inicialmente, se utilizaron los productos de la PCR1-A (condiciones originales de Giloteaux et al. 2010) pero no se detectó amplificación mediante gel de agarosa. Luego, se utilizaron los productos de las PCR1-H y PCR1-I en las cuales sí se había verificado amplificación.

Se ensayó el ciclo de temperatura descrito por Giloteaux et al. 2010 para ambas amplificaciones: 94°C por 5min seguido de 35 ciclos a 94°C durante 45s, una etapa de annealing durante 45s a 55°C para la PCR1 y a 54°C para la PCR2, y 72°C durante 90s, con un paso de extensión final a 72°C durante 10min. Debido a que utilizando este ciclo no se alcanzó una amplificación exitosa, se ensayaron distintas modificaciones en la temperatura y duración de algunas etapas (Tablas 1.2 y 1.3). En la PCR1 se ensayaron dos nuevas temperaturas de annealing (53 y 50°C) mientras que en la PCR2 se modificó la duración de las etapas de desnaturalización a 60s, annealing a 60s y la de extensión a 2min.

La PCR1 fue realizada por duplicado mientras que la PCR2 se realizó por triplicado. En todas las amplificaciones se incluyó como control positivo ADN de la cepa *Desulfovibrio desulfuricans* (DSMZ 642) y se corrieron geles de agarosa 1% en TBE 0.5X (45 min a 100mv) con los productos obtenidos para confirmar la presencia y el tamaño de la banda de interés (1200-1400pb), utilizando el intercalante GoodView (SBS Genetech Co.) y el marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb (Fermentas).

nested -PCR	Secuencia	Nombre	Posición*	Referencia
Primera amplificación (PCR1)	5'- ACS CAC TGG AAG CAC G - 3'	DSR1F	187-202	Wagner et al. 1998
	5'- GTG TAG CAG TTA CC GCA - 3'	DSR4R	2113-2129	Wagner et al. 1998
Segunda amplificación (PCR2)	5'- GYC CGG CVT TCC CST ACA A -3'	DSR619AF**	623-641	Giloteaux et al. 2010
	5'- ATG TGC GGC GCS GTD CAY -3'	DSR1905BR	1909-1926	Giloteaux et al. 2010

**Tabla 1.1:** Secuencias de los primers utilizados en las amplificaciones por nested-PCR del gen *dsrAB* para el T-RFLP. \*Se indica la posición en el gen *dsrAB* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (NC-002937, 449888...452365). \*\*Primer marcado en el extremo 5' - con 6-carboxifluoresceína.

Primera amplificación (PCR1)	Combinación de condiciones ensayadas								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1.5	2	3	3.5	4	5	5	5	4
dNTPs (mM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Primers DSR1F/4R (μM)	0.2	0.4	0.4	0.5	1	1	1	1	1
T annealing (°C)*	55	55	55	55	55	55	53	50	50

**Tabla 1.2:** Condiciones ensayadas en la primera amplificación (PCR1) de la nested-PCR del gen *dsrAB* para el T-RFLP. \*Modificación realizada con respecto al ciclo de temperatura original de Giloteaux et al. 2010.

Segunda amplificación (PCR2)	Combinación de condiciones ensayadas					
	A	B	C	D	E	F
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1.5	1.5	2.5	2.5	1.5	1.5
dNTPs (mM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Primers: DSR619AF**/ 1905BR (μM)	0.2	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5
Template***	PCR1-A PCR1-H PCR1-I	PCR1-H PCR1-I	PCR1-H PCR1-I	PCR1-H PCR1-I	PCR1-H PCR1-I	PCR1-H PCR1-I
Duración desnaturalización*	45s	45s	45s	45s	45s	60s
Duración annealing*	45s	45s	45s	45s	45s	60s
Duración extensión*	90s	90s	90s	90s	90s	2min

**Tabla 1.3:** Condiciones ensayadas en la segunda amplificación (PCR2) de la nested-PCR del gen *dsrAB* para el T-RFLP. \*Modificaciones realizadas con respecto al ciclo de temperatura original de Giloteaux et al. 2010. \*\*Primer marcado en el extremo 5' - con 6-carboxifluoresceína. \*\*\*Se utilizó como molde el producto de la(s) PCR1 que se indican (ver Tabla 1.2), concentrado y diluido (1:10 y 1:100).

### 1.2.2.2. Purificación de productos de PCR

Se hizo un pool de los triplicados de los productos de la nested-PCR y se concentraron mediante columnas MICROCON100 (Millipore) en un volumen final de 15μl. Se sembraron 13μl de estos productos concentrados en gel de agarosa 1% y se corrieron en TBE 0.5X durante 45 min a 100mv. Las bandas que presentaron el tamaño esperado fueron cortadas y purificadas a partir del gel utilizando el kit Gel DNA Recovery (Zymo Research) y los productos de PCR marcados se eluyeron en un volumen final de 15μl. Algunas de estas bandas fueron secuenciadas en Macrogen y posteriormente analizadas mediante la herramienta BLASTx.

### **1.2.2.3. Selección de enzima de restricción para T-RFLP mediante evaluación *in silico***

Se realizó un análisis *in silico* de las secuencias para las dos enzimas de restricción tetraméricas que habían revelado mayor cantidad de T-RFs en Giloteaux et al. 2010, Taq $\alpha$ 1 y Sau3AI. Para esto, se obtuvieron 61 secuencias de referencias del gen *dsrAB* del tipo reductivo de la base de datos de NCBI. Se tomaron secuencias representativas de los distintos clusters descritos por Müller et al. 2015 (Figura 1.2), incluyendo secuencias de microorganismos ya cultivados y caracterizados como también secuencias asignadas a linajes no cultivados. Las secuencias se alinearon utilizando el software MEGA X (Kumar et al. 2018), se determinó la posición de la secuencia del primer forward y los sitios blanco de ambas enzimas, y se determinaron los tamaños teóricos de los fragmentos terminales generados.

### **1.2.2.4. Digestión con enzima de restricción y análisis de los fragmentos**

Los productos de PCR marcados fueron digeridos con la enzima Sau3AI seleccionada luego del análisis *in silico*. Las condiciones de restricción en un volumen final de 15 $\mu$ l fueron las siguientes: buffer CutSmart 1X, 4U de la enzima Sau3AI (NEB) y 150ng de producto de PCR marcado. La mezcla de reacción fue incubada a 37°C durante 4hs y luego la enzima fue inactivada a 65°C durante 20min. Los productos marcados y digeridos fueron enviados a Macrogen Corea para el servicio de Fragment Analysis, utilizando el estándar de longitud 1200LIZ para la asignación del tamaño de los fragmentos de restricción terminales marcados (T-RFs).

### **1.2.2.5. Análisis y procesamiento de los perfiles de T-RFLP**

Los datos crudos obtenidos se visualizaron con el software Peak Scanner (Applied Biosystems), el cual permite conocer con exactitud el tamaño de los fragmentos de restricción al compararlos con el estándar interno y observar los perfiles (electroferogramas) que muestran la intensidad de fluorescencia de cada fragmento. Los datos fueron exportados inicialmente a Excel (Microsoft office) donde se eliminaron los T-RFs de tamaño menor a 50pb y luego fueron cargados en el software disponible online T-REX (Culman et al. 2009) para su procesamiento. Se filtró el ruido en base a la desviación estándar (multiplicador=1) de la altura de los picos y se alinearon los T-RFs en todas las muestras con un umbral de agrupamiento de 2pb. La abundancia relativa de los T-RFs fue calculada en base a la altura de los picos.

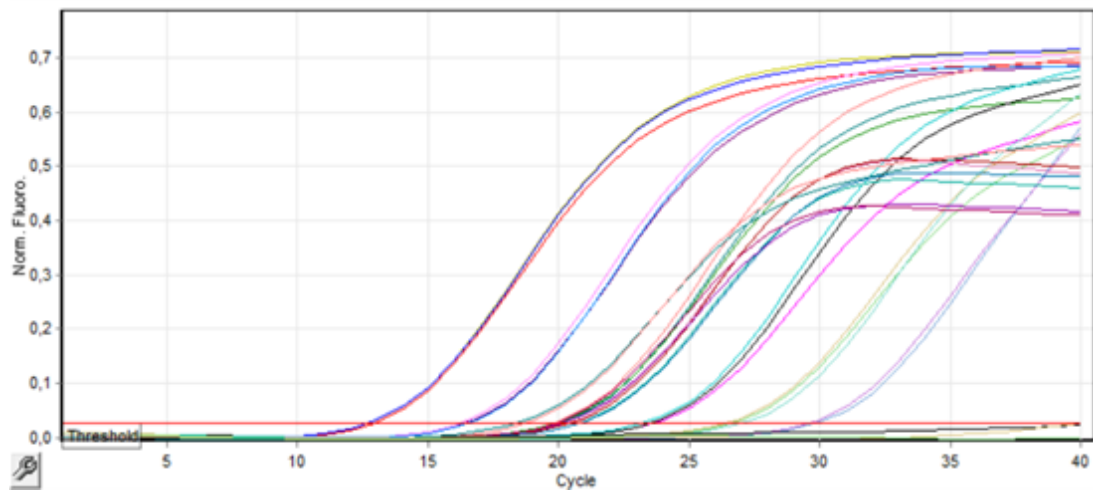
## 1.3. RESULTADOS

### 1.3.1. Optimización de la técnica qPCR para cuantificación de genes *dsrA*

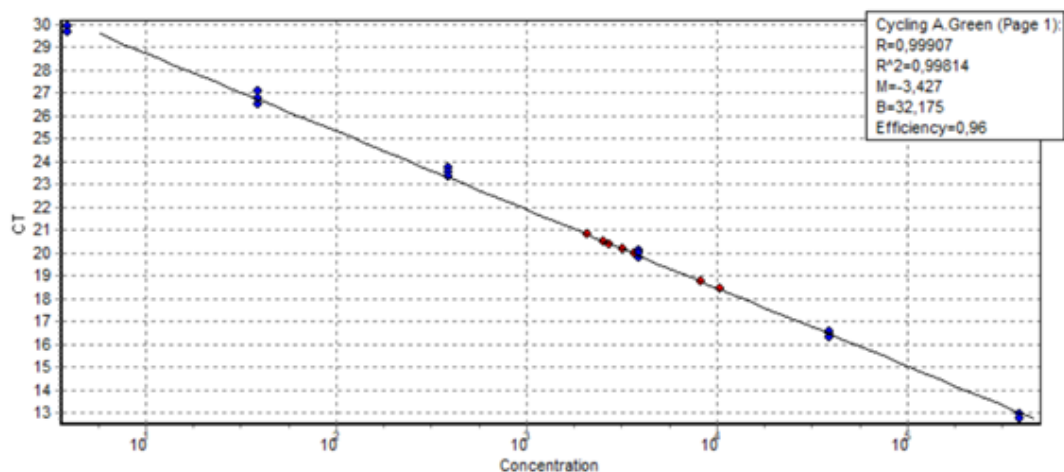
Para determinar la abundancia de las comunidades BRS en suelo y asociadas a raíces de arroz, se optimizó la técnica de qPCR para el gen *dsrA*. El número de copias del gen *dsrA* del estándar preparado mediante clonado a partir de la cepa *Desulfovibrio desulfuricans* (DSMZ 642) fue de  $3.9 \times 10^{10}$  copias.  $\mu\text{l}^{-1}$ . La curva construida con este estándar presentó una óptima eficiencia (entre 88 y 97%), una adecuada linealidad ( $r^2 \geq 0.99$ ) y un amplio rango dinámico que permite la cuantificación de muestras con baja concentración de copias del gen, entre  $3.9 \times 10^5$  y 3.9 copias del gen.  $\mu\text{l}^{-1}$  (Figuras 1.4 y 1.5). En la curva de melting de la corrida realizada con la mayor concentración de primers (1  $\mu\text{M}$ ) se observó un pico ancho entre 60°C y 70°C que podría indicar presencia de dímeros de primers. Para minimizar la formación de estas estructuras durante la reacción, se decidió trabajar con una concentración de primers de 0.5  $\mu\text{M}$  (Figura 1.6). Asimismo, la adquisición de la fluorescencia fue medida a 80°C para evitar la posible contribución de los dímeros de primers que se podrían formar a temperaturas menores. A esta temperatura los dímeros se encuentran disociados y no contribuye a la fluorescencia medida, lo cual evita la interferencia. Los controles sin ADN no mostraron amplificación.

En un inicio, la optimización de las condiciones de amplificación fue realizada con muestras de ADN de suelo y raíces de arroz obtenidos anteriormente de ensayos previos. Esto permitió determinar que la dilución 1:10 permitía realizar la cuantificación del gen *dsrA* sin registrarse un efecto inhibitorio de la matriz. No obstante, fue necesario realizar ajustes a estas condiciones para las muestras de suelo, rizósfera y raíces obtenidas en el desarrollo de esta tesis.

En la Tabla 1.4 se resumen las condiciones de amplificación óptimas determinadas para la qPCR del gen *dsrA*. La especificidad de los productos obtenidos se verificó mediante la obtención de un único pico en las curvas de melting entre 87-93°C y la confirmación del tamaño esperado del fragmento de 221pb por electroforesis en gel de agarosa. Mediante secuenciación y análisis de la secuencia de los amplicones con la herramienta BLASTx se verificó que correspondían a secuencias que codifican para la subunidad alfa de la proteína DsrAB de diferentes especies reductoras de sulfato, con similitudes mayores al 80 %. Como era esperado, no se obtuvieron secuencias completamente limpias ya que los amplicones pueden provenir de diferentes microorganismos sulfato reductores.



**Figura 1.4:** Curva de cuantificación del gen *dsrA* por qPCR para las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-10}$ ), muestras de suelo y rizósfera, y controles negativos (no superan el umbral). Se representa Fluorescencia vs. N° de ciclos.

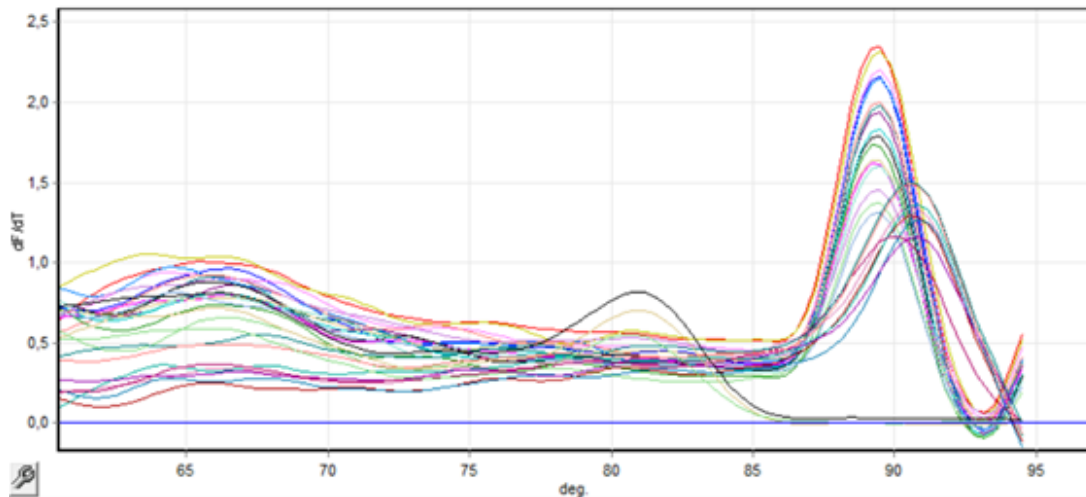


**Figura 1.5:** Curva estándar obtenida para qPCR del gen *dsrA*. Se representa  $C_T$  vs concentración ( $\text{copias} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). En azul se indican las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-10}$ ) y en rojos las muestras de suelo y rizósfera.

Tamaño del fragmento (pb)	Primers y referencia	Concentración utilizada
221	DSR1F+ (Kondo et al. 2004) DSR-R (Kondo et al. 2004)	0.5 $\mu$ M 0.5 $\mu$ M
Ciclo de temperatura	95°C 5min – 40 x [95°C 5s (desnaturalización), 60°C 10s (annealing y extensión), 80°C 1s (adquisición de fluorescencia)]	

**Tabla 1.4:** Primers utilizados para qPCR del gen *dsrA* y condiciones de corrida optimizadas.





**Figura 1.6:** Curva de temperatura de melting obtenida para qPCR del gen *dsrA* con una concentración de primers de  $0.5\mu\text{M}$  (DSR1F+/ DSR-R). Se muestran los gráficos para los diferentes estándares de la curva de calibración, muestras de suelo y raíces, y controles negativos (formación de dímeros de primers  $T_m = 81^\circ\text{C}$ ).

### 1.3.2. Optimización de la técnica de T-RFLP para el gen *dsrAB*

La amplificación del gen *dsrAB* mediante nested-PCR utilizando las concentraciones de reactivos y ciclos de temperatura reportados por Giloteaux et al. 2010, no fue exitosa ya que no se detectó amplificación en ninguna de las muestras evaluadas ni en el control positivo. De acuerdo a lo descrito en *Materiales y Métodos* de este capítulo (sección 1.2), se evaluaron diferentes condiciones de amplificación del gen *dsrAB* a partir de las muestras de interés tanto para la primera amplificación (PCR1) como para la segunda (PCR2). La combinación de las condiciones PCR1-H y PCR2-F (Tablas 1.2 y 1.3) fue la que mostró una mejor eficiencia en la amplificación del fragmento de interés con una menor cantidad de bandas inespecíficas. Se resumen en la Tabla 1.5 las condiciones óptimas alcanzadas para la amplificación mediante nested-PCR del gen *dsrAB* a partir de ADN de rizósfera. En el caso de las raíces, no fue posible obtener producto de amplificación a pesar de las múltiples condiciones ensayadas.

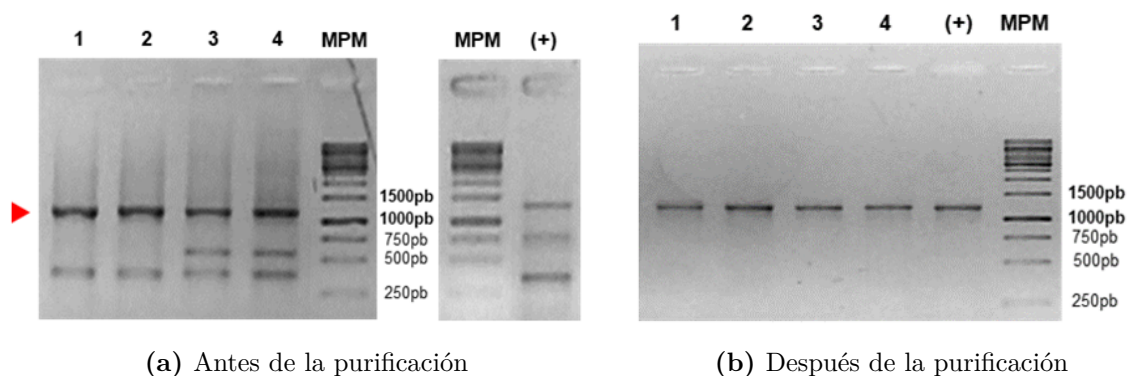
En la electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos de la nested-PCR se corroboró la presencia de una banda del tamaño esperado (aprox. 1300pb), pero también de otras bandas inespecíficas de menor tamaño (Figura 1.7a). Por esta razón, se purificaron las bandas del tamaño esperado a partir del gel y se secuenciaron en el servicio de secuenciación MacroGen Korea. A modo de ejemplo, en la Figura 1.7 se muestra un gel de agarosa con las bandas correspondientes al tamaño esperado antes y después de la etapa de purificación.

El análisis mediante BLASTx de las secuencias de los amplicones provenientes de las muestras mostró similitudes mayores al 80 % con secuencias que codifican para la proteína

Reactivo	Primera amplificación (PCR1)	Segunda amplificación (PCR2)
Buffer Taq (Invitrogen)	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	5mM	1.5mM
dNTPs (Thermo Scientific)	0.4mM cada uno	0.2mM cada uno
Primer forward	1μM (DSR1F)	0.5μM (DSR619AF*)
Primer reverse	1μM (DSR4R)	0.5μM (DSR1905BR)
Taq Polimerasa (Invitrogen)	1.5U	1.5U
ADN	aprox. 10ng	1μl dilución 1:10 del producto de PCR1
Ciclo de temperatura	94°C 5min - 35 x (94°C 45s, 50°C 45s, 72°C 90s) - 72°C 10min	94°C 5min - 35 x (94°C 60s, 54°C 60s, 72°C 2min) - 72°C 10min

**Tabla 1.5:** Concentraciones de reactivos y ciclos de temperatura utilizados en las amplificaciones por nested-PCR del gen *dsrAB* para el T-RFLP. \*Primer marcado en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína.

DsrAB de diferentes especies reductoras de sulfato cultivadas y no cultivadas. El amplicón correspondiente al control positivo, presentó una similitud de 97 % con la proteína DsrAB de la especie *D. desulfuricans* (N° acceso: WP\_022658934.1).



**Figura 1.7:** Productos de la amplificación por nested-PCR del gen *dsrAB* en gel de agarosa antes (a) y después de la purificación (b), a partir de ADN de rizósfera. 1-4: ADN de muestras de rizósfera. (+) control positivo, correspondiente a ADN de la cepa *Desulfovibrio desulfuricans* (DSMZ 642). La punta de flecha roja indica la banda del tamaño esperado (aprox. 1300pb). MPM: marcador de peso molecular 1kb utilizado (Fermentas).

Los resultados obtenidos del análisis de restricción *in silico* realizado sobre secuencias de referencia del gen *dsrAB* afiliadas a los diferentes linajes mencionados anteriormente, con las enzimas de restricción Sau3AI y Taqα1, se muestra en la Figura 1.8. Como se puede observar en esta figura, teniendo en cuenta sólo los fragmentos terminales (T-RFs) mayores de 50pb, la enzima Sau3AI arrojó un mayor número de T-RFs que la enzima Taqα1. Cinco de los 14 T-RFs totales obtenidos con Sau3AI se obtuvieron con mayor frecuencia en el set de secuencias de referencia utilizado (T-RFs de 86, 110, 116, 120 y 293pb). Los T-RFs 120 y 116pb se obtuvieron para el 50 % de las secuencias analizadas. Ninguna de ambas enzimas arrojó tamaños de T-RFs que pudieran asociarse claramente

a los distintos clusters ni a géneros específicos. La mayoría de las especies del género *Desulfovibrio* arrojaron T-RFs de entre 116 y 126pb con la enzima Sau3AI, mientras que las secuencias afiliadas a este género digeridas *in silico* con la enzima Taq $\alpha$ 1 mostraron en su mayoría un fragmento muy pequeño de 34pb. Asimismo, la mayor parte de las secuencias asignadas a los linajes no cultivados arrojaron T-RFs de tamaños menores a 50pb con la enzima Sau3AI, mientras que con la enzima Taq $\alpha$ 1 presentaron fragmentos de tamaños variados o ausencia del sitio de corte de la enzima. Considerando estos resultados, se seleccionó la enzima Sau3AI para realizar la digestión de los productos de PCR del gen *dsrAB* amplificados a partir de las muestras de rizósfera.

Como se describe en detalle en el *Capítulo 3* de esta tesis, la técnica de T-RFLP del gen *dsrAB* se utilizó para comparar la estructura y diversidad de las comunidades de BRS rizosféricas establecidas en las distintas etapas del ciclo del cultivo de arroz y bajo diferentes sistemas de rotación.

		Sau3AI	TaqI
		(VGATC)	(T/CGA)
N° acceso y asignación taxonómica de la secuencia			
		116	34
		120	208
		116	34
		116	34
		116	34
		116	34
		116	34
		116	118
		120	34
		116	118
		116	34
		381	34
		120	118
		120	118
		293	118
		120	208
		86	34
		110	34
		120	34
		120	34
		78	229
		120	NC
		120	511
		120	NC
		120	118
		120	511
		120	118
		116	34
		293	208
		293	208
		120	34
		227	34
		116	34
		110	63
		110	229
		86	45
		116	118
		293	84
		86	84
		86	84
		120	NC
		506	118
		120	NC
		231	118
		26	118
		86	332
		384	118
		387	295
		120	NC
		116	118
		32	208
		26	253
		110	NC
		405	208
		26	208
		26	63
		120	NC
		26	63
		26	118
		26	118
		14	9

**Figura 1.8:** Tamaños teóricos de los T-RFs obtenidos para diferentes secuencias del gen *dsrAB* con las enzimas de restricción Sau3AI y TaqI. El análisis *in silico* se realizó considerando el fragmento determinado por los primers 619AF/1905BR, sobre 61 secuencias obtenidas de la base de datos de NCBI. En la parte superior de la tabla se indica entre paréntesis la secuencia reconocida por cada enzima, la barra (/) indica el sitio de corte. NC: no presenta la secuencia de corte de la enzima. Los linajes indicados corresponden a los definidos por Müller et al. 2015.

## 1.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las BRS juegan un rol clave en diferentes procesos microbianos implicados en los ciclos biogeoquímicos, particularmente en los ciclos del azufre y del carbono. En los arrozales inundados, se ha demostrado que la reducción de sulfato alcanza valores de actividad importantes, similares a los encontrados en sedimentos marinos (Pester et al. 2012). Sin embargo, el desarrollo de técnicas moleculares para el estudio de las comunidades de BRS que llevan a cabo este proceso ha sido escaso y dificultoso. En el ecosistema arrocerero ha sido poco abordado hasta el momento, menos aún en relación a las comunidades que se establecen como endófitas en la planta de arroz. Debido a esto, en el presente capítulo se planteó como objetivo la optimización de técnicas moleculares que permitieran estudiar la estructura de las comunidades de BRS presentes en suelo, rizósfera y tejidos internos de raíces de arroz.

Diferentes enfoques moleculares dirigidos a genes funcionales que codifican enzimas claves del proceso de reducción de sulfato se han desarrollado con éxito para abordar el estudio de estas comunidades en diversos ambientes, tanto dirigidos al gen *aprBA* como al gen *dsrAB* (Ben-Dov et al. 2007; Blazejak y Schippers, 2011; Leloup et al. 2007; Steger et al. 2011). En base a estudios filogenéticos basados en la enzima APS reductasa de bacterias oxidantes de azufre, se ha verificado la transferencia horizontal de genes entre éstas y BRS. En contraste con esto, la filogenia de la enzima DsrAB presente en los oxidantes de azufre se presenta en un cluster separado y distante de la enzima DsrAB de tipo reductivo presente en las BRS (Meyer y Kuever, 2007a) (Figura 1.2). Por esta razón, se decidió seleccionar el gen *dsrAB* de tipo reductivo como gen marcador del proceso de interés. Sin embargo, para utilizar el gen *dsrAB* como marcador funcional en el estudio de comunidades de BRS, es importante considerar que este gen también está presente en algunos microorganismos que no son capaces de respirar sulfato, pero sí pueden crecer a expensas de la reducción de sulfito empleando un proceso respiratorio y posiblemente también detoxificante (por ej. *Sulfurospirillum* y *Desulfitobacterium*, Simon y Kroneck, 2013).

En este trabajo se logró optimizar la técnica de qPCR para la cuantificación del gen *dsrA* en muestras de suelo y tejidos internos de raíces de arroz, alcanzándose un amplio rango dinámico de cuantificación (entre  $3.9 \times 10^5$  y 3.9 copias del gen.  $\mu\text{l}^{-1}$ ) con una buena eficiencia (entre 88 % y 97 %). La especificidad de la metodología optimizada fue confirmada tanto por obtención de un único pico en las curvas de Temperatura de melting (Figura 1.6), como la visualización de un único fragmento del tamaño esperado en gel de agarosa y la secuenciación y análisis de la secuencia nucleotídica del amplicón obtenido.

Uno de los principales desafíos presentados a la hora de optimizar herramientas mo-

leculares para estudiar este grupo fisiológico fue la selección de los primers, ya que como fue mencionado antes en la *Introducción* de este capítulo, solo existen unos pocos primers reportados en bibliografía que presentan una buena cobertura (mayor al 90%) de las secuencias disponibles en la base de datos de Müller et al. 2015.

Si bien los primers DSR1F+/DSR-R (Kondo et al. 2004) utilizados en este trabajo para la qPCR de genes *dsrA* no muestran una amplia cobertura *in silico* de todos los clusters de microorganismos sulfato reductores conocidos hasta el momento, han sido utilizado en diversos estudios para relevar la abundancia de BRS mediante qPCR en diferentes ambientes, incluyendo agua de mar y sedimentos marinos (Blazejak y Schippers, 2011; Kondo et al. 2008; Leloup et al. 2007) así como también en suelos de arroz (C. Chen et al. 2019).

Según Müller et al. 2015 estos primers tendrían una cobertura del 34% de las secuencias del gen *dsrAB* recogidas en la base de datos, todas ellas clasificadas dentro del supercluster *Deltoteobacteria* (Figura 1.3). Sin embargo, solamente se observa una cobertura igual o mayor para algunas mezclas complejas de primers. Considerando los pares de primers reportados dirigidos a este gen que amplifican una región de tamaño menor a 500pb aplicable en la cuantificación mediante qPCR, únicamente dos mezclas de entre cinco y ocho pares de primers (*dsrBF1a-h/4RSI1a-f*; Lever et al. 2013; y *DSR1728mix/DSR4Rmix*; Steger et al. 2011) cubren un mayor porcentaje de las secuencias pertenecientes al supercluster *Deltaproteobacteria* y una parte de las secuencias del grupo *Firmicutes* y del supercluster ambiental 1, el cual no contiene secuencias de *dsrAB* de organismos cultivados. Además, ninguna de estas mezclas de primers cubren secuencias clasificadas dentro del supercluster *Nitrospirae*. Esto puede resultar importante si consideramos que existe una alta proporción de secuencias de *dsrAB* (de organismos cultivados y no cultivados) dentro del grupo *Firmicutes* de los superclusters *Nitrospirae* y ambiental 1 que provienen de distintos tipos de suelo, en su gran mayoría de suelos de humedales naturales (Müller et al. 2015). Por lo tanto, la qPCR optimizada en este trabajo podría estar subestimado la abundancia de secuencias del gen *dsrA* afiliadas a grupos no cubiertos por los primers seleccionados. Sin embargo, esta técnica permite comparar la abundancia de BRS entre distintas muestras asociadas a las raíces de arroz y bajo diferentes condiciones de cultivo.

El empleo de la estrategia de nested-PCR T-RFLP del gen *dsrAB* permitió obtener perfiles de diversidad para muestras de rizósfera de arroz, introduciendo diferentes modificaciones a la técnica reportada por Giloteaux et al. 2010. Sin embargo, a pesar de las múltiples condiciones ensayadas (Tablas 1.2 y 1.3), tanto en las concentraciones de reactivos como en los ciclos de temperatura, no fue posible obtener producto de amplificación en el caso de las raíces. Esto puede deberse a una menor abundancia de BRS en raíces que

en rizósfera, lo que concuerda con los resultados de la cuantificación por qPCR obtenidos en estas mismas muestras, que serán detallados más adelante en esta tesis (*Capítulo 3*). Asimismo, distintas dificultades metodológicas que se discuten a continuación asociadas a la cobertura de los primers también pueden afectar la abundancia y diversidad de los genes *dsrA* relevados en los distintos tipos de muestras y, por lo tanto, ser una posible causa de la ausencia de amplificación en las raíces.

De forma similar a lo mencionado para los primers aplicables en la qPCR del gen *dsrAB*, la mayoría de los pares de primers reportados que pueden ser utilizados para estudiar la composición y diversidad de las comunidades de BRS dirigidos a este gen, no presentan altos porcentajes de cobertura entre los distintos grupos taxonómicos (Müller et al. 2015). Las variantes desarrolladas por Pester et al. 2010 sobre el par de primers DSR1F/DSR4R (Wagner et al. 1998) mejoraron ampliamente su cobertura, pero consisten en una mezcla de ocho primers forwards y siete primers reverse (DSR1Fa-h/DSR4Ra-g), y amplifican un fragmento demasiado extenso para ser aplicable en técnicas moleculares que permitan realizar un screening de diversidad en un gran número de muestras. Si consideramos los primers internos a la región DSR1F/DSR4R que permiten amplificar un fragmento de menor tamaño y cubrir la diversidad existente dentro de las BRS, la mayoría de ellos presentan bajos valores de cobertura (Figura 1.3) y amplifican mayoritariamente secuencias del supercluster *Deltaproteobacteria*.

Como los primers reportados para DGGE, DSRp2060F/DSR4Rmix (Geets et al. 2006), amplifican una región del gen *dsrB* muy pequeña (378pb) para ser aplicada en T-RFLP, se diseñaron posteriormente nuevos primers y estrategias de amplificación con el objetivo de utilizar esta técnica para el estudio de comunidades de BRS (Giloteaux et al. 2010; Santillano et al. 2010; Schmalenberger et al. 2007). Y. R. Liu et al. 2014 utilizaron T-RFLP del gen *dsrAB* para evaluar la composición de comunidades sulfato reductoras en suelos de arroz contaminados con mercurio, utilizando los primers DSRAB.F/DSRAB.-R diseñados por Schmalenberger et al. 2007. Estos primers amplifican una región de extensión similar al par DSR1F/DSR4R, de aprox. 1.9kb, y su cobertura *in silico* alcanza el 38 % de las secuencias de la base de datos (Müller et al. 2015). Por su parte, los primers 619AF/1905BR (Giloteaux et al. 2010) usados en el presente trabajo, han sido utilizados en varios trabajos para relevar la diversidad de estas comunidades en distintos ambientes, por ejemplo, en agua de un estuario (Colin et al. 2017), en sedimentos marinos contaminados con petróleo (Stauffert et al. 2014) y en agua de drenaje ácido de minas rica en sulfato y metales pesados (Giloteaux et al. 2013). Igualmente, cabe señalar que los sesgos asociados tanto a la cobertura de los primers usados en este trabajo en ambas amplificaciones (PCR1 y PCR2) como a la técnica misma de nested-PCR podrían causar una subestimación de la diversidad evaluada en las muestras de interés, dejando afuera

grupos de BRS que no pertenecen a la clase *Deltaproteobacteria*.

Como ya fue mencionado, la amplia mayoría de los primers reportados en bibliografía para estudiar las comunidades de BRS presentan un sesgo importante hacia el supercluster *Deltaproteobacteria*. Diversos estudios realizados sobre la estructura de la comunidad bacteriana asociada al cultivo de arroz muestran que las principales BRS encontradas en este ecosistema se clasifican dentro de la clase *Deltaproteobacteria* (X. Z. Liu et al. 2009; H. Wang et al. 2016; Zecchin et al. 2017). Asimismo, en un trabajo previo, Ferrando y Fernández Scavino, 2015 estudiaron las comunidades de bacterias diazótrofes endófitas de raíces de arroz en nuestro país, encontrando que las deltaproteobacterias constituían una alta proporción de los diazótrofes presentes en la etapa inundada del cultivo.

A pesar de las dificultades y sesgos, la optimización de estas técnicas permitió estudiar la abundancia, dinámica y diversidad de BRS en suelo, rizósfera y raíces de arroz provenientes de un ensayo de campo de diferentes sistemas de rotación arroceras, como será detallado más adelante en esta tesis.





## Capítulo 2

# MICROBIOMA BACTERIANO DE SUELO, RIZÓSFERA Y RAÍCES DE ARROZ CULTIVADO BAJO DIFERENTES SISTEMAS DE ROTACIÓN DE CULTIVOS

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas del suelo son parte esencial de la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas agrícolas (Sathya et al. 2016; Tikhonovich y Provorov, 2011). Esto se debe a que los microorganismos juegan un rol fundamental en las funciones del suelo, promoviendo la descomposición de la materia orgánica y el reciclado de nutrientes, y aumentando la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos necesarios para el crecimiento vegetal.

El arroz se distingue de otras plantas de interés agrícola ya que se cultiva bajo condiciones de inundación durante gran parte del ciclo, provocando cambios fisicoquímicos que modifican la composición de las comunidades microbianas presentes tanto en suelo como asociadas a la planta (Ferrando y Fernández Scavino, 2015; Hardoim et al. 2012; Kögel-knabner et al. 2010). El microbioma presente en el suelo desnudo (*bulk soil*), es el aspecto que ha sido más estudiado en el cultivo de arroz. Típicamente, las comunidades bacterianas del suelo de arroz están dominadas principalmente por bacterias de los phyla *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria* (Hussain et al. 2011; Jiang et al. 2016; Kim y Lee, 2020). En el caso de los suelos de arroz uruguayos, se encontró que la comunidad bacteriana fue dominada por *Firmicutes*, principalmente *Bacillales*, y *Proteobacteria*, principalmente *Rhizobiales* (Fernández Scavino et al. 2013). Además, varios trabajos han abordado el estudio de la relación entre la estructura de estas comunidades y distintas características del suelo, como las propiedades químicas, factores geográficos, historia de uso del suelo y manejo del cultivo (Jiang et al. 2016; Y. Liu et al. 2016; J. Wang et al. 2017; Yuan et al. 2019). El pH del suelo tiene un fuerte impacto sobre las comunidades microbianas de arrozales, y el contenido de dadores o aceptores de electrones podría explicar la composición de algunos grupos microbianos relacionados con los procesos redox en el suelo de arroz (Yuan et al. 2019). Jiang et al. 2016 estudiaron las comunidades microbianas presentes en distintos suelos de arroz del este asiático con una larga historia de utilización de diferentes sistemas de rotación de cultivos, concluyendo que la rotación fue el principal factor que determinó la composición de estas comunidades, por encima de factores geográficos o variables químicas del suelo.

El microbioma asociado a nivel de las raíces de las plantas ha sido ampliamente estudiado debido a sus potenciales beneficios para el crecimiento de la planta, por ejemplo, aportando nutrientes, fitohormonas, o incrementando su resistencia a múltiples factores bióticos y abióticos (Haney et al. 2015; Reinhold-Hurek et al. 2015; Trivedi et al. 2020; Van Der Heijden et al. 2008). A su vez, a través de las raíces las plantas proporcionan mediante sus exudados radiculares sustratos para el crecimiento de los microorganismos rizosféricos (Philippot et al. 2013; Reinhold-Hurek et al. 2015). Debido a esto, los micro-

biomas de raíces asociados a distintas especies de plantas han sido caracterizados en los últimos años produciendo importantes avances en el conocimiento de estas comunidades. Varios estudios han señalado la existencia de un subconjunto de microorganismos denominado “*core microbiota*” (comunidad microbiana núcleo o central) que se asocia de forma estable y reproducible con una cierta planta hospedera en un amplio rango de condiciones ambientales (J. Edwards et al. 2015; Lemanceau et al. 2017; Trivedi et al. 2020).

En la planta de arroz, la entrada de oxígeno a través del aerénquima resulta en la formación de zonas parcialmente óxicas en la rizósfera que permiten la colonización de grupos de microorganismos aerobios, anaerobios o con metabolismo facultativo (Kögelknabner et al. 2010; Liesack et al. 2000; Scheid et al. 2004). Distintos estudios han indicado que la comunidad bacteriana rizosférica de arroz está compuesta principalmente por proteobacterias (mayormente de las clases *Alpha*, *Beta* y *Deltaproteobacteria*), *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi* (Breidenbach, Pump et al. 2016; J. Edwards et al. 2015; Lee et al. 2015; H. L. Li et al. 2019; H. Li et al. 2019; Santos-Medellín et al. 2017). Esta comunidad presente en la rizósfera de arroz es distinta a la presente en la rizósfera de otros cultivos y plantas, como maíz (Peiffer et al. 2013), soja (Sugiyama et al. 2014) y la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Lundberg et al. 2012), principalmente por la mayor abundancia de *Deltaproteobacteria*, grupo taxonómico que incluye una gran cantidad de bacterias anaerobias y facultativas (Ding et al. 2019).

Por otra parte, se ha demostrado en diferentes especies de plantas, que distintos compartimientos asociados a las raíces contienen comunidades microbianas marcadamente diferentes: el suelo rizosférico (suelo contiguo a las raíces), el rizoplano (la superficie de las raíces), y la endósfera radicular (interior de las raíces) (J. Edwards et al. 2015; Lundberg et al. 2012; Peiffer et al. 2013). En un estudio realizado sobre el microbioma de *Arabidopsis thaliana*, la comunidad endófitas resultó menos diversa que la comunidad establecida en el suelo donde fueron cultivadas, y este resultado fue similar en suelos geoquímicamente diferentes (Lundberg et al. 2012). Asimismo, tanto en *A. thaliana* como también en maíz, se observó que la comunidad rizosférica fue distinta de la establecida en el suelo desnudo (*bulk soil*) adyacente, pero entre ellas resultaron más similares en comparación con las comunidades de rizósferas de plantas crecidas en suelos diferentes (Lundberg et al. 2012; Peiffer et al. 2013). Estos resultados indican que el tipo de suelo es un factor determinante en la estructura de las comunidades que se asocian a las plantas, especialmente a nivel de la rizósfera, pero además confirman que la planta juega un papel muy importante en la selección de los microorganismos que colonizan el interior de sus tejidos. Además de las características geoquímicas del suelo, se ha visto que la especie de planta, el genotipo, y la etapa del desarrollo también tienen efectos significativos sobre las comunidades rizosféricas (Chaparro et al. 2014; J. Edwards et al. 2015; J. A. Edwards et al. 2018; Micallef et

al. 2009; Sugiyama et al. 2014).

El estudio de las comunidades endófitas de arroz ha sido abordado en números trabajos (J. Edwards et al. 2015; J. A. Edwards et al. 2018; Santos-Medellín et al. 2017; J. Zhang et al. 2019), encontrando entre los principales taxones bacterias afiliadas a los phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* y *Bacteroidetes*. Una caracterización detallada del microbioma asociado a distintos compartimientos de las raíces de arroz fue realizada por J. Edwards et al. 2015. Estos autores determinaron que, bajo condiciones de crecimiento controladas, la composición del microbioma varió principalmente con el tipo de suelo y el genotipo de la planta, mientras que, bajo condiciones de campo, la ubicación geográfica y el manejo del cultivo (orgánico vs. convencional) fueron los principales factores que contribuyeron a la variación del microbioma. Aunque el suelo fue el segundo factor de variación en estas comunidades luego de los compartimientos donde habitan (rizósfera, rizoplano y endósfera), el tipo de suelo no afectó el perfil de separación de las comunidades asociadas a estos compartimientos, indicando que el enorme efecto ejercido por estos nichos sobre la colonización de poblaciones microbianas es independiente de la fuente de microorganismos. Además de este estudio, enfoques metagenómicos y proteómicos también han sido utilizados para estudiar las comunidades en la rizósfera, filósfera (Knief et al. 2012), y endósfera de la planta arroz (Sessitsch et al. 2012). Resulta interesante señalar que varios de estos estudios sobre el microbioma de arroz han mostrado que no solamente el tipo de suelo puede afectar estas comunidades sino también factores asociados directamente a la planta, detectándose taxones específicos de ciertas variedades (J. A. Edwards et al. 2018; J. Zhang et al. 2019) o asociados fuertemente a distintas etapas del desarrollo fisiológico de la planta (J. A. Edwards et al. 2018; Sessitsch et al. 2012).

En las últimas décadas, se han llevado a cabo importantes esfuerzos para incrementar la productividad agrícola en respuesta a la creciente demanda mundial de alimentos. Sin embargo, existe una importante preocupación con respecto a la intensificación y sus consecuencias sobre la capacidad del suelo para mantener sus funciones, que conducen a la degradación del ecosistema y la pérdida de productividad a largo plazo (Tilman et al. 2002; Trivedi et al. 2016). Los cambios en las poblaciones o en la actividad microbiana frente a estas prácticas agrícolas, podrían preceder a los cambios detectados en las propiedades físicas y químicas del suelo, proporcionando una señal temprana de mejora o una alerta de la degradación en sistemas agrícolas (Trivedi et al. 2016). Sin embargo, comprender la relación existente entre las prácticas agrícolas y la nutrición de las plantas requiere enfocar los esfuerzos hacia aquellas poblaciones microbianas que establecen una asociación más fuerte con la planta (Ryan et al. 2009).

Como fue mencionado antes, se sabe que las comunidades microbianas que colonizan los distintos compartimientos asociados a las raíces de arroz son afectadas por distintas

prácticas agrícolas como el cultivo orgánico vs. el cultivo convencional que incluye la utilización de fertilizantes químicos, fungicidas y herbicidas (J. Edwards et al. 2015). Sin embargo, el manejo del cultivo de arroz frecuentemente involucra la rotación con otros cultivos de secano, pero hasta el momento existen solo unos pocos estudios que evalúen el efecto de estos manejos sobre el microbioma asociado a la planta. Algunos estudios han mostrado que la incorporación de abonos verdes durante el invierno previo a la zafra de arroz tiene un efecto importante sobre la estructura de las comunidades microbianas asociadas a la planta, enriqueciendo la rizósfera en bacterias beneficiosas para la planta (X. Zhang et al. 2017) e incrementando la diversidad de las comunidades endófitas de las raíces (X. X. Zhang et al. 2013). Otros estudios se han enfocado en la rotación arroz-maíz, una práctica habitual en regiones de Asia que implica arroz en verano y maíz durante el invierno, en comparación con el cultivo de arroz durante ambas estaciones. Estos estudios mostraron que en el microbioma más fuertemente asociadas a la planta (ecto y endorizósfera) tanto la comunidad de arqueas como la de bacterias apenas se vieron impactadas por la incorporación de maíz en la rotación con arroz (Breidenbach et al. 2017). Mientras tanto, a nivel del suelo rizosférico, esta rotación tuvo un efecto importante sobre la composición y actividad de las arqueas metanogénicas, pero un impacto leve sobre la comunidad bacteriana (Breidenbach, Blaser et al. 2016).

Como fue explicado en detalle en la *Introducción General* de esta tesis, el cultivo de arroz en Uruguay es llevado a cabo bajo un sistema de producción particular y diferente al utilizado en el resto del mundo, basado en una siembra en condiciones de secano con inundación continua recién a partir de 40 días aproximadamente después de la siembra, con un posterior drenaje unos 15-20 días previos a la cosecha (ACA, 2018). Además, se cultiva tradicionalmente bajo un sistema de rotación arroz-pastura que alterna dos años consecutivos de arroz con tres o cuatro años de pasturas para alimentación del ganado, constituyendo un sistema de producción de baja intensidad y considerado fundamental en la obtención de los excelentes rendimientos alcanzados (Deambrosi, 2007; Pittelkow et al. 2016). Actualmente, la implementación de nuevos sistemas de rotaciones con mayores niveles de intensificación en el uso del suelo se presenta como una alternativa para incrementar la productividad y los márgenes de ganancia para los productores. El aumento en la frecuencia de arroz en la rotación o la incorporación de otros cultivos más rentables, como la soja, son algunas de estas alternativas.

En el presente capítulo se utilizó la secuenciación masiva de genes 16S rRNA como herramienta para caracterizar en profundidad el microbioma asociado al cultivo de arroz bajo diferentes sistemas de rotación en un ensayo de campo de largo plazo. Se abordó el estudio de la estructura de las comunidades bacterianas establecidas en el suelo y en distintos compartimientos asociados a la planta (rizósfera y endósfera), en dos etapas del

ciclo de cultivo. Además, se buscó identificar taxones bacterianos fuertemente asociados a distintos sistemas de rotación de cultivos que pudieran relacionarse con el impacto de la intensificación en el sistema de producción arrocero.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Ensayo de campo y rotaciones arroceras estudiadas

Se utilizó un ensayo de campo de largo plazo, instalado en 2012 en la Unidad Experimental Paso de la Laguna de INIA Treinta y Tres. Este experimento contrasta distintos sistemas de rotaciones arroceras y su principal objetivo es evaluar los efectos de la intensificación sobre el cultivo de arroz, ya sea en términos de productividad, uso de insumos, así como también sobre otros indicadores ambientales, en búsqueda de generar lineamientos para una intensificación agrícola sostenible (Macedo et al. 2016). El diseño experimental del ensayo es un factorial con parcelas (18 x 60m) y bloques completos al azar, en el cual se evalúan sistemas de rotación diferentes, repetidos tres veces en el espacio (tres bloques) y cuyas fases se presentan todas al mismo tiempo. De los seis sistemas de rotación presentes en el ensayo, se seleccionaron tres sistemas teniendo en cuenta su nivel de intensidad e incorporación del cultivo de soja en la rotación (Figura 2.1). En este trabajo, el término intensificación hace referencia a la relación entre tiempo en cultivo y tiempo en pastura de cada sistema de rotación, aumentando la intensidad cuanto mayor es esta relación. Asimismo, se eligió una única fase arroceras dentro de cada rotación considerando el cultivo previo. El sistema R1 consiste en un monocultivo de arroz de alta intensidad. El sistema R4 representa la clásica rotación con pasturas utilizada históricamente en nuestro país. En este caso, se seleccionó la fase de arroz de primer año proveniente de tres años de pastura. La incorporación de la soja en la rotación con arroz se representa en el sistema R5, en el cual se seleccionó la fase de arroz proveniente de dos años consecutivos de cultivo de soja.

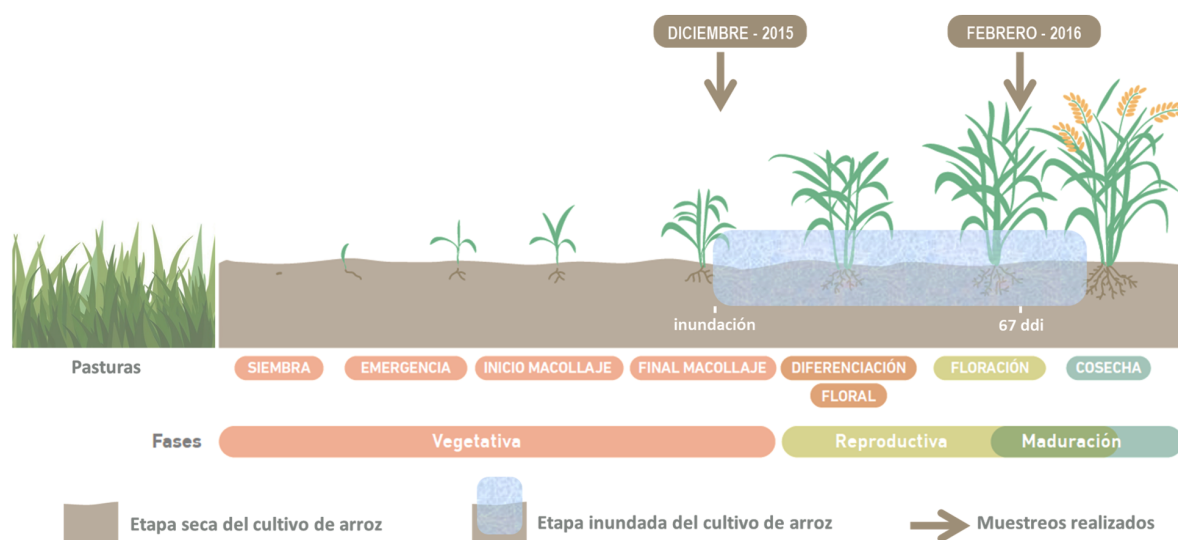
Año	1		2		3		4		5		6	
Sistema de rotación	PV	OI	PV	OI	PV	OI	PV	OI	PV	OI	PV	OI
R1: Az-Continuo	Az	CC										
R4: Az-PP	Az 1	CC	Az 2	Pastura								
R5: Az-Soja-PP	Az 1	CC	Soja	CC	Soja	CC	Az 2	Pastura				

**Figura 2.1:** Sistemas arroceros en estudio, provenientes del ensayo de rotaciones instalado en la Unidad Experimental Paso de la Laguna en INIA Treinta y Tres. PV: primavera-verano; OI: otoño-invierno. Az: arroz; Az1: arroz de primer año; Az2: arroz de segundo año; PP: pradera permanente; CC: cultivo de cobertura. Se indica en color amarillo fuerte las fases arroceras seleccionadas dentro de cada rotación.



### 2.2.2. Muestreos y acondicionamiento de las muestras

Se realizaron dos muestreos durante la zafra 2015-2016, tomando muestras de suelo y plantas de arroz de la variedad Parao en diferentes etapas de crecimiento y manejo de agua (Figura 2.2). El primer muestreo fue realizado en diciembre de 2015 previo a la inundación del cultivo, representando la etapa seca del cultivo en la cual el suelo se encuentra bajo condiciones aeróbicas. El segundo muestreo, representativo de la etapa inundada del cultivo, se realizó en febrero de 2016, 67 días después de la inundación.



**Figura 2.2:** Esquema anual del cultivo de arroz, zafra 2015-2016, y momentos de muestro. Se muestran las dos etapas del cultivo, seca e inundada. Las flechas indican los momentos de los dos muestreos realizados. ddi: días después de la inundación. Figura modificada de ACA, 2018

#### 2.2.2.1. Muestras de suelo

Las muestras de suelo desnudo (*bulk soil*) fueron tomadas con calador integrando 5 submuestras (0-10cm de profundidad) por parcela en cada bloque y conservadas en frío hasta el momento de su procesamiento. En el laboratorio, fueron homogeneizadas y tamizadas con malla de 6 mm, retirando los restos de material vegetal de mayor tamaño. Luego, fueron secadas al aire a 30°C durante 5 días hasta masa constante y tamizadas con malla de 3mm. Finalmente fueron almacenadas a temperatura ambiente para realizar los análisis moleculares posteriores y su caracterización química.

#### 2.2.2.2. Muestras de plantas y suelo rizosférico

Con respecto al muestreo del material vegetal, se tomaron entre 3-5 plantas de arroz (con las raíces y suelo adherido) por parcela en cada bloque y se conservaron refrigeradas

hasta el momento de su procesamiento. Se retiró de cada planta el suelo que no se encontraba adherido a las raíces y luego se realizaron las suspensiones de suelo rizosférico en agua esterilizada. Se centrifugaron las suspensiones, se descartaron los sobrenadantes, y se almacenaron los pellets en freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los análisis moleculares. En el primer muestreo, las suspensiones se realizaron a partir de 5 plantas por tratamiento por bloque y 50ml de agua; en el segundo muestreo se utilizaron 3 plantas por tratamiento por bloque y 100ml de agua. Para facilitar la lectura de esta tesis, de aquí en más se utilizará el término *rizósfera* para referirse al suelo rizosférico y únicamente el término *suelo* para referirse al suelo desnudo.

Se midieron los siguientes parámetros de rendimiento vegetal: longitud de parte aérea, longitud de raíz y el peso fresco total por planta. Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros se compararon mediante un ANOVA factorial ( $\alpha=0.05$ ) con los factores rotación y muestreo, y comparaciones de medias mediante el Test de Tukey. Los resultados son meramente descriptivos por lo que se incluyen como anexo a esta tesis (Anexo 1).

Luego, las raíces fueron separadas de la parte aérea y desinfectadas superficialmente con NaClO 2% de acuerdo a Ferrando et al. 2012. Las raíces desinfectadas se congelaron en nitrógeno líquido y, junto con las muestras de rizósfera, fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para los análisis moleculares posteriores.

### 2.2.3. Caracterización de los suelos

El suelo donde está instalado el ensayo se clasifica como Natraquoll (USDA Soil Taxonomy), y presenta un carbono orgánico del 1.5% y un pH de 5.9 aproximadamente. Las determinaciones de carbono orgánico y pH fueron realizadas previamente en nuestro laboratorio sobre muestras de este mismo ensayo de campo (carbono orgánico mediante el método de oxidación húmeda y cuantificación por espectrofotometría según Heanes, 1984; Tiesen y Moir, 2008; pH de acuerdo con Brady y Weil, 2008). Los datos de textura del suelo de cada rotación fueron brindados por INIA Treinta y Tres y corresponden al momento del inicio del ensayo en el año 2012 (Tabla 2.1).

Rotación	% Arena $\pm$ DE	% Limo $\pm$ DE	% Arcilla $\pm$ DE
R1	20.8 $\pm$ 8.3	48.4 $\pm$ 3.3	30.8 $\pm$ 8.0
R4	12.2 $\pm$ 5.6	56.6 $\pm$ 6.4	31.2 $\pm$ 3.3
R5	19.9 $\pm$ 8.6	51.8 $\pm$ 5.9	28.3 $\pm$ 3.8

**Tabla 2.1:** Textura de los suelos provenientes de las rotaciones en estudio. DE: Desviación Estándar de replicados biológicos (bloques),  $n=3$ . Los datos fueron tomados al inicio del ensayo de campo en el año 2012.

Se realizaron análisis químicos en todas las muestras de suelo de ambos muestreos.

La determinación de sulfato se realizó mediante extracción con  $\text{CaCl}_2$ , precipitación con  $\text{BaSO}_4$  y posterior determinación por turbidimetría, según Franzen, 2015. Las determinaciones de amonio y nitrato se realizaron mediante extracción con  $\text{KCl}$ , análisis mediante el método estándar de azul de indofenol para amonio y el método de reducción con  $\text{Cu-Cd}$  para nitrato, seguido del método colorimétrico modificado de Griess-Ilosvay (Tan, 2005). El fósforo disponible fue analizado mediante el método de Bray1 (Bray, R.H. & Kurtz, 1945), y el potasio mediante espectrofotometría de llama según Isaac y Kerber, 1971. Estas determinaciones fueron llevadas a cabo en el laboratorio del Departamento de Suelos y Aguas de Facultad de Agronomía (Udelar) bajo la supervisión del Ing. Agr. (MSc) Marcelo Ferrando y la Dra. Lucía Salvo. Los resultados de los análisis químicos se compararon estadísticamente mediante un ANOVA factorial ( $\alpha=0.05$ ) con los factores rotación y muestreo, y comparaciones de medias mediante el Test de Tukey.

#### **2.2.4. Extracción y cuantificación del ADN de suelos, rizósferas y raíces**

La extracción de ADN de las raíces se realizó según el método de Doyle y Doyle, 1987, como se describe en Ferrando et al. 2012. Para la extracción de ADN de los suelos y rizósferas se utilizó el kit comercial MOBIO PowerSoil®. Todos los ADN extraídos fueron conservados a  $-20^\circ\text{C}$ . La cuantificación del ADN extraído de todas las muestras se realizó utilizando el kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, diseñado específicamente para el uso con Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Además, se verificó el estado del ADN de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en TBE 0.5X (30min, 100mV) utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Fermentas).

En la Tabla 2.2 se especifica el código utilizado para cada muestra de ADN según los distintos factores evaluados (material de partida, momento de muestreo y sistema de rotación). En el Anexo 2 se presentan los resultados de la cuantificación de ADN de suelos, rizósferas y raíces en  $\text{ng ADN}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  y  $\mu\text{g ADN}\cdot\text{g}$  de material de partida<sup>-1</sup>.

Sample	Material	Sampling	Rotation	Replicate	Treatment
SDR1.1	Soil	December	R1	1	SDR1
SDR1.2	Soil	December	R1	2	SDR1
SDR1.3	Soil	December	R1	3	SDR1
SDR4.1	Soil	December	R4	1	SDR4
SDR4.2	Soil	December	R4	2	SDR4
SDR4.3	Soil	December	R4	3	SDR4
SDR5.1	Soil	December	R5	1	SDR5
SDR5.2	Soil	December	R5	2	SDR5
SDR5.3	Soil	December	R5	3	SDR5
SFR1.1	Soil	February	R1	1	SFR1
SFR1.2	Soil	February	R1	2	SFR1
SFR1.3	Soil	February	R1	3	SFR1
SFR4.1	Soil	February	R4	1	SFR4
SFR4.2	Soil	February	R4	2	SFR4
SFR4.3	Soil	February	R4	3	SFR4
SFR5.1	Soil	February	R5	1	SFR5
SFR5.2	Soil	February	R5	2	SFR5
SFR5.3	Soil	February	R5	3	SFR5
RhDR1.1	Rhizosphere	December	R1	1	RhDR1
RhDR1.2	Rhizosphere	December	R1	2	RhDR1
RhDR1.3	Rhizosphere	December	R1	3	RhDR1
RhDR4.1	Rhizosphere	December	R4	1	RhDR4
RhDR4.2	Rhizosphere	December	R4	2	RhDR4
RhDR4.3	Rhizosphere	December	R4	3	RhDR4
RhDR5.1	Rhizosphere	December	R5	1	RhDR5
RhDR5.2	Rhizosphere	December	R5	2	RhDR5
RhDR5.3	Rhizosphere	December	R5	3	RhDR5
RhFR1.1	Rhizosphere	February	R1	1	RhFR1
RhFR1.2	Rhizosphere	February	R1	2	RhFR1
RhFR1.3	Rhizosphere	February	R1	3	RhFR1
RhFR4.1	Rhizosphere	February	R4	1	RhFR4
RhFR4.2	Rhizosphere	February	R4	2	RhFR4
RhFR4.3	Rhizosphere	February	R4	3	RhFR4
RhFR5.1	Rhizosphere	February	R5	1	RhFR5
RhFR5.2	Rhizosphere	February	R5	2	RhFR5
RhFR5.3	Rhizosphere	February	R5	3	RhFR5
RDR1.1	Root	December	R1	1	RDR1
RDR1.2	Root	December	R1	2	RDR1
RDR1.3	Root	December	R1	3	RDR1
RDR4.1	Root	December	R4	1	RDR4
RDR4.2	Root	December	R4	2	RDR4
RDR4.3	Root	December	R4	3	RDR4
RDR5.1	Root	December	R5	1	RDR5
RDR5.2	Root	December	R5	2	RDR5
RDR5.3	Root	December	R5	3	RDR5
RFR1.1	Root	February	R1	1	RFR1
RFR1.2	Root	February	R1	2	RFR1
RFR1.3	Root	February	R1	3	RFR1
RFR4.1	Root	February	R4	1	RFR4
RFR4.2	Root	February	R4	2	RFR4
RFR4.3	Root	February	R4	3	RFR4
RFR5.1	Root	February	R5	1	RFR5
RFR5.2	Root	February	R5	2	RFR5
RFR5.3	Root	February	R5	3	RFR5

**Tabla 2.2:** Código de las muestras de suelo, rizósfera y raíces utilizadas según los diferentes factores.

### 2.2.5. Secuenciación masiva de genes 16S rRNA de suelo, rizósfera y raíces de arroz

Se realizó la secuenciación masiva de amplicones dirigida al gen 16S rRNA utilizando la tecnología Illumina MiSeq. Se amplificó la región V4 de los genes 16S rRNA de *Bacteria* con los primers 515F y 806R según el protocolo de Kozich et al. 2013, en el servicio de secuenciación Microbiome Insights (University of British Columbia, Vancouver, Canadá). Se analizaron muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz correspondientes a dos bloques de cada rotación, en ambas etapas del cultivo (36 muestras totales).

#### 2.2.5.1. Procesamiento y filtrado de las secuencias crudas

Se analizó la calidad de las secuencias crudas de cada muestra mediante gráficos de calidad (*quality score*); en el Anexo 3 se adjuntan algunas de estas gráficas. El procesamiento de las secuencias crudas fue realizado por el servicio de secuenciación utilizando el software Mothur (v. 1.39.5; Schloss et al. 2009) de acuerdo con el protocolo operativo estándar desarrollado por Kozich et al. 2013. Los pares de secuencias crudas provenientes de cada molécula fueron concatenados, y luego las secuencias fueron filtradas según su calidad considerando un valor de calidad mayor a 25. Además, se removieron secuencias con bases ambiguas, tamaño mayor a 275pb, secuencias con homopolímeros de más de 8 bases, quimeras y secuencias de linajes no deseados (como cloroplastos y mitocondrias). El alineamiento se realizó con la base de referencia de SILVA (versión 102). Finalmente, las secuencias fueron agrupadas en OTUs (97% de similitud) y clasificadas obteniendo la taxonomía consenso según la base de datos de Greengenes (versión 13.8). Se obtuvieron  $7.2 \times 10^5$  lecturas de alta calidad que se agruparon en 37670 OTUs.

#### 2.2.5.2. Análisis de las comunidades bacterianas utilizando *Phyloseq*

Los datos fueron importados y analizados con la herramienta *Phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013) en el software R (versión 3.6.1) con Rstudio (versión 1.2.5033). *Phyloseq* es un paquete para R, disponible de forma libre, enfocado en la manipulación y análisis de datos generados por diferentes metodologías de secuenciación masiva. Esta herramienta es útil para abordar el estudio de la estructura de las comunidades microbianas ya que permite importar, analizar y visualizar datos de secuenciación masiva de amplicones luego de un procesamiento inicial. La ventaja de *Phyloseq* es que organiza y agrupa en un único objeto distintos componentes relevantes de nuestros datos: la tabla de OTUs, la clasificación taxonómica de las OTUs, los metadatos y un árbol filogenético con los representantes de las OTUs. Los objetos de clase *phyloseq* utilizados en el presente trabajo fueron creados únicamente con los tres primeros componentes.

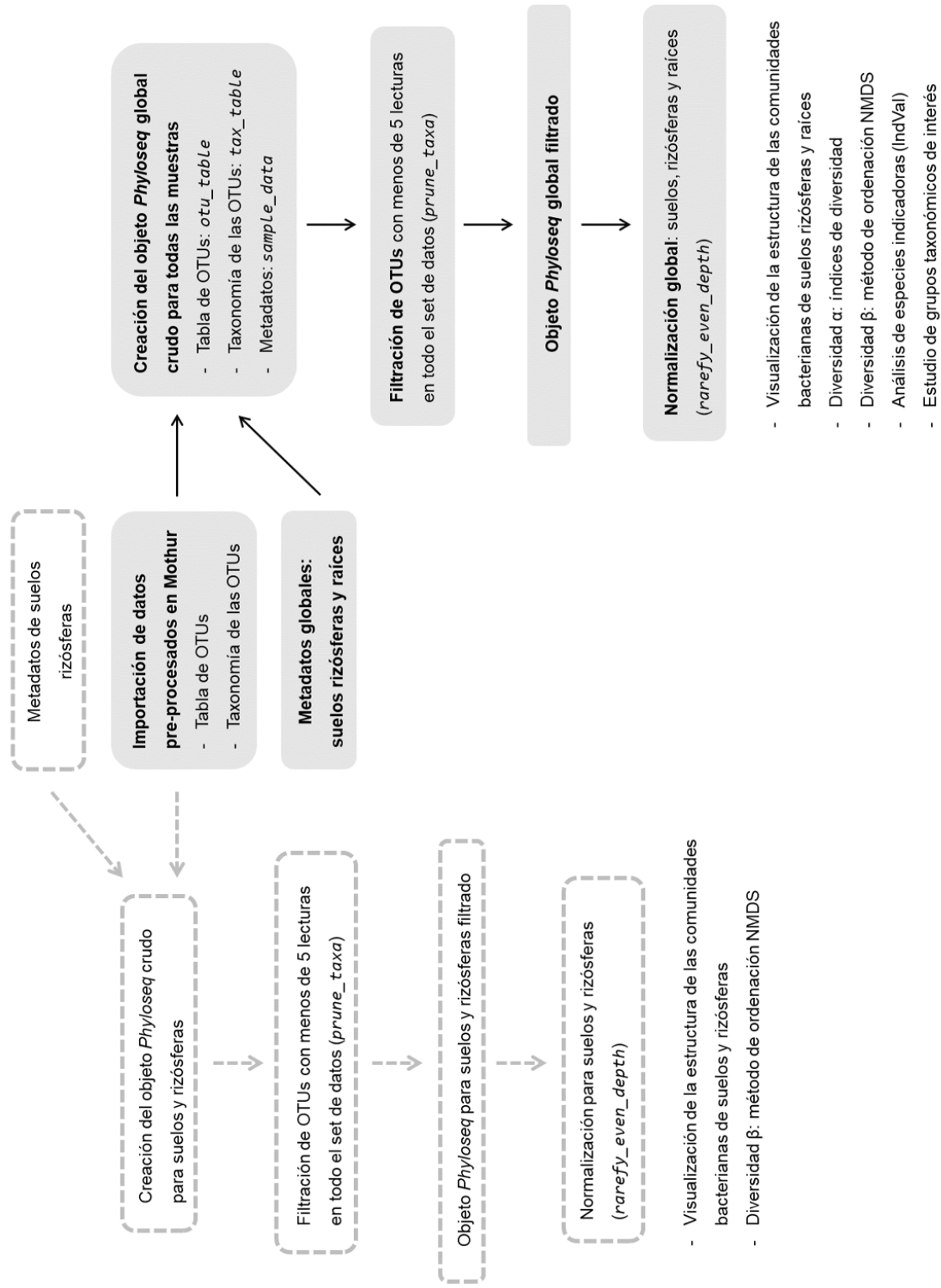
En la Figura 2.3 se puede observar el esquema de trabajo que se llevó a cabo. Se realizó un primer objeto *phyloseq* crudo conteniendo la tabla de OTUs, la taxonomía de las OTUs y los metadatos para el total de las muestras (suelos, rizósferas y raíces). Este objeto *phyloseq* global crudo, que contó con un total de 37670 OTUs, fue filtrado utilizando la función *prune\_taxa* eliminando las OTUs que aportaban menos de 5 lecturas a todo el set de datos. El objeto *phyloseq* global filtrado presentó 6504 OTUs. Debido a las diferentes profundidades de muestreo observadas en las muestras provenientes de los distintos materiales estudiados, los datos fueron normalizados mediante el método *rarefying* utilizando la función *rarefey\_even\_depth*. Este método implica un submuestreo aleatorio de secuencias en cada muestra para alcanzar el mismo número de secuencias en todas las muestras y así poder compararlas entre sí. Todo el set de datos fue normalizado a la muestra que presentó el menor número de secuencias (RDR1.1, 2667 secuencias). El objeto *phyloseq* global filtrado y normalizado (5545 OTUs) fue utilizado para visualizar y comparar la estructura de las comunidades bacterianas de suelos, rizósferas y raíces de arroz en distintas etapas del cultivo y bajo diferentes sistemas de rotación.

Teniendo en cuenta los distintos perfiles obtenidos en las curvas de rarefacción que indican una mayor diversidad en las muestras de suelo y rizósfera con respecto a las raíces, se decidió realizar un análisis *Phyloseq* alternativo para comparar únicamente las comunidades de suelo y rizósfera (Figura 2.3). Para esto, se creó un nuevo objeto *phyloseq* crudo únicamente con los datos de las muestras de suelo y rizósfera (33692 OTUs). Este objeto fue filtrado y normalizado a la muestra con menor número de secuencias (5821 OTUs, SDR1.1, 12707 secuencias), de igual forma a lo mencionado para el objeto global.

Los análisis que se detallan a continuación, así como la realización de diferentes gráficos para visualizar la estructura de las comunidades a diferentes niveles taxonómicos, fueron llevados a cabo utilizando diferentes paquetes (*phyloseq*, *vegan*, *ggplot2*, *RcolorBrewer*, *limma*, *ranacapa*, *rioja*, *mvabund*, *indicspecies*) en el software R (versión 3.6.1) con Rstudio (versión 1.2.5033). Para mostrar la distribución de los taxones dominantes en las distintas muestras, se realizó un heatmap basado en los valores de abundancia relativa de los 50 géneros más abundantes, transformados mediante  $\log_{10}$ , centrados y escalados.

### 2.2.5.3. Análisis de $\alpha$ diversidad

La diversidad de las comunidades bacterianas en cada una de las muestras ( $\alpha$  diversidad) fue evaluada mediante curvas de rarefacción y el cálculo de los siguientes índices de diversidad: riqueza (*observed*), Chao1, ACE, Shannon y Simpson. Las curvas de rarefacción se realizaron sobre los datos filtrados, utilizando la función *ggrare* del paquete *ranacapa* para R (Kandlikar et al. 2018). Los índices de diversidad se calcularon sobre los datos filtrados y normalizados utilizando la función *estimate\_richness* del paquete



**Figura 2.3:** Esquema del flujo de trabajo utilizado en el análisis de las comunidades bacterianas mediante *Phyloseq*. Se muestra el análisis principal en rectángulos grises y el análisis alternativo en rectángulos de borde discontinuo.

*Phyloseq*, y se compararon estadísticamente mediante el Test de Kruskal-Wallis (no paramétrico) para cada uno de los factores evaluados (material, muestreo, y rotación) y para la interacción material por muestreo, y el Test de comparación de rangos de Wilcoxon ( $\alpha=0.05$ ).

#### 2.2.5.4. Análisis de $\beta$ diversidad

Fueron construidos diagramas de Venn para mostrar la distribución de las OTUs entre los distintos tipos de muestra estudiados (materiales) y entre las dos etapas del cultivo (muestreos), utilizando la función *venn* del paquete *limma*. Para comparar la estructura de las comunidades de las distintas muestras ( $\beta$  diversidad) se realizó un análisis de ordenación utilizando el método de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) con la medida de distancia de Bray-Curtis, utilizando los paquetes *Phyloseq* y *ggplot2*. Un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA,  $\alpha=0.05$ , número de permutaciones=999) fue utilizado para probar la significancia estadística de la composición de las comunidades entre muestras según los factores material, muestreo y rotación, usando el paquete *vegan*.

#### 2.2.5.5. Análisis de especies indicadoras

Se realizó un análisis de especies indicadoras con el objetivo de identificar OTUs específicas que estuvieran fuertemente asociadas a rizósfera y raíces de arroz de los distintos sistemas de rotación estudiados. Se seleccionó este método debido a que es posible de ser aplicado a una gran cantidad de secuencias por muestra y proporciona un apoyo estadístico. Para esto, se realizaron dos análisis independientes, uno para las muestras de rizósfera y otro para las de raíces. La información de abundancia para las 4049 OTUs presentes en las muestras de rizósfera y las 2059 OTUs presentes en las muestras de raíces, fue utilizada para obtener OTUs indicadoras de los diferentes sistemas de rotación presentes en cada tipo de muestra. Se calculó el índice IndVal (*Indicator Value*, rango 0 a 1), que combina abundancia y frecuencia relativas de ocurrencia (Dufrêne y Legendre, 1997), y se consideraron únicamente aquellas OTUs asociadas fuertemente a cada una de las rotaciones (IndVal>0.7, p-valor<0.05). El análisis fue hecho utilizando el paquete *Indicspecies* en R con la función *multipatt* (usando *delug=TRUE*, *control=how(nperm=999)*).



## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Caracterización de los suelos

En las Tabla 2.3 se detallan los resultados obtenidos en los análisis químicos de los suelos. Los parámetros nitrato y fósforo presentaron valores significativamente mayores en diciembre que en febrero (p-valor<0.001 para el factor muestreo para ambos parámetros). El resto de los parámetros no presentaron diferencias significativas con respecto a los factores evaluados.

Rotación	Muestreo	Amonio $\pm$ DE (ppm)	Nitrato $\pm$ DE (ppm) *	Sulfato $\pm$ DE (mM)	Fósforo $\pm$ DE (ppm) *	Potasio $\pm$ DE (meq/100g suelo)
R1	Diciembre	16.1 $\pm$ 3.0	59.2 $\pm$ 5.4	0.14 $\pm$ 0.08	13.2 $\pm$ 6.3	0.21 $\pm$ 0.02
R4	Diciembre	15.0 $\pm$ 1.7	47.9 $\pm$ 9.0	0.10 $\pm$ 0.00	17.4 $\pm$ 5.3	0.22 $\pm$ 0.05
R5	Diciembre	16.1 $\pm$ 3.1	13.8 $\pm$ 4.4	0.14 $\pm$ 0.06	9.3 $\pm$ 3.0	0.21 $\pm$ 0.03
R1	Febrero	12.3 $\pm$ 3.2	<1 ppm	0.10 $\pm$ 0.01	4.7 $\pm$ 2.8	0.19 $\pm$ 0.06
R4	Febrero	19.7 $\pm$ 3.6	<1 ppm	0.09 $\pm$ 0.02	4.9 $\pm$ 0.8	0.20 $\pm$ 0.03
R5	Febrero	14.8 $\pm$ 1.9	<1 ppm	0.08 $\pm$ 0.01	6.1 $\pm$ 1.8	0.14 $\pm$ 0.02

**Tabla 2.3:** Análisis químicos de los suelos provenientes de las distintas rotaciones arroceras (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero). DE: Desviación Estándar de replicados biológicos (bloques), n=3. \*valores significativamente mayores en diciembre que en febrero (p-valor<0.001)

### 2.3.2. Estructura de las comunidades bacterianas de suelo y asociadas a raíces de arroz mediante secuenciación masiva de genes 16S rRNA

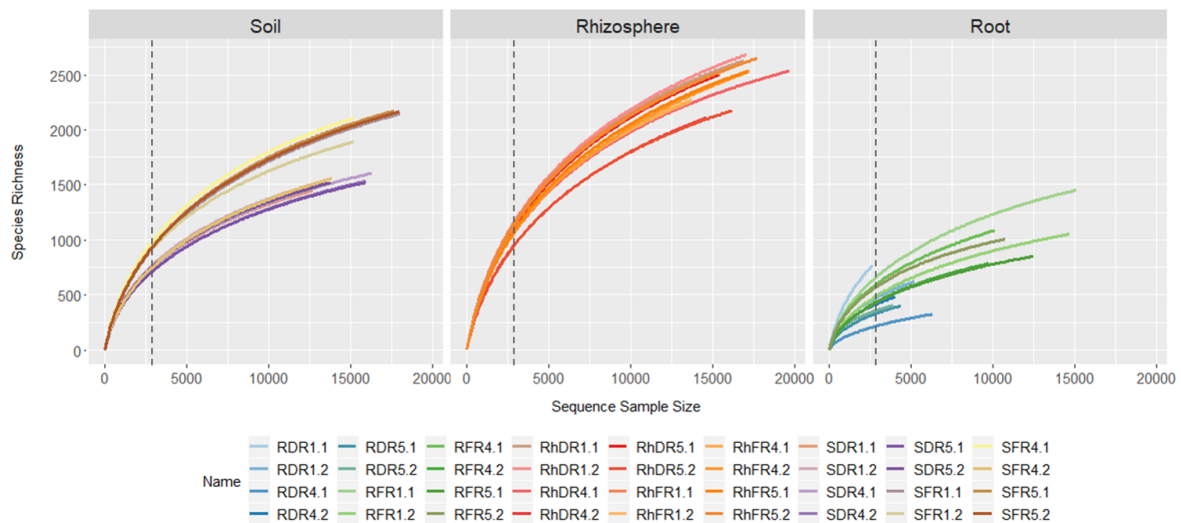
#### 2.3.2.1. Análisis de $\alpha$ y $\beta$ diversidad

La riqueza y la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en suelo y asociadas con la rizósfera y la endósfera de raíces de arroz fueron evaluadas mediante las curvas de rarefacción, la riqueza de especies (número de OTUs observadas) y los estimadores de diversidad de Chao1, ACE, Shannon y Simpson.

Las curvas de rarefacción permiten observar el grado de cobertura alcanzado en la secuenciación y comparar visualmente la diversidad entre las distintas muestras. En la Figura 2.4 se muestran las curvas de rarefacción con el número de OTUs generados para cada muestra de suelo, rizósfera y raíces en función del número de secuencias. Se puede observar claramente que el número de OTUs máximo alcanzado fue diferente para los distintos tipos de muestras. Con respecto a la forma de las curvas, varias de las muestras de suelo y algunas raíces presentaron curvas que se aproximan a una asíntota horizontal indicando que la secuenciación cubrió una parte importante de la riqueza de especies

en estas muestras. No obstante, a pesar de haber repetido la secuenciación para alguna muestra de raíces, varias de las muestras de raíces y rizósfera no alcanzaron el *plateau*, lo cual indica que sería necesario aumentar el esfuerzo de secuenciación para lograr una óptima cobertura de la diversidad.

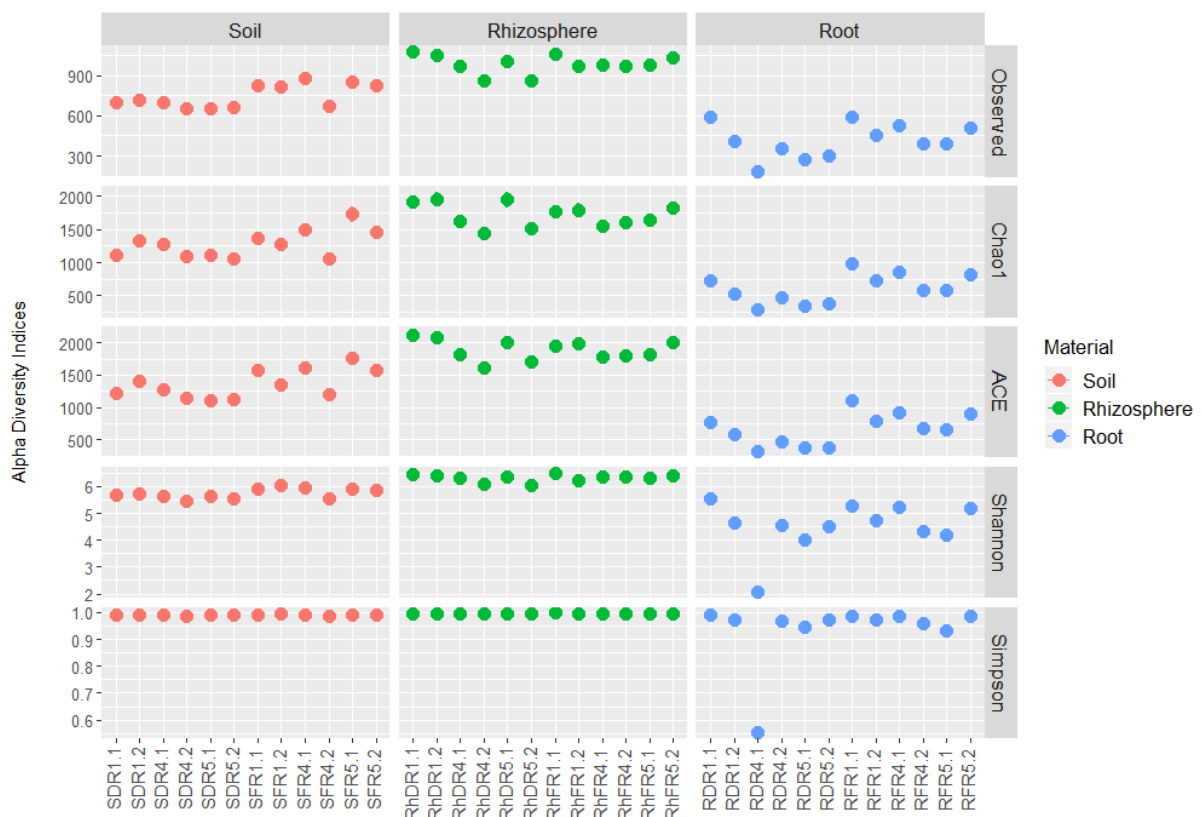
Para poder comparar la estructura de las comunidades presentes en los distintos tipos de muestras, se realizó la normalización global de los datos (todas las muestras). Con el valor de corte de 2667 secuencias utilizado en esta normalización global, se obtuvo 5545 OTUs en el total de las muestras. La comparación entre los distintos tipos de muestras, las rizósfera presentaron el mayor número de OTUs, entre 860 y 1076 OTUs, seguidas por las muestras de suelo que presentaron entre 651 y 876 OTUs, y por último las raíces con 182-591 OTUs.



**Figura 2.4:** Curvas de rarefacción para las comunidades bacterianas de las muestras de suelo, rizósfera y raíces. La línea punteada vertical indica el valor de corte en la normalización global de los datos (método *rarefying*) correspondiente a la muestra con menor número de secuencias (2667).

Debido a las diferentes coberturas mencionadas y al bajo valor de corte en la normalización global, se realizó además un análisis preliminar alternativo únicamente sobre las muestras de suelos y rizósfera para evaluar los efectos de esta normalización sobre la estructura de las comunidades. A pesar de utilizar un valor de corte casi cuatro veces superior (12707 secuencias), el análisis alternativo arrojó un total de 5803 OTUs, solamente 258 OTUs por encima del análisis global (0.04 % de incremento en el número de OTUs). Comparando la estructura y composición taxonómica de estas OTUs, no se detectaron diferencias relevantes entre el análisis global y el análisis alternativo (Anexo 4). Por lo tanto, se continuó con los datos globales normalizados para poder comparar la estructura de las comunidades bacterianas de suelo, rizósfera y raíces de arroz.

Los valores de riqueza y de diversidad de las comunidades bacterianas para las distintas muestras obtenidos para suelo, rizósfera y raíces de arroz se presentan en la Figura 2.5. Similar a lo observado en las curvas de rarefacción, para todos los índices utilizados, las rizósferas presentaron una diversidad  $\alpha$  significativamente superior al resto de los materiales (p-valor<0.001) mientras que las raíces mostraron la menor diversidad (p-valor<0.001). Los suelos presentaron una diversidad intermedia, menor a la rizósferas (p-valor<0.001, excepto para Simpson) pero mayor a las raíces (p-valor<0.001). Según el índice ACE, las raíces de febrero resultaron significativamente más diversas que las de diciembre (p-valor=0.035). Sin embargo, es necesario tomar con precaución estos resultados dada la estandarización de datos realizada.



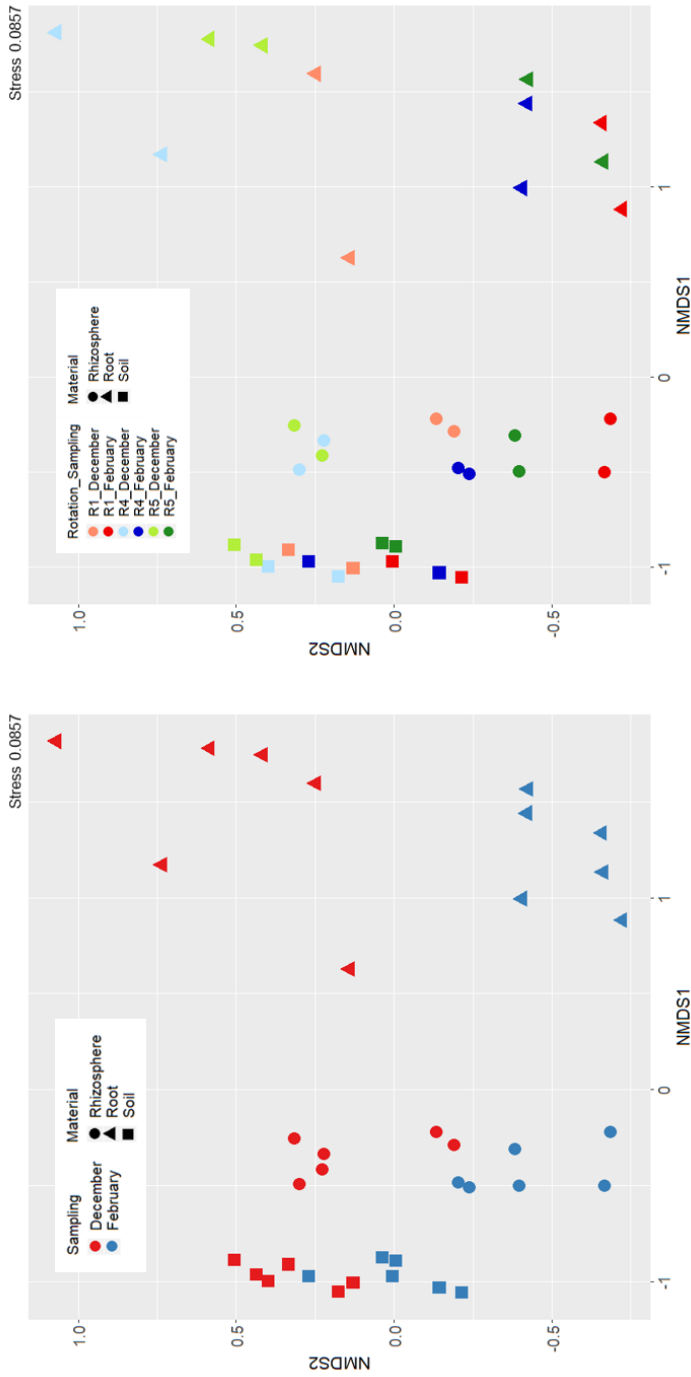
**Figura 2.5:** Riqueza (*observed*) e índices de diversidad calculados para las distintas muestras de suelo, rizósfera y raíces.

Para visualizar cuáles son los factores que dirigen la variación en la estructura de las comunidades bacterianas en el conjunto de muestras, se utilizó un análisis NMDS en combinación con un PERMANOVA, basado en las distancias de Bray-Curtis entre muestras (Figura 2.6). El análisis estadístico se realizó considerando los factores material, muestreo y rotación, y las interacciones entre ellos, las cuales pueden ser interpretadas en este caso como el efecto de la combinación de estos factores. Se encontró que las muestras de suelo,

rizósfera y raíces se ubicaron en grupos claramente diferenciados a lo largo del eje NMDS1, donde las comunidades de rizósfera se ubican en un espacio intermedio entre las comunidades de suelo y raíces. El PERMANOVA indicó que las comunidades provenientes de los distintos materiales difieren significativamente ( $R^2=0.3956$ ,  $Pr=0.0010$ , Figura 2.6b). Las muestras provenientes de ambas etapas del cultivo, seca e inundada, correspondientes a los muestreos de diciembre y febrero respectivamente, se separaron a lo largo del eje NMDS2, siendo las raíces las que más difieren entre muestreos. Estas observaciones fueron confirmadas estadísticamente con los resultados del PERMANOVA para el factor muestreo ( $R^2=0.0666$ ,  $Pr=0.0020$ , Figura 2.6b) y para la interacción material por muestreo ( $R^2=0.0845$ ,  $Pr=0.0010$ , Figura 2.6b). Con respecto a las distintas rotaciones arroceras, es posible observar que las rizósferas de la rotación intensiva (R1) en la etapa seca presentaron una comunidad bacteriana más similar a las rizósferas inundadas que al resto de las rizósferas secas (Figura 2.6a), aunque el PERMANOVA no mostró un agrupamiento significativo de las muestras en función de este factor ( $R^2=0.0409$ ,  $Pr=0.1960$ , Figura 2.6b).

Sin embargo, considerando exclusivamente la comparación de rizósferas y suelos de la normalización alternativa (Figura 2.7), el efecto de las rotaciones sobre las comunidades microbianas estudiadas sí resultó significativo de acuerdo al PERMANOVA realizado ( $R^2=0.0772$ ,  $Pr=0.0450$ , Figura 2.7a). Los resultados arrojados en este análisis fueron similares a los obtenidos en el análisis global con respecto al tipo de material ( $R^2=0.3033$ ,  $Pr=0.0010$ , Figura 2.7b), al muestreo ( $R^2=0.1046$ ,  $Pr=0.0020$ , Figura 2.7b) y a la interacción material por muestreo ( $R^2=0.0822$ ,  $Pr=0.0040$ , Figura 2.7b). Las muestras de rizósfera se diferenciaron claramente en dos grupos provenientes de las distintas etapas del cultivo y, en cada uno de estos grupos, se observa una separación de las muestras de rizósfera de la rotación intensiva (R1) de las rizósferas del resto de las rotaciones.

Se realizaron diagramas de Venn para evaluar las OTUs comunes y/o exclusivas de los distintos tratamientos estudiados (Figura 2.8). Del total de OTUs obtenidas (5545) sólo un 14% (769) fueron compartidas entre los tres materiales estudiados, mientras que la mitad (2714) fueron detectadas en ambas etapas del cultivo en estos materiales. Las rizósferas presentaron la mayor cantidad de OTUs diferentes (4049), luego los suelos (2956) y por último las raíces (2059). De todas las OTUs presentes en rizósfera, casi la mitad también se encontraron en suelo (1955), y cerca de una tercera parte en el interior de las raíces (1452). Asimismo, resulta interesante mencionar que 549 OTUs fueron encontradas exclusivamente en las raíces y 1411 OTUs exclusivamente en las rizósferas, lo cual representa el 26% y 35%, respectivamente, del total de OTUs presentes en cada tipo de muestra.

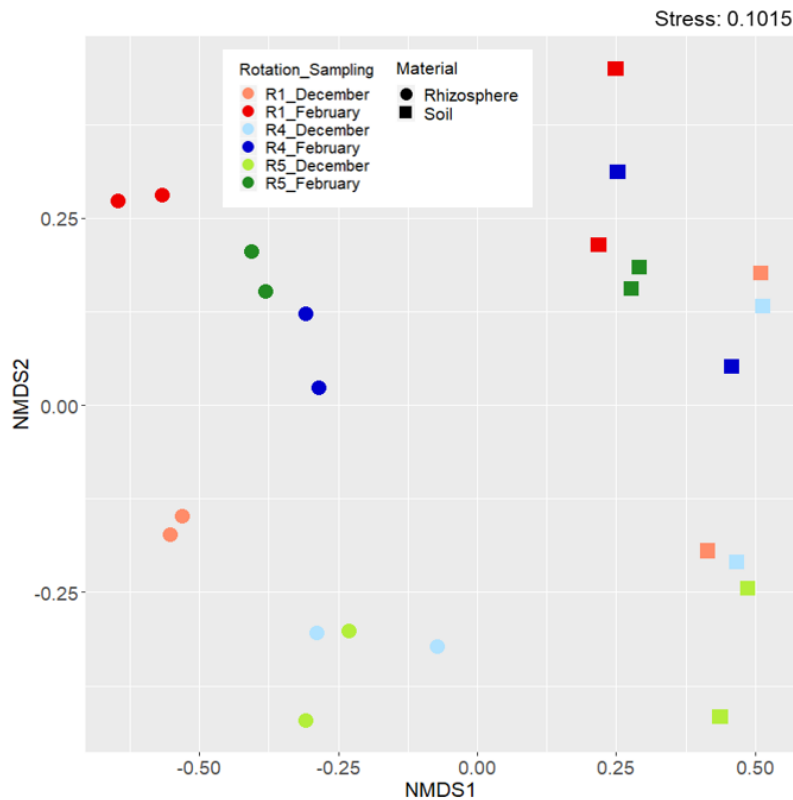


(a) Análisis NMDS

	R2	Pr(>F)
Material	0.3956	0.0010
Sampling	0.0666	0.0020
Crop Rotation	0.0409	0.1300
Material x Sampling	0.0845	0.0010
Material x Crop Rotation	0.0639	0.3370
Sampling x Crop Rotation	0.0289	0.4530
Material x Sampling x Crop Rotation	0.0531	0.6011
Residuals	0.2665	
Total	1.0000	

(b) PERMANOVA

**Figura 2.6:** Análisis NMDS (a) y PERMANOVA (b) realizados sobre la abundancia relativa de OTUs en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. Basados en la distancia de Bray-Curtis. En (b) se indica en gris los factores para los que el PERMANOVA fue significativo ( $Pr < 0.05$ ).



(a) Análisis NMDS

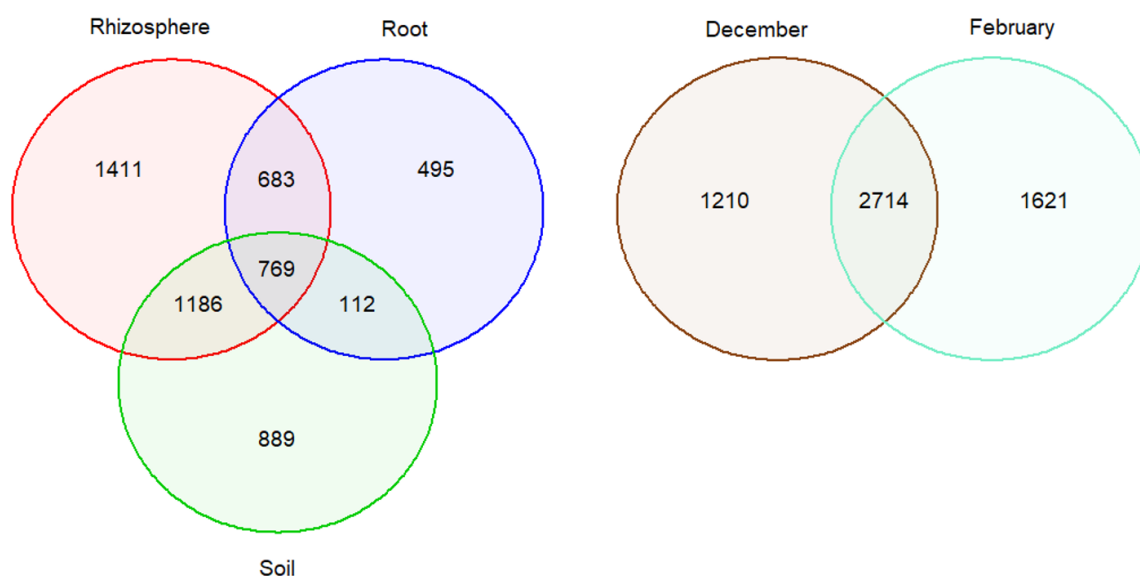
	R2	Pr(>F)
Material	0.3033	0.0010
Sampling	0.1046	0.0020
Crop Rotation	0.0772	0.0450
Material x Sampling	0.0822	0.0040
Material x Crop Rotation	0.0688	0.0970
Sampling x Crop Rotation	0.0469	0.3390
Material x Sampling x Crop Rotation	0.0460	0.3940
Residuals	0.2709	
Total	1.0000	

(b) PERMANOVA

**Figura 2.7:** Análisis NMDS (a) y PERMANOVA (b) realizados sobre la abundancia relativa de OTUs en las muestras de suelo y rizósfera en las dos etapas del cultivo, a partir del análisis alternativo de los datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. Basados en la distancia de Bray-Curtis. En (b) se indica en gris los factores para los que el PERMANOVA fue significativo ( $Pr < 0.05$ ).

### 2.3.2.2. Composición taxonómica de la comunidad bacteriana total de suelo, rizósfera y raíces de arroz

El análisis taxonómico de las comunidades bacterianas presentes en las distintas muestras asociadas a las raíces de arroz reveló un perfil de composición a nivel de phylum característico para cada tipo de muestra (Figura 2.9). Debido a que el phylum *Proteobac-*



**Figura 2.8:** Diagramas de Venn de las OTUs compartidas entre los distintos materiales y entre las dos etapas del cultivo estudiadas, seca e inundada (diciembre y febrero).

*teria* constituye una gran proporción de estas comunidades y está compuesto por una gran diversidad de taxones, en la Figura 2.9 este phylum fue dividido en sus respectivas clases. Aunque a este nivel taxonómico no se observaron diferencias claras con respecto a los sistemas de rotación evaluados, fue posible identificar algunas diferencias en la presencia o abundancia de algunos grupos taxonómicos asociados a las distintas etapas del cultivo.

Considerando el promedio de abundancias relativas de cada phylum (clase dentro del phylum *Proteobacteria*) para el grupo de muestras provenientes de cada material, se identificaron los grupos más abundantes presentes en suelo, rizósfera y raíces, y se evaluó su dinámica a través de los distintos compartimientos asociados a la raíz. En los suelos, los phyla más abundantes fueron *Acidobacteria* (23%) y *Proteobacteria* (23%), seguidos de *Actinobacteria* (14%), *Verrucomicrobia* (11%) y *Chloroflexi* (11%). En comparación con los suelos, las rizósferas se vieron enriquecidas en proteobacterias (37%) y *Bacteroidetes* (9% en rizósfera, 1% en suelo), en tanto disminuyó la proporción de *Actinobacteria* (5%) y *Chloroflexi* (6%). Sin embargo, los principales cambios en la estructura a nivel de phylum pueden observarse en la transición de la rizósfera al interior de las raíces. A nivel de la endósfera, se encontró la mayor proporción de *Proteobacteria* (66%) y *Firmicutes* (15%).

El phylum *Proteobacteria* no sólo presentó un aumento en su abundancia relativa desde el suelo hacia la raíz, sino también importantes cambios en su estructura (Figura 2.9). En los suelos, la clase *Alphaproteobacteria* representó aproximadamente la mitad de este phylum (13%), aunque también se identificaron en suelo bacterias pertenecientes a las clases *Beta* (5%), *Delta* (3%), y *Gammaproteobacteria* (2%) en menores proporciones. A

nivel de la rizósfera, las clases *Beta* y *Deltaproteobacteria* mostraron un importante aumento (14 y 9 %, respectivamente) con respecto al suelo, mientras las alfa proteobacterias disminuyeron su abundancia (9 %).

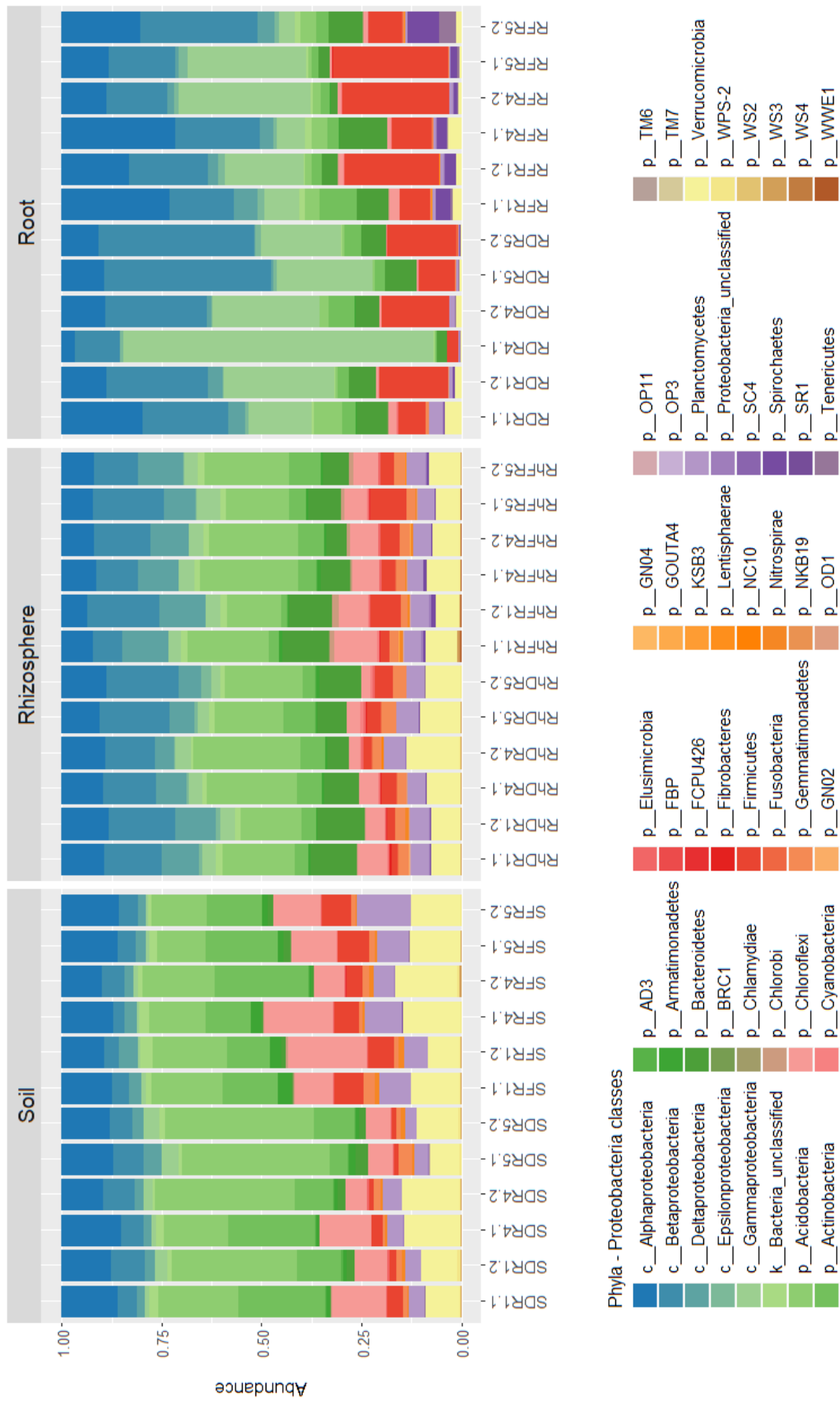
Las comunidades endófitas de raíz están compuestas predominantemente por *Gamma*, *Beta* y *Alphaproteobacteria*; estas tres clases suman entre el 52 % y 92 % de la composición total de las comunidades bacterianas presentes en las raíces. La alta proporción de proteobacterias encontrada en las raíces se debió principalmente a un gran enriquecimiento de la clase *Gammaproteobacteria* en la mayoría de las muestras, con valores variables de abundancias relativas que superaron el 15 % en casi todas las muestras (9 de las 12 raíces). Las clases *Beta* y *Alphaproteobacteria* también se detectaron en el interior de las raíces en proporciones importantes y variables (entre 11 % y 42 % para *Beta*; entre 3 % y 28 % para *Alpha*). La clase *Epsilonproteobacteria* fue detectada únicamente en rizósfera y en raíz, en baja abundancia relativa (menor al 1 % en la mayoría de las muestras).

Para profundizar en el análisis se observaron los resultados de algunos grupos a niveles taxonómicos menores. Si observamos las betaproteobacterias a nivel de orden y a nivel de familia, los *Burkholderiales* y *Rhodocyclales* fueron los grupos predominantes tanto en las muestras de rizósfera como en las raíces, principalmente de las familias *Comamonadaceae* dentro del orden *Burkholderiales* y *Rhodocyclaceae* dentro del orden *Rhodocyclales* (Figuras 2.10a y 2.10b, *Betaproteobacteria* a nivel de orden y familia, respectivamente). Ambos órdenes se encontraron en proporciones similares a nivel de la rizósfera (34 % para cada orden, con respecto al total de *Betaproteobacteria*), en tanto las raíces se vieron dominadas por *Burkholderiales* (57 %).

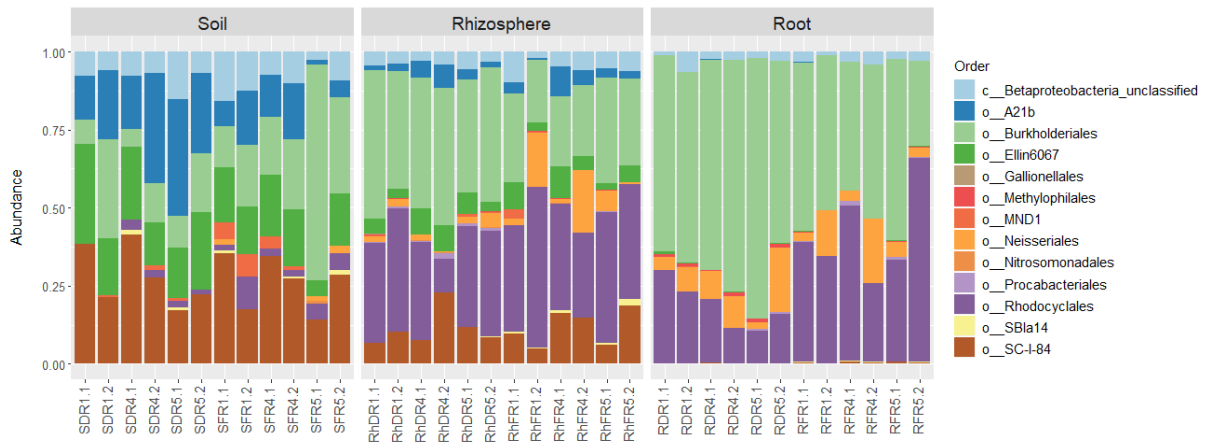
La clase *Alphaproteobacteria* estuvo compuesta en todas las muestras, principalmente por *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* y *Sphingomonadales* (Figura 2.11). Los tres órdenes fueron encontrados en proporciones importantes en las muestras de rizósfera (*Rhizobiales* 33 %, *Rhodospirillales* 21 %, *Sphingomonadales* 18 %, con respecto al total de *Alphaproteobacteria*), mientras que la endósfera de las raíces se vio marcadamente enriquecida en *Rhizobiales* (64 %).

Dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, las raíces se vieron ampliamente dominadas por unos pocos ordenes (Figura 2.12), principalmente *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales* (57 % y 19 % en promedio, respectivamente, con respecto al total de *Gammaproteobacteria*), mientras que en las rizósferas se encontró una mayor diversidad de esta clase con una alta proporción de *Xanthomonadales* (61 %). Miembros del orden *Methylococcales* fueron detectados casi exclusivamente en muestras de la etapa inundada del cultivo en los tres materiales estudiados, alcanzando una abundancia importante en esta etapa incluso a nivel de la endósfera de las raíces (promedio del 8 % de las gammaproteobacterias, en raíces de la etapa inundada).

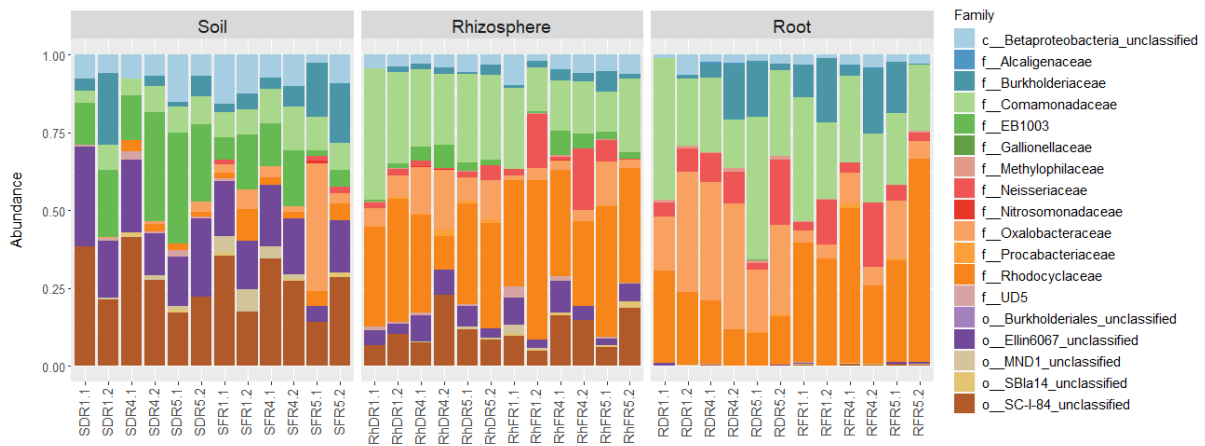




**Figura 2.9:** Composición taxonómica a nivel de phylum de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. El phylum *Proteobacteria* fue dividido en sus respectivas clases.

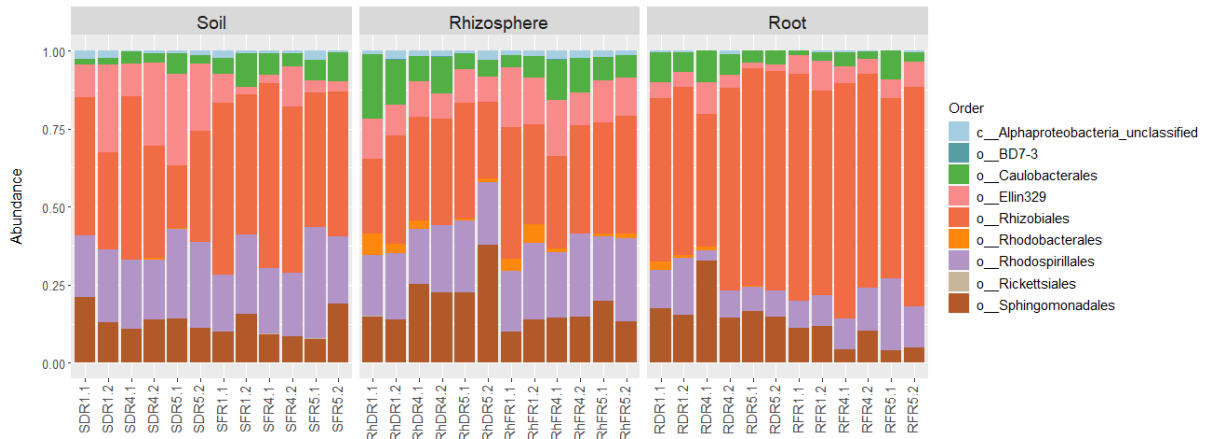


(a) A nivel de orden

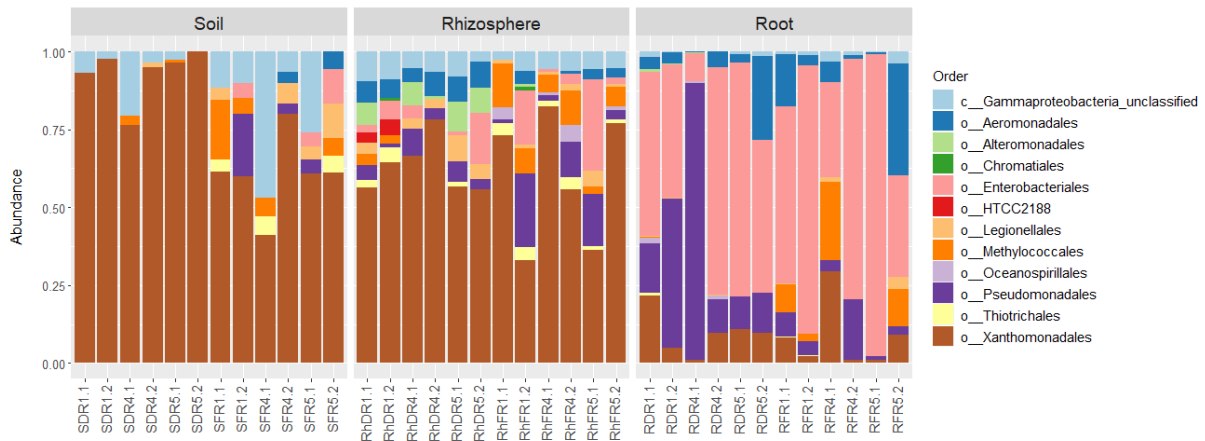


(b) A nivel de familia

**Figura 2.10:** Composición taxonómica de la clase *Betaproteobacteria* a nivel de orden (a) y a nivel de familia (b), obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo.



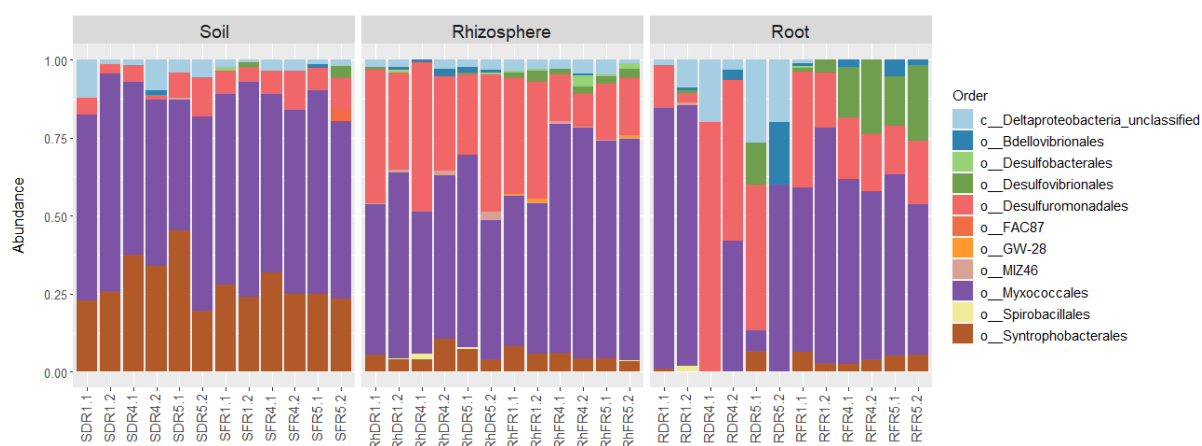
**Figura 2.11:** Composición taxonómica de la clase *Alphaproteobacteria* a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo.



**Figura 2.12:** Composición taxonómica de la clase *Gammaproteobacteria* a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo.

Tanto la clase *Deltaproteobacteria* como el phylum *Firmicutes*, resultan de particular interés ya que comprenden una gran variedad de bacterias anaerobias, muchas de ellas reductoras de sulfato, grupo fisiológico que se aborda en esta tesis. Aunque más adelante se presenta un análisis más profundo de estos grupos, y en el *Capítulo 3* de esta tesis un análisis específicos de las grupos taxonómicos conocidos como reductores de sulfato, es importante mencionar algunos aspectos generales de la dinámica de estos dos grupos taxonómicos en las distintas muestras y etapas del cultivo. Los resultados obtenidos muestran que la rizósfera presentó una mayor proporción de *Deltaproteobacteria* (9% en promedio para las rizósferas) que los suelos y las raíces (2-3%) (Figura 2.9), siendo el orden *Myxococcales* el más abundante en los tres tipos de muestra (Figura 2.13). Los *My-*

*xococcales* fueron, en promedio, el 59, 58 y 52% de las deltaproteobacterias en los suelos, rizósferas y raíces, respectivamente. Sin embargo, los principales cambios se observaron en los órdenes *Syntrophobacterales* y *Desulfuromonadales*. El primero, presentó abundancias importantes en suelo (entre 28% y 45% de las deltaproteobacterias), mientras que el segundo se vio enriquecido a nivel de la rizósfera (entre 10 y 47%) y en la mayoría de las muestras de raíces (más de 14% en 10 de 12 muestras de raíces). Además, es importante mencionar que el orden *Desulfovibrionales* fue detectado principalmente en las muestras de rizósfera y raíces inundadas (entre 2 y 4% para las rizósferas inundadas, entre 2 y 24% en raíces inundadas). En particular, a nivel de la endósfera de las raíces inundadas, los *Desulfovibrionales* alcanzaron abundancias importantes en cuatro muestras, entre 16 y 24% de las deltaproteobacterias (Figura 2.13).

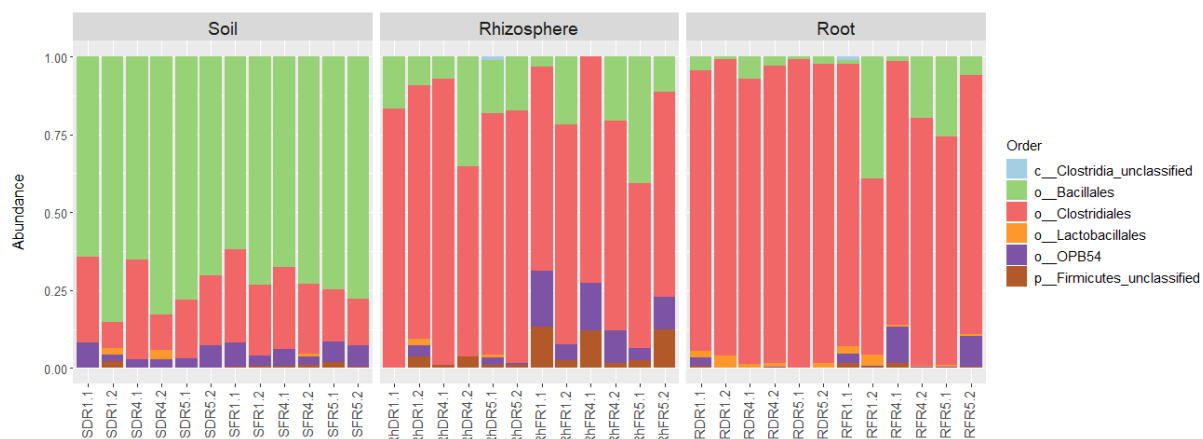


**Figura 2.13:** Composición taxonómica de la clase *Deltaproteobacteria* a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo.

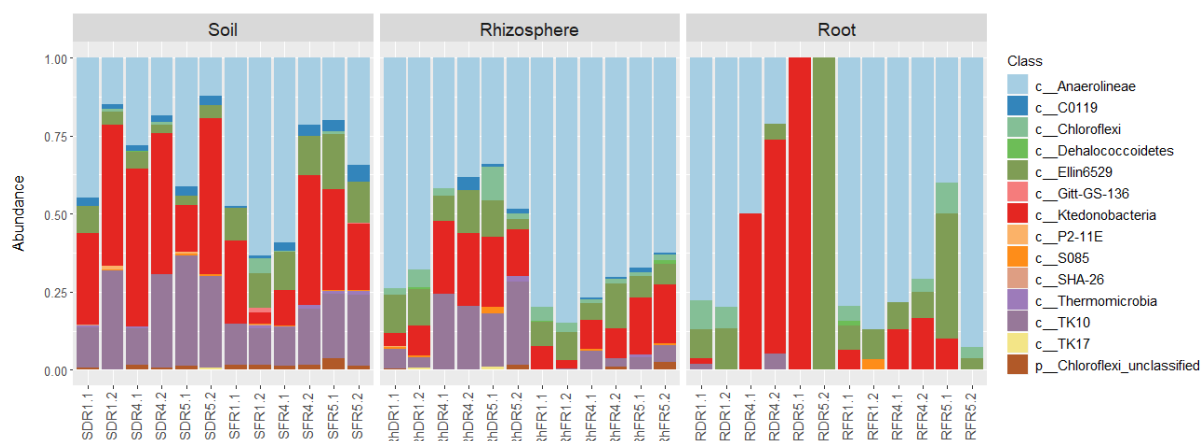
Aunque el phylum *Firmicutes* está presente en todas las muestras estudiadas, es notable el aumento en la proporción de este grupo taxonómico en el interior de las raíces. La abundancia promedio de *Firmicutes* en suelo y rizósfera fue de 4% mientras que en las raíces fue de 15%, alcanzando más del 20% en algunas raíces en la etapa inundada del cultivo (Figura 2.9). Mientras que la amplia mayoría de los *Firmicutes* encontrados en suelo pertenecen al orden *Bacillales* (73% del total de *Firmicutes*), una gran proporción de *Clostridiales* fue encontrada en la rizósfera y en la endósfera de las raíces (73% en rizósfera y 86% en raíces, con respecto al total de *Firmicutes*) (Figura 2.14).

El grupo *Chloroflexi* se encontró entre los cinco phyla más abundantes tanto en suelo (11%) como en rizósfera (6%), en cambio su abundancia promedio en las raíces fue menor al 1% (Figura 2.9). Aunque este phylum es conocido por contener un gran número de bacterias fotosintéticas anoxigénicas, en las muestras de suelo y rizósfera analizadas en este trabajo, este grupo estuvo compuesto principalmente por bacterias anaerobias estrictas

fermentadoras de la clase *Anaerolineae* (Figura 2.15).



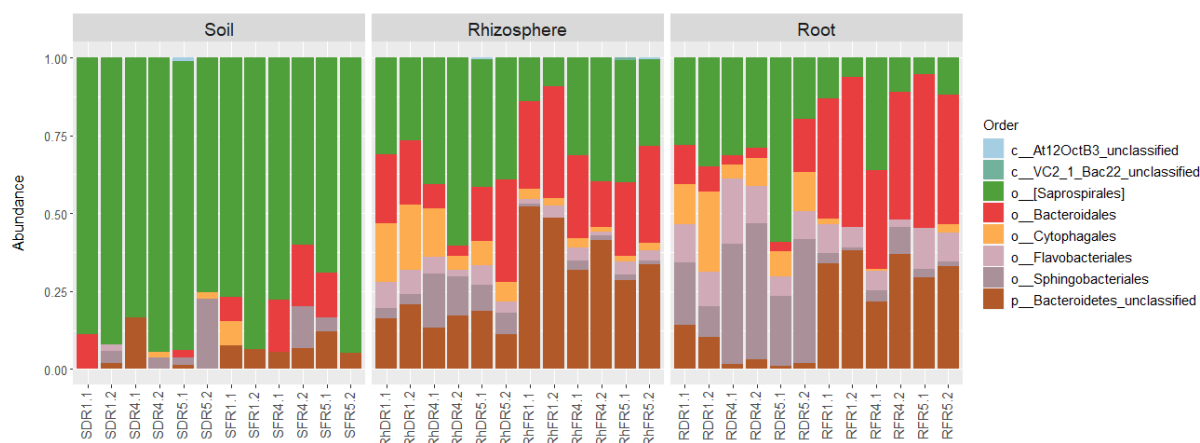
**Figura 2.14:** Composición taxonómica del phylum *Firmicutes* a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo.



**Figura 2.15:** Composición taxonómica del phylum *Chloroflexi* a nivel de clase, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo.

Resulta interesante explorar la composición del phylum *Bacteroidetes*, ya que la rizósfera y la endósfera de las raíces de arroz se vieron claramente enriquecidas en microorganismos de este grupo taxonómico (1 % en suelo, 9 % en rizósfera y 6 % en raíces) (Figura 2.9). Dentro de este grupo, las principales diferencias en la composición se observaron con respecto a la etapa del cultivo, particularmente en el interior de las raíces. Los órdenes *Sphingobacteriales* y *Cytophagales* fueron encontrados mayormente en la etapa seca, en tanto el orden *Bacteroidales* dominó en la etapa inundada (Figura 2.16) (en raíces secas: *Sphingobacteriales* 29 %, *Cytophagales* 12 % y *Bacteroidales* 8 %; en raíces inundadas: *Sphingobacteriales* 3 %, *Cytophagales* 1 % y *Bacteroidales* 42 %). Asimismo, también se

observaron marcadas diferencias en rizósferas y raíces entre las etapas del cultivo para un grupo de secuencias de *Bacteroidetes* no clasificados, incrementando su abundancia en la inundación (en rizósferas: 16 % en la etapa seca, 39 % en la etapa inundada; en raíces: 5 % en la etapa seca, 32 % en la etapa inundada).



**Figura 2.16:** Composición taxonómica del phylum *Bacteroidetes* a nivel de orden, obtenida a partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo.

Es importante destacar que el phylum *Spirochaetes* fue asociado fuertemente a las raíces inundadas. Su abundancia en suelo y rizósfera fue casi despreciable, así como también en el interior de las raíces en la etapa seca. En cambio, este phylum representó entre 2-7% de la comunidad bacteriana endófito de raíces inundadas (Figura 2.9), principalmente bacterias clasificadas dentro del género *Treponema* (no se muestra este resultado).

Por otra parte, para visualizar más claramente los principales cambios en la estructura de las comunidades microbianas estudiadas, se seleccionaron los grupos taxonómicos dominantes y se evaluó su abundancia y dinámica a través de los distintos compartimientos y a lo largo del ciclo de cultivo. Los 50 géneros (o el máximo nivel taxonómico alcanzado) más abundantes del conjunto de datos se muestran en el heatmap de la Figura 2.17, donde puede observarse los cambios en sus abundancias relativas en las distintas muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz, en las dos etapas del cultivo estudiadas.

Los taxones dominantes en los suelos se encontraron afiliados a varios de los phyla más abundantes ya mencionados anteriormente presentes en estas muestras (Figura 2.17). Entre ellos encontramos *actinobacterias*, principalmente *Actinomycetales* y las familias *Conexibacteraceae* y *Gaiellaceae*, bacterias del phylum *Chloroflexi* (*Thermogemmatissporaceae* y el orden no descripto B07\_WMSP1), alfa y betaproteobacterias, principalmente del género *Rhodoplanes* y la familia *Rhodspirillaceae*.

Además, se observaron algunos taxones presentes en suelo con abundancias claramente diferentes en las dos etapas del cultivo. Secuencias afiliadas al orden *Bacillales* (phylum

*Firmicutes*), a las familias *Isosphaeraceae* y *Gemmataceae* (recientemente propuestas dentro del phylum *Planctomycetes*, [Kulichevskaya et al. 2017; Kulichevskaya et al. 2016]) y un género dentro del phylum *Verrucomicrobia* aún no descrito (DA101) fueron encontradas en los suelos inundados con altas abundancias relativas en comparación con los suelos secos. En cambio, secuencias de las familias *Koribacteraceae* y *Acidobacteriaceae* (phylum *Acidobacteria*) y algunos grupos no descritos (Ellin329 y iii1-15) presentaron abundancias relativas marcadamente superiores en los suelos secos (diciembre) que bajo inundación (febrero). Como se observa en el dendrograma superior de la Figura 2.17, estas diferencias agruparon casi todos los suelos inundados (SF) en un cluster separado del resto de los suelos, a excepción de la muestra SFR4.2 que no se agrupó dentro de este cluster de suelos inundados.

Por otra parte, la rizósfera presentó el mayor número de taxones dominantes en el conjunto de datos (Figura 2.17). Dentro de los dominantes en rizósfera encontramos los géneros *Dechloromonas* y *Geobacter*. Además, varios taxones presentes en suelo pertenecientes a diversos phyla se vieron enriquecidos a nivel de la rizósfera, entre ellos los *Myxococcales*, *Solibacterales* y *Pedosphaerales*, y las familias *Sinobacteraceae* y *Chitinophagaceae*.

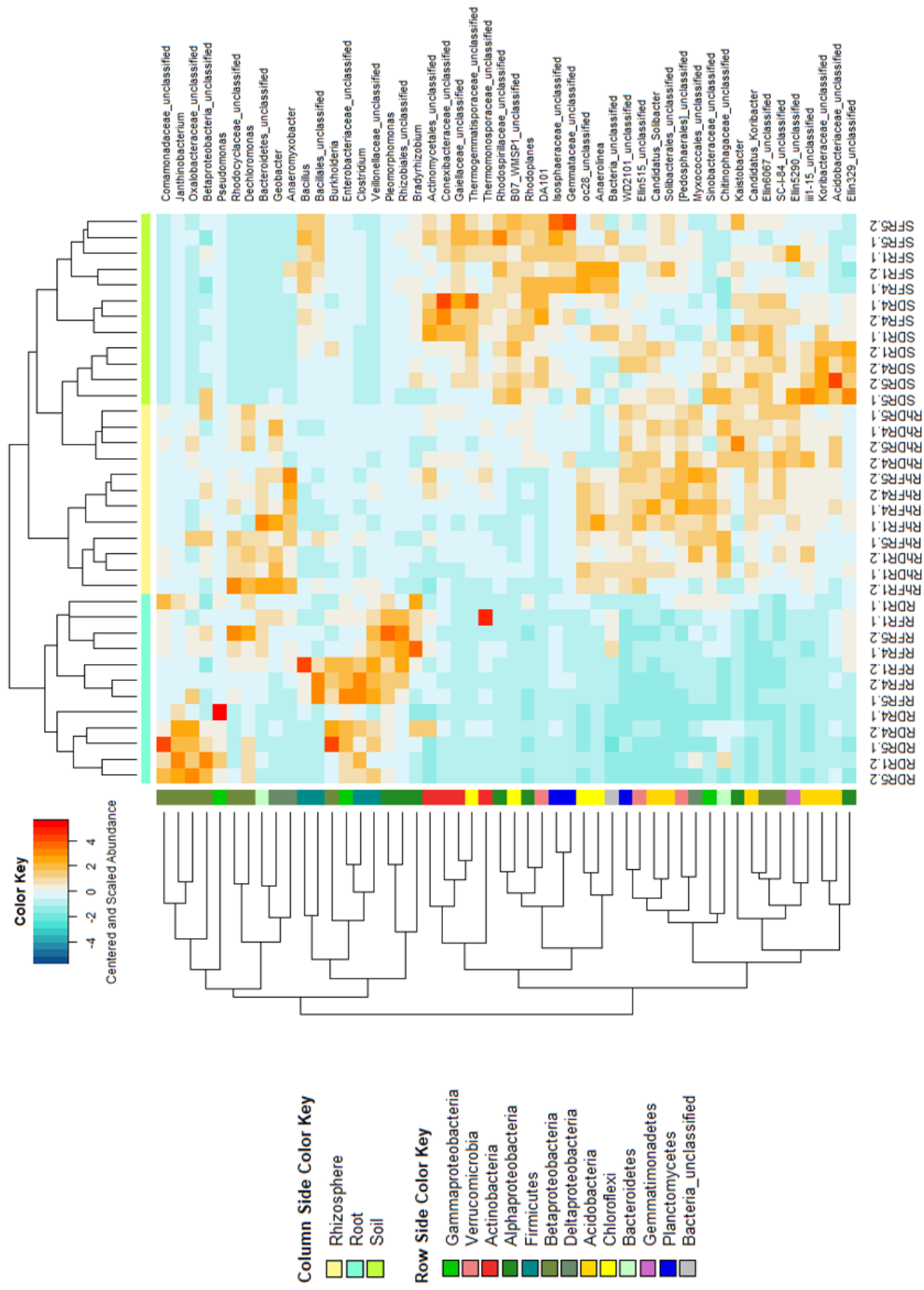
Similar a lo observado a nivel del suelo, también se observó un claro agrupamiento de las muestras de rizósfera según la etapa del cultivo (Figura 2.17). En el dendrograma realizado sobre las muestras fue posible identificar un conjunto de rizósferas que se agruparon separadas al resto de las muestras, que incluyó todas las rizósferas inundadas (RhF) y las rizósferas secas de la rotación intensiva (RhDR1). En cuanto a la composición de las comunidades bacterianas de estas muestras, se diferenciaron principalmente por presentar mayores abundancias del género *Anaeromyxobacter*, de taxones clasificados dentro de la clase *Anaerolineae* (el género *Anaerolinea* y el grupo no descrito oc28) y de secuencias de *Bacteroidetes* no clasificadas. Las comunidades presentes en el resto de las rizósferas secas, por su parte, resultaron ser más similares a las presentes en varios suelos de la etapa seca que a las rizósferas inundadas.

A diferencia de lo observado en suelo y rizósfera, en el interior de las raíces los taxones más abundantes pertenecen al phylum *Firmicutes* y a las cuatro clases principales de proteobacterias (*Beta*, *Alpha*, *Delta* y *Gammaproteobacteria*) (Figura 2.17). Asimismo, taxones clasificados en los phyla *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* disminuyeron marcadamente desde el suelo y rizósfera hacia la endósfera radicular. Resulta particularmente interesante que varios de los grupos dominantes encontrados en la endósfera de las raíces, presentaron abundancias relativas muy bajas tanto en suelo como en rizósfera. Entre ellos encontramos los géneros *Burkholderia* y *Clostridium*, y secuencias afiliadas a las familias *Veillonellaceae* y *Enterobacteriaceae*. Asimismo, varios taxones encontrados a nivel de la rizósfera en proporciones importantes

colonizaron también el interior de algunas raíces, por ejemplo, *Dechloromonas*, *Anaeromyxobacter*, y la familia *Rhodocyclaceae*.

El dendrograma superior de la Figura 2.17 mostró dos grupos claramente distintos dentro de las muestras de raíces asociados a cada etapa del cultivo. Un grupo, formado por todas las raíces inundadas (RF) y una de las muestras de raíces de la etapa seca (RDR1.1), se caracterizó por presentar altas abundancias de *Pleomorphomonas* y otros *Rhizobiales* no clasificados. Algunas muestras que integran este grupo presentaron, además, altas abundancias de *Bradyrhizobium*, *Clostridium* y *Bacillales*. En cambio, las raíces del segundo grupo que corresponden a casi todas las raíces de la etapa seca (RD), presentaron altas abundancias de los géneros *Janthinobacterium* y *Pseudomonas*, y de secuencias afiliadas a las familias *Comamonadaceae* y *Oxalobacteraceae*.





**Figura 2.17:** Heatmap con los 50 géneros (o el máximo nivel taxonómico alcanzado) más abundantes en suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. Los datos de abundancia para cada taxón fueron transformados mediante  $\log_{10}$ , centrados y escalados; se muestra el gradiente de abundancias relativas mediante escala de colores (azul a rojo). El dendrograma superior muestra el agrupamiento de las muestras de acuerdo al tipo de muestra; los colores en la parte superior indican el tipo de muestra. El dendrograma lateral muestra el agrupamiento de los distintos taxones de acuerdo a su distribución de abundancia relativa entre las muestras; los colores en la parte lateral indican la afiliación taxonómica a nivel e phylum (clase para el phylum *Proteobacteria*) de cada taxón.

### 2.3.2.3. Deltaproteobacterias y Firmicutes presentes en suelo, rizósfera y raíces de arroz

Como ya fue mencionado anteriormente, la clase *Deltaproteobacteria* y el phylum *Firmicutes* incluyen una gran cantidad de bacterias anaerobias y facultativas. Muchos de estos microorganismos son capaces de llevar a cabo procesos metabólicos relevantes en la biogeoquímica de los sistemas de arroz inundado, incluyendo bacterias fermentadoras, acetogénicas, homoacetogénicas, y varias capaces de respirar utilizando aceptores alternativos al oxígeno, como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ . Por esta razón, se seleccionaron estos grupos para profundizar en el análisis a menores niveles taxonómicos y así poder evaluar la dinámica de algunos géneros con metabolismo anaeróbico o facultativo conocido.

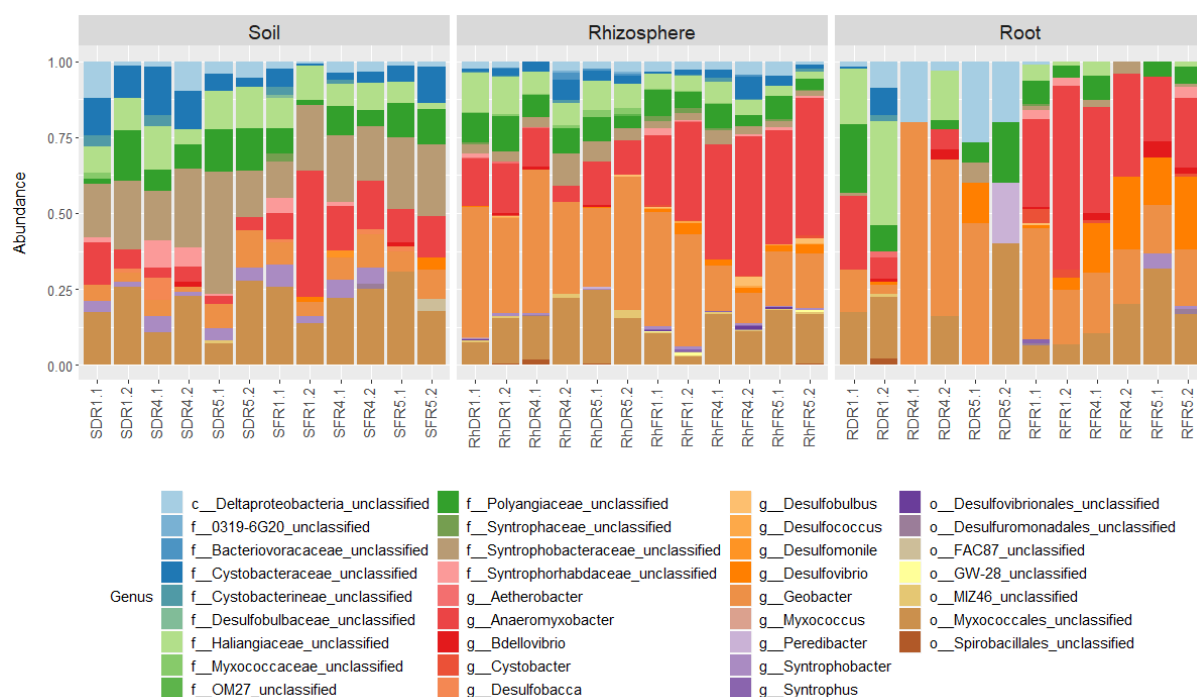
Los diferentes géneros pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria* establecidos en suelo, rizósfera y raíces de arroz se muestran en la Figura 2.18. Aunque varios géneros están presentes en todas las muestras, es posible identificar diferencias en los géneros dominantes de los diferentes nichos, así como también en las dos etapas del cultivo estudiadas.

Los géneros *Geobacter* y *Anaeromyxobacter*, conocidos microorganismos anaerobios, se encontraron entre las *deltaproteobacterias* dominantes en todas las rizósferas (Figura 2.18), coincidentemente con lo observado en el heatmap (Figura 2.17). Estos géneros dominaron también las poblaciones de deltaproteobacterias en la mayoría de las raíces y fueron encontrados en menores proporciones en las muestras de suelo. Con respecto a la etapa del cultivo, estos géneros presentaron abundancias relativas inversas para la etapa seca y la etapa inundada, particularmente en las rizósferas, pero también en varias raíces (Figura 2.18). Mientras las rizósferas secas presentaron un promedio de 37% de *Geobacter* y 12% de *Anaeromyxobacter*, los porcentajes de estos grupos en las rizósferas inundadas fueron de 22% y 37%, respectivamente. Estas proporciones inversas para estos géneros se observaron en cierta medida también a nivel de las raíces, donde se destaca la alta proporción de *Anaeromyxobacter* en la etapa inundada (entre 21% y 60% de las deltaproteobacterias), mientras que la proporción de *Geobacter* en las raíces de la etapa seca varió dentro de un rango amplio (entre 3 y 46%).

Secuencias de *Myxococcales* clasificadas en las familias *Polyangiaceae* y *Haliangiaceae*, también se encontraron en la amplia mayoría de las muestras y no presentaron diferencias claras en su proporción con respecto a los distintos tipos de muestra ni a la etapa del cultivo (Figura 2.18). Otros *Myxococcales* no clasificados se encontraron en los tres tipos de muestra, tanto en la etapa seca como en la inundación, estando dentro de las delta-proteobacterias dominantes en suelo y en rizósfera (en promedio, 20 % en suelo y 14 % en rizósfera) y también en algunas muestras de raíces.

A diferencia de lo observado en rizósferas y raíces, la familia *Syntrophobacteraceae* que incluye microorganismos anaerobios estrictos con metabolismo respiratorio o fermentativo, se encuentra entre las más abundantes en suelo, con valores de abundancias que varían entre el 12 % y 40 % de las delta-proteobacterias (Figura 2.18).

Microorganismos del género *Desulfovibrio* fueron detectados únicamente en la etapa de inundación, y su proporción se incrementó marcadamente en el interior de las raíces representando en promedio el 14 % de las secuencias de delta-proteobacterias en estas muestras. En algunas raíces, principalmente en las raíces inundadas, también se detectó el género *Bdellovibrio* (Figura 2.18).

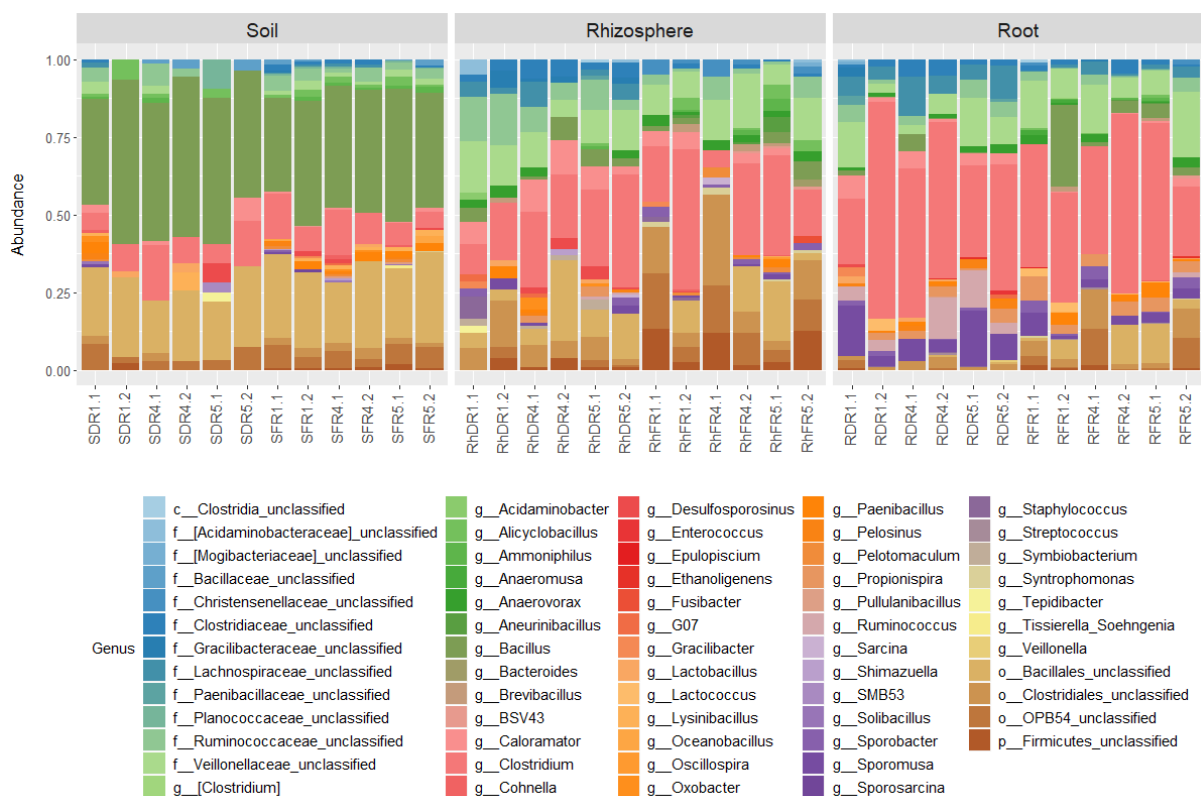


**Figura 2.18:** Composición taxonómica de la clase *Deltaproteobacteria* a nivel de género (o máximo nivel taxonómico alcanzado), presente en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA.

Por otra parte, si consideramos los géneros pertenecientes al phylum *Firmicutes*, también fue posible identificar diferencias en los grupos dominantes de los distintos materiales,

mientras que las diferencias con respecto a la etapa del cultivo no fueron tan claras como para las deltaproteobacterias (Figura 2.19).

Se encontró que la mayor parte de las secuencias presentes en suelo afiliadas a este phylum pertenecieron al género formador de endosporas *Bacillus* (entre el 30% y 53% de los *Firmicutes*), el cual está compuesto por bacterias aerobias, estrictas o facultativas. A este género le siguió en proporción un grupo de otros *Bacillales* no clasificados (entre 16% y 29%). A nivel de la rizósfera, este grupo de *Bacillales* no clasificados disminuyó su abundancia promedio (9%), pero igualmente se mantuvo entre los principales grupos en varias rizósferas (Figura 2.19).



**Figura 2.19:** Composición taxonómica del phylum *Firmicutes* a nivel de género (o máximo nivel taxonómico alcanzado), presente en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA.

Dentro del phylum *Firmicutes*, el género *Clostridium* dominó ampliamente la endósfera de todas las raíces (entre 18% y 65% de los *Firmicutes*) y también algunas rizósferas. Sin embargo, en las rizósferas, tanto este género como la familia *Veillonellaceae* se encontraron en proporciones muy variables (4% a 44% para *Clostridium*, 5% a 17% para *Veillonellaceae* no clasificada). Otros *Clostridiales* también fueron encontrados en abundancias relativas importantes en las muestras de rizósferas, entre ellos, los géneros *Caloramator* (4%) y *Anaerovorax* (2%), secuencias de las familias *Ruminococcaceae* (6%), y *Lachnospiraceae* no clasificadas (2%) y el orden no descripto OPB54 (6%) (Figura 2.19).

En las raíces, luego del género *Clostridium*, le siguieron en abundancia varios taxones afiliados a la familia *Veillonellaceae*. *Sporomusa* fue el segundo género más abundante en raíces, con un promedio de abundancia relativa mayor en las raíces de la etapa seca (9% en la etapa seca, 3% en la etapa inundada). Además, el género *Propionispira* se encontró con una abundancia promedio del 4% en las raíces, y otras secuencias de la familia *Veillonellaceae* no clasificadas en un rango de abundancias variable similar al encontrado en rizósfera (entre 3% y 21%) (Figura 2.19).

#### 2.3.2.4. Taxones bacterianos asociados a los diferentes sistemas de rotación arroceras

Para abordar el estudio del impacto de distintas rotaciones arroceras sobre las comunidades microbianas asociadas a la planta de arroz, se realizó un análisis de especies indicadoras. Este análisis permitió detectar taxones preferencialmente asociadas a cada una de las rotaciones evaluadas tanto a nivel de la rizósfera como en el interior de las raíces. Se obtuvo un total de 86 OTUs fuertemente asociadas a las distintas rotaciones arroceras evaluadas ( $\text{IndVal} > 0.7$ ,  $\text{p-valor} < 0.05$ ), 70 de ellas en rizósfera y 16 en el interior de las raíces (Tabla 2.4). El índice  $\text{IndVal}$  para una determinada OTU se aproxima a 1 cuando esa OTU está presente en todas las muestras de una rotación y solamente está presente en muestras de esa rotación y no en las demás. Como puede observarse en las Figuras 2.20 a 2.24 la gran mayoría de estas OTUs presentaron abundancias relativas menores al 1%.

Material	N° OTUs indicadoras de cada rotación*		
	R1	R4	R5
Rizósfera	30	32	8
Raíz	14	0	2

**Tabla 2.4:** Número de OTUs indicadoras encontradas para las distintas rotaciones en rizósfera y raíz. \* $\text{IndVal} > 0.7$  y  $\text{p-valor} < 0.05$

**Especies (OTUs) rizosféricas indicadoras de las distintas rotaciones de cultivo.** La Figura 2.20 muestra la clasificación taxonómica y la abundancia relativa de las 30 OTUs que fueron encontradas en rizósfera fuertemente asociadas a la rotación de arroz intensiva (R1). La amplia mayoría de ellas fueron proteobacterias, aunque también se encontraron algunas OTUs afiliadas a los phyla *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* y *Bacteroidetes*. Una alta proporción de las proteobacterias fueron clasificadas dentro de la clase *Deltaproteobacteria*, incluyendo varias OTUs del orden *Myxococcales*, una OTU de

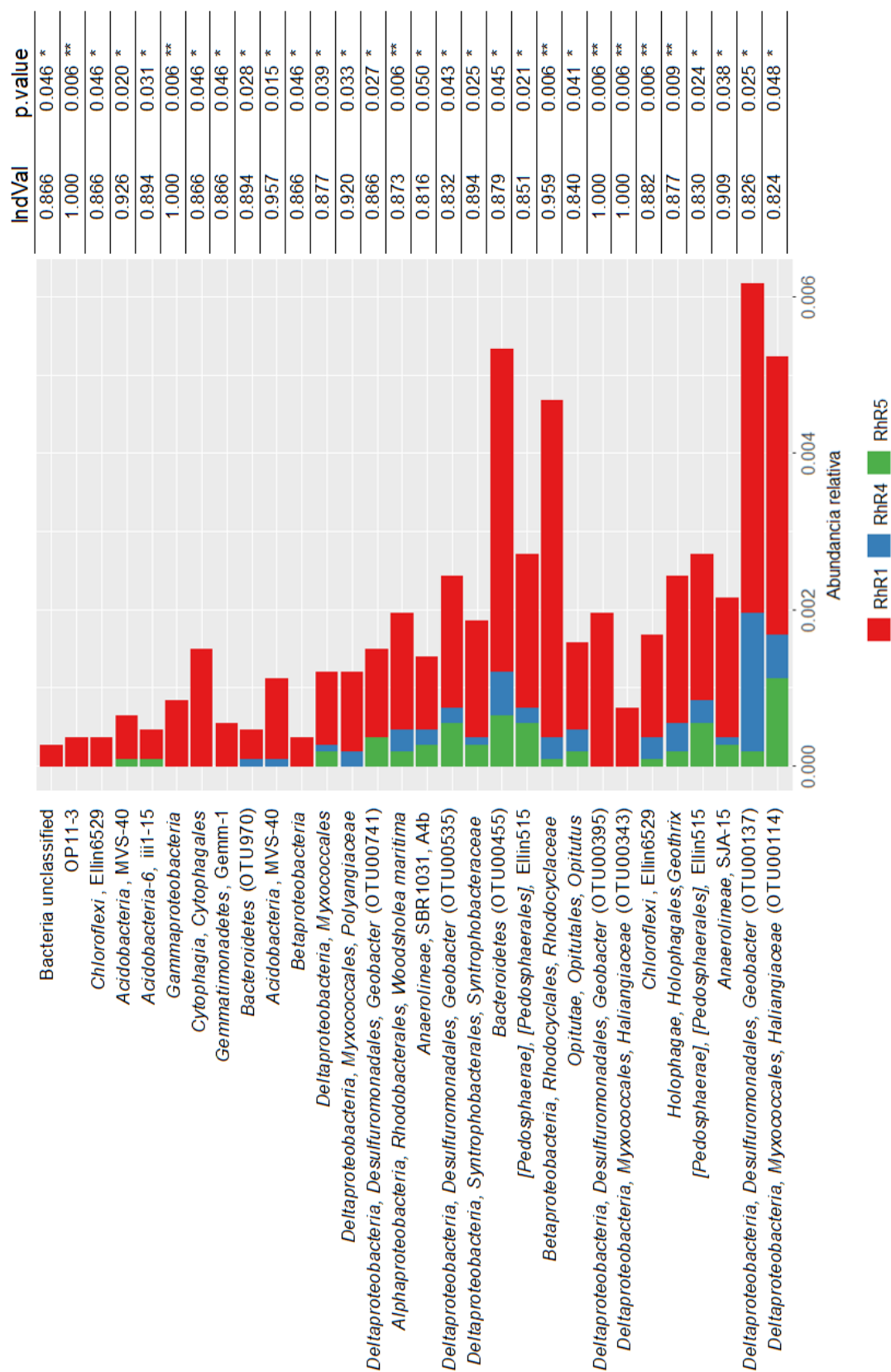
la familia *Syntrophobacteraceae* y tres del género *Geobacter* (*Desulfuromonadales*). Nueve OTUs se encontraron exclusivamente en la rotación R1, todas ellas en abundancias relativas menores al 0.2%. Del resto, se destacan cuatro OTUs por presentar las mayores abundancias relativas en el total de las rizósferas (0.4-0.6%) y la mayor abundancia en la rizósfera de la rotación intensiva (RhR1, 0.3-0.4%), clasificadas como: *Geobacter*, *Haliangiaceae* (orden *Myxococcales*), *Rhodocyclaceae* (*Betaproteobacteria*) y una OTU relacionada al phylum *Bacteroidetes*.

También se detectaron varias OTUs asociadas a la rotación tradicional de arroz-pasturas (R4), 32 OTUs en total (Figura 2.21). Las más abundantes pertenecen al phylum *Acidobacteria*, algunas clasificadas como *Candidatus Solibacter* (no cultivada) y otras en el orden *Acidobacteriales*; cuatro de estas OTUs alcanzaron abundancias relativas mayores al 1% para el total de las rizósferas.

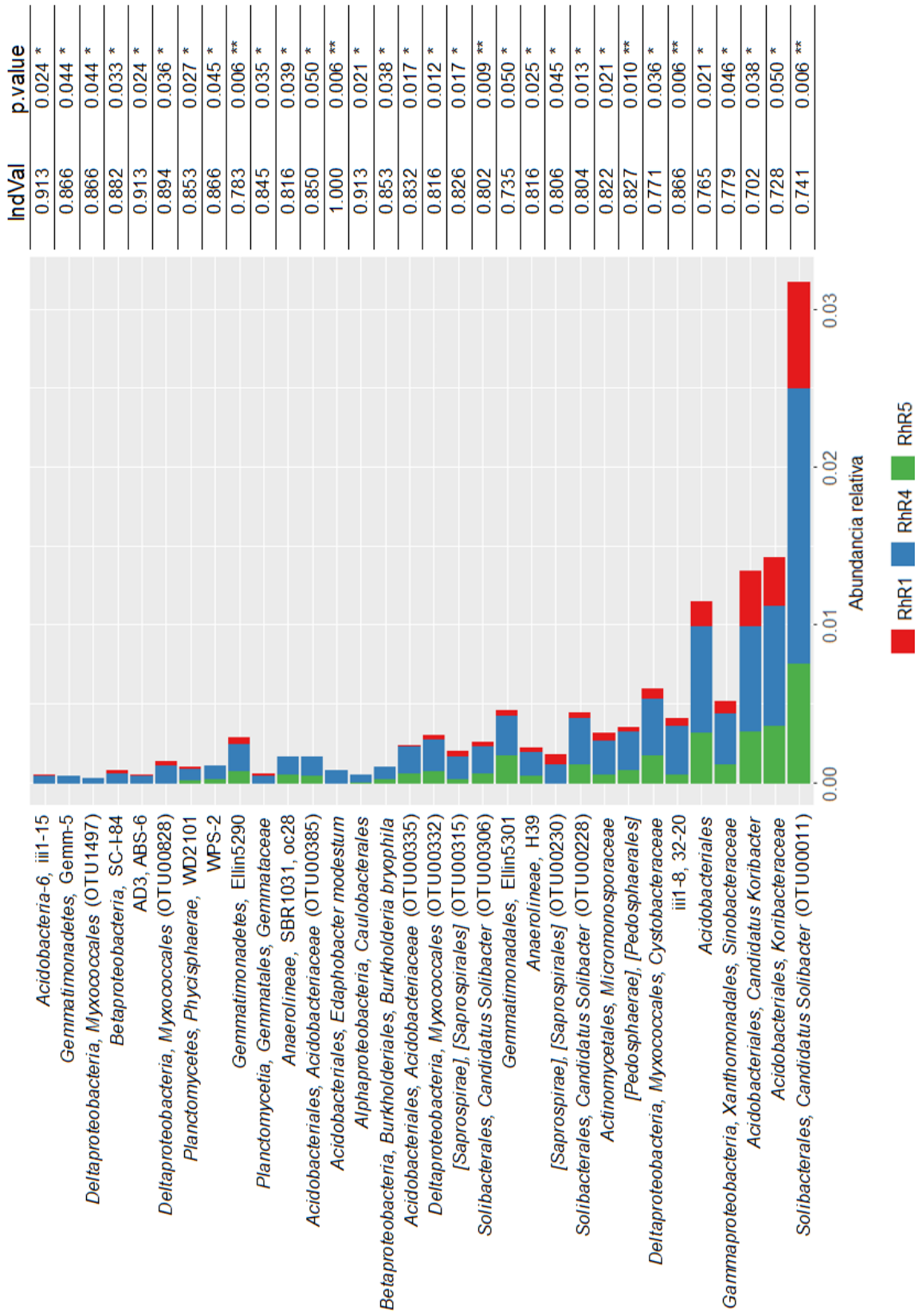
Se detectaron sólo unas pocas OTUs indicadoras de la rotación arroz-soja (R5) en muy baja proporción en R5, menor al 0.2% (Figura 2.22). Ninguna de ellas fue exclusiva de esta rotación.

**Especies (OTUs) endófitas indicadoras de las distintas rotaciones de cultivo.** El análisis identificó 14 OTUs en la comunidad endófitas de raíz como indicadoras de la rotación intensiva (R1) (Figura 2.23). Estas OTUs fueron clasificadas en diversos grupos taxonómicos, entre ellos, *Myxococcales* (*Deltaproteobacteria*), *Planctomycetes*, y los ordenes de alfaproteobacterias *Rhizobiales* y *Rhodospirillales*. Tres OTUs afiliadas a los géneros *Dongia*, *Devosia* y *Anaeromyxobacter*, presentaron las mayores abundancias relativas (0.25%, 0.34% y 0.60%, respectivamente).

En las raíces, también se detectaron 2 OTUs asociadas a la rotación de arroz-soja (R5) (Figura 2.24). Una de estas OTUs fue clasificada dentro de la familia *Oxalobacteraceae* (orden *Burkholderiales*) y presentó una abundancia relativa en raíces del 2%, mientras que la otra se encontró con una abundancia promedio del 0.2% y se afilió a la familia *Ruminococcaceae* (orden *Clostridiales*).

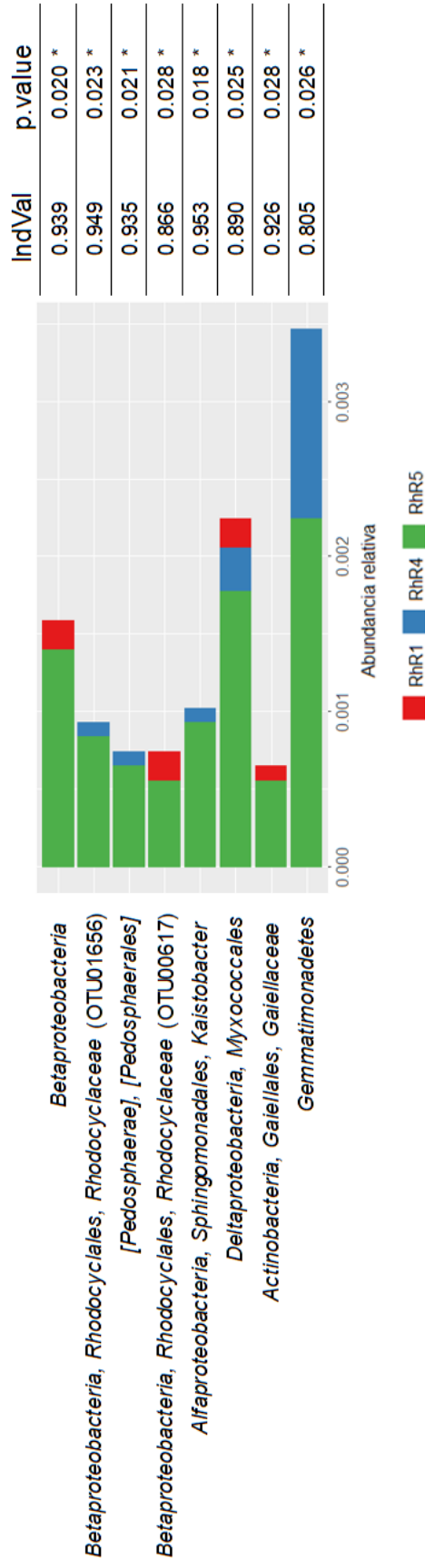


**Figura 2-20:** Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R1 (arroz intensivo) en rizósfera. Se muestran las OTUs con IndVal > 0.7. \*p-valor < 0.05, \*\*p-valor < 0.01.

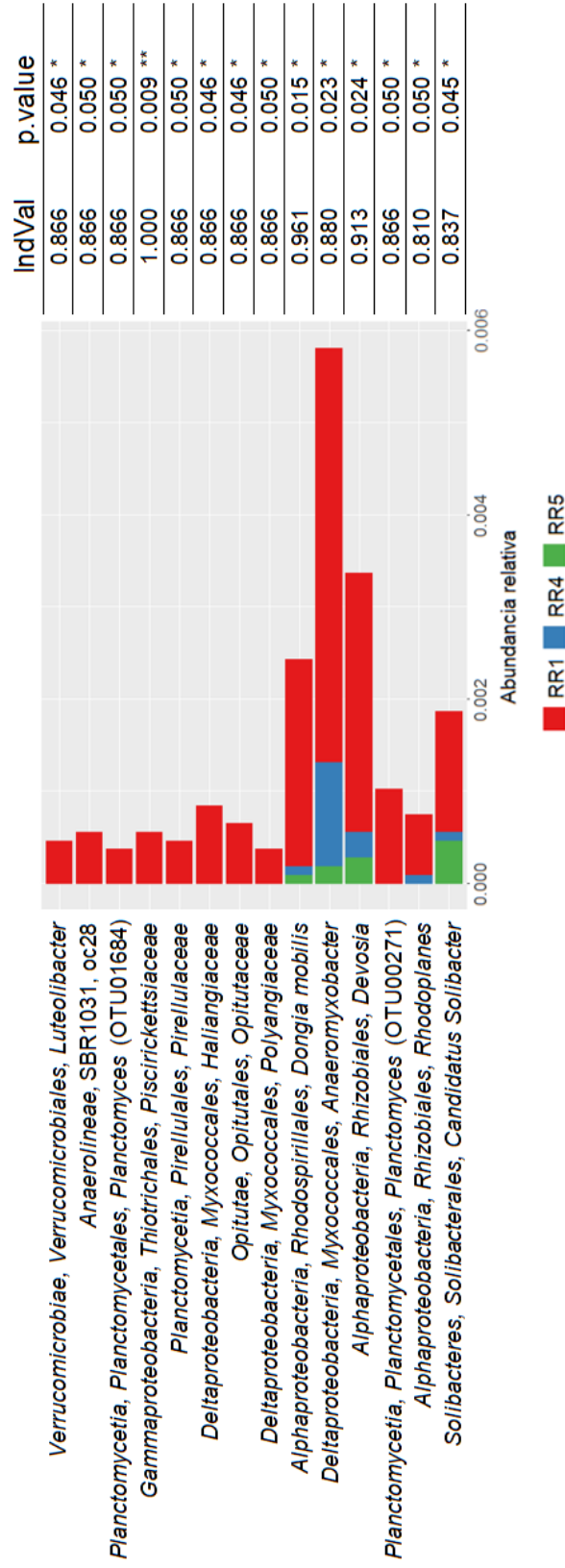


**Figura 2.21:** Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R4 (arroz-pasturas) en rizósfera. Se muestran las OTUs con IndVal > 0.7. \*p-valor < 0.05, \*\*p-valor < 0.01.

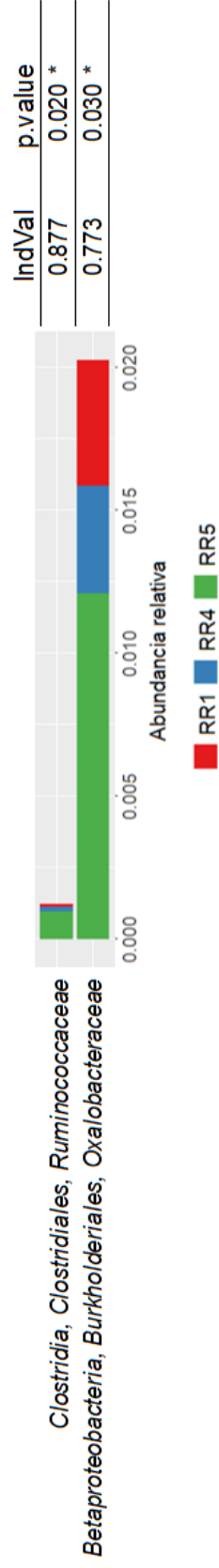




**Figura 2.22:** Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R5 (arroz-soja) en rizósfera. Se muestran las OTUs con IndVal > 0.7. \*p-valor < 0.05, \*\*p-valor < 0.01.



**Figura 2.23:** Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R1 (arroz intensivo) en raíz. Se muestran las OTUs con IndVal > 0.7. \*p-valor < 0.05, \*\*p-valor < 0.01.



**Figura 2.24:** Clasificación taxonómica y abundancia relativa de las OTUs encontradas como indicadoras de la rotación R5 (arroz-soja) en raíz. Se muestran las OTUs con IndVal > 0.7. \*p-valor < 0.05, \*\*p-valor < 0.01.

## 2.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este capítulo se estudió la estructura y la dinámica de las comunidades microbianas presentes en suelo y asociadas a raíces de arroz cultivado bajo diferentes sistemas de rotación. Para esto, se realizó una caracterización en profundidad del microbioma mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA y se utilizaron diferentes herramientas de análisis con el objetivo de visualizar los principales cambios en su estructura a través de los distintos compartimientos asociados a la planta y en distintas etapas del ciclo de cultivo. A partir de estos resultados, se buscaron taxones bacterianos tanto rizosféricos como endófitos que se encuentran fuertemente asociados a las distintas alternativas de intensificación y a la tradicional rotación de arroz-pasturas.

El modelo experimental utilizado en este trabajo presenta fortalezas que vale la pena destacar. El ensayo a campo de largo plazo instalado en la principal región arrocerera de Uruguay permite estudiar la dinámica temporal y espacial de las comunidades microbianas asociadas a la planta de arroz bajo las condiciones naturales en las que se lleva a cabo el cultivo (estructura del suelo, rastrojos, radiación UV, condiciones climáticas, etc.). Además, el ensayo cuenta con diferentes sistemas de rotación de cultivos con todas las fases agronómicas presentes simultáneamente, con verdaderas réplicas biológicas (bloques) y con parcelas de importantes dimensiones que posibilitan la toma de muestras representativas de los distintos tratamientos. Estas características refuerzan las comparaciones estadísticas realizadas y los resultados obtenidos.

**Las comunidades microbianas asociadas al cultivo de arroz se vieron fuertemente afectada por el nicho que habitan y por la inundación del cultivo.**

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los principales factores que dirigen la estructura de las comunidades microbianas asociadas al cultivo de arroz fueron el ambiente generado en cada compartimiento (suelo, rizósfera y endósfera) y la etapa del ciclo óxico-anóxico producido por el efecto de la inundación. De acuerdo al NMDS y al PERMANOVA (Figura 2.6), las comunidades establecidas en los distintos compartimientos fueron significativamente diferentes, aunque las de rizósfera y suelo fueron más similares entre sí que con respecto a las comunidades endófitas de raíz. Las etapas del cultivo, seca e inundada, resultaron un factor determinante en la estructura de todas las comunidades estudiadas, pero el efecto de este factor fue mayor sobre las comunidades endófitas.

Las rizósferas presentaron la comunidad con el mayor número de OTUs, seguidas por los suelos y por último las raíces (Figura 2.4). Asimismo, todos los índices de diversidad calculados mostraron que la comunidad rizosférica resultó significativamente más diversa que la de suelo y endósfera de raíces. Estos resultados de  $\alpha$  y  $\beta$  diversidad son consisten-

tes con los diagramas de Venn (Figura 2.8), donde se observa que una gran proporción de las OTUs detectadas en rizósfera y en el interior de las raíces fueron encontradas exclusivamente en esos compartimientos (35 % y 26 %, respectivamente), reafirmando las particularidades de estos nichos ecológicos.

Estos resultados son consistentes con lo encontrado en estudios anteriores respecto a la importante presión de selección que ejerce tanto el hábitat generado en los distintos nichos como la inundación del cultivo sobre la estructura del microbioma de suelo de arroz y asociado a la planta (Breidenbach, Pump et al. 2016; J. Edwards et al. 2015; J. A. Edwards et al. 2018; Ferrando y Fernández Scavino, 2015). Algunos de estos estudios también han identificado, al igual que en el presente trabajo, un marcado aumento de la diversidad microbiana desde el suelo hacia la rizósfera, y luego un descenso gradual de la diversidad hacia la endósfera (Breidenbach, Pump et al. 2016; J. Edwards et al. 2015).

Esta transición en la estructura de las comunidades bacterianas desde el suelo hasta la rizósfera y luego hasta el interior de las raíces se observó claramente en los perfiles de composición taxonómica, tanto para la totalidad de las OTUs obtenidas a nivel de phylum (Figura 2.9) como para los géneros más abundantes (Figura 2.17). Además, observando estos perfiles taxonómicos también fue posible identificar diferencias entre las comunidades establecidas en las distintas etapas del cultivo (seca e inundada).

En los suelos, los phyla *Acidobacteria*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* representaron en conjunto cerca del 60 % del total de la comunidad bacteriana. En comparación con los suelos, las rizósferas se vieron enriquecidas en bacterias de los phyla *Proteobacteria* (37 %), principalmente *Beta* y *Deltaproteobacteria*, y *Bacteroidetes* (9 % en rizósfera, 1 % en suelo). El microbioma endófito de raíces, por su parte, se vio ampliamente dominado por proteobacterias (66 %), mayormente *Gammaproteobacteria* de los ordenes *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales*, pero también *Beta* y *Alphaproteobacteria*, y en menor proporción *Firmicutes* (15 %) y *Bacteroidetes* (6 %) (Figura 2.9).

Aunque no se identificaron cambios significativos en la diversidad de las comunidades asociadas a la planta con respecto a la etapa del cultivo según los índices calculados, cuando analizamos la composición taxonómica de estas comunidades fueron encontrados varios grupos taxonómicos cuya presencia o abundancia relativa cambiaron fuertemente luego de la inundación y estabilización de las condiciones anóxicas en el sistema. Dentro de estos grupos fueron encontrados microorganismos capaces de llevar a cabo una amplia variedad de procesos metabólicos tanto aerobios como anaerobios.

Los géneros *Geobacter* y *Anaeromyxobacter*, considerados importantes reductores de hierro en suelos de arroz (Hori et al. 2010), fueron encontrados entre los géneros dominantes en rizósfera (Figura 2.17), pero sus abundancias relativas se invirtieron con la inundación (Figura 2.18). *Geobacter* presentó abundancias relativas más altas en las rizósferas

de la etapa seca (37% de las deltaproteobacterias) mientras que *Anaeromyxobacter* dominó ampliamente las rizósferas de la etapa inundada (37% de las deltaproteobacterias). Además, ambos géneros fueron capaces de colonizar la endósfera de las raíces, particularmente *Anaeromyxobacter* durante la etapa inundada del cultivo.

Breidenbach, Pump et al. 2016 obtuvieron resultados similares con respecto al incremento en la abundancia de estos microorganismos a nivel de la rizósfera de arroz en comparación con el suelo. El género *Geobacter* comprende bacterias anaerobias no fermentadoras cuya principal característica es su capacidad de utilizar  $\text{Fe}^{3+}$  pero que también son capaces de llevar a cabo otras funciones importantes en el sistema como la fijación biológica de nitrógeno. En suelos de arroz uruguayo, este género fue encontrado entre los dominantes dentro de las comunidades fijadoras de nitrógeno luego de la inundación (Paolino, 2006). Por su parte, el género *Anaeromyxobacter* que comprende mixobacterias anaerobias o microaerofílicas, algunas de las cuales han sido aisladas a partir de suelos de arroz (Treude et al. 2003), fue encontrado en el presente trabajo con una mayor proporción a nivel de la rizósfera durante la etapa inundada del cultivo. Por el contrario, este género ha sido reportado en trabajos previos entre los grupos enriquecidos en la endósfera de plantas de arroz en comparación con otros compartimientos rizosféricos (J. Edwards et al. 2015).

Aunque tanto los reportes previos como los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *Anaeromyxobacter* y *Geobacter* presentan una gran relevancia en el ecosistema arrocero y muestran que sus abundancias varían considerablemente a través de los distintos nichos asociados a la planta, poco se conoce aún sobre cómo se ven afectados estos microorganismos frente distintos manejos de la inundación. Zecchin et al. 2017 encontraron que *Anaeromyxobacter* y *Geobacter* fueron las deltaproteobacterias más abundantes en rizósfera y rizoplano, respectivamente, ambos favorecidos por un régimen de inundación continua. En el reciente estudio de H. L. Li et al. 2019, la inundación continua del cultivo resultó en mayores abundancias de ambos géneros en las comunidades rizosféricas con respecto a un régimen de inundación intermitente. El particular manejo del cultivo utilizado en nuestro país en el cual el arroz es mantenido en condiciones de secano hasta 30-40 días después de la emergencia, parece tener un efecto diferente sobre estas poblaciones, particularmente sobre las bacterias del género *Geobacter*. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, la alta proporción de *Geobacter* encontrada a nivel de la rizósfera, particularmente en la primera etapa del cultivo antes de establecerse la inundación, sugiere que estos microorganismos podrían colonizar tempranamente nichos anaerobios asociados a las raíces, por lo tanto, su actividad podría resultar importante durante las primeras etapas de degradación anaerobia de la materia orgánica, previa a la producción de  $\text{CH}_4$ .

Además del género *Anaeromyxobacter*, fermentadores estrictos de la clase *Anaerolineae* (phylum *Chloroflexi*) también aumentaron su abundancia en rizósfera luego de la inundación, lo cual se alinea con lo sugerido recientemente por Liechty et al. 2020 con respecto a la potencial relación sintrófica entre bacterias de esta clase y arqueas metanogénicas presentes en el microbioma asociado a plantas de arroz.

Observando la abundancia de los grupos taxonómicos dominantes y su dinámica a través de los distintos compartimientos asociados a la planta, fue posible identificar varios taxones presentes en rizósfera que fueron capaces de colonizar la endósfera de las raíces. Resulta interesante notar que entre los taxones dominantes en las raíces encontramos algunos grupos que también dominaron las comunidades rizosféricas (por ejemplo, *Dechloromonas*, *Anaeromyxobacter*, y la familia *Rhodocyclaceae*) pero otros presentaron abundancias muy bajas tanto en suelo como en rizósfera (por ejemplo, *Burkholderia* y *Clostridium*) (Figura 2.17). Estos resultados sugieren que podrían existir distintas poblaciones microbianas con diferentes capacidades para colonizar el interior de las raíces, presentando algunas de ellas ciertas ventajas competitivas frente a las poblaciones rizosféricas.

Similar a lo observado en otros estudios, encontramos que la endósfera se vio enriquecida en proteobacterias en relación a los suelos y rizósferas, mayormente *Beta*, *Alpha* y *Gammaproteobacteria* (J. Edwards et al. 2015; Sessitsch et al. 2012), mientras que disminuyó la abundancia relativa de los phyla *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* (J. Edwards et al. 2015). Además de los cambios observados en las abundancias de estos phyla, en este trabajo se encontró un notable aumento en la proporción de *Firmicutes* en el interior de las raíces, triplicando su abundancia relativa con respecto a suelos y rizósferas (4% en suelos y raíces, 15% en raíces) (Figura 2.9).

Aunque los *Firmicutes* no se encontraron dentro de los grupos dominantes en rizósfera ni aumentaron su abundancia en comparación con el suelo, su composición a este nivel cambió drásticamente (Figura 2.14). Las poblaciones de *Firmicutes* de suelo se encontraron dominadas por bacterias del orden *Bacillales*, en su gran mayoría bacterias aerobias estrictas o facultativas del género *Bacillus*, similar a lo descrito previamente por Fernández Scavino et al. 2013 en suelo de arroz de la zona este de Uruguay. Mientras tanto, la composición de estas poblaciones a nivel de la rizósfera y la endósfera de las raíces fue restringida a microorganismos del orden *Clostridiales*, conocidos fermentadores de material vegetal en suelos de arroz inundados (Rui et al. 2009).

Diferencias en las poblaciones de *Clostridiales* entre suelo y rizósfera de arroz han sido reportadas previamente, observándose un enriquecimiento de *Clostridiales* en distintos compartimientos rizosféricos con respecto al suelo y diferencias en la estructura de estas

poblaciones a lo largo de las distintas etapas fisiológicas de la planta (Breidenbach, Pump et al. 2016; J. Edwards et al. 2015). Varios estudios han demostrado que estas bacterias se encuentran entre las primeras en proliferar luego de la inundación del cultivo (Noll et al. 2005; Rui et al. 2009). Nuestros resultados mostraron que los *Clostridiales*, en particular el género *Clostridium*, dominaron ampliamente las poblaciones de *Firmicutes* endófitos tanto en la etapa seca del cultivo como en la etapa de inundación (Figura 2.19), contrariamente a lo reportado para otros cultivos donde los *Firmicutes* endófitos son dominados por bacterias del género *Bacillus* (Hallmann et al. 1997; Hardoim et al. 2008).

Se sabe que todas las especies del género *Clostridium* (afiliadas a *Clostridium sensu stricto*, anteriormente llamado Grupo I; Collins et al. 1994), son anaerobios estrictos fermentadores y formadores de esporas, capaces de utilizar una amplia variedad de poli y monosacáridos a través de diferentes vías metabólicas y sus productos de fermentación incluyen butirato como principal producto, pero también otros ácidos y alcoholes (Wiegel, 2009), por lo tanto, son capaces de colonizar una gran diversidad de ambientes anóxicos. Podemos suponer, además, que la capacidad de estas bacterias de formar esporas favorezca su adaptación y proliferación bajo las condiciones de estrés impuestas sobre este sistema agronómico por los sucesivos ciclos de secano-inundación.

Además del género *Clostridium*, diversos *Clostridiales* fueron capaces de colonizar y proliferar tanto a nivel de la rizósfera como en el interior de las raíces de arroz, incluso en la etapa seca del cultivo (Figura 2.19). Una alta abundancia de secuencias afiliadas a la familia *Veillonellaceae* fueron encontradas en la endósfera de las raíces, por ejemplo, acetogénicos del género *Sporomusa* y productores de propionato del género *Propionispira*, recientemente re-clasificados en las familias *Sporomusaeae* y *Selenomonadaceae* respectivamente (Campbell et al. 2015). Además de la familia *Veillonellaceae*, otros *Clostridiales* también fueron encontrados en rizósfera, entre ellos, anaerobios termófilos del género *Caloramator* (que incluye especies capaces de reducir hierro y azufre) y fermentadores estrictos del género *Anaerovorax* y de las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*.

Las poblaciones de *Bacteroidetes* rizosféricas y endófitas mostraron diferencias importantes en su composición en ambas etapas del cultivo, particularmente en el interior de las raíces (Figura 2.16). Los ordenes *Sphingobacteriales* y *Cytophagales*, que comprenden aerobios estrictos y facultativos, fueron encontrados mayormente en la etapa seca, en tanto el orden *Bacteroidales*, que comprende mayormente fermentadores anaerobios obligados, junto con otros *Bacteroidetes* no clasificados, dominaron ampliamente en la etapa inundada. Diferencias en las poblaciones de *Bacteroidetes* similares a las observadas en este trabajo fueron reportadas en el estudio de H. L. Li et al. 2019 mencionado anteriormente, encontrando a nivel de la rizósfera un aumento significativo en la abundancia de *Sphingobacteriales* bajo el régimen de inundación intermitente, y un aumento en los



*Bacteroidales* bajo inundación continua. Nuestros resultados muestran que no solamente las poblaciones rizosféricas de *Bacteroidetes* son sensibles a la inundación, sino también aquellas establecidas como endófitas en las raíces.

Otros grupos taxonómicos encontrados en el interior de las raíces también presentaron marcadas diferencias en las distintas etapas del cultivo. Cuando observamos la dinámica de los grupos dominantes en las comunidades endófitas a lo largo del ciclo (Figura 2.17) identificamos una mayor abundancia de varias betaproteobacterias (*Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, y familias *Comamonadaceae* y *Oxalobacteraceae*) en las raíces de la etapa seca, mientras que en las raíces de plantas inundadas se observó un aumento de alfaproteobacterias del orden *Rhizobiales* y de algunos *Firmicutes* (*Clostridium* y *Bacillales*). Asimismo, bacterias relacionadas a la degradación de celulosa del phylum *Spirochaetes* (Ransom-Jones et al. 2012), conocidas colonizadoras de la endósfera de las raíces de arroz (J. Edwards et al. 2015; Ferrando y Fernández Scavino, 2015), fueron encontradas en proporciones significativas únicamente en el interior de las raíces inundadas.

El incremento o la disminución en la abundancia de ciertos grupos microbianos a través de los distintos compartimientos y en distintas etapas del cultivo evidencian que la colonización de las raíces es un proceso activo y dinámico, en el cual existen diferentes etapas selectivas de reclutamiento en distintos espacios asociados a la planta. Aunque se sabe que este proceso de selección responde a diferentes señales que dependen directamente de factores relacionados a la planta, por ejemplo, el cultivar y el estadio fisiológico (J. Edwards et al. 2015; J. A. Edwards et al. 2018; Sessitsch et al. 2012), nuestros resultados muestran que la inundación del cultivo significa un fuerte impacto en las comunidades microbianas presentes en suelo y asociadas a la planta, no sólo a nivel de la rizósfera sino también en las comunidades que colonizan los tejidos internos de las raíces. Estos resultados refuerzan los obtenidos previamente por nuestro grupo con respecto al impacto de la inundación tanto sobre la comunidad diazótropa de suelo (Paolino, 2006) como sobre la comunidad diazótropa endófitas de raíces (Ferrando y Fernández Scavino, 2015), por lo tanto, es un factor que debe ser tenido en cuenta cuando se estudia el microbioma asociado al cultivo de arroz bajo estas condiciones de manejo.

### **El microbioma asociado a plantas de arroz podría ser susceptible a cambios en la intensificación del sistema de producción.**

En este trabajo se estudió el microbioma de suelo, rizósfera y raíces de plantas de arroz provenientes de un ensayo a campo de largo plazo que consta de diferentes sistemas de rotaciones arroceras y busca comparar en términos de productividad e impacto ambiental la rotación arroceras tradicional (2 años de arroz – 3 años de pasturas) con diferentes sistemas de rotación más intensivos. Se estudiaron las comunidades microbianas asociadas al cultivo de arroz cultivado bajo rotaciones con diferente grado de intensificación en el uso

del suelo. Como fue descrito en *Materiales y Métodos*, las rotaciones estudiadas fueron seleccionadas de forma de comparar la rotación tradicional arroz-pasturas (R4) con dos rotaciones contrastantes, una de arroz en rotación con soja (R5) y una de arroz continuo (R1).

El ensayo utilizado en este trabajo fue establecido en el año 2012 en un campo con una historia previa de 20 años de rotación tradicional arroz-pastura, por lo que los sistemas de rotación evaluados, en particular la rotación arroz-soja que implica un ciclo de rotación mayor a 4 años y difiere del manejo previo del campo, aún estaban en etapa de estabilización al momento del muestreo (zafra 2015-2016). No obstante, podemos señalar que en la zafra estudiada las muestras de la rotación más intensiva de arroz-continuo (R1) tuvieron cultivo de arroz en las tres zafras anteriores, aquellas tomadas en la rotación tradicional (R4) provienen de 3 años consecutivos de pasturas y las muestras de la rotación arroz-soja (R5) provienen de dos veranos de cultivo de soja con un primer año de arroz.

Cuando se evaluó el efecto de las rotaciones sobre la globalidad de los datos, es decir, sobre la composición de las comunidades bacterianas establecidas en suelo, rizósfera y raíces de arroz, no se observaron diferencias significativas con respecto a este factor, observándose que las comunidades se agrupan principalmente por la etapa del ciclo y condición de irrigación del cultivo (Figura 2.6). Sin embargo, si comparamos únicamente las comunidades de suelo y rizósfera el efecto de las rotaciones sí resultó significativo (Figura 2.7), observándose que las comunidades de rizósfera de la rotación más intensiva fue claramente diferente a la establecida en el resto de las rizósferas y suelos. Esto sugiere que las comunidades bacterianas de suelo y rizósfera podrían ser susceptibles a los cambios en los sistemas de rotación, mientras que las comunidades endófitas de raíz serían más estables y se verían menos afectadas por estos cambios. Asimismo, nuestros resultados muestran que tanto el ambiente particular establecido en cada compartimiento (suelo, rizósfera y endósfera) como el fuerte impacto ejercido por la inundación del cultivo pueden opacar la visualización del efecto de estas prácticas agrícolas sobre las comunidades estudiadas.

Aunque este efecto no fue observado ni en los perfiles taxonómicos a nivel de phylum ni a niveles inferiores dentro de algunos grupos taxonómicos, fue posible identificar una dinámica particular en el microbioma rizosférico de la rotación más intensiva (R1) a lo largo del ciclo del cultivo, diferente a la observada en las otras rotaciones. Según lo observado en el análisis NMDS (Figura 2.6), la comunidad presente en la rizósfera de la rotación arroz-continuo (R1) en la etapa seca del cultivo presentó una estructura similar a la establecida en todas las rizósferas en la etapa inundada. Observando la dinámica de los grupos taxonómicos más abundantes en el heatmap (Figura 2.17) identificamos algunos grupos anaerobios dominantes de estas comunidades, como *Anaeromyxobacter*, miembros

de la clase *Anaerolineae* y *Bacteroidetes* no clasificados.

Breidenbach, Blaser et al. 2016 estudiaron las comunidades rizosféricas de arroz, y en particular, cómo éstas se ven afectadas por el uso de la rotación arroz-maíz en comparación con el cultivo de arroz durante ambas estaciones. Entre los pocos grupos bacterianos impactados se observó un enriquecimiento de *Anaeromyxobacter* en la rotación arroz-maíz, mientras que varias deltaproteobacterias fueron encontradas en mayores abundancias en el cultivo de arroz sin rotación. El incremento de *Anaeromyxobacter* en la rotación más intensiva (R1) encontrado en el presente trabajo, podría ser consistente con lo reportado por Breidenbach, Blaser et al. 2016, ya que tanto la rotación arroz-maíz de ese estudio como la rotación arroz-continuo del presente trabajo implican varios años consecutivos de cultivo de arroz bajo inundación durante el verano, posterior drenaje y cultivo de secano durante el invierno, es decir, ciclos anuales de inundación y drenaje. Estos ciclos óxicos-anóxicos podrían sostener una continua regeneración de hierro férrico, favoreciendo la colonización temprana de la rizósfera por reductores de hierro como *Anaeromyxobacter*.

Dado que no se encontraron cambios sustanciales en la composición de las comunidades bacterianas asociadas a las distintas rotaciones a niveles taxonómicos altos (phylum o clase), se realizó un análisis de especies indicadoras (paquete *IndicSpecies*, ambiente R) con el objetivo de identificar taxones a niveles inferiores que pudieran estar asociados fuertemente a los distintos sistemas de rotación estudiados. Considerando la importancia de contar con herramientas que permitan evaluar los efectos del uso de distintas prácticas agrícolas, el análisis de especies indicadoras ha sido utilizado en varios estudios previos para estudiar los cambios en las comunidades microbianas del suelo, por ejemplo, bajo diferentes grados de laboreo del suelo (Figuerola et al. 2012), distintos rastrojos y tipos de fertilización (Jiménez-Bueno et al. 2016).

En el presente trabajo, el análisis de especies indicadoras resultó de utilidad para evaluar el efecto causado por las distintas rotaciones sobre las comunidades microbianas asociado al cultivo de arroz. La búsqueda de taxones indicadores se enfocó en las comunidades que se asocian más fuertemente a la planta, rizosféricas y endófitas, dado que estas bacterias presentan gran relevancia no solamente en el ciclado de nutrientes sino también contribuyendo a través de distintos mecanismos al crecimiento y salud de la planta.

El uso de esta herramienta permitió identificar varias OTUs que se asociaron fuertemente con alguna de las rotaciones arroceras evaluadas, independientemente de la etapa del cultivo. Varias OTUs afiliadas a taxones anaerobios de la clase *Deltaproteobacteria*, incluyendo *Geobacter*, *Syntrophobacteraceae* y *Myxococcales*, se asociaron fuertemente a la rizósfera de la rotación más intensiva (R1), mientras que las OTUs indicadoras de la rotación tradicional arroz-pasturas (R4) fueron principalmente del phylum *Acidobacteria*. Estos resultados refuerzan la asociación de las deltaproteobacterias al cultivo intensivo de

arroz reportada por otros autores, mencionada previamente.

La endósfera de las raíces presentó un número de OTUs indicadoras muy por debajo del número encontrado en rizósfera, lo cual podría sugerir que las comunidades endófitas serían más estables frente a los cambios en los sistemas de rotación en comparación con aquellas establecidas en la rizósfera. Sin embargo, esto puede deberse también a otras causas, entre ellas, la mayor dispersión encontrada en la estructura de estas comunidades (Figura 2.6), la menor cobertura alcanzada o la menor diversidad observada en estas muestras. No obstante, también en las comunidades endófitas varias especies fueron identificadas como potenciales indicadores de la rotación de arroz continuo, principalmente *Anaeromyxobacter* y algunas alfaproteobacterias.

Por su parte, aunque en la rotación de arroz-soja sólo se identificaron unas pocas especies indicadoras, resulta interesante destacar una OTU afiliada a la familia *Oxalobacteraceae* fuertemente asociada a la endósfera de las raíces en esta rotación, alcanzando una abundancia relativa cercana al 1%. Dentro de esta familia, distintas especies del género *Herbaspirillum* se caracterizan por encontrarse asociadas con una gran variedad de plantas y presentar la capacidad para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, estableciéndose en muchos casos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Elbeltagy et al. 2001; Monteiro et al. 2012; Olivares et al. 1996). Se conocen especies de este género capaces de colonizar los tejidos internos de la planta de arroz, pero también son capaces de asociarse a otras plantas como las leguminosas, por ejemplo, la soja (Hardoim et al. 2015; Mano y Morisaki, 2008). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se obtuvieron aislamientos de bacterias diazótrofes endófitas del género *Herbaspirillum* a partir de plantas de arroz (Rariz et al. 2013) y se cuantificó este género en raíces mediante qPCR dirigida al gen 16S rRNA con primers específicos para este género, obteniéndose una abundancia de entre  $10^4$  y  $10^6$  copias del gen por gramo de raíz (Rariz, 2016). Una alta abundancia de la clase *Betaproteobacteria*, principalmente del género *Herbaspirillum*, fue encontrada en suelos de arroz históricamente cultivados bajo rotación arroz-leguminosas (Jiang et al. 2016). Considerando estos resultados de Jiang et al. 2016 y los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, podríamos suponer que el género *Herbaspirillum* podría ser parte de la fuerte asociación encontrada a nivel de la endósfera de las raíces entre la familia *Oxalobacteraceae* y la rotación arroz-soja.

Cabe señalar que la gran mayoría de las OTUs indicadoras obtenidas en este análisis presentaron abundancias relativas menores al 1%, lo cual refleja la necesidad de utilizar herramientas que permitan detectar integrantes minoritarios de las comunidades para abordar el efecto de este tipo de prácticas agrícolas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el uso de sistemas de rotación más intensivos que el tradicional sistema de producción arroz-pasturas, es decir, una mayor frecuencia

de arroz o la incorporación de otros cultivos en la rotación, podría afectar el microbioma asociado al cultivo, particularmente en taxones que no se encuentran entre los dominantes de las comunidades. Asimismo, el microbioma rizosférico sería más susceptible a los cambios en los sistemas de rotación mientras que el microbioma endófito se mantendría relativamente estable e independiente frente a estos cambios.

## Capítulo 3

# **DINÁMICA DE GRUPOS MICROBIANOS ANAEROBIOS DE RELEVANCIA AMBIENTAL ASOCIADOS AL CULTIVO DE ARROZ**

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La inundación del cultivo de arroz es una práctica habitual de manejo que se da durante el ciclo de cultivo. Esto genera una disminución del potencial redox en el suelo que impulsa una secuencia de activación de diferentes procesos microbianos, donde el oxígeno es sustituido por el nitrato, el hierro y luego el sulfato como aceptores de electrones, para finalmente ocurrir procesos fermentativos acoplados a la metanogénesis. Mientras el suelo se mantiene en condiciones anóxicas, a nivel de la rizósfera de la planta de arroz se crea un ambiente parcialmente óxico en donde conviven procesos anaerobios y aerobios como la oxidación de amonio, sulfuro, hierro y metano (Kögel-knabner et al. 2010; Liesack et al. 2000; Scheid et al. 2004). Esto es posible debido a que la liberación de oxígeno a nivel radicular ocurre principalmente en los extremos y donde emergen las raíces laterales (Armstrong, 1971). Esta liberación de oxígeno permite la oxidación de amonio a nitrato y de sulfuro a sulfato en la rizósfera, de forma que estos aceptores de electrones pueden estar disponible para las comunidades microbianas rizosféricas (pudiendo además difundir al interior de la raíz) y afectar su actividad (Scheid et al. 2004; Wind y Conrad, 1997). Por esta razón, los procesos de desnitrificación y reducción de sulfato presentan gran relevancia en este ecosistema.

Altas tasas de reducción de sulfato han sido reportadas en arrozales, incluso luego de varias semanas de ocurrida la inundación (Pester et al. 2012; Wind y Conrad, 1997). Según estos reportes, la re-oxidación de sulfuro a sulfato que ocurre en zonas de interfase óxicas-anóxicas podrían explicar estos valores. Dado que la reducción de sulfato es energéticamente más favorable que los procesos fermentativos y que la metanogénesis, si el sulfato está disponible, las bacterias reductoras de sulfato (BRS) pueden competir por lo mismos sustratos ( $H_2$  y acetato) con las arqueas metanogénicas y, por lo tanto, alterar o retrasar la producción de metano (Muyzer y Stams, 2008). El cultivo de arroz irrigado, debido a que se mantiene inundando gran parte del ciclo, es considerado un importante emisor de metano ( $CH_4$ ) y óxido nitroso ( $N_2O$ ), dos potentes gases de efecto invernadero (GEI) (Ciais et al. 2013; Conrad, 2009). Estudios realizados en nuestro país muestran que las emisiones de  $CH_4$  se incrementan gradualmente luego de la inundación, hasta alcanzar un pico a fines de la etapa reproductiva (Tarlera et al. 2016). Asimismo, varios estudios han demostrado que la adición de sulfato en arrozales puede reducir las emisiones de  $CH_4$  del sistema hasta un 70 %, con un mínimo impacto sobre la estructura de las comunidades microbianas de suelo y rizósfera, y sin efectos negativos sobre el crecimiento o rendimiento del cultivo (Van der Gon et al. 2001; Wassmann et al. 2000; Wörner et al. 2016).

Por otra parte, se estima que aproximadamente el 60 % del  $CH_4$  producido en los arrozales se debe a la descomposición de exudados radiculares o degradación de restos

vegetales (Watanabe et al. 1999). Sin embargo, las arqueas metanogénicas no son capaces de consumir compuestos complejos de carbono, sino que dependen de la actividad bacteriana, incluidas bacterias fermentadoras y acetogénicas, para producir sustratos precursores de la metanogénesis como el acetato,  $H_2$  y  $CO_2$ . En ausencia de sulfato, muchas BRS pueden fermentar diversos ácidos orgánicos y alcoholes produciendo estos sustratos, e incluso pueden depender de que las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas o acetotróficas conviertan estos productos en metano. Esta relación simbiótica, conocida como sintrofia, es un tipo de interacción microbiana muy extendida, especialmente en ambientes metanogénicos (Plugge et al. 2011). Por ejemplo, *Syntrophobacter* spp son conocidos degradadores sintróficos de propionato bajo condiciones metanogénicas en arrozales (Gan et al. 2012).

Varias especies de BRS han sido aisladas mediante cultivo o identificadas utilizando metodologías moleculares a partir de arrozales, pertenecientes a las familias *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Syntrophobacteraceae*, y *Peptococcaceae* (Knief et al. 2012; Scheid y Stubner, 2001; Scheid et al. 2004; Wind y Conrad, 1997; Wind et al. 1999). Asimismo, algunos trabajos han abordado el estudio de las comunidades de BRS en suelos de arroz y cómo estas se ven afectadas frente a algunos factores. Mediante secuenciación masiva de genes *dsrB*, Lu et al. 2018 encontraron que los taxones dominantes de las comunidades de BRS de suelo en un sistema de rotación canola-arroz irrigado fueron afiliados principalmente a linajes de DsrAB no cultivados. Estos autores reportaron además una disminución en la diversidad de estas comunidades con el pasaje desde condiciones de secano hacia el cultivo de arroz, y este cambio estuvo fuertemente relacionado a cambios en el pH, contenido de sulfato y contenido total de fósforo. Aunque la aplicación de diferentes combinaciones de fertilizantes químicos (nitrógeno, fósforo, y potasio) a largo plazo, no mostraron tener un efecto significativo sobre la estructura de las comunidades de BRS de suelos de arroz del sureste de China (X. Z. Liu et al. 2009), Wörner et al. 2016 encontraron que el sulfato de calcio estimula el crecimiento a nivel de la rizósfera de arroz de BRS filogenéticamente relacionadas con *Syntrophobacter*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbaceae* y *Desulfobacteraceae*. El riego del cultivo con drenaje ácido de una mina rico en sulfato y metales pesados también condujo al incremento en la abundancia de BRS en arrozales (H. Wang et al. 2016). Además, en suelos de arroz contaminados con metilmercurio se observó una fuerte correlación positiva entre la abundancia de BRS y el contenido de mercurio, materia orgánica, amonio y sulfato (Y. R. Liu et al. 2014). A pesar de estos estudios, aún existe una gran carencia de conocimiento con respecto a la estructura y dinámica de las comunidades de BRS asociadas al cultivo de arroz y su rol ecológico en el sistema, particularmente de aquellas poblaciones que establecen fuertes relaciones con la planta.



Por otra parte, la desnitrificación, es decir, el proceso microbiano de reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y luego a productos gaseosos ( $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ ), es el principal proceso responsable de la pérdida de nitrógeno a la atmósfera y una importante fuente de  $\text{N}_2\text{O}$  en suelos agrícolas (Butterbach-Bahl et al. 2013). Debido a que este proceso ocurre bajo condiciones preferentemente anóxicas, el suelo de arroz inundado puede presentar una fuerte actividad desnitrificante, estimulada por la aplicación de fertilizantes nitrogenados. M. Yoshida et al. 2009 han reportado que tanto la diversidad como la cantidad de bacterias desnitrificantes en un arrozal cambian a lo largo del cultivo en respuesta a las condiciones del suelo y a la inundación. Sin embargo, la planta de arroz también tiene gran influencia sobre la actividad desnitrificante. La interfase óxica-anóxica generada en la rizósfera puede ofrecer un hábitat favorable para los procesos acoplados de nitrificación-desnitrificación (Arth y Frenzel, 2000; Arth et al. 1998; X. Wei et al. 2019). Según Arth y Frenzel, 2000 la nitrificación ocurre en los primeros 2cm desde la superficie de la raíz, mientras que la desnitrificación ocurre entre 1.5-5cm. A su vez, varios estudios han demostrado que el carbono proveniente de los exudados radiculares en distintas especies de plantas influye en la desnitrificación porque suministra sustratos reducidos que cambian la abundancia, la estructura y la actividad de la comunidad desnitrificante, afectando por ende la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  (Achouak et al. 2019; Ai et al. 2017; Philippot et al. 2007). Por lo tanto, es probable que la rizósfera sea un punto crítico de pérdida de nitrógeno en los arrozales.

Asimismo, estudios metagenómicos realizados para elucidar las características funcionales de la comunidad de bacterias endófitas de arroz, detectaron la expresión de genes que intervienen en el proceso de desnitrificación dentro de las raíces (Sessitsch et al. 2012). Los resultados obtenidos por Ai et al. 2017 en plantas de trigo mostraron que las raíces por sí mismas (rizoplano y endósfera) presentaron una alta producción de  $\text{N}_2\text{O}$  y comunidades desnitrificantes significativamente distintas a las establecidas en rizósfera y suelo. Estos reportes muestran que la desnitrificación puede ser un proceso viable dentro de las raíces y que las poblaciones desnitrificantes endófitas podrían contribuir a las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en arrozales.

Los genes *nirS* y *nirK*, que codifican para las dos variantes conocidas de la enzima nitrito reductasa, son utilizados frecuentemente para abordar el estudio de las comunidades desnitrificantes ya que esta enzima lleva a cabo la etapa clave del proceso, es decir, la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a óxido nítrico (NO). Estos genes parecen ser mutuamente excluyente entre especies desnitrificantes y representarían dos grupos de desnitrificantes ecológicamente distintos, denominados desnitrificantes tipo *nirK* y tipo *nirS* (Jones y Hallin, 2010). Es importante tener en cuenta que, aunque estos genes están presentes en los genomas de organismos desnitrificantes frecuentemente en copia única, han sido reportadas múltiples copias de ambos genes en genomas de varias especies (Graf et al. 2014; Jones et al. 2008).

Por lo tanto, la abundancia de estos genes podría no corresponder exactamente al número de microorganismos desnitrificantes tipo *nirK* y tipo *nirS*.

Numerosos estudios han mostrado que las poblaciones desnitrificantes tipo *nirS* responden de manera distinta frente a cambios ambientales que las poblaciones tipo *nirK*, apoyando la posibilidad de que ambas poblaciones podrían ocupar nichos ecológicos diferentes (Azziz et al. 2017; Hou et al. 2018; Jones y Hallin, 2010; W. Wei et al. 2015). Se sabe que diferentes tipos de fertilización pueden alterar la estructura y la actividad de las comunidades desnitrificantes presentes en suelo de arroz, y estas variaciones son generalmente resultado de cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo (Z. Chen et al. 2012; Z. Chen et al. 2010; Duan et al. 2018; Yin et al. 2015). Sin embargo, aún se desconoce cómo se ven impactadas aquellas poblaciones desnitrificantes que se asocian más fuertemente a las raíces de la planta frente a estas u otras prácticas agrícolas.

La utilización de distintos sistemas de rotación de cultivos en la producción de arroz que implican un uso más intensivo del suelo con respecto a la tradicional rotación con pasturas utilizada en nuestro país, modifican la entrada y disponibilidad de nutrientes en el suelo. Por lo tanto, estas prácticas agrícolas podrían afectar la composición y actividad de las poblaciones microbianas presentes tanto en el suelo como asociadas a la planta y, por ende, alterar los procesos microbianos que participan en el ciclado de C y N y en la emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O.

En este capítulo de la tesis, se estudió la estructura y dinámica de distintos grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental asociados al cultivo de arroz utilizando métodos moleculares basadas en genes marcadores funcionales de estos grupos. A partir de muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz provenientes de rotaciones arroceras con diferente grado de intensificación, tomadas en distintas etapas del ciclo de cultivo (etapas seca e inundada), se detectaron y cuantificaron las comunidades de BRS, arqueas metanogénicas, y bacterias desnitrificantes mediante qPCR de los genes *dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK*, respectivamente. El estudio de la diversidad y los principales cambios en la estructura de las comunidades de BRS y desnitrificantes presentes en rizósfera y como endófitas de raíces, se abordó mediante la técnica de T-RFLP de los genes *dsrAB*, *nirS* y *nirK*. Asimismo, se utilizaron los resultados del análisis de secuenciación masiva de genes 16S rRNA presentados en el *Capítulo 2* para identificar y evaluar la dinámica de grupos taxonómicos potencialmente reductores de sulfato presentes en las distintas muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las distintas etapas del cultivo.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Muestras de suelos y raíces de arroz provenientes de ensayo de rotaciones a campo

Se utilizó el ADN previamente extraído de las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz descriptas en el *Capítulo 2* (sección 2.2), provenientes del ensayo de rotaciones arroceras instalado en la Unidad Experimental Paso de la Laguna de INIA Treinta y Tres. Las muestras se tomaron a partir de tres sistemas de rotación con distinto nivel de intensidad (R1: arroz continuo, R4: arroz-pasturas; R5: arroz-soja; Figura 2.1) en dos momentos de muestreo representativos de las etapas seca e inundada del cultivo (Figura 2.2).

### 3.2.2. Cuantificación de genes marcadores funcionales en suelos, rizósferas y raíces mediante qPCR

La técnica de qPCR del gen *dsrA* optimizada como parte de esta tesis, cuyos detalles metodológicos y resultados se presentan en el *Capítulo 1*, fue utilizada para determinar la abundancia de las comunidades sulfato reductoras en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz obtenidas en ambos muestreos en los diferentes sistemas de rotación evaluados. Asimismo, en estas muestras se determinó la abundancia de arqueas metanogénicas mediante qPCR del gen *mcrA* (Angel et al. 2011) y de las comunidades desnitrificantes mediante qPCR de los genes *nirS* y *nirK* (Bellini et al. 2018).

En la Tabla 3.1 se resume la información de los primers utilizados para cada gen, así como de los estándares usados en las curvas de calibración. Todas las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Rotor Gene® 600 para Real Time PCR (QIAGEN) utilizando un volumen final de 10µl, conteniendo 5µl de la mezcla de reacción comercial Rotor Gene SYBR Green PCR Kit® (QIAGEN), 2µl de cada primer (concentraciones finales en Tabla 3.1) y 1ul de ADN concentrado o diluido.

Se verificó la ausencia de inhibición en las amplificaciones probando diferentes diluciones al décimo de las muestras de ADN (0, 1:10, 1:100) en las reacciones de qPCR. Para la cuantificación del gen *dsrA*, se determinó que la dilución 1:10 del ADN era la adecuada para realizar las determinaciones en las muestras de rizósfera y raíz mientras que para las muestras de suelo se utilizó el ADN concentrado. En las cuantificaciones de los genes *nirS* y *nirK* se utilizó la dilución 1:10 para todas las muestras. Para cuantificar el gen *mcrA* se utilizó la dilución 1:100 del ADN de rizósfera del muestreo de febrero y la dilución 1:10 para el resto de las muestras de rizósferas, suelos y raíces. Todas las cuantificaciones se realizaron utilizando duplicados técnicos de las muestras y en cada

corrida se realizó una curva de calibración utilizando triplicados técnicos de cada dilución del estándar (diluciones decimales sucesivas desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-10}$  para *dsrA* y *nirS*, y desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-9}$  para *nirK* y *mcrA*). En cada corrida fueron incluidos controles de amplificación sin ADN (NTC) por triplicado en los cuales se verificó la ausencia de amplificación. Todas las corridas fueron llevadas a cabo con un primer paso a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos seguido de 40 ciclos de 5s a  $95^{\circ}\text{C}$ , 10s a  $60^{\circ}\text{C}$  (annealing) y 1s a  $80^{\circ}\text{C}$  (adquisición de fluorescencia). Para verificar la especificidad de la amplificación, se realizaron curvas de temperatura de melting en cada corrida incrementando la temperatura de a  $1^{\circ}\text{C}$  desde  $60^{\circ}\text{C}$  hasta  $95^{\circ}\text{C}$ . Asimismo, algunos de los productos de amplificación obtenidos tanto en las curvas de calibración como a partir de las muestras se corrieron en geles de agarosa 1.5 % para confirmar los tamaños de los fragmentos y la ausencia de bandas inespecíficas, y se verificó mediante secuenciación y análisis de las secuencias (Macrogen, Corea del Sur; comparación con bases de datos de NCBI, herramienta BLASTx) que correspondían a secuencias que codifican para las proteínas correspondientes a cada gen.

Los resultados de los duplicados técnicos promediados y corregidos por el factor de dilución, fueron expresados por gramo de material de partida (para suelo y rizósfera, gramos de material seco; para raíces, gramos de tejido fresco), así como también por nanogramo de ADN total extraído. Considerando que los métodos de extracción de ADN utilizados para los distintos materiales de partida presentaron diferentes eficiencias de extracción, se utilizaron los resultados expresados en copias del gen. ng de ADN-1 para hacer las comparaciones estadísticas entre las distintas muestras. Los resultados fueron comparados mediante ANOVAs ( $\alpha=0.05$ ) y comparaciones de medias mediante el Test de Tukey. Para cada gen se realizó un primer ANOVA para comparar entre los distintos materiales estudiados. Luego, para comparar el efecto de los distintos factores estudiados, se realizaron ANOVAs factoriales de forma independiente para cada material, utilizando como factores la rotación y el muestreo.

Grupo microbiano	Gen	Tamaño del fragmento (pb)	Información de los primers			Información del estándar		
			Nombre	Secuencias	Referencia	Concentración final	Cepa o clon	Copias del gen. $\mu\text{l}^{-1}$
Bacterias sulfato reductoras	<i>dsrA</i>	221	DSRIF+	5' - ACS CAC TGG AAG CAC GGC GG - 3'	Kondo et al. 2004 Kondo et al. 2004	0.7 $\mu\text{M}$	<i>Desulfotribrio desulfuricans</i> (DSMZ 642)	$3.9 \times 10^{10}$
			DSR-R	5' - GTG GMR CCG TGC AKR TTG G - 3'				
Arqueas metanogénicas	<i>mcrA</i>	496	m1as-mod-F	5'- GG YGG TGT MGG DTT CAC MCA RTA - 3'	Steinberg y Regan, 2008 Steinberg y Regan, 2008	0.5 $\mu\text{M}$	Clon obtenido de suelo Angel et al. 2011	$3.4 \times 10^9$
			mcrA-rev-R	5'- CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT - 3'				
Bacterias desnitrificantes	<i>nirS</i>	425	cd3AF	5' - GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG - 3'	Throbäck et al. 2004 Throbäck et al. 2004	0.5 $\mu\text{M}$	AR45 <i>Pseudomonas stutzeri</i> Bellini et al. 2018	$3.7 \times 10^{10}$
			R3cd	5' - GAS TTC GGR TGS GTC TTG A - 3'				
Bacterias desnitrificantes	<i>nirK</i>	165	876	5' - ATY GGC GGV CAY GGC GA- 3'	Henry et al. 2004 Hallin y Lindgren, 1999	0.5 $\mu\text{M}$	<i>Achromobacter</i> sp. Bellini et al. 2018	$3.9 \times 10^{10}$
			R3Cu	5' - GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT- 3'				

**Tabla 3.1:** Información sobre los primers utilizados en las cuantificaciones por qPCR de los genes *dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK*, y sobre los estándares usados en las respectivas curvas de calibración.

### 3.2.3. Diversidad de comunidades sulfato reductoras y desnitrificantes en rizósfera y raíces mediante T-RFLP de los genes *dsrAB*, *nirS* y *nirK*

Para abordar el estudio de la diversidad y los principales cambios en la estructura de las comunidades BRS y desnitrificantes presentes en rizósfera y como endófitas de raíces de plantas de arroz provenientes de distintos sistemas de rotación de cultivos, se realizaron análisis mediante T-RFLP dirigido a genes marcadores funcionales de estos procesos microbianos. La estructura de las comunidades BRS se estudió mediante T-RFLP del gen *dsrAB*, cuya optimización se describe en detalle en el *Capítulo 1* de esta tesis. Para estudiar la estructura de las comunidades desnitrificantes se implementó esta técnica para los genes *nirS* y *nirK*.

#### 3.2.3.1. Selección de enzimas de restricción para T-RFLP genes *nirS* y *nirK*

Se realizó un análisis *in silico* con distintas enzimas de restricción reportadas en la bibliografía para discriminar grupos de bacterias desnitrificantes tipo *nirS* y tipo *nirK*. Se probaron las enzimas HaeIII (GG↓CC) y HhaI (GCG↓C) para el gen *nirS* y las enzimas HaeIII, HhaI, AspI (GACN↓NNGTC), Sau96I (G↓GNCC), TaqαI (T↓CGA) y HpyCH4IV (A↓CGT) para el gen *nirK*. Para este análisis, se obtuvieron secuencias de referencia para ambos genes a partir de la base de datos de NCBI pertenecientes a diferentes especies bacterianas conocidas como desnitrificantes y comúnmente encontradas en suelo. Las secuencias se alinearon mediante el software MEGA X (Kumar et al. 2018), se determinó la posición de la secuencia del primer forward y los sitios blanco de las enzimas, y se determinaron los tamaños teóricos de los fragmentos terminales generados. En base a ese análisis se seleccionaron las enzimas HaeIII para el gen *nirS* y HpyCH4IV para el gen *nirK*.

#### 3.2.3.2. Análisis mediante T-RFLP

Se utilizó ADN genómico extraído de las muestras de rizósfera y de raíces provenientes de los tres sistemas arroceros en estudio, tomadas en ambas etapas del cultivo (seca e inundada). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) en un volumen final de 25µL. La amplificación del gen *dsrAB* se realizó mediante una nested-PCR con los primers DSR1F/4R (Wagner et al. 1998) en la primera amplificación y los primers DSR619AF/1905BR (Giloteaux et al. 2010) en la segunda (Tabla 1.1), utilizando las concentraciones de reactivos y ciclos de temperatura descritos en la Tabla 1.5. Para la amplificación de los genes *nirS* y *nirK* se utilizaron los primers cd3AF/R3cd (Throbäck et al. 2004) y F1aCu/nirK5R (Braker

et al. 1998; Hallin y Lindgren, 1999), respectivamente. Las condiciones de amplificación para estos genes fueron las siguientes: buffer Taq 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, dNTPs 0.2mM cada uno, primers 0.2mM para el gen *nirS* y 0.5mM para el gen *nirK*, 1U Taq Polimerasa (Invitrogen) y 10ng de ADN.

Las amplificaciones de los genes *nirS* y *nirK* se realizaron por triplicado para cada muestra. Se realizó un pool de los triplicados, se purificaron y concentraron utilizando columnas MICROCON100 (Millipore), previa verificación del amplicón de interés mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 0.5X (30min a 100mv). Todos los productos obtenidos para ambos genes mostraron en el gel una única banda del tamaño esperado (425pb para *nirS* y 472pb para *nirK*).

Aproximadamente 150ng de productos de PCR de cada gen fueron digeridos con la enzima seleccionada correspondiente. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 15µl conteniendo buffer de la enzima 1X y 4U de la enzima de restricción (buffer R y enzima HaeIII [Thermo Scientific] para el gen *nirS*, buffer CutSmart y enzima HpyCH4IV [New England Biolabs] para el gen *nirK*). Para ambos genes, la mezcla de reacción fue incubada a 37°C durante 4hs y luego la enzima fue inactivada a 65°C durante 20min. Los fragmentos fueron enviados a Macrogen Corea para el servicio de Fragment Analysis, utilizando el estándar de longitud 500LIZ para la asignación del tamaño de los fragmentos de restricción terminales marcados (T-RFs). La visualización y el procesamiento de los resultados se realizó de forma similar a lo explicado para el gen *dsrAB* (Capítulo 1, sección 1.2.2.5)

### 3.2.3.3. Estimación de la diversidad y análisis estadísticos

La diversidad de las comunidades BRS y desnitrificantes en cada una de las muestras ( $\alpha$  diversidad) fue estimada mediante el cálculo de los siguientes índices: número de T-RFs o riqueza (*richness*), índice de Shannon e índice de Simpson. Los índices se calcularon a partir de la matriz de abundancias relativas utilizando el paquete *vegan* en el software R (versión 3.6.1) con Rstudio (versión 1.2.5033). Para comparar la diversidad de las muestras según los diferentes factores evaluados, sobre cada uno de los índices calculados se realizó un ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) factorial considerando los factores rotación y muestreo. En el caso de los resultados del gen *nirS*, se realizó además un ANOVA por el factor material, ya que fue el único gen para el cual se obtuvieron resultados en muestras de rizósfera y de raíces. En todos los casos en los que se obtuvo un resultado del ANOVA significativo ( $p$ -valor $<0.05$ ) se realizó la comparación de medias mediante el Test de Tukey. Los datos de abundancias relativas de los T-RFs obtenidos para cada gen se utilizaron para realizar análisis de cluster mediante el método UPGMA utilizando el índice de Morisita (software Past 1.42).

### **3.2.4. Estudio de grupos taxonómicos con capacidad potencial de reducir sulfato a partir de datos de secuenciación masiva de genes 16S rRNA**

A partir de los resultados de secuenciación masiva del gen 16S rRNA presentados en el *Capítulo 2*, se seleccionaron grupos taxonómicos bacterianos en los que ha sido encontrado el gen funcional *dsrAB* (Müller et al. 2015) y se analizó su dinámica en las distintas muestras y en las diferentes etapas de cultivo (seca e inundada). Para esto, se utilizó la herramienta *Phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013) en el software R (versión 3.6.1) para seleccionar las OTUs afiliadas a estos grupos taxonómicos, y obtener información sobre su abundancia relativa en las distintas muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz evaluadas.



### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Abundancia de grupos microbianos de relevancia ambiental en suelos, rizósferas y raíces de arroz mediante qPCR de genes marcadores funcionales

A partir del ADN extraído de las distintas muestras, cuya concentración se detalla en el Anexo 2, se realizó la cuantificación de los distintos genes marcadores funcionales de los procesos de interés. Mediante qPCR, se evaluó la abundancia de las comunidades sulfato reductoras (gen *dsrA*), metanogénicas (gen *mcrA*) y desnitrificantes (genes *nirS* y *nirK*) en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz tomadas en dos momentos del ciclo del cultivo (diciembre y febrero) en tres sistemas de rotación diferentes (R1: arroz continuo, R4: arroz-pasturas, y R5: arroz-soja).

Las curvas de melting obtenidas para todos los genes presentaron un solo pico indicando la especificidad de los productos cuantificados (para el gen *dsrA* ver Figura 1.6, para el resto de los genes ver Anexo 5). Las curvas estándar presentaron linealidad adecuada para todos los genes ( $r^2 \geq 0.99$ ) y buena eficiencia para los genes *mcrA* (89-100 %), *dsrA* (88-95 %) y *nirS* (83-91 %). En el caso del gen *nirK*, las eficiencias obtenidas fueron menores (76-83 %), lo cual ha sido previamente reportado en bibliografía para este gen utilizando los mismos primers usados en este trabajo (Conthe et al. 2018).

Los resultados de las cuantificaciones obtenidos para las diferentes muestras, expresados en copias del gen por ng de ADN total extraído, fueron comparados estadísticamente entre los distintos materiales, con respecto a la etapa del cultivo y a las distintas rotaciones estudiadas. A continuación, se presentan los ANOVAs factoriales realizados para cada material de forma independiente, considerando los factores rotación y muestreo. En el Anexo 6 se presenta el resto de los análisis estadísticos, las comparaciones de medias (Test de Tukey) para los casos en los que se obtuvo diferencias significativas ( $p$ -valor < 0.05) y otros ANOVAs complementarios. Asimismo, en este Anexo también se incluyen los valores obtenidos en todas las cuantificaciones (Tablas 6.1 y 6.2, y Figuras 6.1, 6.2 y 6.3, Anexo 6), expresados tanto en copias del gen.ng de  $\text{ADN}^{-1}$  total extraído como también en copias.g de material de partida<sup>-1</sup>, ya que esta información puede resultar de interés para comparar con resultados de qPCR de otros estudios.

##### 3.3.1.1. Abundancia de bacterias reductoras de sulfato: qPCR genes *dsrA*

Utilizando la técnica de qPCR de genes *dsrA*, fue posible detectar y cuantificar BRS presentes en el suelo y asociadas a las raíces de arroz, tanto rizosféricas como endófitas. Los resultados de abundancia de genes *dsrA* obtenidos para las distintas muestras analiza-

das, así como los p-valores de los ANOVAs factoriales realizados de forma independiente para cada material, se muestran en la Figura 3.1. Como puede observarse, la abundancia de genes *dsrA* en las raíces ( $1.29 \times 10^1 - 1.95 \times 10^2$  copias de *dsrA*.ng ADN<sup>-1</sup>,  $2.39 \times 10^4 - 2.66 \times 10^5$  copias de *dsrA*.g tejido fresco<sup>-1</sup>, Tablas 6.1 y 6.2 del Anexo 6) fue significativamente menor que en los suelos y las rizósferas, independientemente de la etapa del cultivo y de las distintas rotaciones (p-valor < 0.0001, Tabla 6.3 del Anexo 6). Asimismo, en la etapa inundada (febrero), la abundancia de genes *dsrA* en rizósfera fue significativamente superior a la que presentaron los suelos (p-valor < 0.0001, Tabla 6.4 del Anexo 6), alcanzando los mayores valores de todas las muestras ( $3.64 \times 10^2 - 2.66 \times 10^3$  copias de *dsrA*.ng ADN<sup>-1</sup>,  $3.49 \times 10^6 - 8.96 \times 10^6$  copias de *dsrA*.g rizósfera seca<sup>-1</sup>, Tablas 6.1 y 6.2 del Anexo 6).

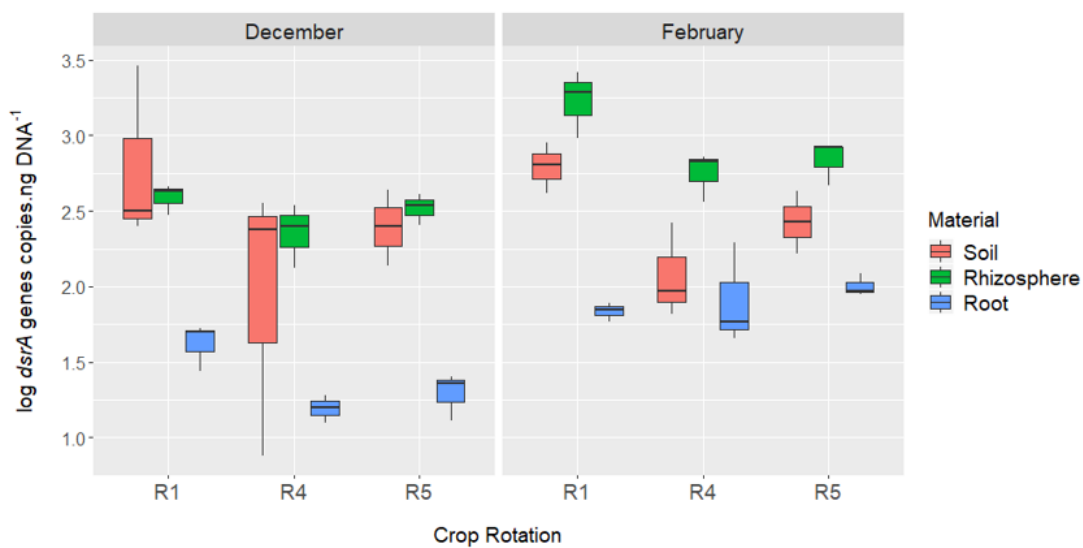
Los diferentes sistemas de rotación utilizados no afectaron significativamente la abundancia de BRS presentes en el interior de las raíces. No obstante, para las muestras de raíces se encontró una interacción significativa entre la rotación y el muestreo (Figura 3.1, p-valor = 0.0418), observándose en la etapa seca del cultivo (diciembre) una tendencia a mayores abundancias de genes *dsrA* en la rotación intensiva (R1) (Tabla 6.8 del Anexo 6). A nivel de la rizósfera, esta rotación más intensiva (R1) presentó un número de copias de genes *dsrA* significativamente superior al resto de las rotaciones, sin importar el momento de muestreo (Figura 3.1, p-valor = 0.0057, comparaciones en Tabla 6.6 del Anexo 6). Luego de la inundación del cultivo, tanto las poblaciones BRS rizosféricas como las endófitas, aumentaron significativamente (Figura 3.1, p-valores < 0.0001, comparaciones en Tabla 6.7 del Anexo 6). Por el contrario, las abundancias de estas poblaciones en los suelos permanecieron estables.

### 3.3.1.2. Abundancia de arqueas metanogénicas: qPCR genes *mcrA*

Se detectaron y cuantificaron los genes *mcrA* en suelo y rizósfera en todos los tratamientos evaluados, y también en el interior de las raíces del muestreo de febrero. La cuantificación de genes *mcrA* en las raíces provenientes de la etapa seca (diciembre) mostró que este gen se encuentra en concentraciones menores al límite de cuantificación de la técnica de qPCR utilizada (4.2 copias de *mcrA*.ng ADN<sup>-1</sup> o  $1.0 \times 10^4$  copias de *mcrA*.g raíz fresca<sup>-1</sup>, Tablas 6.1 y 6.2 del Anexo 6).

Tanto los suelos como las rizósferas presentaron valores de copias del gen *mcrA* significativamente superiores en febrero que en diciembre (Figura 3.2, p-valor suelo = 0.0010, p-valor rizósfera < 0.0001, comparaciones en Tabla 6.7 del Anexo 6). Similar a lo observado para el gen *dsrA*, en la etapa inundada del cultivo (febrero) las rizósferas presentaron abundancias significativamente superiores a los suelos (p-valor < 0.0001, Tabla 6.5 del Anexo 6).

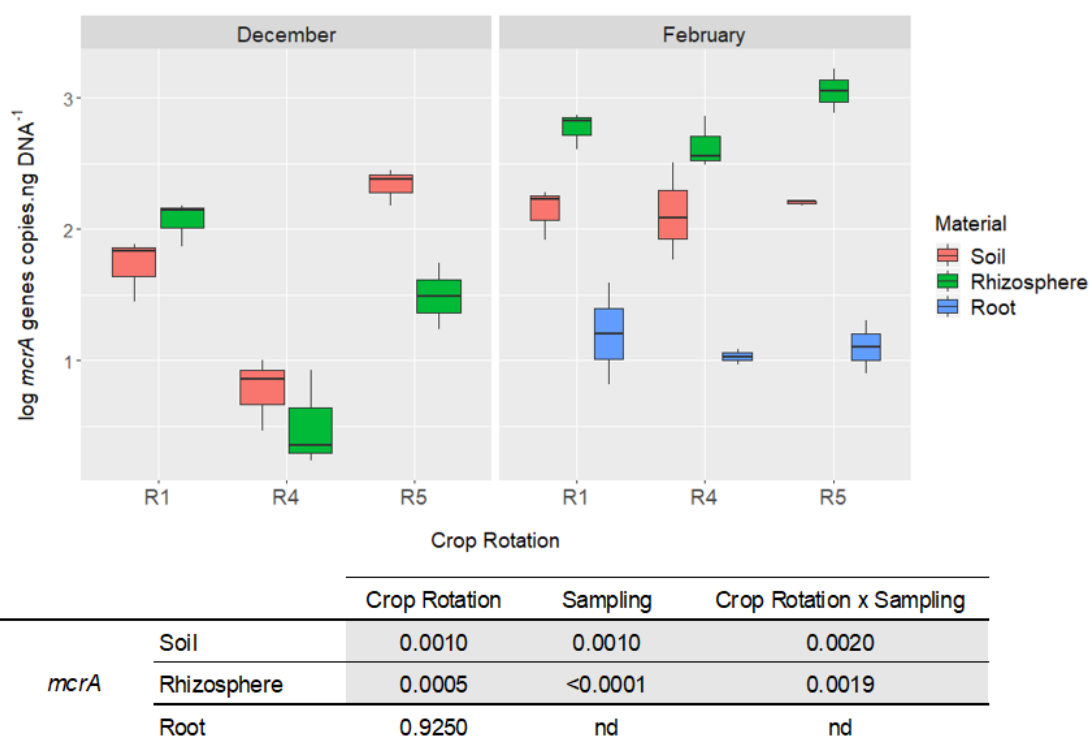
Analizando los resultados obtenidos con respecto a los sistemas de rotación evaluados,



		Crop Rotation	Sampling	Crop Rotation x Sampling
<i>dsrA</i>	Soil	0.0904	0.8974	0.9770
	Rhizosphere	0.0057	<0.0001	0.2678
	Root	0.2283	<0.0001	0.0418

**Figura 3.1:** Abundancia de genes *dsrA* en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero), y p-valores obtenidos en los ANOVAs factoriales ( $\alpha=0.05$ ) realizados de forma independiente para cada material. Los resultados se expresan en  $\log_{10}$  del número de copias del gen *dsrA* por ng de ADN total extraído. Se indican en gris los p-valores <0.05. Las comparaciones de medias (Test de Tukey) se presentan en Anexo 6

se encontraron diferencias significativas en suelo y rizósfera (Figura 3.2, p-valor suelo = 0.0010, p-valor rizósfera=0.0005). En ambos materiales, la rotación tradicional con pasturas (R4) presentó una abundancia de genes *mcrA* significativamente menor a las rotaciones de arroz intensivo (R1) y de arroz-soja (R5) (Tabla 6.6 del Anexo 6). Si observamos la interacción de los factores rotación y muestreo (rotación x muestreo) que también resultó significativa (Figura 3.2, p-valor suelo=0.0020, p-valor rizósfera = 0.0019), es posible identificar que esta diferencia se debió particularmente a la etapa seca del cultivo (diciembre), donde los suelos y las rizósferas de la rotación arroz-pastura (R4) presentaron valores de copias del gen *mcrA* al menos un orden por debajo de las demás rotaciones (Tabla 6.8 del Anexo 6). A partir de la interacción rotación x muestreo también es posible observar que esta rotación con pasturas (R4), a pesar de presentar un bajo número de copias de *mcrA* en la etapa seca (diciembre), luego de la inundación (febrero) alcanzó valores de abundancia similares a los presentes en las demás rotaciones (Tabla 6.8 del Anexo 6). En el interior de las raíces inundadas (febrero), no se observaron diferencias significativas en la abundancia de genes *mcrA* provenientes de las diferentes rotaciones.



**Figura 3.2:** Abundancia de genes *mcrA* en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero), y p-valores obtenidos en los ANOVAs factoriales ( $\alpha = 0.05$ ) realizados de forma independiente para cada material. Los resultados se expresan en  $\log_{10}$  del número de copias del gen *mcrA* por ng de ADN total extraído. Se indican en gris los p-valores  $< 0.05$ . nd: no determinado, ya que no se detectaron genes *mcrA* en las raíces de diciembre. Las comparaciones de medias (Test de Tukey) se presentan en el Anexo 6

### 3.3.1.3. Abundancia de bacterias desnitrificantes: qPCR de genes *nirS* y *nirK*

Mediante qPCR de los genes *nirS* y *nirK* se detectaron y cuantificaron las comunidades desnitrificantes en las distintas muestras estudiadas. En la Figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos para ambos genes (Fig. 3.3a, *nirS*; Fig. 3.3b, *nirK*), y los p-valores de los ANOVAs factoriales para cada material.

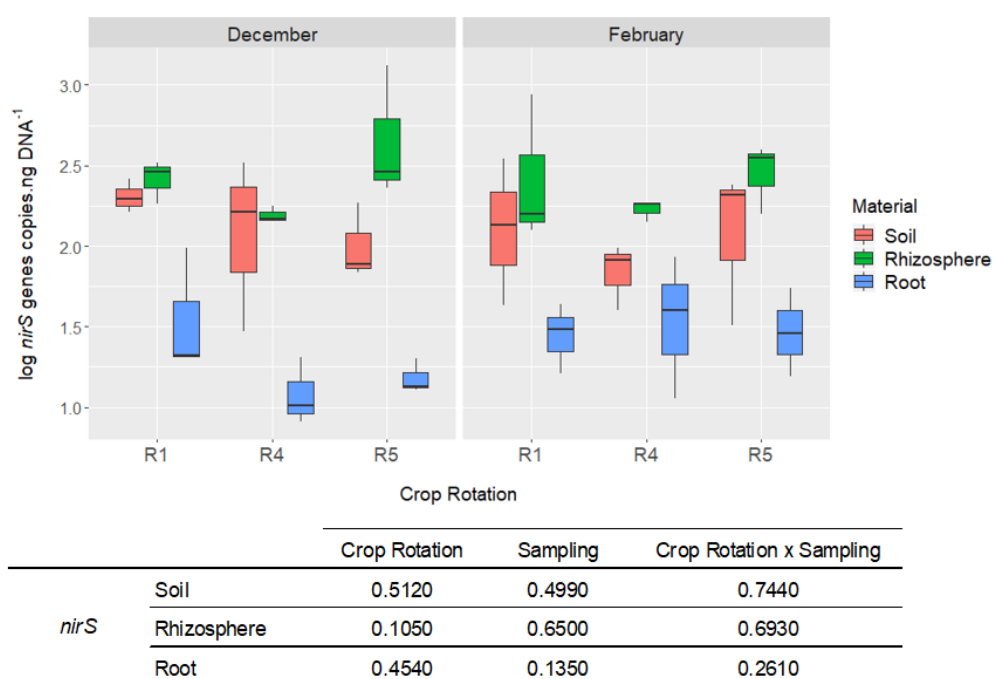
Como se observa en la Figura 3.3, en todas las muestras analizadas los genes *nirK* fueron más abundantes que los genes *nirS*, entre uno y tres órdenes logarítmicos. La mayor diferencia entre la abundancia de ambos genes se observó en los suelos, en particular, en la rotación con soja (R5), en la cual las poblaciones desnitrificantes tipo *nirK* se encontraron en una proporción aproximadamente 1000 veces superior a las tipo *nirS*.

La abundancia de genes *nirS* fue significativamente distinta en los diferentes materiales evaluados: las raíces presentaron la menor abundancia, las rizósferas la mayor, y los suelos una abundancia intermedia entre rizósferas y raíces (p-valor  $< 0.0001$ , Tabla 6.3 del Anexo

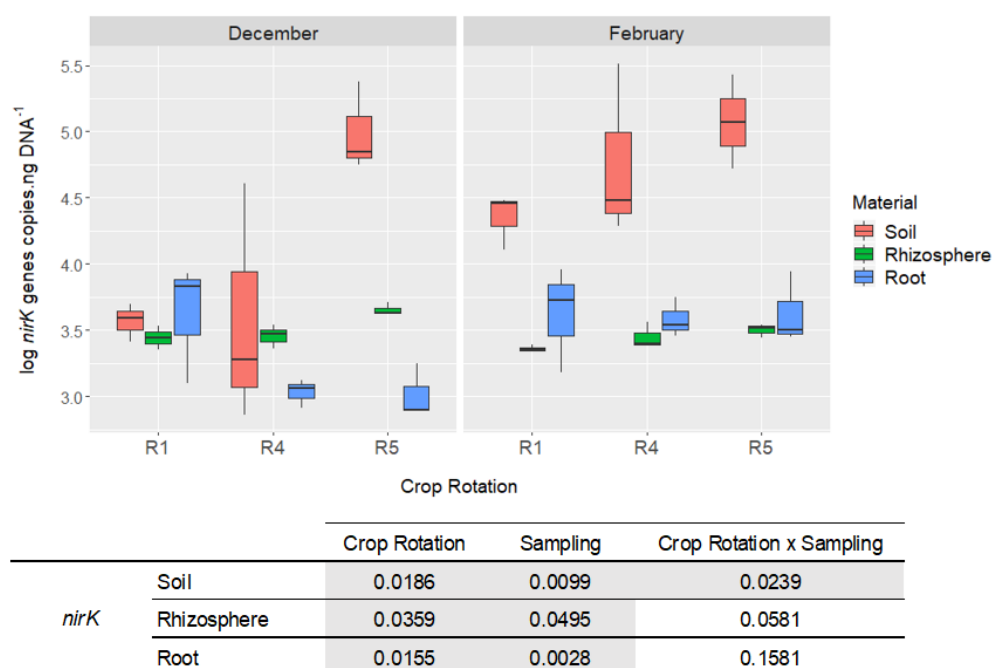
6). En cambio, esto no se observó para los genes *nirK*, para los cuales se obtuvieron valores de abundancia similares en raíces y rizósferas, significativamente menores a los suelos (p-valor<0.0001, Tabla 6.3 del Anexo 6).

Ni los diferentes sistemas de rotación utilizados ni la inundación del cultivo afectaron significativamente la abundancia de las poblaciones desnitrificantes tipo *nirS* (Figura 3.3a, p-valores>0.05 para ambos factores en los tres materiales), mientras que sí tuvieron un efecto significativo sobre la abundancia de las poblaciones tipo *nirK* en los tres materiales estudiados (Figura 3.3b, p-valores<0.05 para ambos factores en los tres materiales). La abundancia de genes *nirK* en la rotación de arroz continuo (R1) fue significativamente menor que en la rotación con soja (R5) tanto en suelo como en rizósfera, mientras que las raíces de la rotación intensiva (R1) presentaron un número de copias de este gen significativamente superior a las demás rotaciones (Tabla 6.6 del Anexo 6).

Con respecto a la inundación, también se observaron efectos diferentes sobre las poblaciones tipo *nirK* de los distintos materiales. Luego de la inundación, la abundancia de estas poblaciones aumentó significativamente en el interior de las raíces y disminuyó a nivel de la rizósfera (Tabla 6.7 del Anexo 6). Observando la combinación de los factores rotación x muestreo que resultó significativa para las poblaciones tipo *nirK* de suelo (Figura 3.3b, p-valor=0.0239), se encontró que en la etapa seca del cultivo (diciembre) la rotación con soja (R5) presentó la mayor abundancia de estas poblaciones, superando en casi 1.5 órdenes a las presentes en las otras rotaciones (Tabla 6.8 del Anexo 6).



(a) qPCR *nirS*



(b) qPCR *nirK*

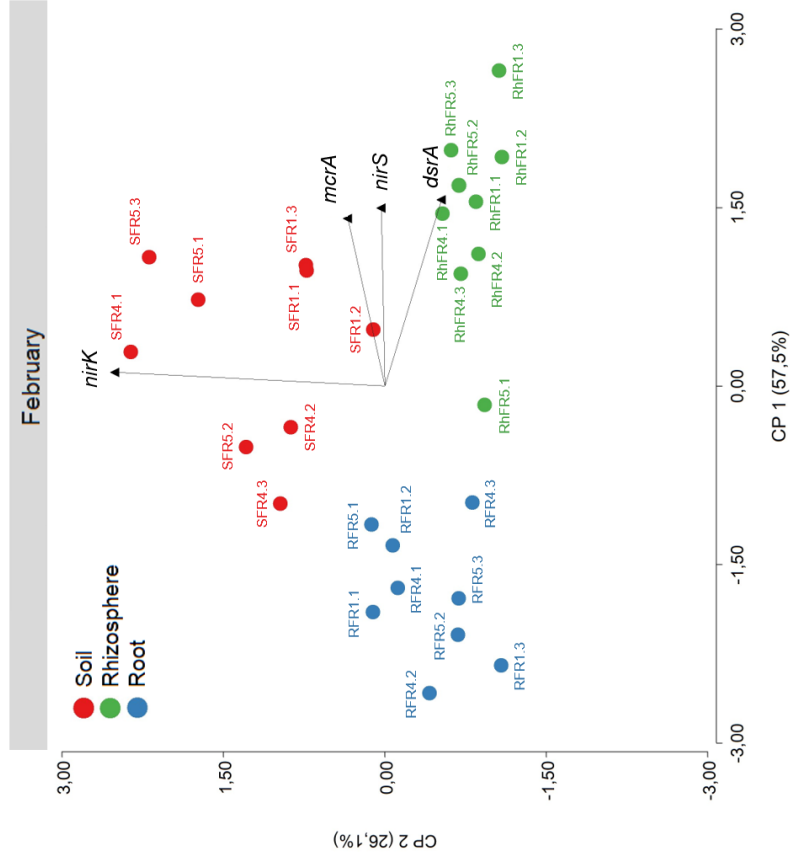
**Figura 3.3:** Abundancia de genes *nirS* (a) y *nirK* (b) en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero), y p-valores obtenidos en los ANOVAs factoriales ( $\alpha=0.05$ ) realizados de forma independiente para cada material. Los resultados se expresan en  $\log_{10}$  del número de copias del gen por ng de ADN total extraído. Se indican en gris los p-valores  $< 0.05$ . Las comparaciones de medias (Test de Tukey) se presentan en Anexo 6

#### 3.3.1.4. Ordenamiento de comunidades microbianas de suelo, rizósfera y raíces de arroz de acuerdo a la abundancia de genes marcadores funcionales

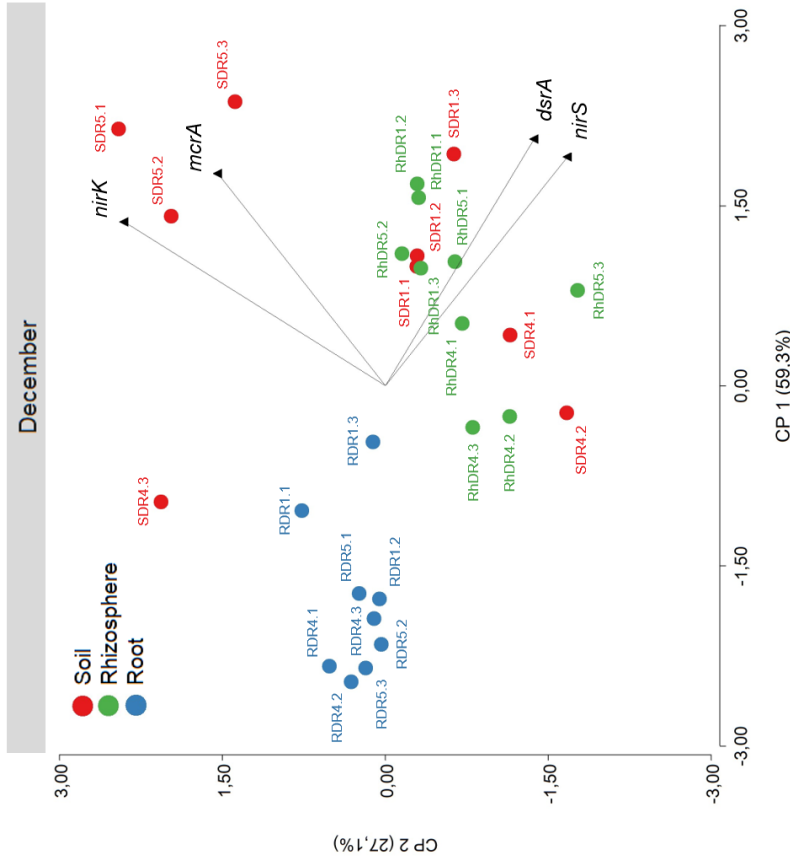
Con el objetivo de estudiar la relación entre las abundancias de los grupos microbianos de interés y evaluar como estas variables aportan al ordenamiento de las muestras en las distintas etapas del cultivo, se llevaron a cabo dos Análisis de Componentes Principales (PCA), uno para cada muestreo. El resultado de estos análisis se muestra en las Figura 3.4a y 3.4b, donde se observa que permitieron explicar el 86 % y 84 % de la variabilidad total observada en diciembre y febrero respectivamente. La abundancia de genes *dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK* permitió diferenciar las comunidades establecidas como endófitas de raíz de aquellas presentes en suelo y rizósfera tanto en la etapa seca como en la etapa inundada del cultivo. Sin embargo, únicamente en la etapa inundada fue posible diferenciar claramente las comunidades de suelo de las establecidas en rizósfera (Figura 3.4b).

En el PCA realizado para las muestras de febrero (Figura 3.4b), el CP1 permitió diferenciar las comunidades de raíz de las comunidades presentes en rizósfera, siendo las variables que más influyen en este componente las abundancias de genes *dsrA*, *nirS* y *mcrA*. El CP2, asociado principalmente a la abundancia de *nirK*, permitió diferenciar las comunidades presentes en los suelos del resto de las muestras.

En el análisis realizado sobre las muestras de diciembre (Figura 3.4a), vale la pena resaltar el agrupamiento que se observó para las tres réplicas biológicas (bloques) de suelo de la rotación con soja (R5). Estas muestras se diferenciaron claramente del resto debido a que presentaron las mayores abundancias de genes *nirK* y *mcrA* en esta etapa del cultivo.



(b) PCA Febrero



(a) PCA Diciembre

**Figura 3.4:** Análisis de Componentes Principales (PCA) para las raíces, rizósferas y suelos provenientes de las tres rotaciones (R1, R4 y R5) en la etapa seca (diciembre) (a) y en la etapa inundada (febrero) (b) según la abundancia de los genes *dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK*. Los valores de abundancia de genes se utilizaron en  $\log_{10}$  del número de copias del gen por ng de ADN total extraído. La variabilidad explicada por cada componente principal se indica entre paréntesis en cada eje.

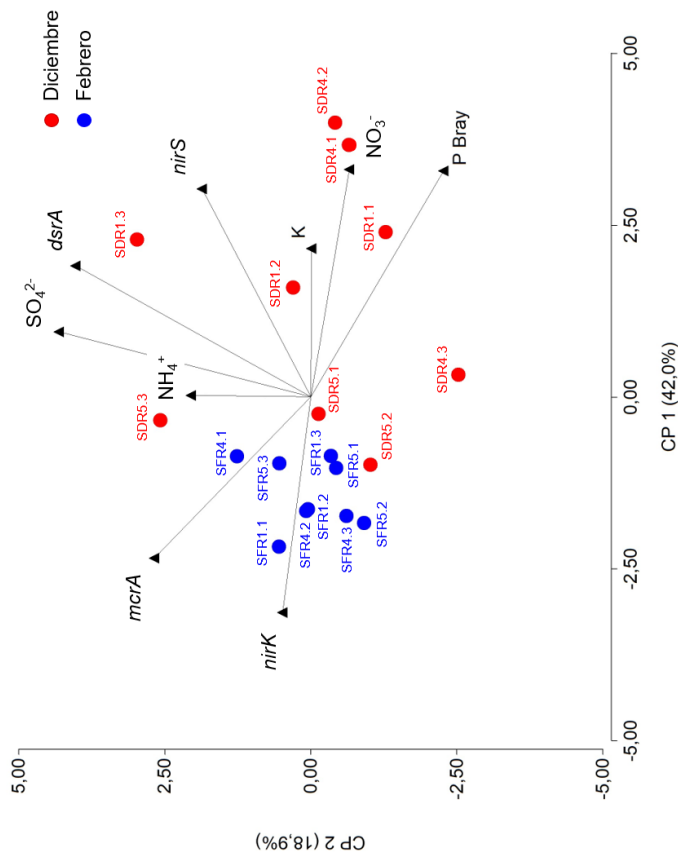


### 3.3.2. Abundancia de microorganismos reductores de sulfato, metanogénicos y desnitrificantes y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo

Para evaluar si las características químicas de los suelos (Tabla 2.3 del *Capítulo 2*) podrían correlacionarse con la abundancia de las comunidades microbianas estudiadas, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) exploratorio y el cálculo de los coeficientes de correlaciones de Pearson (Figura 3.5). En estos análisis se utilizaron los valores de abundancia de los genes *dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK* y los resultados de los parámetros químicos determinados en los suelos de las distintas rotaciones en ambos muestreos.

Los componentes principales CP1 y CP2 explicaron el 61 % de la variabilidad total en el PCA (Figura 3.5a). Es posible observar que las muestras de suelo tomadas en febrero resultaron más similares entre sí que las muestras tomadas en diciembre. Los suelos de febrero se caracterizaron por presentar mayor abundancia de genes *nirK* y *mcrA* y menor contenido de nitrato y fósforo. En cambio, los suelos de diciembre presentaron una alta variabilidad en los parámetros evaluados. Entre las muestras de diciembre, fue posible identificar que los suelos provenientes de la rotación con soja (SDR5.1, SDR5.2 y SDR5.3) parecen presentar características similares a los suelos de febrero.

Como se muestra en la Figura 3.5b, la abundancia de genes *nirS* y *nirK* en suelo mostraron una correlación negativa significativa (p-valor<0.05). Tanto el nitrato como el fósforo presentaron una correlación negativa con la abundancia de genes *nirK* mientras que se correlacionaron positivamente con la abundancia de genes *nirS* (p-valor<0.05). El fósforo, además, presentó una fuerte correlación negativa con la abundancia de genes *mcrA* (p-valor<0.05). También se observó una correlación positiva y significativa entre el sulfato y la abundancia de genes *dsrA* (p-valor<0.05).



(a) PCA

	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$	$\text{SO}_4^{2-}$	P Bray	K	<i>dsrA</i>	<i>mcrA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>
$\text{NH}_4^+$	1.00	0.85	0.72	0.68	0.98	0.84	0.51	0.66	0.88
$\text{NO}_3^-$	0.05	1.00	0.39	<0.05	0.08	0.42	0.06	<0.05	<0.05
$\text{SO}_4^{2-}$	0.09	0.22	1.00	0.78	0.93	<0.05	0.79	0.20	0.70
P Bray	-0.10	0.75	-0.07	1.00	<0.05	0.53	<0.05	<0.05	<0.05
K	-0.01	0.42	0.02	0.51	1.00	0.09	0.35	0.32	0.30
<i>dsrA</i>	0.05	0.20	0.52	0.16	0.41	1.00	0.90	<0.05	0.34
<i>mcrA</i>	0.16	-0.45	0.07	-0.70	-0.23	-0.03	1.00	0.14	0.15
<i>nirS</i>	0.11	0.54	0.32	0.52	0.25	0.63	-0.36	1.00	<0.05
<i>nirK</i>	-0.04	-0.80	-0.10	-0.66	-0.26	-0.24	0.35	-0.64	1.00

Referencia de colores: -1.00 -0.80 -0.60 -0.40 -0.20 0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00

(b) Matriz de Correlaciones de Pearson

**Figura 3.5:** Análisis de Componentes Principales (a) y matriz de correlaciones de Pearson (b) para los suelos de las 3 rotaciones evaluadas (R1, R4 y R5), los 2 muestreos (diciembre y febrero) y los 3 bloques. Las variables utilizadas para ambos análisis fueron los parámetros fisicoquímicos de los suelos (amonio, nitrato, sulfato, fósforo y potasio) y las abundancias de genes marcadores funcionales (*dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK*). Los valores de abundancia de genes se utilizaron en  $\log_{10}$  copias.g suelo  $\text{seco}^{-1}$ . Los vectores representan el aporte de cada variable a la distribución de las muestras. La matriz de correlaciones de Pearson se presenta como matriz de coeficientes \probabilidades; en negrita se indican las correlaciones estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ).

### 3.3.3. Composición y diversidad de las comunidades sulfato reductoras asociadas al cultivo de arroz bajo diferentes sistemas de rotación

La técnica de T-RFLP del gen *dsrAB* fue utilizada para comparar la estructura de las comunidades de BRS asociadas a raíces de arroz cultivado bajo diferentes sistemas de rotación y en distintas etapas del ciclo del cultivo. Sin embargo, en el caso de las raíces no fue posible obtener producto de amplificación a pesar de las múltiples condiciones ensayadas (*Capítulo 1*, sección 1.2.2).

En la Figura 3.6a se muestra un gráfico del porcentaje relativo de los T-RFs presentes en cada una de las muestras de rizósfera analizadas, en el cual se indica con diferentes colores los distintos fragmentos obtenidos identificados con las letras AB y el tamaño del fragmento. Se obtuvo un total de 19 T-RFs con tamaños comprendidos entre 58 y 226pb, y el número de T-RFs por muestra varió entre 2 y 14. Solo unos pocos T-RFs fueron detectados en la mayoría de las rizósferas analizadas. Los T-RFs de 61 y 72pb (AB61 y AB72) se observaron en 16 y 14 de las 18 muestras totales, respectivamente. En particular, el T-RF AB72 se encontró en el total de las muestras de rizósfera de diciembre en abundancias relativas importantes (entre 12 y 81 %). Además, es posible observar que la proporción de este T-RF disminuye o en algunos casos desaparece en las muestras de febrero. Con respecto a las distintas rotaciones evaluadas, no se encontraron T-RFs específicos de alguna rotación o que presentaran una clara variación en su proporción asociada a este factor.

El número de T-RFs (*richness*) y los índices de diversidad de Shannon y Simpson para las distintas muestras analizadas se presentan en la Figura 3.6a. De acuerdo a los valores obtenidos para estos índices y las comparaciones estadísticas realizadas (Figura 3.6b, comparaciones en Tabla 7.1 del Anexo 7), la rizósfera de la rotación arroz-soja (R5) presentó un número de T-RFs significativamente superior a la rotación tradicional de arroz-pasturas (p-valor=0.0490). Aunque esta diferencia de diversidad no es significativa para los demás índices y el p-valor es apenas menor a 0.05 para el número de T-RFs, es posible identificar que dos de las tres réplicas biológicas (bloques) correspondientes a las muestras de la rotación con soja, independientemente de la etapa del cultivo, presentaron altos valores de riqueza (RhDR5.2, RhDR5.3, RhFR5.2 y RhFR5.3). Con respecto a la etapa del cultivo, no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los índices de diversidad evaluados.

De acuerdo con el Análisis de Cluster que se muestra en la Figura 3.6a, las muestras no se agruparon ni por rotación ni por etapa del ciclo de cultivo. Asimismo, el análisis permite observar que las comunidades BRS rizosféricas presentaron una baja similitud entre sí

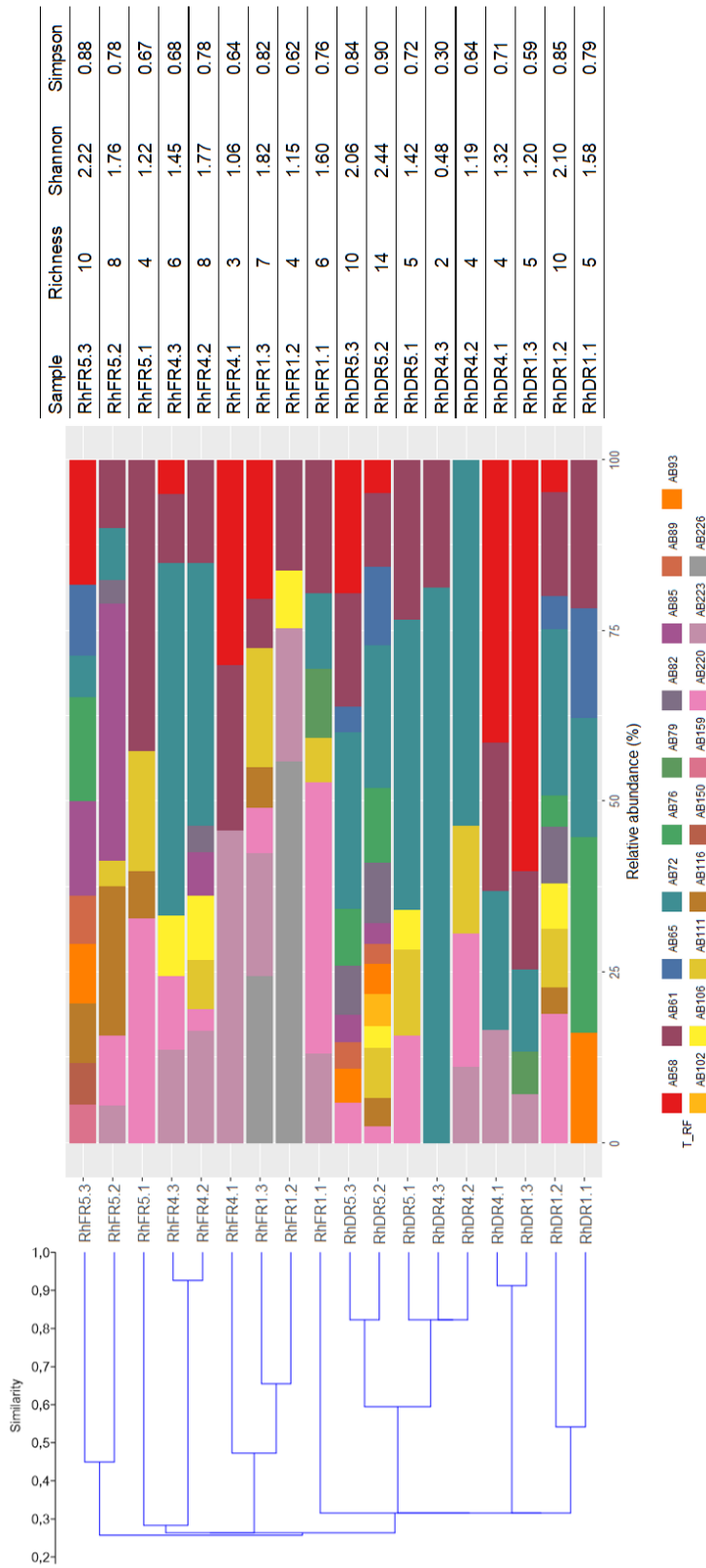
(30 % de similitud aprox.), inclusive entre réplicas biológicas del mismo tratamiento.

Los resultados obtenidos para estas muestras fueron comparados con los T-RFs teóricos identificados en el análisis *in silico* adoptando un intervalo de variación de tamaño de  $\pm 2$ pb con el objetivo de relacionar algunos fragmentos con secuencias presentes en bases de datos (Tabla 1.8, *Capítulo 1*). De los 5 fragmentos obtenidos con mayor frecuencia en el análisis *in silico*, 3 de ellos se encontraron con abundancias significativas (mayores al 1 %) en algunas de las muestras de rizósfera analizadas. El T-RF 116 (AB116) fue encontrado en 6 de las 18 muestras analizadas con una abundancia relativa entre 4-20 %. Según el análisis *in silico* este fragmento podría asignarse a algunas especies del género *Desulfovibrio*, pero también a otros géneros y secuencias de organismos no cultivados. La mitad de las muestras presentaron un T-RF de 111pb (AB111, T-RF 110 en el análisis *in silico*) con abundancias de entre 3-16 %, mientras que en 5 de ellas se encontró un T-RF de 85pb (AB85, T-RF 86 en el análisis *in silico*) con abundancias que van desde 3-4.5 % en la etapa seca del cultivo hasta 10-36 % en la etapa inundada. Esto resulta interesante debido a que estos dos T-RFs, 85-86 y 110-111, fueron asignados en su mayoría a secuencias de clones de organismos no cultivados provenientes de suelos de arroz, según el análisis *in silico*.

Por otra parte, estos resultados se complementaron mediante la evaluación de la presencia y abundancia de grupos taxonómicos relacionados a la reducción de sulfato mediante otro abordaje. Utilizando los resultados del análisis de secuenciación masiva de genes 16S rRNA realizado para estas mismas muestras, cuyo procesamiento se presenta en detalle en el *Capítulo 2* de esta tesis, se seleccionaron taxones conocidos por presentar el gen funcional *dsrAB* (Müller et al. 2015). En la mayoría de estos grupos la capacidad de utilizar el sulfato como aceptor final de electrones ha sido confirmada. Sin embargo, en algunos géneros no se ha detectado esta capacidad a pesar de presentar el gen *dsrAB*, aunque la mayoría de ellos sí pueden utilizar otros compuestos de azufre como sulfito, tiosulfato, tiosulfito, entre otros.

La Figura 3.7 muestra la abundancia relativa de estos grupos taxonómicos potencialmente reductores de sulfato encontrados en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las distintas etapas del cultivo, a nivel de género (o máximo nivel taxonómico alcanzado). El conjunto de estos taxones por muestra, presentaron abundancias de entre 0.5 % y 1 % del total de la comunidad bacteriana en todos los suelos y rizósferas, con excepción de la muestra SDR5.1 donde llegó al 2 %, y fueron detectados también en el interior de las raíces inundadas con abundancias de 0.2-1 %.

Considerando los grupos taxonómicos reportados como BRS, se observaron diferencias claras en sus abundancias relativas a través de los distintos nichos estudiados y con respecto a la etapa del cultivo. La familia sulfato reductora *Syntrophobacteraceae* dominó



(a) Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad

Rhizosphere			
Diversity index	Crop Rotation	Sampling	Crop Rotation x Sampling
Richness	0.0490	0.7761	0.2735
Shannon	0.0832	0.8918	0.4103
Simpson	0.1314	0.6268	0.4511

(b) P-valores de ANOVAs factoriales

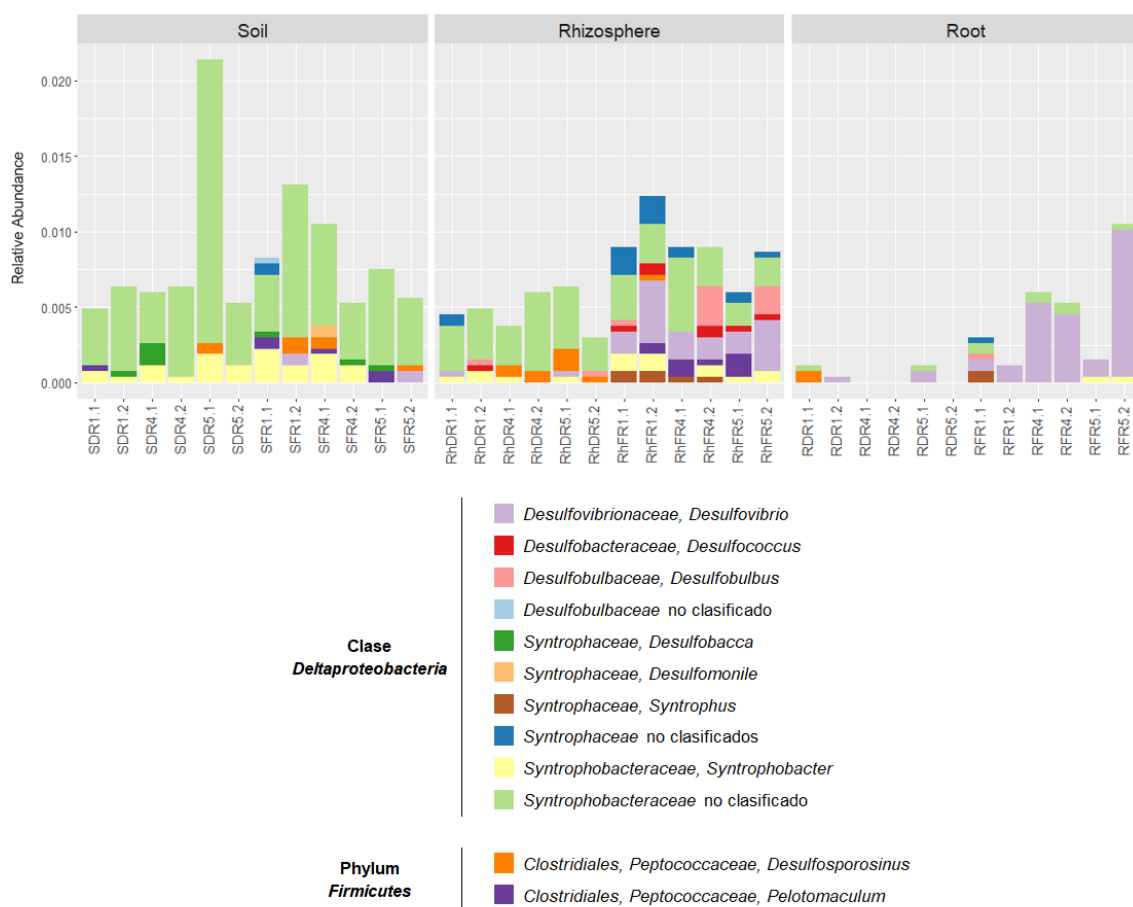
**Figura 3.6:** Composición y diversidad de las comunidades sulfato reductoras de rizósfera en los dos muestreos (diciembre y febrero), a partir de los perfiles de T-RFLP del gen *dsrAB*. Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad (a). P-valores obtenidos en los ANOVAs factoriales ( $\alpha=0.05$ ) realizados para cada índice, se indican en gris los p-valores  $<0.05$  (b). Las comparaciones de medias (Test de Tukey) se presentan en la Tabla 7.1 del Anexo 7

claramente las muestras de suelo, incluyendo algunas secuencias clasificadas como *Syntrophobacter* y otras *Syntrophobacteraceae* no clasificadas. En varios suelos se detectaron también otros géneros de BRS, como *Desulfosporosinus* y *Desulfobacca*, afiliados a la familia *Syntrophaceae*. Mientras las rizósferas de la etapa seca presentaron una composición de BRS similar a la encontrada en las muestras de suelo, las rizósferas inundadas presentaron una mayor diversidad de géneros. Luego de la inundación, en la rizósfera se encontró una mayor proporción de secuencias afiliadas a los géneros reductores de sulfato *Desulfovibrio*, *Desulfococcus* y *Desulfobulbus*.

En la etapa inundada del cultivo, algunas de estas BRS fueron capaces de colonizar la endósfera de las raíces de arroz. El género *Desulfovibrio* fue detectado en todas las muestras de raíces inundadas con abundancias entre 0.2 y 1 %. Asimismo, *Desulfobulbus* y *Syntrophobacter* también fueron detectados en el interior de las raíces inundadas, mientras que en una de las muestras de raíces de la etapa seca se detectó el género *Desulfosporosinus*.

De todos los géneros encontrados en este análisis, dos de ellos no han sido reportados como reductores de sulfato. El género *Syntrophus*, encontrado en las muestras de rizósfera inundadas, no es capaz de utilizar sulfato, sulfito u otros compuestos de azufre, y ha sido caracterizado como sintrófico estricto. En este género no se han detectado genes funcionales involucrados en la reducción de sulfato, aunque sí se han detectado en otros géneros de la familia *Syntrophaceae*. Por otro lado, el género *Pelotomaculum* encontrado en la etapa inundada en varias rizósferas y en algunos suelos, incluye bacterias sintróficas que no presentan la capacidad de reducir sulfato ni sulfito, pero sí se ha reportado la presencia del gen *dsrAB* en una especie de este género (Imachi et al. 2007).

No se encontraron secuencias afiliados al phylum *Thermodesulfobacteria* y al género *Thermodesulfovibrio* (phylum *Nitrospirae*), grupos taxonómicos que también han sido identificados como BRS. Otros géneros de *Firmicutes* capaces de utilizar compuestos de azufre diferentes al sulfato y cuyos genomas presentan el gen *dsrAB*, tampoco fueron encontrados en las muestras estudiadas (*Desulfitobacterium*, *Desulfitibacter*, *Carboxydotherrmus*, y la especie *Moorella thermoacetica*).



**Figura 3.7:** Abundancia relativa de géneros bacterianos (o máximo nivel taxonómico alcanzado) con capacidad potencial de reducir sulfato (contienen gen funcional *dsrAB*), presentes en las muestras de suelo, rizósfera y raíces de arroz en las dos etapas del cultivo. Los grupos taxonómicos fueron seleccionados a partir de datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA.

### 3.3.4. Composición y diversidad de las comunidades desnitrificantes asociadas al cultivo de arroz bajo diferentes sistemas de rotación

Se realizó la caracterización de las comunidades desnitrificantes tipo *nirS* mediante T-RFLP de este gen en muestras de rizósfera y raíces de los tres sistemas arroceros estudiados, con excepción de la muestra RFR4.3 a partir de la cual no fue posible amplificar este gen.

En el caso de la comunidad desnitrificante tipo *nirK*, a pesar de los intentos realizados para lograr la amplificación de este gen a partir de muestras de rizósfera y raíces, modificando diferentes variables de la PCR (concentración de reactivos, cantidad de ADN molde y ciclo de temperatura), sólo fue posible amplificar este gen de forma exitosa en las rizósferas de febrero. Para la mayoría de las muestras de rizósfera de diciembre la ampli-

ficación del gen *nirK* fue muy pobre y la cantidad de producto obtenida fue insuficiente para la aplicación de esta técnica. En cambio, en las raíces no se detectó amplificación del gen *nirK* bajo las condiciones ensayadas.

Por lo tanto, se presentan a continuación los resultados obtenidos para las comunidades desnitrificantes tipo *nirS* asociadas a la rizósfera y establecidas en el interior de las raíces de arroz en las dos etapas del cultivo (seca e inundada), y los resultados obtenidos para las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* asociadas a la rizósfera en la etapa inundada.

Las Figuras 3.3.4 y 3.10 muestran la composición de las comunidades desnitrificantes en base a los perfiles de T-RFLP obtenidos, donde los distintos fragmentos se identifican con las letras S y K para los genes *nirS* y *nirK*, respectivamente.

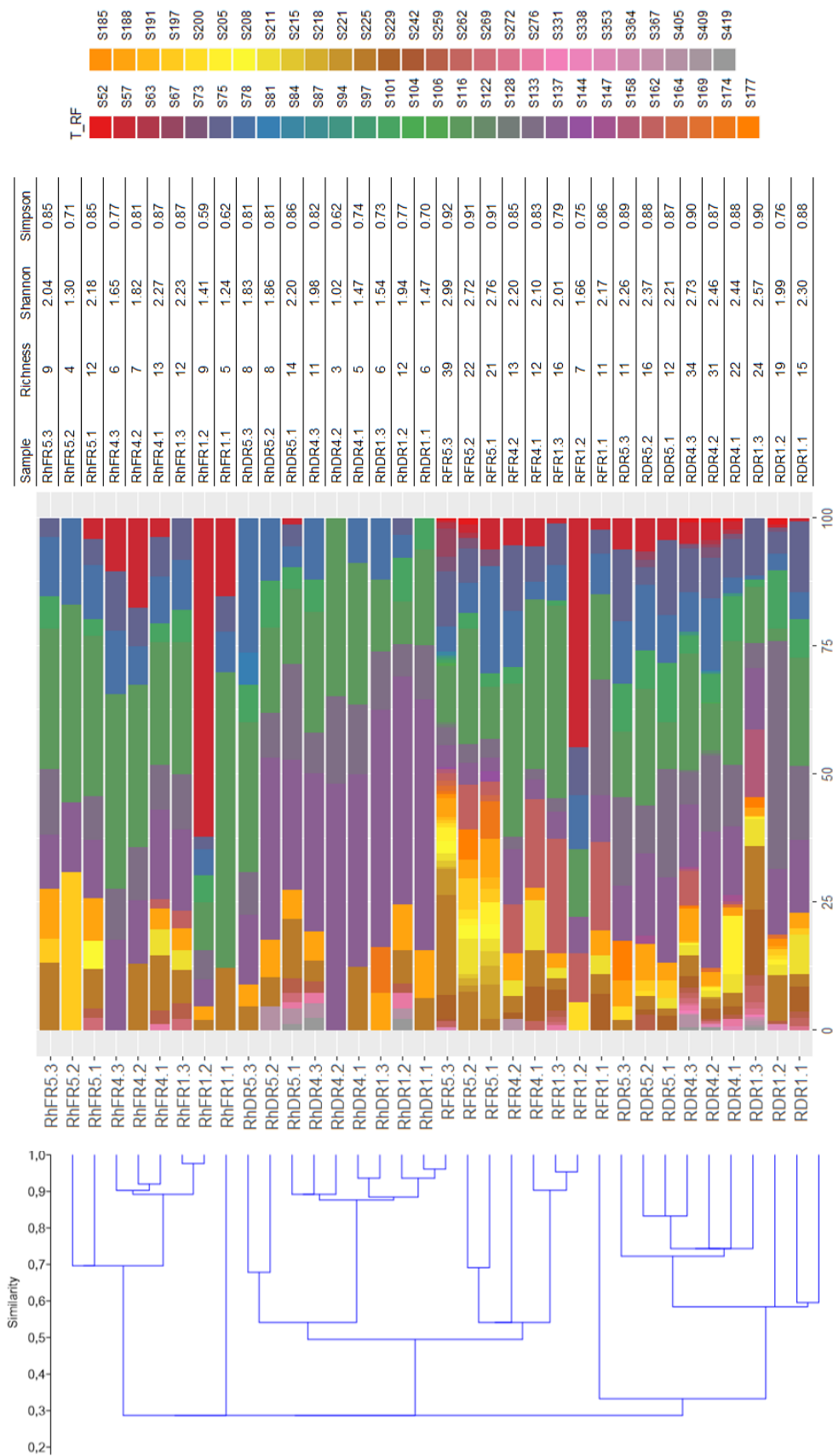
El T-RFLP del gen *nirS* permitió detectar 55 T-RFs cuyos tamaños se encontraron entre 52 y 419pb (Figura 3.8a). Los T-RFs más abundantes tanto en rizósfera como en raíz fueron S137, S133, S116 y S78. Dos de ellos, S133 y S78, presentaron abundancias similares para raíces y rizósferas (S133: 11 y 9%; S78: 8 y 9%, promedios para raíces y rizósferas respectivamente). Sin embargo, los T-RFs S137 y S116, presentaron abundancias menores en raíces que en rizósferas (S137: 11 y 24%; S116:18 y 26 %, promedios para raíces y rizósferas respectivamente). En el diagrama de Venn que se presenta en la Figura 3.9 se puede observar que se encontraron 35 T-RFs exclusivamente en el interior de las raíces, y de éstos, 19 se encontraron tanto en la etapa seca como en la etapa inundada del cultivo. En cambio, no se encontró ningún T-RF exclusivo de las rizósferas.

Los índices de diversidad determinados para cada muestra a partir de los resultados del T-RFLP del gen *nirS* se presentan en la Figuras 3.8a. Según los tres índices de diversidad utilizados, la comunidad desnitrificante tipo *nirS* presente en la endósfera de las raíces de arroz resultó significativamente más diversa que aquella asociada a la rizósfera (p-valores<0.0001 para riqueza y Shannon, p-valor=0.0005 para Simpson, Figura 3.8b). No se encontraron diferencias en la diversidad de las comunidades desnitrificantes tipo *nirS* de rizósfera con respecto a los sistemas de rotación ni a los muestreos realizados (p-valores>0.05, Figura 3.8c). Por el contrario, en el interior de las raíces, se observaron cambios significativos en la diversidad de estas poblaciones según las distintas rotaciones estudiadas (p-valores<0.05 para Shannon y Simpson, Figura 3.8c). La rotación arroz-soja (R5) presentó una población *nirS* significativamente más diversa que la rotación de arroz intensiva (R1) según los índices de Shannon y Simpson, mientras que la rotación tradicional con pasturas (R4) presentó valores de diversidad intermedios (Tabla 7.2 del Anexo 7). Asimismo, en las raíces, para el índice de Shannon se observó una interacción significativa entre la rotación y el muestreo (p-valor=0.0008, Figura 3.8c). Según este índice, las raíces de arroz en rotación con soja (R5) durante la etapa inundada del cultivo (febrero) presentaron la población más diversa de bacterias desnitrificantes tipo *nirS* (Tabla 7.3 del



Anexo 7).

Coincidentemente con estos resultados, el Análisis de Cluster (Figura 3.8a) realizado sobre los perfiles de T-RFLP del gen *nirS* mostró un agrupamiento claro de las muestras según el material de partida. De forma general, se puede decir que las comunidades desnitrificantes tipo *nirS* de rizósfera presentan una alta similitud entre sí, de entre 70 % y 90 %, mientras que en las comunidades endófitas de raíz la similitud disminuye al 55 %-60 %. Asimismo, tanto en rizósfera como en raíces, es posible diferenciar dos grupos correspondientes a las distintas etapas del cultivo.



(a) Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad

Rhizosphere		Root	
Diversity index	p-value (Material)	Root	Rhizosphere
Richness	<0.0001	18.75 a	8.33 b
Shannon	<0.0001	2.34 a	1.75 b
Simpson	0.0005	0.86 a	0.77 b

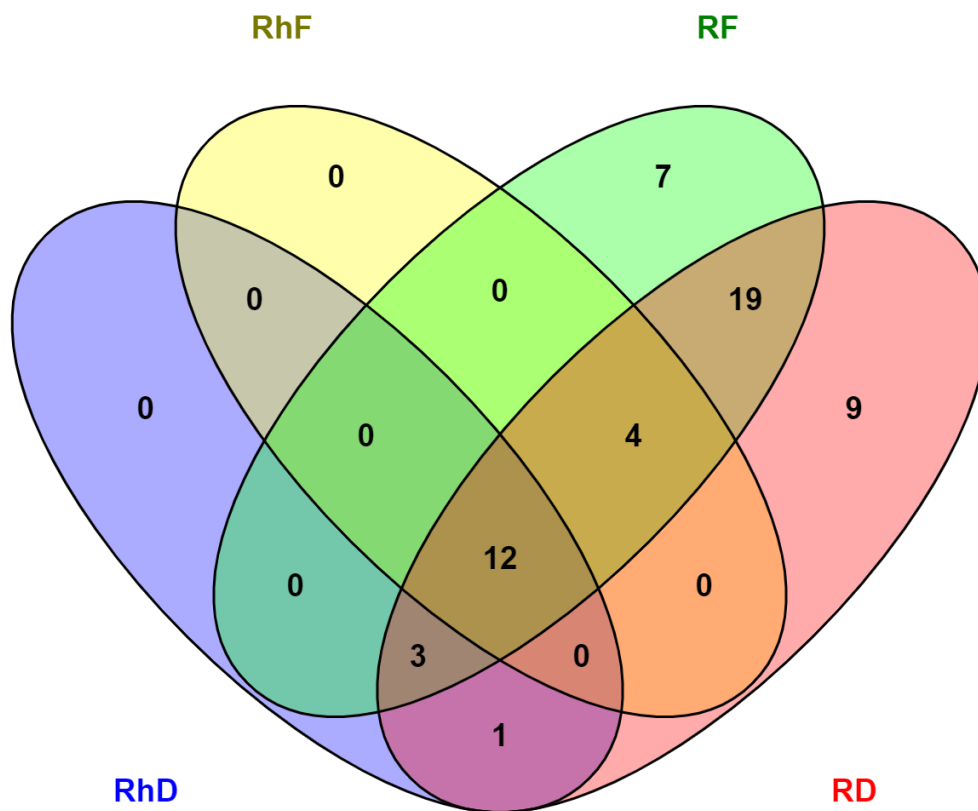
Rhizosphere		Root	
Diversity index	Crop Rotation	Sampling	Crop Rotation x Sampling
Richness	0.7705	0.8160	0.6876
Shannon	0.5058	0.6327	0.4748
Simpson	0.1356	0.7580	0.3367

Sample	Richness	Shannon	Simpson
RhFR5.3	9	2.04	0.85
RhFR5.2	4	1.30	0.71
RhFR5.1	12	2.18	0.85
RhFR4.3	6	1.65	0.77
RhFR4.2	7	1.82	0.81
RhFR4.1	13	2.27	0.87
RhFR1.3	12	2.23	0.87
RhFR1.2	9	1.41	0.59
RhFR1.1	5	1.24	0.62
RhDR5.3	8	1.83	0.81
RhDR5.2	8	1.86	0.81
RhDR5.1	14	2.20	0.86
RhDR4.3	11	1.98	0.82
RhDR4.2	3	1.02	0.62
RhDR4.1	5	1.47	0.74
RhDR1.3	6	1.54	0.73
RhDR1.2	12	1.94	0.77
RhDR1.1	6	1.47	0.70
RFR5.3	39	2.99	0.92
RFR5.2	22	2.72	0.91
RFR5.1	21	2.76	0.91
RFR4.2	13	2.20	0.85
RFR4.1	12	2.10	0.83
RFR1.3	16	2.01	0.79
RFR1.2	7	1.66	0.75
RFR1.1	11	2.17	0.86
RDR5.3	11	2.26	0.89
RDR5.2	16	2.37	0.88
RDR5.1	12	2.21	0.87
RDR4.3	34	2.73	0.90
RDR4.2	31	2.46	0.87
RDR4.1	22	2.44	0.88
RDR1.3	24	2.57	0.90
RDR1.2	19	1.99	0.76
RDR1.1	15	2.30	0.88

(b) ANOVAs y Tukey por material (c) P-valores de los ANOVAs factoriales

**Figura 3.8:** Composición y diversidad de las comunidades desnitrificantes tipo *nirS* de raíz y rizósfera en los dos muestreos (diciembre y febrero), a partir de los perfiles de T-RFLP de este gen. Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad (a). P-valores de los ANOVAs por material ( $\alpha=0.05$ ) y comparaciones de medias (Test de Tukey), para cada índice (b). P-valores de los ANOVAs factoriales ( $\alpha=0.055$ ) para cada índice, realizados de forma independiente para cada material (c). Se indican en gris los p-valores  $< 0.05$ . Las comparaciones de medias (Test de Tukey) según los factores rotación y muestreo se presentan en la Tabla 1 del Anexo 7.

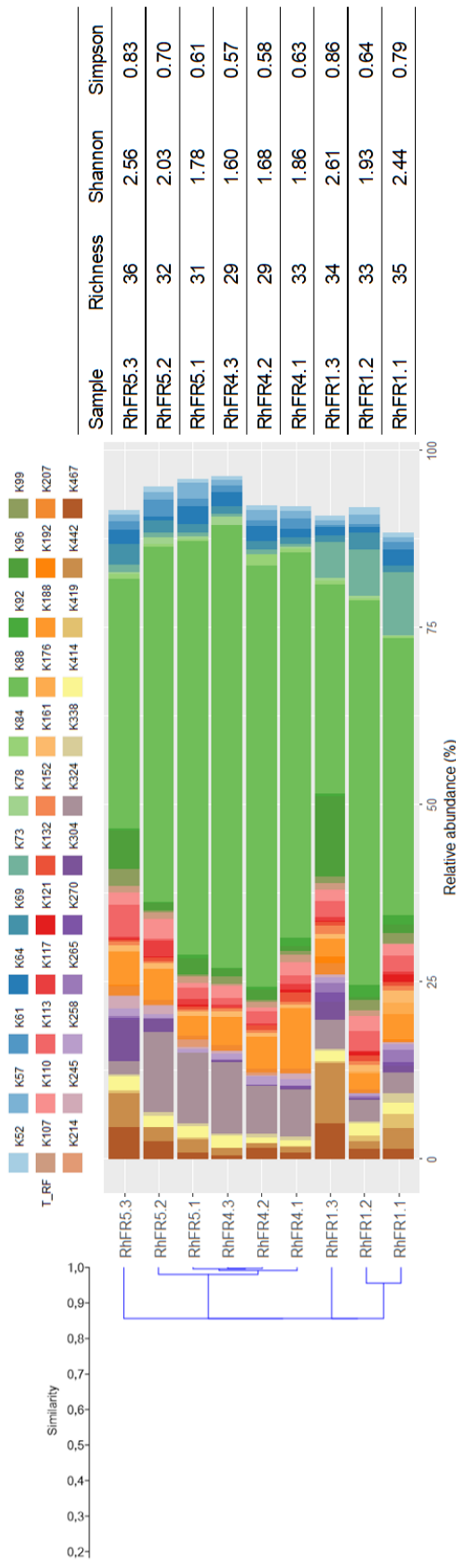


**Figura 3.9:** Diagrama de Venn de los T-RFs obtenidos en el análisis de T-RFLP del gen *nirS* de raíz y rizósfera en las dos etapas del cultivo, seca e inundada (diciembre y febrero). RhD: rizósferas de diciembre; RhF: rizósferas de febrero; RD: raíces de diciembre; RF: raíces de febrero.

La Figura 3.10a muestra la abundancia relativa de los T-RFs y el Análisis de Cluster realizado sobre los perfiles de T-RFLP de las comunidades desnitrificante tipo *nirK* asociadas a la rizósfera en la etapa inundada del cultivo, considerando aquellos fragmentos con abundancias relativas mayores al 1% en al menos una muestra. Se identificaron 36 T-RFs en el total de las muestras, con tamaños entre 52 y 467pb. Aunque el número de T-RFs por muestra fue alto (entre 29 y 36 T-RFs), el fragmento K88 fue el más abundante en todas las muestras, promediando una abundancia relativa del 49% (entre 30 y 62%).

No se encontraron diferencias significativas en la diversidad de las comunidades tipo *nirK* presentes en estas muestras de rizósfera según las diferentes rotaciones estudiadas (Figura 3.10b). Además, mediante el Análisis de Cluster se observó una alta similitud entre todas las muestras, cercana al 85% (Figura 3.10a).

Para relacionar algunos de los fragmentos obtenidos con secuencias presentes en bases de datos, los T-RFs encontrados para ambos genes, *nirS* y *nirK*, fueron comparados con los tamaños teóricos de los fragmentos obtenidos en los análisis *in silico*. Para realizar esta asignación es necesario tener en cuenta que varias especies cuyas secuencias están presentes en la base de datos utilizada (NCBI) presentan un mismo tamaño de fragmento teórico terminal. Solo unos pocos T-RFs obtenidos para el gen *nirK* en bajas abundancias coincidieron con los tamaños esperados para algunas especies, cuya información se resume en la Tabla 3.2.



Sample	Richness	Shannon	Simpson
RhFR5.3	36	2.56	0.83
RhFR5.2	32	2.03	0.70
RhFR5.1	31	1.78	0.61
RhFR4.3	29	1.60	0.57
RhFR4.2	29	1.68	0.58
RhFR4.1	33	1.86	0.63
RhFR1.3	34	2.61	0.86
RhFR1.2	33	1.93	0.64
RhFR1.1	35	2.44	0.79

(a) Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad

	Rhizosphere - February
Diversity index	Crop Rotation
Richness	0.2448
Shannon	0.1587
Simpson	0.1613

(b) P-valores de ANOVAs por rotación

**Figura 3.10:** Composición y diversidad de las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* de rizósfera en el muestreo de febrero, a partir de los perfiles de T-RFLP de este gen, considerando los T-RFs que presentaron una abundancia relativa mayor al 1% en al menos una muestra. Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad (a). P-valores de los ANOVAs por rotación ( $\alpha=0.05$ ) para cada índice (b).

T-RF encontrado (%)	Presente en muestras	Especie	T-RF teórico (pb)
K96 (0.4 – 11 %)	Todas*	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (AJ002516)	95
		<i>Rhizobium meliloti</i> (AJ224909)	
		<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (AJ224902)	
K270 (0.1- 1.3 %)	RhFR1.1; RhFR1.2; RhFR1.3; RhFR4.1; RhFR4.2; RhFR5.3	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (U62291)	270
K442 (0.6 – 8.5 %)	Todas*	<i>Azospirillum dobereineriae</i> (AY072263)	444
		<i>Azospirillum irakense</i> (AY072264)	

**Tabla 3.2:** Especies bacterianas que presentan fragmentos terminales (T-RFs) correspondientes a los obtenidos mediante T-RFLP del gen *nirK* en muestras de rizósfera del muestreo de febrero. \*Se refiere a todas las muestras de rizósfera de febrero.

### 3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estudio de la estructura de las comunidades de bacterias reductoras de sulfato (BRS) y bacterias desnitrificantes asociadas al cultivo de arroz fue abordado en este capítulo de la tesis mediante distintas herramientas moleculares (qPCR y T-RFLP de genes marcadores funcionales, y secuenciación masiva de genes 16S rRNA). Se estudió la dinámica de estos grupos microbianos en suelo, rizósfera y raíces de plantas de arroz a lo largo del ciclo del cultivo, así como también su impacto frente a la utilización de diferentes sistemas de rotación. Además, se evaluó la abundancia de arqueas metanogénicas en los distintos nichos y fases del cultivo ya que en este sistema las BRS pueden competir con estos microorganismos responsables de la producción biológica de metano.

**La inundación del cultivo tiene un fuerte impacto sobre la abundancia y la composición de las comunidades BRS asociadas al cultivo de arroz.**

Mediante qPCR del gen *dsrA* fue posible detectar y cuantificar BRS asociadas a las raíces de arroz, tanto rizosféricas como endófitas (Figura 3.1). Diferentes grupos taxonómicos conocidos como reductores de sulfato han sido encontrados previamente formando parte de las comunidades microbianas más fuertemente asociadas a la planta de arroz, tanto a nivel de la rizósfera como en la endósfera de las raíces (Ding et al. 2019; J. Edwards et al. 2015; Knief et al. 2012; Liechty et al. 2020), utilizando abordajes moleculares dirigidos a estudiar la totalidad de la comunidad bacteriana o enfocados en otros grupos funcionales como los fijadores de nitrógeno (Ferrando y Fernández Scavino, 2015). Sin embargo, la cuantificación de poblaciones de BRS asociadas al cultivo de arroz resulta novedosa ya que no se había reportado anteriormente su abundancia mediante metodologías independientes del cultivo en estos compartimientos específicos asociados a la planta.

Como era de esperar, la abundancia de BRS en suelo y en rizósfera resultó significativamente superior a las poblaciones establecidas como endófitas. Igualmente, fue posible detectar y cuantificar estas poblaciones en el interior de las raíces alcanzando valores de  $10^4$ - $10^5$  copias del gen *dsrA.g* de raíz fresca<sup>-1</sup>. Tanto las poblaciones de BRS rizosféricas como las endófitas aumentaron significativamente luego de la inundación, mientras que las presentes en suelo permanecieron estables. La mayor abundancia de estas poblaciones fue alcanzada a nivel de la rizósfera en la etapa de inundación, entre  $10^6$ - $10^7$  copias del gen *dsrA.g* de rizósfera seca<sup>-1</sup>, incluso superior a la encontrada en los suelos de esta misma etapa. Además, la rizósfera de la rotación más intensiva (R1) presentó una abundancia de BRS significativamente superior al resto de las rotaciones, particularmente en la etapa inundada del cultivo. Resulta interesante mencionar que, en ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio, BRS fueron detectadas mediante métodos de cultivo asociadas a plantas de arroz, en el orden de  $10^3.g^{-1}$  en rizósfera y  $10^2.g^{-1}$  en las raíces (datos no

mostrados).

En el cultivo de arroz, la mayor abundancia de BRS cultivables y la tasa más alta de reducción de sulfato han sido encontradas en zonas parcialmente oxigenadas o cercanas a éstas, como en la capa más superficial del suelo y en el suelo rizosférico, lo cual prueba que las BRS prefieren colonizar estas áreas donde los compuestos de sulfuro reducidos pueden ser re-oxidados (Wind y Conrad, 1995, 1997). Asimismo, ciertos sustratos que forman parte de los exudados de la raíz representan una importante fuente de nutrientes para los microorganismos que colonizan la rizósfera (Bacilio-Jiménez et al. 2003). Algunos ácidos orgánicos tales como malato, succinato y lactato, que están presentes en los exudados radiculares de arroz en altas concentraciones durante las etapas de floración y maduración (Aulakh et al. 2001), son sustratos ampliamente utilizados por las BRS (Pester et al. 2012). Estos aspectos particulares del sistema podrían explicar el aumento observado en las poblaciones de BRS asociadas a la planta luego de la inundación.

La técnica de qPCR de genes *dsrAB* (*dsrA* o *dsrB*) ha sido reportada previamente para abordar el estudio de las comunidades de BRS en suelos de arroz y para evaluar cómo se ven afectadas frente a diversos factores, como contaminantes (Y. R. Liu et al. 2014; H. Wang et al. 2016) y distintos regímenes de fertilización (X. Z. Liu et al. 2009). En uno de estos estudios realizado en China, X. Z. Liu et al. 2009 detectaron aproximadamente  $10^8$  copias del gen *dsrB.g* de suelo seco<sup>-1</sup> en un arrozal cuyas concentraciones de sulfato y materia orgánica fueron similares a las del presente trabajo (100µM de sulfato y 2,6% de materia orgánica), pero empleando una rotación intensiva con dos cultivos de arroz anuales. La concentración de sulfato y el contenido de materia orgánica han sido identificados como factores importantes que controlan la abundancia de BRS en arrozales (Pester et al. 2012; H. Wang et al. 2016). Los bajos valores de abundancia de BRS obtenidos en el presente trabajo en comparación con los resultados de X. Z. Liu et al. 2009 podrían indicar que otros aspectos relacionados al manejo del cultivo, por ejemplo, el régimen de fertilización, la duración de las condiciones de secano entre cultivos, y el uso de distintas rotaciones, podrían tener un efecto sobre la abundancia de estas poblaciones.

En el presente trabajo, se evaluó también la abundancia de arqueas metanogénicas en los distintos nichos asociados al cultivo mediante qPCR de genes *mcrA* (Figura 3.2). Esta determinación resulta relevante ya que, en presencia de sulfato, las BRS pueden competir con los metanogénicos, pero al mismo tiempo, mediante su actividad fermentadora, algunas BRS pueden establecer relaciones de cooperación sintrófica con estas arqueas. Como era esperado, la abundancia de metanogénicos aumentó significativamente luego de la inundación tanto en suelo como en rizósfera. El mayor incremento se observó a nivel de la rizósfera, donde se alcanzó el número más alto de estos microorganismos, entre  $10^6$  y  $10^7$  copias del gen *mcrA.g* de rizósfera seca<sup>-1</sup>, similar a lo reportado en rizósfera de



arroz en otros estudios (Liechty et al. 2020). Asimismo, en la etapa seca del cultivo, el suelo y la rizósfera de las rotaciones arroceras más intensivas (R1 y R5, arroz-continuo y arroz soja) presentaron abundancias de genes *mcrA* entre 10 y 100 veces superiores a las observadas en la rotación tradicional (menos intensiva) de arroz-pasturas (R4) (Figura 3.2). Estos resultados sugieren que el pasaje del sistema tradicional de rotación arroz-pasturas a sistemas con mayor grado de intensificación podría estimular la proliferación de las poblaciones metanogénicas en etapas tempranas del cultivo de arroz antes de la inundación, especialmente a nivel de la rizósfera. Esto es consistente con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo, en los cuales se reportó al inicio del ciclo del cultivo, mayores flujos de emisión de metano en arroz de segundo año en comparación con arroz proveniente de varios años de pasturas (datos no publicados).

Resulta particularmente interesante la detección y cuantificación de metanogénicos en la endósfera de las raíces inundadas (en el orden de  $10^4$ - $10^5$  copias del gen *mcrA.g* de raíz fresca<sup>-1</sup>), un compartimiento que podría ser considerado aeróbico. Algunos trabajos recientes que estudiaron la comunidad procariota total asociada al cultivo de arroz han encontrados metanogénicos en el interior de las raíces, incluso observando diferencias en sus abundancias relativas entre distintos compartimientos asociados a la raíz (J. Edwards et al. 2015) y entre diferentes cultivares (Liechty et al. 2020). Adicionalmente, un estudio reciente reportó el enriquecimiento de ciertos metanogénicos en la endósfera de plantas de arroz en comparación con otras plantas crecidas en el mismo sitio (J. Edwards et al. 2019), lo cual evidencia la asociación específica que existe entre algunas especies de metanogénicos y la planta de arroz.

El PCA realizado a partir de las abundancias de los genes marcadores funcionales y las características fisicoquímicas de los suelos, permitió comparar de forma global los diferentes suelos estudiados y su distribución con respecto a estos parámetros (Figura 3.5a). Aunque no es posible identificar diferencias claras entre los suelos de la etapa seca y la etapa inundada, se observa que los suelos inundados son más similares entre sí que los suelos en la etapa seca. La mayor abundancia de genes *mcrA* presente en los suelos inundados es uno de los parámetros que parece afectar esta distribución. Aunque en la etapa seca se observó una mayor variabilidad, los suelos de la rotación arroz-soja (R5) de esta etapa presentaron características similares a los suelos de la etapa inundada. Asimismo, los análisis de correlación muestran que la abundancia de genes *mcrA* en suelos presenta una fuerte correlación negativa con la concentración de fósforo y nitrato (Figura 3.5b). Una fuerte correlación entre el fósforo y las emisiones de metano ha sido reportada en varios estudios, aunque algunos de éstos sugieren una relación distinta a la encontrada en este trabajo, indicando que la actividad de estas poblaciones en arrozales disminuye bajo deficiencia de fósforo (Sheng et al. 2016) y puede ser levemente estimulada con el

agregado de este nutriente (Gao et al. 2020).

Mediante T-RFLP del gen *dsrAB*, se estudió la diversidad y los principales cambios en la composición de las comunidades BRS asociadas al cultivo de arroz. El hecho de no haber obtenido producto de amplificación en el caso las raíces, es coherente con el bajo número de copias del gen *dsrA* encontrado en estas muestras mediante qPCR. Los perfiles de T-RFLP obtenidos para las comunidades BRS rizosféricas fueron heterogéneos, no evidenciando diferencias claras con respecto a la etapa del cultivo o sistema de rotación (Figura 3.6). Se detectaron dos T-RFs comunes a la amplia mayoría de las muestras analizadas, de 61 y 72 pb (AB61 y AB72), lo que sugiere que estos fragmentos podrían corresponder a taxones reductores de sulfato asociados a la rizósfera de arroz. Según el análisis *in silico* de secuencias *dsrAB*, algunos T-RFs encontrados en bajas abundancias en las rizósferas podrían ser asignados a fragmentos teóricos obtenidos a partir de secuencias de organismos no cultivados provenientes de suelos de arroz (Müller et al. 2015), afiliadas al supercluster *Deltaproteobacteria* o al grupo *Firmicutes*. Sin embargo, los T-RFs más frecuentes en las muestras y/o aquellos con las mayores abundancias relativas no fue posible relacionarlos con los fragmentos teóricos esperados para microorganismos ya descritos.

Como fue explicado en el *Capítulo 1* de esta tesis, la base de datos de secuencias del gen *dsrAB* más completa fue construida por Müller et al. 2015 y utilizada en este trabajo para el análisis *in silico*. Una gran proporción de las secuencias contenidas en esta base de datos corresponde a secuencias que no han sido afiliadas a grupos taxonómicos descritos. Muchas de estas secuencias ambientales de genes *dsrAB* no clasificadas asignadas a linajes no cultivados provienen de distintos tipos de humedales, incluyendo arrozales (Pester et al. 2012). Esto pone en evidencia la existencia de una gran diversidad desconocida de potenciales BRS que habitan este tipo de ambientes y podría explicar, en parte, el hecho de no poder asignar la gran mayoría de los T-RFs obtenidos. Asimismo, a pesar de que la estrategia de amplificación utilizada (nested-PCR) ha sido empleada por otros autores como forma de recuperar una mayor diversidad de secuencias correspondientes a BRS (Colin et al. 2017; Giloteaux et al. 2013), los sesgos que introduce podrían haber afectado los resultados obtenidos.

De acuerdo a los índices de diversidad obtenidos y al análisis realizado, en general, la diversidad de las poblaciones de BSR rizosféricas no se verían afectadas por la rotación de cultivos (Figura 3.6). Sin embargo, en la rotación arroz-soja (R5) se observó un número de T-RFs significativamente superior al presente en la rotación con pasturas (R4), aunque esta diferencia no fue significativa para los demás índices de diversidad (Shannon y Simpson). Este resultado podría sugerir un efecto de la rotación con soja sobre la composición de las comunidades de BRS rizosféricas.

Varios autores han abordado el estudio de la estructura de las comunidades de BRS

en arrozales (Y. R. Liu et al. 2014; H. Wang et al. 2016; Wörner et al. 2016), pero la respuesta de estas comunidades frente a los cambios en los sistemas de producción aún permanece poco clara, en particular de aquellas que establecen una relación más fuerte con la planta. Lu et al. 2018 realizaron estudios genómicos de la comunidad de BRS en suelos de un sistema de rotación canola- arroz irrigado, observando una menor diversidad de la comunidad reductora de sulfato de suelo durante el cultivo de arroz. Esto demuestra la presión de selección que ejercen las condiciones del cultivo de arroz sobre estas comunidades de suelo. En esta línea, resultan interesantes los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a las BRS asociadas a la rizósfera de arroz, ya que sugieren que estas comunidades podrían verse afectadas, principalmente en su abundancia, no solamente por el propio cultivo de arroz, sino también por el uso previo del suelo.

En base al análisis del microbioma establecido en los distintos compartimientos asociados a la planta de arroz presentado en el *Capítulo 2*, fue posible identificar varios grupos taxonómicos conocidos como BRS o con la capacidad potencial de reducir sulfato (presencia de *dsrAB* en sus genomas) (Figura 3.7). El total de estos grupos constituyeron entre 0.5-1 % de la comunidad bacteriana de suelo y rizósfera de arroz, y entre 0.2-1 % de la comunidad endófito de raíz. Abundancias similares han sido reportadas en humedales de agua dulce, entre ellos arrozales, donde los taxones reductores de sulfato son encontrados con poca frecuencia o constituyendo menos del 1 % de la comunidad bacteriana del suelo (Pester et al. 2010). En las turberas, por ejemplo, la reducción de sulfato aparentemente está dirigida por especies de BRS presentes en baja abundancia, tales como *Desulfosporosinus*, *Desulfopila*, *Desulfomonile* y *Desulfovibrio* (Hausmann et al. 2016).

Considerando los taxones reductores de sulfato encontrados en este trabajo, el suelo de arroz se vio ampliamente dominado por la familia *Syntrophobacteraceae* y en menor medida la familia *Syntrophaceae*, al igual que la rizósfera en la etapa seca del cultivo. Luego de la inundación, se observó a nivel de la rizósfera un incremento tanto en la abundancia como en la diversidad de estos grupos de BRS, encontrándose además de estas familias bacterias de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfococcus* y *Desulfobulbus*.

El aumento en la abundancia relativa de estos grupos de BRS luego de la inundación en la rizósfera y en el interior de las raíces es coherente con los resultados obtenidos mediante qPCR que mostraron un incremento en el número de copias del gen *dsrA*. Sin embargo, la mayor diversidad de taxones BRS observada en la rizósfera luego de la inundación no se correspondió con un aumento significativo en la diversidad observada mediante el T-RFLP del gen *dsrAB*.

Miembros de la familia *Syntrophobacteraceae* han sido encontrados anteriormente en suelos de arroz (P. Liu y Conrad, 2017; Wörner et al. 2016) y también en otros humedales de agua dulce (Pester et al. 2012). Se sabe que las especies afiliadas a esta familia son

capaces de degradar el propionato de forma sintrófica, pero también utilizando el sulfato como aceptor final de electrones (Gan et al. 2012; Plugge et al. 2011), y fueron identificadas como las principales BRS degradadoras de propionato en suelo de arroz (P. Liu y Conrad, 2017). Sin embargo, no habían sido propuestas especies de *Syntrophobacteraceae* como acetotróficas hasta un estudio reciente de P. Liu et al. 2018. En este estudio, mediante análisis moleculares incluyendo RNA-SIP con acetato marcado, se identificaron miembros de esta familia como los principales reductores de sulfato degradadores de acetato en suelos de arroz, incluyendo *Syntrophobacter* spp. Entre la gran variedad de sustratos que pueden ser utilizados por la BRS, el acetato y el propionato resultan de particular interés por ser los principales intermediarios en la producción de metano en arrozales (Glissmann y Conrad, 2000). La familia *Syntrophobacteraceae* fue el taxón de BRS presente en mayor abundancia en el sistema estudiado en el presente trabajo. Fue el principal grupo de BRS en suelo y rizósfera (0.3-1.5 % del total de la comunidad), y luego de estabilizadas las condiciones anóxicas en el sistema, también fue encontrado formando parte del microbioma endófito de raíces (0.1 %). Si bien algunas bacterias de esta familia podrían estar oxidando materia orgánica de forma incompleta dejando acetato como producto y favoreciendo la metanogénesis acetoclástica, en presencia de sulfato en estos nichos, BRS acetotróficas de la familia *Syntrophobacteraceae* podrían estar compitiendo exitosamente por el acetato con microorganismos metanogénicos.

*Desulfovibrio* fue claramente el género de BRS dominante en la comunidad bacteriana endófito de las raíces inundadas, aunque también fueron detectadas en menores proporciones en este compartimiento secuencias afiliadas a las familias *Syntrophobacteraceae* y *Syntrophaceae*, y al género *Desulfobulbus*. En trabajos previos realizados en nuestro grupo, el género *Desulfovibrio* fue reportado como parte de la comunidad endófito fijadora de nitrógeno en raíces de plantas de arroz inundado (Ferrando y Fernández Scavino, 2015). Además, este género fue encontrado recientemente formando parte de la comunidad diazotrofa endófito de plantas de tomate (Collavino et al. 2020) lo cual muestra que su habilidad para colonizar los tejidos vegetales no estaría restringida a plantas que crecen en suelos inundados. Es probable que la capacidad de fijar nitrógeno que presentan varias especies del género *Desulfovibrio* (Postgate y Kent, 1985) sea una ventaja fundamental a la hora de establecerse como endófitos representando un beneficio directo para la planta.

Tanto *Desulfococcus* como *Desulfobulbus*, detectados anteriormente en suelos de arroz (Scheid et al. 2004; Stubner, 2004; Wörner et al. 2016), son capaces de utilizar propionato como dador de electrones para la reducción de sulfato, mientras que *Desulfovibrio*, utiliza típicamente H<sub>2</sub>, lactato y alcoholes, pero no es capaz de utilizar propionato (Rabus et al. 2013). La mayoría de las especies de *Desulfobulbus* también son capaces de utilizar H<sub>2</sub> como dador de electrones (Rabus et al. 2013), lo que implica que este género podría tener

una relación sintrófica con *Syntrophobacteraceae* en la rizósfera bajo inundación e incluso en la endósfera de las raíces.

Especies afiliadas a las familias *Desulfovibrionaceae* y *Desulfobulbaceae* fueron encontradas en una fuerte relación de co-ocurrencia con *Syntrophobacteraceae* en suelos de arroz alimentados con propionato y sulfato (P. Liu y Conrad, 2017). Según este estudio, bacterias de las familias *Desulfovibrionaceae* (principalmente *Desulfovibrio* spp) y *Syntrophobacteraceae* formarían una relación sintrófica estable en estos suelos, con *Syntrophobacteraceae* oxidando propionato a acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (o formiato), y *Desulfovibrionaceae* utilizando H<sub>2</sub> (o formiato) para la reducción de sulfato. Aunque se sabe que las tasas de reducción de sulfato en suelos de arroz pueden llegar a ser relativamente altas, aún no están claras las relaciones metabólicas existentes entre distintas BRS y con otros grupos microbianos bajo condiciones de campo. No obstante, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que podría existir relaciones metabólicas entre distintas BRS también en el microbioma endófito de las raíces de arroz, particularmente entre *Desulfovibrio* spp. y *Syntrophobacteraceae*.

**Las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* y tipo *nirS* rizosféricas y endófitas presentan distinta dinámica a lo largo del cultivo y frente a diferentes sistemas de rotación.**

Los microorganismos desnitrificantes constituyen un grupo microbiano de relevancia en sistemas agrícolas, ya que su actividad puede conducir a importantes pérdidas de nitrógeno, un nutriente fundamental para el desarrollo de los cultivos. Para determinar como se ven afectadas las comunidades desnitrificantes asociadas al cultivo de arroz por el hábitat generado en distintos nichos asociadas a la planta y estudiar su dinámica a lo largo del ciclo de cultivo, en este trabajo se caracterizaron las poblaciones desnitrificantes tipo *nirS* y tipo *nirK* en suelo, rizósfera y endósfera de raíces de arroz en distintas etapas del cultivo. Además, se evaluó como estas comunidades responden frente al uso de diferentes sistemas de rotación de cultivos.

La abundancia de los genes *nirS* y *nirK*, determinada por qPCR, mostró que las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* presentaron mayores abundancias que las desnitrificantes tipo *nirS* tanto en suelo como en rizósfera y raíces de arroz (Figura 3.3). Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Azziz et al. 2017 quien estudió la abundancia y estructura de las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* y tipo *nirS* en distintos suelos de arroz uruguayos. En conjunto, los resultados de Azziz et al. 2017 y los obtenidos en el presente trabajo confirman que las comunidades desnitrificantes asociadas al sistema de cultivo uruguayo serían dominadas por desnitrificantes tipo *nirK*. Asimismo, de acuerdo a los resultados de este trabajo, la dominancia de las poblaciones tipo *nirK* en las comunidades desnitrificantes de arrozales no solamente se presenta a nivel del suelo como

ha sido observado en varios estudios previos (Azziz et al. 2017; Z. Chen et al. 2010; M. Yoshida et al. 2009, 2010) y también en el presente trabajo, sino que podría mantenerse a nivel de la rizósfera e incluso en la comunidad desnitrificante endófito de raíz. Por el contrario, otros trabajos han reportado mayores abundancias de genes *nirS* que de genes *nirK* en suelos de arroz (Jin et al. 2020; H. Wang et al. 2017). Esta discrepancia puede estar relacionada con las propiedades del suelo y con las condiciones climáticas, ya que la estructura de estas poblaciones depende fuertemente de estos factores (H. Wang et al. 2017). Dada la menor probabilidad que presentan los microorganismos desnitrificantes tipo *nirK* de contener en sus genomas alguna de las variantes del gen *nosZ* y por lo tanto completar el proceso de desnitrificación hasta  $N_2$  (Graf et al. 2014; Hallin et al. 2018), la dominancia de poblaciones desnitrificantes tipo *nirK* observada presenta gran relevancia con respecto al posible impacto ambiental del sistema, ya que estas poblaciones podrían contribuir en mayor medida a las emisiones de  $N_2O$  que los desnitrificantes tipo *nirS*.

En general, los resultados de abundancias de genes obtenidos son inferiores a los reportado en suelo y rizósfera de arroz en varios estudios (Azziz et al. 2017; Ji et al. 2020; Jin et al. 2020; H. Wang et al. 2017; M. Yoshida et al. 2009); sin embargo, estos resultados previos varían dentro de un rango bastante amplio (entre  $10^6$ - $10^9$  copias del gen *nirS*.g suelo seco<sup>-1</sup>, entre  $10^5$ - $10^{10}$  copias del gen *nirS*.g suelo seco<sup>-1</sup>). Comparando la abundancia de las poblaciones desnitrificantes presentes en los distintos compartimientos, la mayor abundancia de desnitrificantes tipo *nirS* se encontró en la rizósfera (entre  $10^6$  y  $10^7$  copias del gen *nirS*.g rizósfera seca<sup>-1</sup>), mientras que los valores más altos de desnitrificantes tipo *nirK* se observaron a nivel del suelo (entre  $10^8$  y  $10^9$  copias del gen *nirK*.g suelo seco<sup>-1</sup>) (Figura 3.3). El PCA realizado sobre todas las muestras de la etapa inundada según la abundancia de distintos genes funcionales (Figura 3.4b) permitió diferenciar las comunidades presentes en rizósfera, siendo la alta abundancia de genes *nirS* una de las variables que más aportó en esta separación, mientras que la alta abundancia *nirK* diferenció claramente las comunidades de suelo de las establecidas en el resto de las muestras. Asimismo, se observó una fuerte correlación negativa entre la abundancia de genes *nirK* y *nirS* en suelo (Figura 3.5b). Esto resultados sugieren que los exudados radiculares de la planta de arroz podrían estimular la proliferación de las poblaciones desnitrificantes tipo *nirS*, pero no las poblaciones tipo *nirK*.

Estudios anteriores han encontrado que los desnitrificantes tipo *nirS* se ven favorecidas en suelos ricos en carbono orgánico (Enwall et al. 2010; Hou et al. 2018; Jin et al. 2020). Hou et al. 2018 identificaron las comunidades desnitrificantes de rizósfera de plantas de trigo que son capaces de utilizar activamente carbono derivado de raíces, encontrando un incremento en la abundancia de las poblaciones activas tipo *nirS* a nivel de la rizósfera en comparación con el suelo, mientras que las poblaciones tipo *nirK* activas fueron

igualmente abundantes en suelo y en rizósfera. Una tendencia similar ha sido observada en la rizósfera de otras plantas en humedales, donde se encontró una correlación positiva entre la concentración de los ácidos acético y succínico con la riqueza de desnitrificantes tipo *nirS*, pero no con los tipo *nirK*, mostrando que los desnitrificantes tipo *nirS* y *nirK* podrían tener diferentes preferencias de sustratos (Wu et al. 2009). Igualmente, cabe señalar que algunos estudios recientes realizados en arrozales no identificaron diferencias claras en la abundancia de las poblaciones desnitrificantes tipo *nirK* y *nirS* entre rizósfera y suelo (Jin et al. 2020; Tang et al. 2019).

La abundancia de genes *nirK* encontrada en los suelos del presente trabajo correlacionó negativamente con el contenido de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3.5b). La baja concentración de  $\text{NO}_3^-$  encontrada en los suelos inundados (<1 ppm, Tabla 2.3) es habitual en arrozales (X. Wei et al. 2019), debido a que el cultivo de arroz es normalmente fertilizado con  $\text{N-NH}_4^+$  (como por ej. urea), y la producción de  $\text{NO}_3^-$  vía nitrificación se ve limitada bajo las condiciones anóxicas establecidas con la inundación. Además, el  $\text{NO}_3^-$  es de los primeros aceptores de electrones que se consumen en condiciones de inundación. Dada la alta abundancia de genes *nirK* encontrada en los suelos del presente trabajo, particularmente en la etapa inundada del cultivo (Figura 3.3), podríamos suponer que estas poblaciones desnitrificantes tipo *nirK* presentan un perfil más amplio de utilización de sustratos que las poblaciones tipo *nirS*, o una mayor variedad de capacidades metabólicas que les permiten proliferar en este ambiente sin la necesidad de utilizar  $\text{NO}_3^-$ . Posiblemente, estas poblaciones *nirK* de suelo no estarían activamente involucradas en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  en el sistema estudiado. Distintos estudios han explorado la correlación entre la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  y la abundancia de las comunidades desnitrificantes de suelo mostrando que no siempre existe una correlación clara entre estos parámetros (Putz et al. 2018; Yin et al. 2015; Yin et al. 2017). Se debe considerar no solamente que las bacterias desnitrificantes son capaces de obtener energía a través de otros mecanismos distintos a la reducción de nitrato, sino también que existen múltiples procesos microbianos que producen  $\text{N}_2\text{O}$ , como fue explicado en la *Introducción General* de esta tesis.

La abundancia de las poblaciones tipo *nirS* resultó relativamente estable en cada uno de los nichos estudiados frente a la inundación del cultivo, así como también en los distintos sistemas de rotación estudiados (Figura 3.3a). Sin embargo, mediante T-RFLP del gen *nirS* se observaron efectos significativos de estos factores sobre la composición y diversidad de las poblaciones desnitrificantes tipo *nirS* asociadas a la rizósfera y establecidas en el interior de las raíces de arroz (Figura 3.3.4). Aunque la comunidad tipo *nirS* endófito presentó la menor abundancia ( $10^4$ - $10^5$  copias del gen *nirS.g* de raíz fresca<sup>-1</sup>), resultó significativamente más diversa que la establecida en rizósfera. Un gran número de T-RFs fueron identificados exclusivamente en las raíces, mientras que todos los T-RFs

presentes en rizósferas también fueron encontrados en las raíces (Figura 3.9). Entre los fragmentos más abundantes, encontramos algunos con proporciones similares en raíces y rizósferas (133 y 78 pb, S133 y S78, respectivamente), mientras que otros presentaron menores abundancias relativas en las raíces (137 y 116pb, S137 y S116, respectivamente). Estos resultados muestran que existiría una amplia diversidad de desnitrificantes tipo *nirS* establecidos en la endósfera de las raíces de arroz. Algunos de ellos formarían una parte importante de la comunidad desnitrificante rizosférica y presentarían diferente capacidad de colonizar el interior de las raíces. Otros, quizás, podrían estar presentes en abundancias muy bajas en rizósfera, podrían haber colonizado las raíces en las primeras etapas del crecimiento de la planta, o incluso podrían ser parte de la comunidad microbiana endófito de la semilla ya que se conoce que la semilla de arroz es una importante fuente de bacterias endófitas (Hardoim et al. 2012). Según el Análisis de Cluster realizado sobre los perfiles de T-RFLP del gen *nirS*, dentro de cada compartimiento (rizósfera y endósfera), las comunidades desnitrificantes tipo *nirS* se agruparon según las distintas etapas del cultivo. Las poblaciones desnitrificantes tipo *nirS* endófitas de raíz resultaron más diferentes entre sí que las rizosféricas y su diversidad se vio incrementada en la rotación arroz-soja (Figura 3.3.4). Diversas bacterias desnitrificantes que poseen el gen *nirS* han sido recuperadas a partir de arrozales, incluyendo bacterias fijadoras de nitrógeno afiliadas a los géneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* (Ishii et al. 2011). Varias especies pertenecientes a estos géneros son conocidos endófitos de raíces de arroz, pero también son capaces de asociarse a otras plantas como las leguminosas (Hardoim et al. 2015; Mano y Morisaki, 2008), por lo que podríamos suponer que la incorporación del cultivo de soja en la rotación podría favorecer un aumento en la diversidad de las poblaciones desnitrificantes tipo *nirS* endófitas.

Tanto la inundación del cultivo como los distintos sistemas de rotación tuvieron un efecto significativo en la abundancia de las poblaciones desnitrificantes tipo *nirK* presentes en los distintos nichos estudiados (Figura 3.3b). La inundación afectó de forma diferente la abundancia de estas poblaciones en los distintos compartimientos, disminuyendo a nivel de la rizósfera y aumentando significativamente en el interior de las raíces. Asimismo, las comunidades endófitas de la rotación arroz continuo (R1) presentaron una abundancia de genes *nirK* significativamente superior al resto de las rotaciones, indicando que un sistema de rotación con mayor frecuencia de arroz podría estimular la colonización de las raíces por parte de desnitrificantes tipo *nirK*. De acuerdo con el análisis de T-RFLP, las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* establecidas en rizósfera de arroz en la etapa inundada de las diferentes rotaciones presentaron una alta similitud y estarían dominadas por unos pocos integrantes (Figura 3.10). El T-RF de 88pb (K88) fue el fragmento más abundante en todas las rizósferas con una abundancia relativa del 49 %, por lo cual este



fragmento podría corresponder a taxones desnitrificantes tipo *nirK* que dominan en este ambiente. Aunque algunos T-RFs encontrados en este análisis en menores abundancias relativas, coincidieron con los tamaños esperados para distintas especies de *Rhizobiales* según el análisis *in silico*, entre ellos *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum* spp (Tabla 3.2), este T-RF dominante no pudo ser asignado.

Es sabido que no es posible inferir la capacidad desnitrificante de un microorganismo por su identidad taxonómica. No obstante, resulta de interés considerar algunos grupos taxonómicos encontrados mediante el análisis de secuenciación masiva de genes 16S rRNA presentado en el *Capítulo 2* de esta tesis, dado que la capacidad desnitrificante es altamente frecuente dentro de algunos taxones.

Entre los grupos dominantes en rizósfera y raíces se encontraron bacterias de las clases *Alpha* y *Betaproteobacteria*, principalmente afiliadas a los órdenes *Rhizobiales* dentro de las alfa, *Burkholderiales* y *Rhodocyclales* dentro de las beta. Entre los géneros con mayor abundancia dentro estos órdenes, se encontraron *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* y *Dechloromonas*. Estos grupos microbianos incluyen una gran variedad de bacterias que contienen genes relacionados al proceso de desnitrificación (Graf et al. 2014; Shapleigh, 2013) y se han identificado por metodologías dependientes del cultivo bacterias pertenecientes a estos órdenes involucradas en la desnitrificación en arrozales (Tago et al. 2011). Mediante el estudio de un alto número de genomas disponibles de microorganismos desnitrificantes, Graf et al. 2014 encontraron que dentro de las alfaproteobacterias la frecuencia de genes *nirK* es ampliamente superior a la de genes *nirS*, debido principalmente a la alta frecuencia de genes *nirK* encontrada en el orden *Rhizobiales*, mientras que en los órdenes *Burkholderiales* y *Rhodocyclales* la frecuencia de genes *nirS* y *nirK* fue similar.

De acuerdo a los resultados presentados en el *Capítulo 2*, entre los grupos dominantes del microbioma endófito de raíz luego de la inundación del cultivo se encontraron taxones afiliados al orden *Rhizobiales*, algunos de ellos afiliados al género *Bradyrhizobium* (Figura 2.17, *Capítulo 2*). Esto podría explicar el aumento en la abundancia de genes *nirK* en este compartimiento luego de la inundación (Figura 3.3b). De hecho, distintas especies de *Bradyrhizobium* han sido reportadas como endófitas de raíces de arroz (Mano y Morisaki, 2008; Yousefi y Hasanzadeh, 2019), y en varias cepas de la especie *B. japonicum* fue verificada la presencia de genes *nirK* (Sameshima-Saito et al. 2006). Es importante destacar, además, la capacidad que presentan varias bacterias del orden *Rhizobiales* de realizar la fijación biológica de nitrógeno. *Bradyrhizobium* sp. fue identificada previamente como parte de la comunidad diazotrofa endófitas de raíces de arroz (Ferrando y Fernández Scavino, 2015). Probablemente, la alta proporción de *Rhizobiales* en el microbioma endófito se relacione con esta propiedad promotora del crecimiento vegetal, ya que le aporta una ventaja competitiva que puede contribuir a establecer interacciones benéficas con la

planta.

Asimismo, varias especies de *Rhizobiales* fijadores de nitrógeno, conocidos conjuntamente como rizobios, poseen la habilidad de inducir la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas entre ellos el género *Bradyrhizobium* (Hardoim et al. 2015). La gran abundancia de genes *nirK* encontrada en los suelos de la rotación arroz-soja (R5) en la etapa óxica del cultivo (Figura 3.3b) podría estar relacionada a un aumento en el número de rizobios, que poseen genes *nirK*, provenientes del cultivo de soja previo al arroz. Este resultado sugiere que la incorporación del cultivo de soja en la rotación con arroz podría incrementar las poblaciones desnitrificantes tipo *nirK* en suelo, y por ende favorecer la emisión de N<sub>2</sub>O cuando ocurre la transición hacia las condiciones anóxicas.

Entre los grupos dominantes en la comunidad bacteriana de rizósfera se encontró el género *Dechloromonas* (aprox. 2% de la comunidad bacteriana rizosférica) (Figura 2.17, Capítulo 2). Este género está formado por bacterias anaerobias facultativas con un metabolismo estrictamente respiratorio, conocidas por su capacidad de reducir clorato y perclorato, pero también nitrato y nitrito. Distintas especies de este género fueron detectadas como dominantes y activas en la comunidad bacteriana asociada a raíces de arroz cuando se suministra nitrato bajo condiciones anóxicas (Scheid et al. 2004). Dentro de la comunidad endófito diazótropa de raíces de arroz inundadas, este género fue encontrado entre los dominantes representando el 16% de las secuencias de *nifH* obtenidas mediante clonado y 5% de abundancia relativa mediante pyrosecuenciación de este gen (Ferrando y Fernández Scavino, 2015). Asimismo, el estudio del genoma de *Dechloromonas aromatica* mostró su habilidad para llevar a cabo el proceso de desnitrificación completa, presentando dos copias del gen *nirS* y dos copias del gen *nosZ* (Graf et al. 2014; Jones et al. 2008). Por lo tanto, este género podría estar contribuyendo a la alta abundancia de genes *nirS* encontrada en rizósfera (Figura 3.3a).



# CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Como fue descrito anteriormente, el cultivo de arroz irrigado presenta dos fases bien diferenciadas en su ciclo de cultivo: seca e irrigada. En la etapa inundada, aunque el suelo se mantiene en condiciones anóxicas durante la etapa inundada del ciclo de cultivo, la liberación de oxígeno a través de las raíces de la planta genera un ambiente parcialmente óxico a nivel de la rizósfera que sostiene procesos microbianos tanto aerobios como anaerobios. Estas características llevan a que sea necesario considerar distintos factores a la hora de estudiar las comunidades microbianas asociadas a este cultivo, tanto aspectos espaciales a nivel de los distintos compartimientos asociados a las raíces, como también temporales considerando las dos condiciones de manejo de agua que ocurren durante el ciclo de cultivo como también los cambios fisiológicos que atraviesa la planta durante su desarrollo.

El trabajo desarrollado en esta tesis abordó distintos aspectos de las comunidades bacterianas asociadas al cultivo de arroz. Se estudió el microbioma bacteriano de suelo, endofítico y rizosférico de raíces de arroz, y se seleccionaron dos grupos fisiológicos anaerobios de relevancia ambiental, como son las bacterias reductoras de sulfato (BRS) y las bacterias desnitrificantes, para estudiar su abundancia, diversidad y composición. La optimización y aplicación de diferentes técnicas moleculares, en combinación con herramientas de análisis bioinformático y estadístico, permitió estudiar la dinámica de estas comunidades a lo largo del ciclo de cultivo y evaluar cómo se ven impactadas por la utilización de sistemas de rotación de cultivos con distinto grado de intensificación.

Los máximos rendimientos alcanzados en los últimos años con el sistema clásico de rotación arroz-pastura y el aumento en la rentabilidad de otros sistemas agrícolas, han favorecido el desarrollo de sistemas de producción más intensivos en el cultivo de arroz. En este contexto, resulta vital comprender las modificaciones que pueden ocurrir en las poblaciones microbianas presentes tanto en el suelo como asociadas a la planta, ya que éstas juegan un papel fundamental en la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas agrícolas. El aumento en la frecuencia de arroz o la incorporación de soja en el sistema de

rotación de cultivos, constituyen sistemas productivos más intensivos que la tradicional rotación arroz-pastura, y se presentan actualmente como una alternativa para incrementar la productividad del sistema. En este trabajo se estudiaron las comunidades bacterianas asociadas a plantas de arroz provenientes de un ensayo a campo, cultivadas bajo tres sistemas de rotaciones de cultivos contrastantes respecto al grado de intensificación: rotación tradicional arroz-pastura (R4), arroz continuo (R1) y rotación arroz-soja (R5).

Cuando comparamos la estructura de los microbiomas únicamente de suelo y rizósfera, se encontraron diferencias significativas con respecto a las distintas rotaciones evaluadas (*Capítulo 2*). Fue posible identificar que la rotación más intensiva de arroz-continuo presentó una comunidad rizosférica distinta a la establecida en el resto de las rizósferas, en ambas etapas del cultivo (seca e inundada). Aunque no se encontraron diferencias en los grupos taxonómicos dominantes que componen el microbioma asociado a las raíces provenientes de los distintos sistemas de rotación, se detectaron algunos taxones minoritarios que podrían ser susceptibles a estos cambios en la intensificación. Mediante un análisis de especies indicadoras (IndVal), se identificaron varias OTUs fuertemente asociadas a alguna de las rotaciones arroceras. OTUs del phylum *Acidobacteria* se encontraron principalmente asociadas a la rizósfera de la rotación arroz-pasturas, mientras que varios taxones anaerobios de la clase *Deltaproteobacteria* se asociaron fuertemente a la rotación de arroz continuo, incluyendo *Geobacter*, *Syntrophobacteraceae* y *Myxococcales* en la rizósfera, y *Anaeromyxobacter* en el interior de las raíces. Estos resultados muestran que el microbioma asociado a las raíces de arroz, principalmente a nivel de la rizósfera, podría ser susceptible al aumento en la intensificación del sistema de producción. Considerando que los sistemas de rotación utilizados en esta tesis aún se encontraban en etapa de estabilización, estos resultados impulsan la necesidad de continuar estudiando el comportamiento del microbioma en estos sistemas productivos para confirmar cómo puede verse afectado por el uso de estas prácticas agrícolas.

Los principales factores que dirigen la estructura de las comunidades microbianas estudiadas en este trabajo fueron el nivel de influencia de la planta sobre los distintos nichos asociados a las raíces (suelo, rizósfera y endósfera) y la etapa del ciclo óxico-anóxico producido por el efecto de la inundación (*Capítulo 2*). Las comunidades bacterianas establecidas en los distintos compartimientos fueron claramente diferentes, presentando diferentes phyla dominantes. Mientras las comunidades del suelo desnudo (*bulk soil*) se vieron dominadas por bacterias de los phyla *Acidobacteria* (23%), *Proteobacteria* (23%), *Actinobacteria* (14%), *Verrucomicrobia* (11%) y *Chloroflexi* (11%), el microbioma rizosférico se vio marcadamente enriquecido en bacterias de los phyla *Proteobacteria* (37%), principalmente *Beta* y *Deltaproteobacteria*, y *Bacteroidetes* (9%). Asimismo, la comunidad rizosférica resultó significativamente más diversa que las de suelo y raíces. Por su parte,

la endósfera de las raíces presentó el microbioma más diferente con respecto a los demás nichos estudiados, dominado ampliamente por proteobacterias (66 %), principalmente por las clases *Alpha*, *Beta* y *Gammaproteobacteria*, y también *Firmicutes* (15 %), mayormente afiliados al orden *Clostridiales*.

Diversas bacterias anaerobias fueron capaces de establecer interacciones fuertes y estables con la planta de arroz a lo largo del ciclo del cultivo (*Bacteroidales*, *Clostridium*, *Anaeromyxobacter*, *Geobacter*, *Desulfovibrio*, entre otras), algunas inclusive en etapas tempranas del cultivo previo a que se establecieran las condiciones completamente anóxicas en el sistema. El microbioma rizosférico presentó la mayor abundancia relativa de la clase *Deltaproteobacteria*, conocida por comprender una gran variedad de bacterias anaerobias, muchas de ellas reductoras de sulfato. Al igual que lo observado en estudios previos para otros grupos microbianos, la inundación del cultivo representó un fuerte impacto sobre la estructura de las poblaciones de BRS que se asocian de forma más estrecha a las raíces de la planta, incrementando significativamente su abundancia tanto en rizósfera como en el interior de las raíces, de acuerdo a los resultados de la cuantificación del gen funcional *dsrA* (Capítulo 3). Una tendencia similar se observó para las arqueas metanogénicas cuantificadas mediante qPCR del gen funcional *mcrA*, aumentando su abundancia en suelo y en rizósfera luego de la inundación, y alcanzando valores detectables y cuantificables en el interior de las raíces en la etapa inundada. Varios grupos taxonómicos conocidos como BRS fueron encontrados en rizósfera en la etapa inundada, entre ellos, bacterias de las familias *Syntrophobacteraceae* y *Syntrophaceae* y los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfococcus* y *Desulfobulbus*, mientras que el género *Desulfovibrio* fue el taxón reductor de sulfato dominante en la endósfera de las raíces. Como fue reportado en trabajos anteriores, la capacidad de fijar nitrógeno que presentan varias especies de *Desulfovibrio* podría explicar esta fuerte interacción con la planta. Dada la flexibilidad metabólica que presentan las BRS, estos resultados sugieren que las relaciones establecidas entre distintos grupos de BRS y con otros microorganismos relevantes, como los metanogénicos, podrían ser diferentes en los distintos nichos y a lo largo del cultivo, modificando así el rol ecológico que cumplen en el sistema.

Por su parte, las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* y tipo *nirS* rizosféricas y endófitas presentaron distinta dinámica a lo largo del cultivo y frente a los diferentes sistemas de rotación (Capítulo 3). El número de copias de genes *nirK* y *nirS* determinado por qPCR mostró que las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* dominaron en todos los nichos estudiados frente a las comunidades tipo *nirS*, y su abundancia se veía afectada tanto por los cambios que se dan durante el ciclo del cultivo como por las distintas rotaciones evaluadas. Por el contrario, la abundancia de las comunidades tipo *nirS* se mantuvo constante a lo largo del ciclo y en los diferentes sistemas de rotación, incrementando sig-

nificativamente su diversidad (evaluada mediante T-RFLP del gen *nirS*) en la endósfera de las raíces con respecto a la rizósfera. Estos resultados se alinean con lo sugerido por varios autores con respecto a que ambas poblaciones desnitrificantes responden de manera diferente frente a distintos factores ambientales y, por lo tanto, podrían ocupar diferentes nichos ecológicos. Dada la gran relevancia que presenta la reducción de N<sub>2</sub>O para mitigar las emisiones de este GEI en los sistemas agrícolas, sería interesante realizar la cuantificación de los genes *nosZI* y *nosZII*. Estos datos permitirían establecer relaciones con las abundancias de genes *nirS* y *nirK*, y correlacionar estos resultados con datos de actividad potencial desnitrificante. Esta actividad podría ser determinada en el laboratorio mediante ensayos en microcosmos suplementados con nitrato midiendo la acumulación de N<sub>2</sub>O mediante cromatografía gaseosa, y utilizando la técnica de bloqueo por acetileno para diferenciar la actividad de las poblaciones bacterianas que pueden realizar el proceso de desnitrificación completa hasta N<sub>2</sub> de aquellas que solo producen N<sub>2</sub>O.

Los datos crudos obtenidos mediante secuenciación masiva de genes 16S rRNA en este trabajo abren un gran número de posibilidades de procesamiento y análisis que permitirían enfocar el estudio hacia distintos aspectos del microbioma asociado al cultivo de arroz. En este sentido, sería relevante avanzar en el análisis alternativo presentado en el *Capítulo 2* de este trabajo con el objetivo de profundizar en el estudio de grupos minoritarios presentes en las comunidades de suelo y rizósfera. Además, sería interesante realizar un análisis de abundancias diferencial que nos permitiera detectar exactamente qué taxones están más representados en las distintas etapas del cultivo en cada uno de los nichos estudiados.

Para profundizar en el conocimiento de las comunidades bacterianas asociadas al cultivo de arroz, resultaría particularmente interesante estudiar las comunidades microbianas activas. Este aspecto podría ser abordado mediante enfoques transcriptómicos, por ejemplo, aplicando la técnica de qPCR de genes funcionales o la secuenciación masiva al ADNc sintetizado a partir del ARN. Por otro lado, la técnica de SIP (*Stable Isotope Probing*) también podría ser utilizada para identificar los principales taxones activos en las distintas etapas del cultivo o en los diferentes compartimientos asociados a la planta. Dada la relevancia que presentan el acetato y el propionato en este sistema por ser los principales intermediarios en la producción de metano, sería interesante identificar los principales taxones degradadores de estos sustratos, combinando ensayos en microcosmos anóxicos de rizósfera de arroz alimentados con acetato y/o propionato marcado (<sup>13</sup>C), con estudios genómicos basados en el ADN o en el ARNr. Asimismo, alimentando estos microcosmos también con sulfato, podríamos identificar las principales BRS degradadoras de acetato y propionato. Complementar los resultados de este trabajo con el estudio de la comunidad activa brindaría un escenario más claro de las relaciones metabólicas existentes entre dis-

tintas poblaciones microbianas en los distintos compartimientos y a lo largo del ciclo de cultivo.

El estudio en profundidad de las comunidades bacterianas realizado en el presente trabajo permitió ampliar los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo con respecto al impacto que representa la inundación sobre la comunidad asociada al cultivo de arroz. Estos trabajos previos mostraron el fuerte impacto de este factor tanto sobre la comunidad diazótropa de suelo (Paolino, 2006) como sobre la comunidad diazótropa endófito de raíces (Ferrando y Fernández Scavino, 2015), observándose un incremento en la abundancia de diazótrofos anaerobios luego de la inundación. El presente trabajo permitió evidenciar los cambios que sufren otros grupos fisiológicos microbianos presentes en suelo y asociados a la planta, como las BRS, las arqueas metanogénicas y las bacterias desnitrificantes tipo *nirK*, durante el ciclo de cultivo y en distintas condiciones de irrigación. Por el contrario, las comunidades desnitrificantes tipo *nirS* rizosféricas y endófitas parecen ser relativamente estables a este factor. Asimismo, nuestros resultados de secuenciación masiva de genes 16S rRNA refuerzan los reportes previos sobre la fuerte presión que ejerce la inundación sobre la estructura del microbioma de suelo, rizosférico y endófito de raíces de arroz. El aumento o la disminución en la abundancia de ciertos grupos microbianos en las distintas etapas del cultivo y a través de los distintos nichos, desde el suelo hacia la rizósfera y luego hacia la endósfera radicular, sugieren que las raíces estarían “seleccionando” comunidades bacterianas diferentes en las distintas fases del cultivo.

En suma, este trabajo permitió profundizar en el conocimiento de las comunidades microbianas asociadas al cultivo de arroz y de algunos factores que las afectan, aportando información relevante sobre la ecología de estas comunidades. Los resultados obtenidos muestran que microorganismos anaerobios con diferentes capacidades metabólicas constituyen una parte importante del microbioma rizosférico y endófito y, por lo tanto, podrían estar jugando un rol fundamental en las transformaciones biogeoquímicas de nutrientes esenciales, afectando tanto la nutrición y desarrollo de la planta como también al resto del ecosistema.





# Bibliografía

- ACA. (2018). *Guía de Buenas Prácticas en el Cultivo de Arroz en Uruguay*. Consultado el 12 de octubre de 2020, desde <http://www.aca.com.uy/>
- Achouak, W., Abrouk, D., Guyonnet, J., Barakat, M., Ortet, P., Simon, L., Lerondelle, C., Heulin, T. y El Zahar Haichar, F. (2019). Plant hosts control microbial denitrification activity. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 95(3).
- Ai, C., Liang, G., Wang, X., Sun, J., He, P. y Zhou, W. (2017). A distinctive root-inhabiting denitrifying community with high  $N_2O/(N_2O+N_2)$  product ratio. *Soil Biol. Biochem.*, 109, 118-123.
- An, X., Baker, P., Li, H., Su, J., Yu, C. y Cai, C. (2016). The patterns of bacterial community and relationships between sulfate-reducing bacteria and hydrochemistry in sulfate-polluted groundwater of Baogang rare earth tailings. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23(21), 21766-21779.
- Angel, R., Matthies, D. y Conrad, R. (2011). Activation of methanogenesis in arid biological soil crusts despite the presence of oxygen. *PLoS One*, 6(5), 1-8.
- Armstrong, W. (1971). Radial Oxygen Losses from Intact Rice Roots as Affected by Distance from the Apex, Respiration and Waterlogging. *Physiol. Plant.*, 25(2), 192-197.
- Arth, I. y Frenzel, P. (2000). Nitrification and denitrification in the rhizosphere of rice: The detection of processes by a new multi-channel electrode. *Biol. Fertil. Soils*, 31(5), 427-435.
- Arth, I., Frenzel, P. y Conrad, R. (1998). Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice. *Soil Biol. Biochem.*, 30(4), 509-515.
- Aulakh, M. S., Wassmann, R., Bueno, C. y Rennenberg, H. (2001). Impact of root exudates of different cultivars and plant development stages of rice (*Oryza sativa* L.) on methane production in a paddy soil. *Plant Soil*, 230(1), 77-86.
- Azziz, G., Monza, J., Etchebehere, C. y Irisarri, P. (2017). *nirS*- and *nirK*-type denitrifier communities are differentially affected by soil type, rice cultivar and water management. *Eur. J. Soil Biol.*, 78, 20-28.

- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquetlet, S. y Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil*, 249(2), 271-277.
- Baldani, J. I., Caruso, L., Baldani, V. L., Goi, S. R. y Dobereiner, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.*, 29(5-6), 911-922.
- Bellini, M. I., Kumaresan, D., Tarlera, S., Murrell, J. C. y Fernández-Scavino, A. (2018). Identification of active denitrifiers by DNA-stable isotope probing and amplicon sequencing reveals *Betaproteobacteria* as responsible for attenuation of nitrate contamination in a low impacted aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 94(2), 1-13.
- Benaiges-Fernandez, R. y Urmeneta, J. (2018). Use of specific PCR primers for the study of sulfate-reducing bacteria diversity in microbial mats of Ebro Delta, Spain. *Int. Microbiol.*, 21(4), 231-235.
- Ben-Dov, E., Brenner, A. y Kushmaro, A. (2007). Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microb. Ecol.*, 54(3), 439-451.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M. y Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: Implications for experimental botany. *J. Exp. Bot.*, 67(4), 995-1002.
- Blazejak, A. y Schippers, A. (2011). Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *aprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea. *Front. Microbiol.*, 2(DEC), 1-11.
- Bowles, M. W., Mogollón, J. M., Kasten, S., Zabel, M. y Hinrichs, K.-U. (2014). Global Rates of Marine Sulfate Reduction and Implications for Sub-Sea-Floor Metabolic Activities. *Science*, 344(6186), 889-891.
- Brady, N. C. y Weil, R. R. (2008). *The Nature and Properties of Soils* (14th edition). Pearson Prentice Hall.
- Braker, G., Fesefeldt, A. y Witzel, K. P. (1998). Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10), 3769-3775.
- Bray, R.H. & Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.*, 59(1), 39-45.
- Breidenbach, B., Blaser, M. B., Klose, M. y Conrad, R. (2016). Crop rotation of flooded rice with upland maize impacts the resident and active methanogenic microbial community. *Environ. Microbiol.*, 18(9), 2868-2885.

- Breidenbach, B., Brenzinger, K., Brandt, F. B., Blaser, M. B. y Conrad, R. (2017). The effect of crop rotation between wetland rice and upland maize on the microbial communities associated with roots. *Plant Soil*, 419(1-2), 435-445.
- Breidenbach, B. y Conrad, R. (2015). Seasonal dynamics of bacterial and archaeal methanogenic communities in flooded rice fields and effect of drainage. *Front. Microbiol.*, 5(DEC), 1-17.
- Breidenbach, B., Pump, J. y Dumont, M. G. (2016). Microbial community structure in the rhizosphere of rice plants. *Front. Microbiol.*, 6(JAN), 1-12.
- Brune, A., Frenzel, P. y Cypionka, H. (2000). Life at the oxic-anoxic interface: Microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24(5), 691-710.
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E. M., Dannenmann, M., Kiese, R. y Zechmeister-Boltenstern, S. (2013). Nitrous oxide emissions from soils: How well do we understand the processes and their controls? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 368(1621).
- Campbell, C., Adeolu, M. y Gupta, R. S. (2015). Genome-based taxonomic framework for the class *Negativicutes*: Division of the class *Negativicutes* into the orders *Selenomonadales* emend., *Acidaminococcales* ord. nov. and *Veillonellales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65(9), 3203-3215.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V. y Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.*, 8(4), 790-803.
- Chen, C., Li, L., Huang, K., Zhang, J., Xie, W. Y., Lu, Y., Dong, X. y Zhao, F. J. (2019). Sulfate-reducing bacteria and methanogens are involved in arsenic methylation and demethylation in paddy soils. *ISME J.*, 13(10), 2523-2535.
- Chen, Z., Liu, J., Wu, M., Xie, X., Wu, J. y Wei, W. (2012). Differentiated Response of Denitrifying Communities to Fertilization Regime in Paddy Soil. *Microb. Ecol.*, 63(2), 446-459.
- Chen, Z., Luo, X., Hu, R., Wu, M., Wu, J. y Wei, W. (2010). Impact of Long-Term Fertilization on the Composition of Denitrifier Communities Based on Nitrite Reductase Analyses in a Paddy Soil. *Microb. Ecol.*, 60(4), 850-861.
- Christophersen, C. T., Morrison, M. y Conlon, M. A. (2011). Overestimation of the abundance of sulfate-reducing bacteria in human feces by quantitative PCR targeting the *Desulfovibrio* 16S rRNA gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(10), 3544-3546.
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Quéré, C. L., Myneni, R., Piao, S. y Thornton, P. (2013). Carbon and Other Biogeochemical Cycles. *Clim. Chang. 2013 Phys. Sci. Basis Work. Gr. I Contrib. to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.*, 465-570.

- Coby, A. J. y Picardal, F. W. (2005). Inhibition of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reduction by microbial Fe(III) reduction: Evidence of a reaction between  $\text{NO}_2^-$  and cell surface-bound  $\text{Fe}^{2+}$ . *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(9), 5267-5274.
- Colin, Y., Goñi-Urriza, M., Gassie, C., Carlier, E., Monperrus, M. y Guyoneaud, R. (2017). Distribution of Sulfate-Reducing Communities from Estuarine to Marine Bay Waters. *Microb. Ecol.*, 73(1), 39-49.
- Collavino, M. M., Cabrera, E. V., Bruno, C. y Aguilar, O. M. (2020). Effect of soil chemical fertilization on the diversity and composition of the tomato endophytic diazotrophic community at different stages of growth. *Brazilian J. Microbiol.*
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernández-Garayzabal, J., García, P., Cai, J., Hippe, H. y Farrow, J. A. E. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *Int J Syst Bacteriol*, 44(4), 812-826.
- Conrad, R. (2009). The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.*, 1(5), 285-292.
- Conthe, M., Wittorf, L., Kuenen, J. G., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. C. y Hallin, S. (2018). Life on  $\text{N}_2\text{O}$ : Deciphering the ecophysiology of  $\text{N}_2\text{O}$  respiring bacterial communities in a continuous culture. *ISME J.*, 12(4), 1142-1153.
- Culman, S. W., Bukowski, R., Gauch, H. G., Cadillo-Quiroz, H. y Buckley, D. H. (2009). T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, 10, 1-10.
- Dahl, C., Kredich, N. M., Deutzmann, R. y Truper, H. G. (1993). Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: Physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes. *J. Gen. Microbiol.*, 139(8), 1817-1828.
- Daly, K., Sharp, R. J. y McCarthy, A. J. (2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology*, 146(7), 1693-1705.
- Deambrosi, E. (2007). Rice production situation in Uruguay. *FAO Int. Rice Comm. Newsl.*, 56, 84-85.
- DIEA - MGAP, A. y P., Oficina de Estadísticas Agropecuarias - Ministerio de Ganadería. (2020). *Resultados de la Encuesta de Arroz 2020*. Consultado el 12 de octubre de 2020, desde <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/diea>
- Ding, L. J., Cui, H. L., Nie, S. A., Long, X. E., Duan, G. L. y Zhu, Y. G. (2019). Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 95(5), 1-13.

- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19(1), 11-15.
- Duan, R., Long, X. E., feng Tang, Y., Wen, J., Su, S., Bai, L., Liu, R. y Zeng, X. (2018). Effects of different fertilizer application methods on the community of nitrifiers and denitrifiers in a paddy soil. *J. Soils Sediments*, 18(1), 24-38.
- Duarte, A. G., Catarino, T., White, G. F., Lousa, D., Neukirchen, S., Soares, C. M., Sousa, F. L., Clarke, T. A. y Pereira, I. A. (2018). An electrogenic redox loop in sulfate reduction reveals a likely widespread mechanism of energy conservation. *Nat. Commun.*, 9(1), 1-11.
- Dufrêne, M. y Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecol. Monogr.*, 67(3), 345-366.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., Sundaresan, V. y Jeffery, L. D. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112(8), E911-E920.
- Edwards, J., Santos-Medellín, C., Nguyen, B., Kilmer, J., Liechty, Z., Veliz, E., Ni, J., Phillips, G. y Sundaresan, V. (2019). Soil domestication by rice cultivation results in plant-soil feedback through shifts in soil microbiota. *Genome Biol.*, 20(1), 1-14.
- Edwards, J. A., Santos-Medellín, C. M., Liechty, Z. S., Nguyen, B., Lurie, E., Eason, S., Phillips, G. y Sundaresan, V. (2018). Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice. *PLoS Biol.*, 16(2), 1-28.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. y Minamisawa, K. (2001). Endophytic Colonization and in Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(3-12), 5285-5293.
- Enwall, K., Throbäck, I. N., Stenberg, M., Söderström, M. y Hallin, S. (2010). Soil resources influence spatial patterns of denitrifying communities at scales compatible with land management. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(7), 2243-2250.
- Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., De Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J., Van Alen, T., Luesken, F., Wu, M. L., Van De Pas-Schoonen, K. T., Op Den Camp, H. J., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K. J., . . . Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), 543-548.
- Fernández Scavino, A., Ji, Y., Pump, J., Klose, M., Claus, P. y Conrad, R. (2013). Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields. *Environ. Microbiol.*, 15(9), 2588-2602.

- Ferrando, L. y Fernández Scavino, A. (2015). Strong shift in the diazotrophic endophytic bacterial community inhabiting rice (*Oryza sativa*) plants after flooding. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *91*(9), 1-12.
- Ferrando, L., Mañay, J. F. y Fernández Scavino, A. (2012). Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (*Oryza sativa*) varieties. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *80*(3), 696-708.
- Figuerola, E. L., Guerrero, L. D., Rosa, S. M., Simonetti, L., Duval, M. E., Galantini, J. A., Bedano, J. C., Wall, L. G. y Erijman, L. (2012). Bacterial Indicator of Agricultural Management for Soil under No-Till Crop Production. *PLoS One*, *7*(11), 1-12.
- Frank, K. L., Rogers, D. R., Olins, H. C., Vidoudez, C. y Girguis, P. R. (2013). Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at Middle Valley hydrothermal vents. *ISME J.*, *7*(7), 1391-1401.
- Franzen, D. W. (2015). Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region. *North Central Regional Research Publication*, *221*.
- Gaby, J. C. y Buckley, D. H. (2015). Assessment of Nitrogenase Diversity in the Environment. *Biol. Nitrogen Fixat.*, *1-2*, 209-216.
- Gan, Y., Qiu, Q., Liu, P., Rui, J. y Lu, Y. (2012). Syntrophic oxidation of propionate in rice field soil at 15 and 30°C under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, *78*(14), 4923-4932.
- Gao, D., Sheng, R., Whiteley, A. S., Moreira-Grez, B., Qin, H., Zhang, W., Zhan, Y. y Wei, W. (2020). Effect of phosphorus amendments on rice rhizospheric methanogens and methanotrophs in a phosphorus deficient soil. *Geoderma*, *368*(June), 114312.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. y Vanbroekhoven, K. (2006). *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, *66*(2), 194-205.
- Giloteaux, L., Duran, R., Casiot, C., Bruneel, O., Elbaz-Poulichet, F. y Goñi-Urriza, M. (2013). Three-year survey of sulfate-reducing bacteria community structure in Carnoulès acid mine drainage (France), highly contaminated by arsenic. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *83*(3), 724-737.
- Giloteaux, L., Goñi-Urriza, M. y Duran, R. (2010). Nested PCR and new primers for analysis of sulfate-reducing bacteria in low-cell-biomass environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, *76*(9), 2856-2865.
- Glissmann, K. y Conrad, R. (2000). Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *31*(2), 117-126.

- Graf, D. R., Jones, C. M. y Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PLoS One*, 9(12), 1-20.
- Guo, J. y Zhou, C. (2007). Greenhouse gas emissions and mitigation measures in Chinese agroecosystems. *Agric. For. Meteorol.*, 142(2-4), 270-277.
- Hallin, S., Braker, G. y Philippot, L. (2007). Molecular Tools to Assess the Diversity and Density of Denitrifying Bacteria in Their Habitats. *Biol. Nitrogen Cycle*, 313-330.
- Hallin, S. y Lindgren, P.-E. (1999). PCR Detection of Genes Encoding Nitrite Reductase in Denitrifying Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(44), 1652-1657.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A. y Jones, C. M. (2018). Genomics and Ecology of Novel N<sub>2</sub>O-Reducing Microorganisms. *Trends Microbiol.*, 26(1), 43-55.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. y Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 43, 895-914.
- Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J. y Ausubel, F. M. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat. Plants*, 1(6), 15051.
- Hardoim, P. R., Hardoim, C. C., van Overbeek, L. S. y van Elsas, J. D. (2012). Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS One*, 7(2), e30438.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S. y van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.*, 16(10), 463-471.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. y Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 79(3), 293-320.
- Hausmann, B., Knorr, K. H., Schreck, K., Tringe, S. G., Glavina Del Rio, T., Loy, A. y Pester, M. (2016). Consortia of low-abundance bacteria drive sulfate reduction-dependent degradation of fermentation products in peat soil microcosms. *ISME J.*, 10(10), 2365-2375.
- Heanes, D. L. (1984). Determination of total organic-c in soils by an improved chromic acid digestion and spectrophotometric procedure. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 15(10), 1191-1213.
- Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A. y Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, 59(3), 327-335.



- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme aufdem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Landwirtsch. Ges.*, 98, 89-78.
- Hofstra, N. y Bouwman, A. F. (2005). Denitrification in agricultural soils: Summarizing published data and estimating global annual rates. *Nutr. Cycl. Agroecosystems*, 72(3), 267-278.
- Hori, T., Müller, A., Igarashi, Y., Conrad, R. y Friedrich, M. W. (2010). Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by <sup>13</sup>C-acetate probing. *ISME J.*, 4(2), 267-278.
- Hou, S., Ai, C., Zhou, W., Liang, G. y He, P. (2018). Structure and assembly cues for rhizospheric *nirK*- and *nirS*-type denitrifier communities in long-term fertilized soils. *Soil Biol. Biochem.*, 119, 32-40.
- Hussain, Q., Liu, Y., Jin, Z., Zhang, A., Pan, G., Li, L., Crowley, D., Zhang, X., Song, X. y Cui, L. (2011). Temporal dynamics of ammonia oxidizer (*amoA*) and denitrifier (*nirK*) communities in the rhizosphere of a rice ecosystem from Tai Lake region, China. *Appl. Soil Ecol.*, 48(2), 210-218.
- Imachi, H., Sakai, S., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y. y Sekiguchi, Y. (2007). *Pelotomaculum propionicium* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57(7), 1487-1492.
- Imachi, H., Sekiguachi, Y., Kamagata, Y., Loy, A., Qiu, Y.-L., Hugenholtz, P., Kimura, N., Wagner, M., Ohashi, A. y Harada, H. (2006). Non-Sulfate-Reducing, Syntrophic Bacteria Affiliated with *Desulfotomaculum* Cluster I Are Widely Distributed in Methanogenic Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(3), 2080-2091.
- IRRI. (2018). *World Rice Statistics*, International Rice Research Institute. Consultado el 12 de octubre de 2020, desde <https://www.irri.org/>
- IRRI. (2019). *Annual Report 2019. Race for Impact*, International Rice Research Institute. Consultado el 12 de octubre de 2020, desde <https://www.irri.org/>
- Isaac, R. A. y Kerber, J. D. (1971). Atomic Absorption and Flame Photometry: Techniques and Uses in Soil, Plant, and Water Analysis. En L. M. Walsh (Ed.), *Instrum. Methods Anal. Soils Plant Tissue* (pp. 17-37). Soil Sci. Soc. Amer.
- Ishii, S., Ikeda, S., Minamisawa, K. y Senoo, K. (2011). Nitrogen cycling in rice paddy environments: Past achievements and future challenges. *Microbes Environ.*, 26(4), 282-292.
- James, E. K. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *F. Crop. Res.*, 65(2-3), 197-209.

- Ji, Y., Conrad, R. y Xu, H. (2020). Responses of archaeal, bacterial, and functional microbial communities to growth season and nitrogen fertilization in rice fields. *Biol. Fertil. Soils*, 56(1), 81-95.
- Jiang, Y., Liang, Y., Li, C., Wang, F., Sui, Y., Suvannang, N., Zhou, J. y Sun, B. (2016). Crop rotations alter bacterial and fungal diversity in paddy soils across East Asia. *Soil Biol. Biochem.*, 95, 250-261.
- Jiménez-Bueno, N. G., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Ortiz-Gutiérrez, D., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L. y Navarro-Noya, Y. E. (2016). Bacterial indicator taxa in soils under different long-term agricultural management. *J. Appl. Microbiol.*, 120(4), 921-933.
- Jin, W., Cao, W., Liang, F., Wen, Y., Wang, F., Dong, Z. y Song, H. (2020). Water management impact on denitrifier community and denitrification activity in a paddy soil at different growth stages of rice. *Agric. Water Manag.*, 241(June).
- Jones, C. M., Graf, D. R., Bru, D., Philippot, L. y Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink. *ISME J.*, 7(2), 417-426.
- Jones, C. M. y Hallin, S. (2010). Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *ISME J.*, 4(5), 633-641.
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M. y Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol. Biol. Evol.*, 25(9), 1955-1966.
- Jørgensen, B. B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature*, 296(5858), 643-645.
- Kandlikar, G. S., Gold, Z. J., Cowen, M. C., Meyer, R. S., Freise, A. C., Kraft, N. J., Moberg-Parker, J., Sprague, J., Kushner, D. J. y Curd, E. E. (2018). Ranacapa: An R package and shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations. *F1000Research*, 7(1734), 1-18.
- Kim, H. y Lee, Y. H. (2020). The rice microbiome: A model platform for crop holobiome. *Phytobiomes J.*, 4(1), 5-18.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., Von Mering, C. y Vorholt, J. A. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J.*, 6(7), 1378-1390.
- Kögel-knabner, I., Amelung, W., Cao, Z., Fiedler, S., Frenzel, P., Jahn, R., Kalbitz, K., Kölbl, A. y Schloter, M. (2010). Geoderma Biogeochemistry of paddy soils. *Geoderma*, 157, 1-14.

- Kondo, R., Nedwell, D. B., Purdy, K. J. y de Queiroz Silva, S. (2004). Detection and enumeration of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR. *Geomicrobiol. J.*, 21(3), 145-157.
- Kondo, R., Purdy, K. J., Silva, S. D. E. Q. y Nedwell, D. B. (2007). Spatial Dynamics Sediment along Bacterial Compositions in Gradient in a UK Estuary. *Microbes Environ.*, 22(1), 11-19.
- Kondo, R., Shigematsu, K. y Butani, J. (2008). Rapid enumeration of sulphate-reducing bacteria from aquatic environments using real-time PCR. *Plankt. Benthos Res.*, 3(3), 180-183.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. y Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(17), 5112-5120.
- Kulichevskaya, I. S., Ivanova, A. A., Baulina, O. I., Rijpstra, W. I. C., Sinninghe Damsté, J. S. y Dedysh, S. N. (2017). *Fimbrigiobus ruber* gen. nov., sp. nov., a Gemmata-like planctomycete from *Sphagnum* peat bog and the proposal of *Gemmataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67(2), 218-224.
- Kulichevskaya, I. S., Ivanova, A. A., Suzina, N. E., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. y Dedysh, S. N. (2016). *Paludisphaera borealis* gen. nov., sp. nov., a hydrolytic planctomycete from northern wetlands, and proposal of *Isosphaeraceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66(2), 837-844.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6), 1547-1549.
- Leavitt, W. D., Bradley, A. S., Santos, A. A., Pereira, I. A. y Johnston, D. T. (2015). Sulfur isotope effects of dissimilatory sulfite reductase. *Front. Microbiol.*, 6(DEC), 1-20.
- Lee, H. J., Jeong, S. E., Kim, P. J., Madsen, E. L. y Jeon, C. O. (2015). High resolution depth distribution of Bacteria, Archaea, methanotrophs, and methanogens in the bulk and rhizosphere soils of a flooded rice paddy. *Front. Microbiol.*, 6(JUN), 1-13.
- Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C. y Jørgensen, B. B. (2009). Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): Abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environ. Microbiol.*, 11(5), 1278-1291.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N. J., Borowski, C., Wagner, M. y Jørgensen, B. B. (2007). Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.*, 9(1), 131-142.

- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D. y Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci.*, 22(7), 583-595.
- Lever, M. A., Rouxel, O., Alt, J. C., Shimizu, N., Ono, S., Coggon, R. M., Shanks III, W. C., Lapham, L., Elvert, M., Prieto-Mollar, X., Henrichs, K., Inagaki, F. y Teske, A. (2013). Evidence for Microbial Carbon and Sulfur Cycling in Deeply Buried Riedge Flank Basalt. *Science*, 339, 1305-1309.
- Li, H. L., Yu, Y., Guo, J. X., Li, X., Rensing, C. y Wang, G. (2019). Dynamics of the rice rhizosphere microbial community under continuous and intermittent flooding treatment. *J. Environ. Manage.*, 249, 109326.
- Li, H., Su, J. Q., Yang, X. R. y Zhu, Y. G. (2019). Distinct rhizosphere effect on active and total bacterial communities in paddy soils. *Sci. Total Environ.*, 649, 422-430.
- Liechty, Z., Santos-Medellín, C., Edwards, J., Nguyen, B., Mikhail, D., Eason, S., Phillips, G. y Sundaresan, V. (2020). Comparative Analysis of Root Microbiomes of Rice Cultivars with High and Low Methane Emissions Reveals Differences in Abundance of Methanogenic Archaea and Putative Upstream Fermenters. *mSystems*, 5(1), 1-19.
- Liesack, W., Schnell, S. y Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24(5), 625-645.
- Liu, P. y Conrad, R. (2017). *Syntrophobacteraceae*-affiliated species are major propionate-degrading sulfate reducers in paddy soil. *Environ. Microbiol.*, 19(4), 1669-1686.
- Liu, P., Pommerenke, B. y Conrad, R. (2018). Identification of *Syntrophobacteraceae* as major acetate-degrading sulfate reducing bacteria in Italian paddy soil. *Environ. Microbiol.*, 20(1), 337-354.
- Liu, X. Z., Zhang, L. M., Prosser, J. I. y He, J. Z. (2009). Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Soil Biol. Biochem.*, 41(4), 687-694.
- Liu, Y., Wang, P., Pan, G., Crowley, D., Li, L., Zheng, J., Zhang, X. y Zheng, J. (2016). Functional and structural responses of bacterial and fungal communities from paddy fields following long-term rice cultivation. *J. Soils Sediments*, 16(5), 1460-1471.
- Liu, Y. R., Zheng, Y. M., Zhang, L. M. y He, J. Z. (2014). Linkage between community diversity of sulfate-reducing microorganisms and methylmercury concentration in paddy soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21(2), 1339-1348.
- Liu, Y., Luo, M., Ye, R., Huang, J., Xiao, L., Hu, Q., Zhu, A. y Tong, C. (2019). Impacts of the rhizosphere effect and plant species on organic carbon mineralization rates and pathways, and bacterial community composition in a tidal marsh. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 95(9), 1-15.

- Loaces, I., Ferrando, L. y Fernández Scavino, A. (2011). Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. *Microb. Ecol.*, *61*(3), 606-618.
- Loy, A., Duller, S., Baranyi, C., Mußmann, M., Ott, J., Sharon, I., Béjà, O., Le Paslier, D., Dahl, C. y Wagner, M. (2009). Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. *Environ. Microbiol.*, *11*(2), 289-299.
- Lu, S., Han, S., Du, Y., Liu, H., Nie, H., Luo, X., Huang, Q. y Chen, W. (2018). The shift of sulfate-reducing bacterial communities from the upland to the paddy stage in a rapeseed-rice rotation system, and the effect from the long-term straw returning. *Appl. Soil Ecol.*, *124*, 124-130.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Englebretson, A., Kumin, V., Rio, T. G. D., Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G. y Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, *488*(7409), 86-90.
- Macedo, I., Castillo, J., Saldain, N., Martínez, S., Ayala, W., Hernández, J., Serrón, N., Bordagorri, A., Zorrilla, G. y Terra, J. (2016). Nuevas rotaciones arroceras : primeros datos de productividad. *Arroz*, *88*(Diciembre), 34-39.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. y Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15th Global Edition). Pearson.
- Maeda, K., Spor, A., Edel-Hermann, V., Heraud, C., Breuil, M. C., Bizouard, F., Toyoda, S., Yoshida, N., Steinberg, C. y Philippot, L. (2015). N<sub>2</sub>O production, a widespread trait in fungi. *Sci. Rep.*, *5*, 1-7.
- Mano, H. y Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environ.*, *23*(2), 109-117.
- McMurdie, P. J. y Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One*, *8*(4), e61217.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J. H., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. y Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, *332*(6033), 1097-1100.
- Meyer, B. y Kuever, J. (2007a). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5' -phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing. *Microbiology*, *153*(10), 3478-3498.
- Meyer, B. y Kuever, J. (2007b). Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5' -phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing pro-

- karyotes - Origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology*, 153(7), 2026-2044.
- Micallef, S. A., Channer, S., Shiaris, M. P. y Colón-Carmona, A. (2009). Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. *Plant Signal. Behav.*, 4(8), 777-80.
- Molina, F., Blanco, P. y Pérez de Vida, F. (2011). Nuevo cultivar de Arroz L5502 Parao, Características y Comportamiento. *Arroz*, 28(Diciembre), 28-34.
- Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Tuleski, T., Faoro, H., Cruz, L. M., Wassem, R., de Baura, V. A., Tadra-Sfeir, M. Z., Weiss, V., Darocha, W. D., Muller-Santos, M., Chubatsu, L. S., Huergo, L. F., Pedrosa, F. O. y de Souza, E. M. (2012). Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 80(2), 441-451.
- Moreau, J. W., Zierenberg, R. A. y Banfield, J. F. (2010). Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(14), 4819-4828.
- Mori, F., Umezawa, Y., Kondo, R. y Wada, M. (2018). Dynamics of sulfate-reducing bacteria community structure in surface sediment of a seasonally hypoxic enclosed bay. *Microbes Environ.*, 33(4), 378-384.
- Müller, A. L., Kjeldsen, K. U., Rattei, T., Pester, M. y Loy, A. (2015). Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases. *ISME J.*, 9(5), 1152-1165.
- Mußmann, M., Ishii, K., Rabus, R. y Amann, R. (2005). Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured *Deltaproteobacteria* in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ. Microbiol.*, 7(3), 405-418.
- Muyzer, G. y Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(6), 441-454.
- Myhre, G., Shindell, D., Bréon, F.-M., Collins, W., Fuglestvedt, J., Huang, J., Koch, D., Lamarque, J.-F., Lee, D., Mendoza, B., Nakajima, T., Robock, A., Stephens, G., Takemura, T. y Zhang, H. (2013). Anthropogenic and natural radiative forcing. *Clim. Chang. 2013 Phys. Sci. Basis Work. Gr. I Contrib. to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.*, 659-740.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M. y Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(2), 327-337.

- Nishimura, S., Sawamoto, T., Akiyama, H., Sudo, S., Cheng, W. y Yagi, K. (2005). Continuous, Automated Nitrous Oxide Measurements from Paddy Soils Converted to Upland Crops. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 69(6), 1977-1986.
- Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M. y Liesack, W. (2005). Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ. Microbiol.*, 7(3), 382-395.
- Olivares, F. L., Baldani, V. L. D., Reis, V. M., Baldani, J. I. y Döbereiner, Johanna. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. *Biol. Fertil. Soils*, 21(3), 197-200.
- Paolino, G. (2006). *Dinámica y diversidad de la comunidad bacteriana fijadora de nitrógeno en suelos de arroz* (Tesis de Maestría). Universidad de la República. Uruguay.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Buckler, E. S. y Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(16), 6548-6553.
- Pelikan, C., Herbold, C. W., Hausmann, B., Müller, A. L., Pester, M. y Loy, A. (2016). Diversity analysis of sulfite- and sulfate-reducing microorganisms by multiplex *dsrA* and *dsrB* amplicon sequencing using new primers and mock community-optimized bioinformatics. *Environ. Microbiol.*, 18(9), 2994-3009.
- Peng, G., Zhang, W., Luo, H., Xie, H., Lai, W. y Tan, Z. (2009). *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59(7), 1650-1655.
- Pereira, I. A., Ramos, A. R., Grein, F., Marques, M. C., da Silva, S. M. y Venceslau, S. S. (2011). A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. *Front. Microbiol.*, 2(APR), 1-22.
- Pérez-Montaña, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J. y Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.*, 169(5-6), 325-336.
- Pester, M., Bittner, N., Deevong, P., Wagner, M. y Loy, A. (2010). A 'rare biosphere' microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. *ISME J.*, 4(12), 1-12.
- Pester, M., Knorr, K. H., Friedrich, M. W., Wagner, M. y Loy, A. (2012). Sulfate-reducing microorganisms in wetlands - fameless actors in carbon cycling and climate change. *Front. Microbiol.*, 3(FEB), 1-19.
- Philippot, L. (2005). Denitrification in pathogenic bacteria: For better or worst? *Trends Microbiol.*, 13(5), 191-192.

- Philippot, L. y Hallin, S. (2006). Molecular Analyses of Soil Denitrifying Bacteria. En J. E. Cooper y J. R. Rao (Eds.), *Molecular Techniques for Soil, Rhizosphere and Plant Microorganisms* (pp. 146-165). CAB International.
- Philippot, L., Hallin, S. y Schloter, M. (2007). Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil. *Adv. Agron.*, *96*(07), 249-305.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P. y Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.*, *11*(11), 789-799.
- Pittelkow, C. M., Adviento-Borbe, M. A., Hill, J. E., Six, J., van Kessel, C. y Linquist, B. A. (2013). Yield-scaled global warming potential of annual nitrous oxide and methane emissions from continuously flooded rice in response to nitrogen input. *Agric. Ecosyst. Environ.*, *177*, 10-20.
- Pittelkow, C. M., Zorrilla, G., Terra, J., Riccetto, S., Macedo, I., Bonilla, C. y Roel, A. (2016). Sustainability of rice intensification in Uruguay from 1993 to 2013. *Glob. Food Sec.*, *9*, 10-18.
- Plugge, C. M., Zhang, W., Scholten, J. C. y Stams, A. J. (2011). Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Front. Microbiol.*, *2*(MAY), 1-8.
- Postgate, J. R. y Kent, H. M. (1985). Diazotrophy within *Desulfovibrio*. *J. Gen. Microbiol.*, *131*, 2119-2122.
- Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong, K. y Boonkerd, N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) *42*, 141-149.
- Putz, M., Schleusner, P., Rütting, T. y Hallin, S. (2018). Relative abundance of denitrifying and DNRA bacteria and their activity determine nitrogen retention or loss in agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.*, *123*, 97-104.
- Rabus, R., Hansen, T. A. y Widdel, F. (2013). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt y F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes. Ecophysiology and Biochemistry* (4th edition, pp. 309-404). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rabus, R., Venceslau, S. S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D. y Pereira, I. A. (2015). A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. *Adv. Microb. Physiol.*, *66*, 55-321.
- Ransom-Jones, E., Jones, D. L., McCarthy, A. J. y McDonald, J. E. (2012). The *Fibrobacteres*: An Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Microb. Ecol.*, *63*(2), 267-281.



- Rariz, G. (2016). *Monitoreo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de los géneros Herbaspirillum y Azospirillum inoculadas en Oryza sativa* (Tesis de Maestría). Universidad de la República. Uruguay.
- Rariz, G., Martínez, A., Ferrando, L., Menes, R. J. y Fernández Scavino, A. (2013). Caracterización e interacciones entre bacterias con propiedades promotoras de crecimiento vegetal asociadas al cultivo de arroz. *Revta. Agron. N. O. Argent.*, 33, 13-24.
- Reinhold-Hurek, B., Bünger, W., Burbano, C. S., Sabale, M. y Hurek, T. (2015). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 53, 403-424.
- Rui, J., Peng, J. y Lu, Y. (2009). Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(14), 4879-4886.
- Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C. y Klemmedtsson, L. (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences*, 8(7), 1779-1791.
- Ryan, P. R., Dessaux, Y., Thomashow, L. S. y Weller, D. M. (2009). Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil*, 321(1-2), 363-383.
- Sameshima-Saito, R., Chiba, K. y Minamisawa, K. (2006). Correlation of Denitrifying Capability with the Existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* Genes in Diverse Strains of Soybean Bradyrhizobia. *Microbes Environ.*, 21(3), 174-184.
- Sanford, R. A., Wagner, D. D., Wu, Q., Chee-Sanford, J. C., Thomas, S. H., Cruz-García, C., Rodríguez, G., Massol-Deyá, A., Krishnani, K. K., Ritalahti, K. M., Nissen, S., Konstantinidis, K. T. y Löffler, F. E. (2012). Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(48), 19709-19714.
- Santillano, D., Boetius, A. y Ramette, A. (2010). Improved *dsrA*-based terminal restriction fragment length polymorphism analysis of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(15), 5308-5311.
- Santos, A. A., Venceslau, S. S., Grein, F., Leavitt, W. D., Dahl, C., Johnston, D. T. y Pereira, I. A. (2015). A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. *Science*, 350(6267), 1541-1545.
- Santos-Medellín, C., Edwards, J., Liechty, Z., Nguyen, B. y Sundaresan, V. (2017). Drought Stress Results in a Compartment-Specific Restructuring of the Rice Root-Associated Microbiomes. *MBio*, 8(4), 8:e00764-17.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R. y Gopalakrishnan, S. (2016). Soil Microbes: The Invisible Managers of Soil Fertility. En P. D. Singh, H. B. Singh y R. Prabha (Eds.), *Mi-*

- crobial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (4th edition, pp. 1-16). Springer, New Delhi.
- Scheid, D. y Stubner, S. (2001). Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *36*(2-3), 175-183.
- Scheid, D., Stubner, S. y Conrad, R. (2004). Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *50*(2), 101-110.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. y Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, *75*(23), 7537-7541.
- Schmalenberger, A., Drake, H. L. y Küsel, K. (2007). High unique diversity of sulfate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen. *Environ. Microbiol.*, *9*(5), 1317-1328.
- Schreiber, F., Wunderlin, P., Udert, K. M. y Wells, G. F. (2012). Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: Biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Front. Microbiol.*, *3*(OCT), 1-24.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., Van Overbeek, L., Brar, D., Van Elsas, J. D. y Reinhold-Hurek, B. (2012). Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *25*(1), 28-36.
- Shapleigh, J. P. (2013). Denitrifying Prokaryotes. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt y F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes. Ecophysiology and Biochemistry* (4th edition, pp. 405-425). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sheng, R., Chen, A., Zhang, M., Whiteley, A. S., Kumaresan, D. y Wei, W. (2016). Transcriptional activities of methanogens and methanotrophs vary with methane emission flux in rice soils under chronic nutrient constraints of phosphorus and potassium. *Biogeosciences*, *13*(23), 6507-6518.
- Simon, J. y Kroneck, P. M. (2013). Microbial Sulfite Respiration. *Advances in Microbial Physiology* (pp. 45-117).
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C. y Duran, R. (2014). Dynamic of sulphate-reducing microorganisms in petroleum-contaminated marine sediments inhabited by the polychaete *Hediste diversicolor*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *22*(20), 15273-15284.

- Steger, D., Wentrup, C., Braunecker, C., Deevong, P., Hofer, M., Richter, A., Baranyi, C., Pester, M., Wagner, M. y Loy, A. (2011). Microorganisms with novel dissimilatory (bi)sulfite reductase genes are widespread and part of the core microbiota in low-sulfate peatlands. *Appl. Environ. Microbiol.*, *77*(4), 1231-1242.
- Steinberg, L. M. y Regan, J. M. (2008). Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, *74*(21), 6663-6671.
- Stubner, S. (2004). Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, *57*(2), 219-230.
- Sugiyama, A., Ueda, Y., Zushi, T., Takase, H. y Yazaki, K. (2014). Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. *PLoS One*, *9*(6), 1-9.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. y Song, W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.*, *55*(3), 415-424.
- Tago, K., Ishii, S., Nishizawa, T., Otsuka, S. y Senoo, K. (2011). Phylogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice-soybean rotation fields. *Microbes Environ.*, *26*(1), 30-35.
- Tan, K. H. (2005). *Soil sampling, preparation and analysis* (2nd edition). CRC Press.
- Tang, H., Xiao, X., Li, C., Tang, W., Cheng, K., Wang, K., Pan, X. y Li, W. (2019). Effects of Rhizosphere and Long-Term Fertilization Practices on the Activity and Community Structure of Denitrifiers Under Double-Cropping Rice Field. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, *50*(6), 682-697.
- Tanner, R. S. (1989). Monitoring sulfate-reducing bacteria: comparison of enumeration media. *J. Microbiol. Methods*, *10*(2), 83-90.
- Tarlera, S., Capurro, M. C., Irisarri, P., Fernández Scavino, A., Cantou, G. y Roel, A. (2016). Yield-scaled global warming potential of two irrigation management systems in a highly productive rice system. *Sci. Agric.*, *73*(1), 43-50.
- Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, Å. y Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *49*(3), 401-417.
- Tiesen, H. y Moir, J. (2008). Total and Organic Carbon. En M. R. Carter (Ed.), *Soil sampling and methods of analysis* (First edition, pp. 187-199). Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers.
- Tikhonovich, I. A. y Provorov, N. A. (2011). Microbiology is the basis of sustainable agriculture: An opinion. *Ann. Appl. Biol.*, *159*(2), 155-168.

- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. y Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(August), 671-677.
- Treude, N., Rosencrantz, D., Liesack, W. y Schnell, S. (2003). Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44(2), 261-269.
- Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Anderson, I. C. y Singh, B. K. (2016). Response of soil properties and microbial communities to agriculture: Implications for primary productivity and soil health indicators. *Front. Plant Sci.*, 7(990), 1-13.
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T. y Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat. Rev. Microbiol.*, 18(August), 607-621.
- Van der Gon, H. A. D., Van Bodegom, P. M., Wassmann, R., Lantin, R. S. y Metra-corton, T. M. (2001). Sulfate-containing amendments to reduce methane emissions from rice fields: mechanisms, effectiveness and costs. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.*, 6, 71-89.
- Van Der Heijden, M. G., Bardgett, R. D. y Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.*, 11(3), 296-310.
- Venceslau, S. S., Stockdreher, Y., Dahl, C. y Pereira, I. A. (2014). The "bacterial heterodisulfide" DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1837(7), 1148-1164.
- Voroney, R. P. (2007). Oxygen availability is a major factor and evolutionary force determining the metabolic strategy of bacteria colonizing an environmental niche. En E. A. Paul (Ed.), *The Soil Habitat* (pp. 5-49). Oxford: Academic Press.
- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A. y Stahl, D. A. (1998). Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.*, 180(11), 2975-2982.
- Wang, H., Guo, C. L., Yang, C. F., Lu, G. N., Chen, M. Q. y Dang, Z. (2016). Distribution and diversity of bacterial communities and sulphate-reducing bacteria in a paddy soil irrigated with acid mine drainage. *J. Appl. Microbiol.*, 121(1), 196-206.
- Wang, H., Li, X., Li, X., Li, X., Wang, J. y Zhang, H. (2017). Changes of microbial population and N-cycling function genes with depth in three Chinese paddy soils. *PLoS One*, 12(12), 1-16.
- Wang, J., Song, Y., Ma, T., Raza, W., Li, J., Howland, J. G., Huang, Q. y Shen, Q. (2017). Impacts of inorganic and organic fertilization treatments on bacterial and fungal communities in a paddy soil. *Appl. Soil Ecol.*, 112, 42-50.

- Wassmann, R., Lantin, R. S., Neue, H. U., Buendia, L. V., Corton, T. M. y Lu, Y. (2000). Characterization of methane emissions from rice fields in Asia. III. Mitigation options and future research needs. *Nutr. Cycl. Agroecosystems*, 58(1-3), 23-36.
- Watanabe, A., Takeda, T. y Kimura, M. (1999). Evaluation of origins of CH<sub>4</sub> carbon emitted from rice paddies. *J. Geophys. Res. Atmos.*, 104(D19), 23623-23629.
- Wei, W., Isobe, K., Nishizawa, T., Zhu, L., Shiratori, Y., Ohte, N., Koba, K., Otsuka, S. y Senoo, K. (2015). Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *ISME J.*, 9(9), 1954-1965.
- Wei, X., Zhu, Z., Wei, L., Wu, J. y Ge, T. (2019). Biogeochemical cycles of key elements in the paddy-rice rhizosphere: Microbial mechanisms and coupling processes. *Rhizosphere*, 10(February), 100145.
- Wiegel, J. (2009). Family I Clostridiaceae. En P. DeVos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. Schleifer y W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's Man. Syst. Archaea Bact.* (2nd edition, pp. 736-851). Springer.
- Wind, T. y Conrad, R. (1995). Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thio-sulfate, and numbers of sulfate-reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 18(4), 257-266.
- Wind, T. y Conrad, R. (1997). Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice field soil. *Biogeochemistry*, 37(3), 253-278.
- Wind, T., Stubner, S. y Conrad, R. (1999). Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22(2), 269-279.
- Wörner, S., Zecchin, S., Dan, J., Todorova, N. H., Loy, A., Conrad, R. y Pester, M. (2016). Gypsum amendment to rice paddy soil stimulated bacteria involved in sulfur cycling but largely preserved the phylogenetic composition of the total bacterial community. *Environ. Microbiol. Rep.*, 8(3), 413-423.
- Wrage, N., Velthof, G. L., Laanbroek, H. J. y Oenema, O. (2004). Nitrous oxide production in grassland soils: Assessing the contribution of nitrifier denitrification. *Soil Biol. Biochem.*, 36(2), 229-236.
- Wu, L., Ma, K. y Lu, Y. (2009). Prevalence of betaproteobacterial sequences in *nifH* gene pools associated with roots of modern rice cultivars. *Microb. Ecol.*, 57(1), 58-68.
- Yang, J., Kloepper, J. W. y Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.*, 14(1), 1-4.
- Yin, C., Fan, F., Song, A., Cui, P., Li, T. y Liang, Y. (2015). Denitrification potential under different fertilization regimes is closely coupled with changes in the denitrifying community in a black soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(13), 5719-5729.
- Yin, C., Fan, F., Song, A., Fan, X., Ding, H., Ran, W., Qiu, H. y Liang, Y. (2017). The response patterns of community traits of N<sub>2</sub>O emission-related functional guilds

- to temperature across different arable soils under inorganic fertilization. *Soil Biol. Biochem.*, *108*, 65-77.
- Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S. y Senoo, K. (2009). Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.*, *41*(10), 2044-2051.
- Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S. y Senoo, K. (2010). *nirK*-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harboring bacteria. *Microbes Environ.*, *25*(1), 45-48.
- Yoshida, S. (1981). Fundamentals of Rice Crop Science. *Fundam. rice Crop Sci.*, 65-109.
- Yousefi, H. y Hasanzadeh, N. (2019). *Identification and Determination of Characteristics of Endophytes from Rice Plants*.
- Yuan, C. L., Zhang, L. M., Wang, J. T., Hu, H. W., Shen, J. P., Cao, P. y He, J. Z. (2019). Distributions and environmental drivers of archaea and bacteria in paddy soils. *J. Soils Sediments*, *19*(1), 23-37.
- Zecchin, S., Corsini, A., Martin, M. y Cavalca, L. (2017). Influence of water management on the active root-associated microbiota involved in arsenic, iron, and sulfur cycles in rice paddies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *101*(17), 6725-6738.
- Zelege, J., Sheng, Q., Wang, J. G., Huang, M. Y., Xia, F., Wu, J. H. y Quan, Z. X. (2013). Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. *Front. Microbiol.*, *4*(AUG), 1-13.
- Zhang, J., Liu, Y. X., Zhang, N., Hu, B., Jin, T., Xu, H., Qin, Y., Yan, P., Zhang, X., Guo, X., Hui, J., Cao, S., Wang, X., Wang, C., Wang, H., Qu, B., Fan, G., Yuan, L., Garrido-Oter, R., ... Bai, Y. (2019). NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nat. Biotechnol.*, *37*(6), 676-684.
- Zhang, X. X., Gao, J. S., Cao, Y. H., Ma, X. T. y He, J. Z. (2013). Long-Term Rice and Green Manure Rotation Alters the Endophytic Bacterial Communities of the Rice Root. *Microb. Ecol.*, *66*(4), 917-926.
- Zhang, X., Zhang, R., Gao, J., Wang, X., Fan, F., Ma, X., Yin, H., Zhang, C., Feng, K. y Deng, Y. (2017). Thirty-one years of rice-rice-green manure rotations shape the rhizosphere microbial community and enrich beneficial bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, *104*, 208-217.
- Zhang, Y., Wang, X., Zhen, Y., Mi, T., He, H. y Yu, Z. (2017). Microbial diversity and community structure of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing bacteria in sediment cores from the East China Sea. *Front. Microbiol.*, *8*(NOV), 1-17.
- Zorrilla, H. (2018). *Presentación: Producir y Exportar Arroz en Uruguay*. Consultado el 12 de octubre de 2020, desde <http://www.aca.com.uy/>

- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61(4), 533-616.
- Zverlov, V., Klein, M., Lückner, S., Friedrich, M. W., Kellermann, J., Stahl, D. A., Loy, A. y Wagner, M. (2005). Lateral gene transfer of dissimilatory (Bi)sulfite reductase revisited. *J. Bacteriol.*, 187(6), 2203-2208.

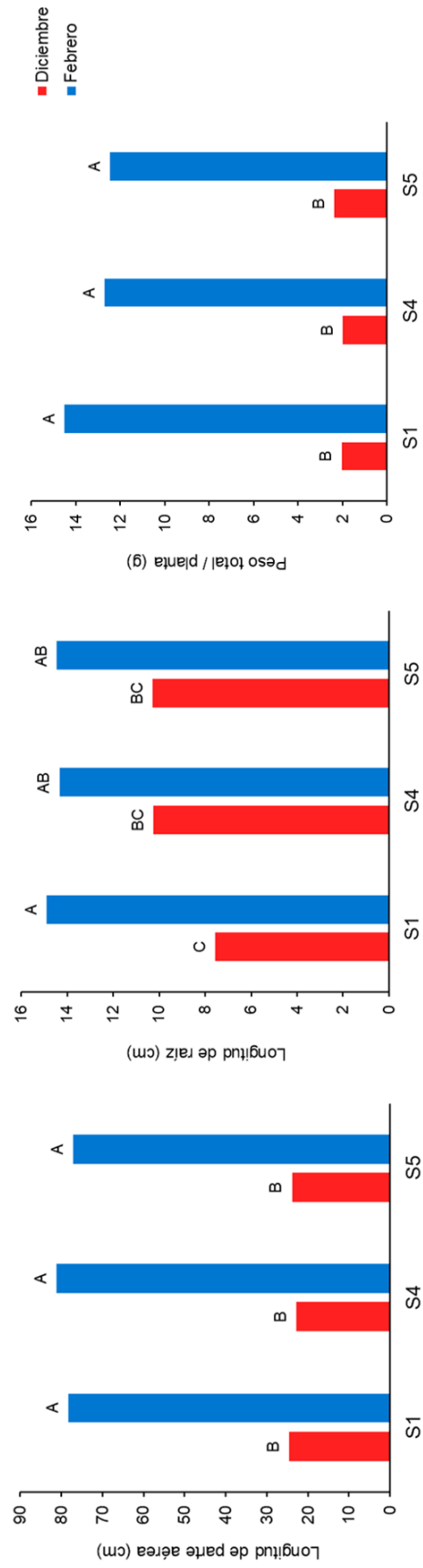
# ANEXOS



# Anexo 1

## Parámetros de rendimiento vegetal

Para evaluar el rendimiento vegetal de las plantas muestreadas se tomaron medidas de la longitud de la parte aérea, longitud de la raíz y peso fresco total por planta. Con excepción de la longitud de la raíz, los resultados de rendimiento presentaron diferencias significativas únicamente con respecto al Muestreo, con valores mayores en febrero que en diciembre, lo cual era esperado debido el tiempo de desarrollo de la planta (Figura 1.1). Con respecto a la raíz, se observó una tendencia a una mayor longitud en Febrero que en Diciembre, aunque estas diferencias no fueron significativas para las 3 rotaciones evaluadas. Cabe mencionar que se presentaron dificultades para mantener sana la totalidad de la raíz de cada planta durante el muestreo en campo y la posterior separación de la rizósfera, por lo cual la longitud de las raíces efectivamente medida puede ser distinta de la longitud real en campo.



**Figura 1.1:** Parámetros de rendimiento vegetal. Resultados correspondientes a longitud de parte aérea (cm), longitud de raíz (cm) y peso total por planta (g) de las plantas muestreadas en diciembre y febrero a partir de distintas rotaciones. S1, S4 y S5 se refieren a los suelos de las 3 rotaciones donde fueron cultivadas las plantas. Letras distintas indican diferencias significativas ( $n=3$ , ANOVA con  $\alpha=0.05$ , Test de Tukey).

## Anexo 2

Concentración del ADN extraído de suelo, rizósfera y raíces de arroz

Suelo	ng ADN. $\mu\text{l}^{-1}$	$\mu\text{g}$ ADN.g suelo seco $^{-1}$	Rizósfera	ng ADN. $\mu\text{l}^{-1}$	$\mu\text{g}$ ADN.g rizósfera seca $^{-1}$	Raíz	ng ADN. $\mu\text{l}^{-1}$	$\mu\text{g}$ ADN.g raíz fresca $^{-1}$
SDR1.1	8.1	0.69	RhDR1.1	96.9	13.09	RDR1.1	9.7	2.92
SDR1.2	13.9	1.23	RhDR1.2	122.0	17.76	RDR1.2	6.7	2.02
SDR1.3	36.0	2.88	RhDR1.3	71.0	9.59	RDR1.3	7.8	2.34
SDR4.1	31.7	2.61	RhDR4.1	107.0	12.96	RDR4.1	5.7	1.71
SDR4.2	33.3	2.81	RhDR4.2	84.5	10.72	RDR4.2	4.3	1.30
SDR4.3	27.5	2.29	RhDR4.3	49.6	6.01	RDR4.3	6.8	2.04
SDR5.1	11.0	1.00	RhDR5.1	62.0	8.00	RDR5.1	5.4	1.61
SDR5.2	4.5	0.38	RhDR5.2	43.9	5.70	RDR5.2	5.9	1.76
SDR5.3	10.8	0.89	RhDR5.3	49.3	6.18	RDR5.3	6.2	1.85
SFR1.1	4.0	0.37	RhFR1.1	26.9	3.36	RFR1.1	8.9	2.66
SFR1.2	7.2	0.61	RhFR1.2	76.0	10.86	RFR1.2	16.4	4.92
SFR1.3	14.3	1.26	RhFR1.3	100.0	13.70	RFR1.3	6.8	2.05
SFR4.1	12.3	1.10	RhFR4.1	67.1	9.59	RFR4.1	10.0	3.00
SFR4.2	5.1	0.48	RhFR4.2	72.1	10.45	RFR4.2	11.3	3.39
SFR4.3	3.6	0.32	RhFR4.3	59.0	7.87	RFR4.3	4.6	1.37
SFR5.1	7.7	0.70	RhFR5.1	40.9	5.84	RFR5.1	3.0	0.91
SFR5.2	11.3	1.03	RhFR5.2	41.4	5.52	RFR5.2	7.6	2.27
SFR5.3	17.9	1.60	RhFR5.3	46.2	6.33	RFR5.3	4.3	1.30

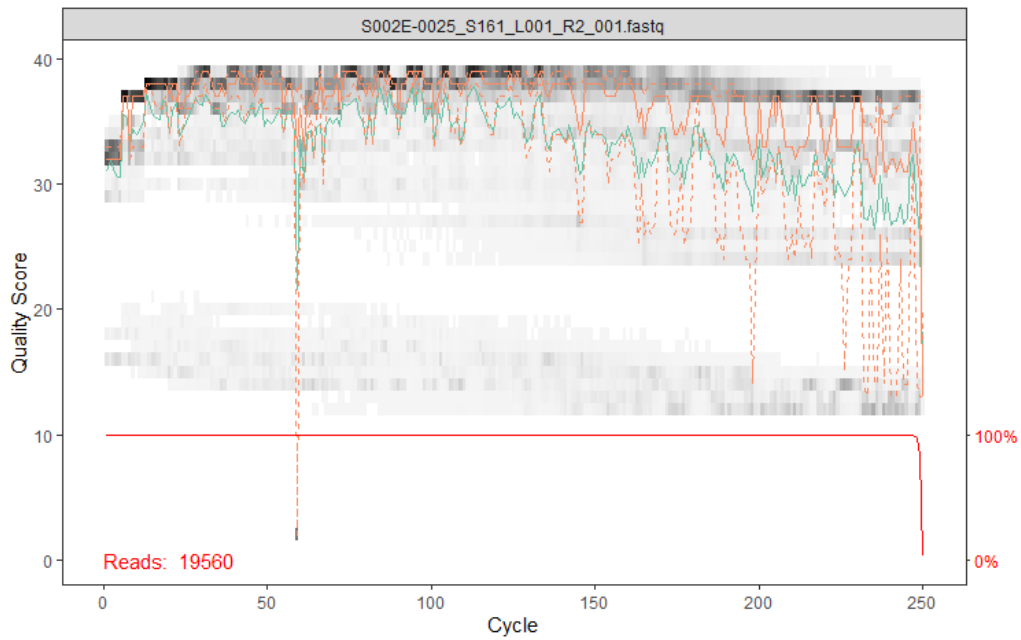
**Tabla 2.1:** Concentración del ADN extraído a partir de suelos, rizósferas y raíces. Se presentan los resultados en ng ADN.  $\mu\text{l}^{-1}$  y  $\mu\text{g}$  ADN.g de material de partida $^{-1}$ .

## Anexo 3

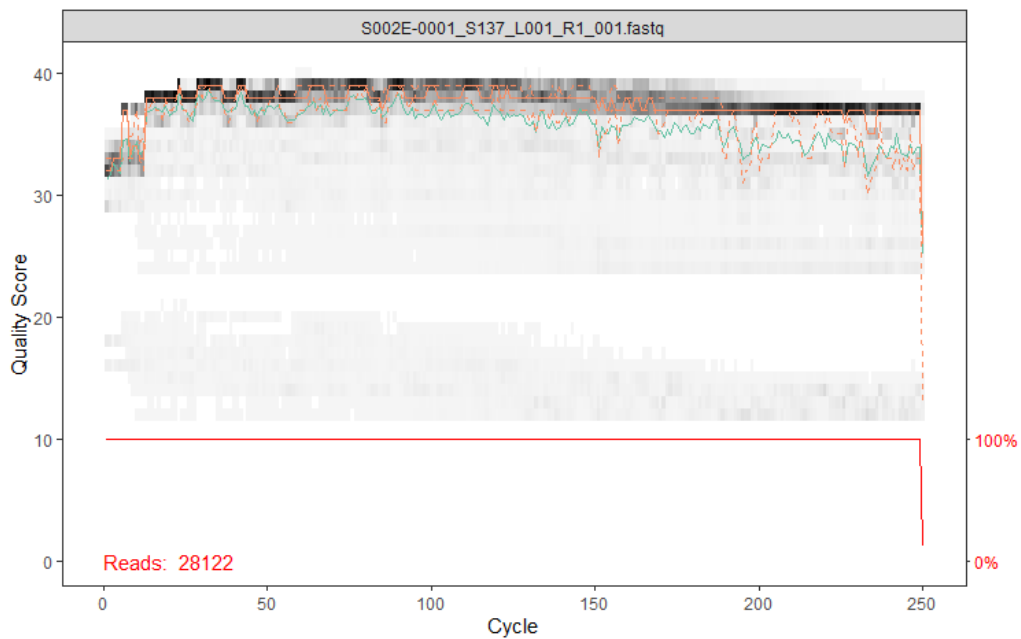
Calidad de las secuencias crudas obtenidas mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA de suelo, rizósfera y raíces de arroz



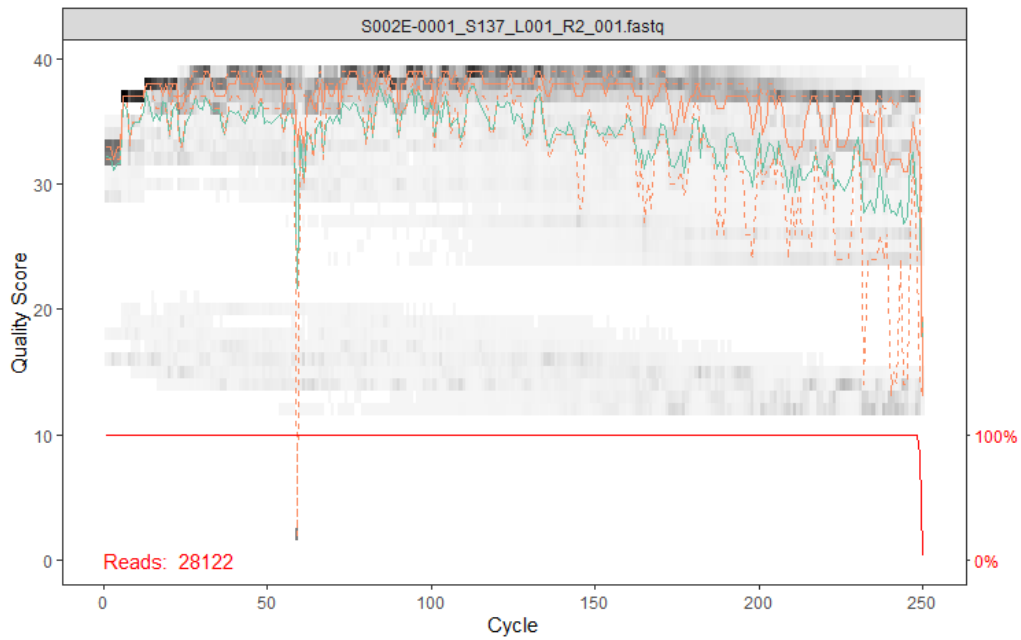
**Figura 3.1:** Ejemplo de calidad de las secuencias crudas *Forward* obtenidas en una muestra de suelo (SDR1.1) y el número de lecturas para esta muestra.



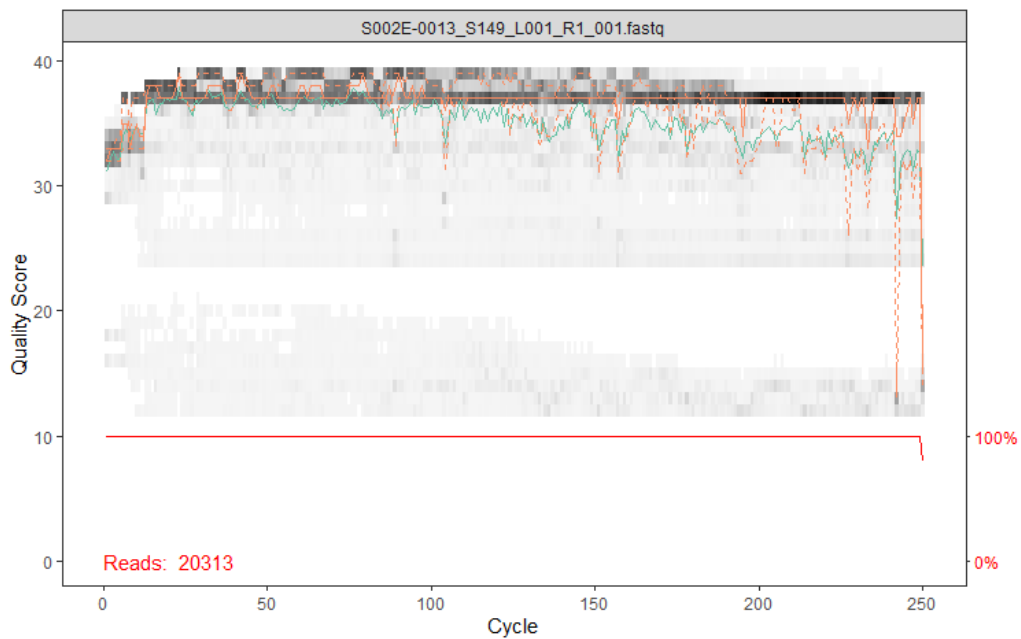
**Figura 3.2:** Ejemplo de calidad de las secuencias crudas *Reverse* obtenidas en una muestra de suelo (SDR1.1) y el número de lecturas para esta muestra.



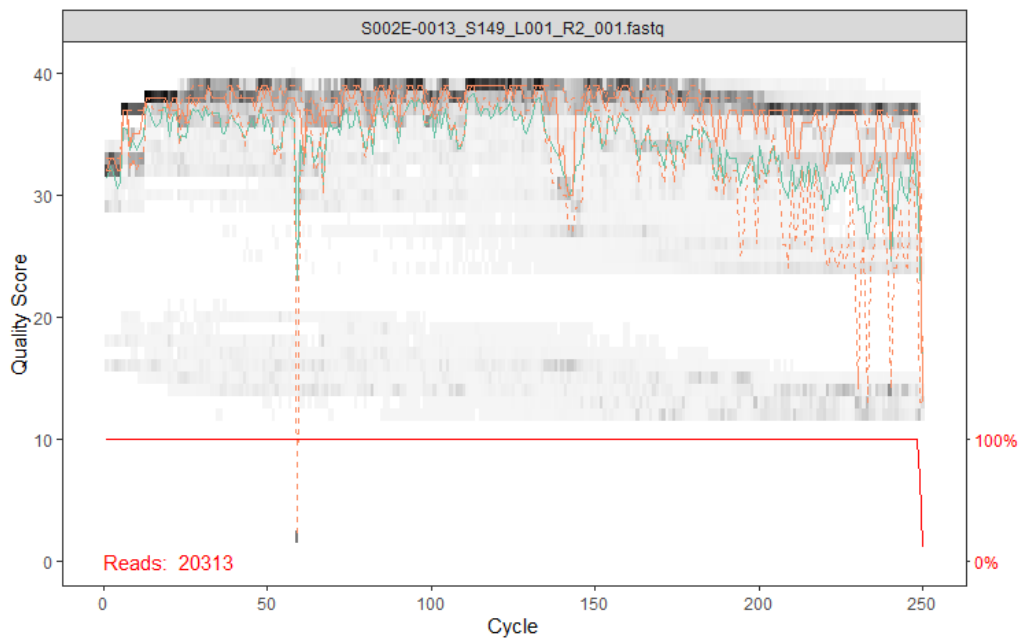
**Figura 3.3:** Ejemplo de calidad de las secuencias crudas *Forward* obtenidas en una muestra de rizósfera (RhDR1.1) y el número de lecturas para esta muestra.



**Figura 3.4:** Ejemplo de calidad de las secuencias crudas *Reverse* obtenidas en una muestra de rizósfera (RhDR1.1) y el número de lecturas para esta muestra.



**Figura 3.5:** Ejemplo de calidad de las secuencias crudas *Forward* obtenidas en una muestra de raíz (RDR1.1) y el número de lecturas para esta muestra.

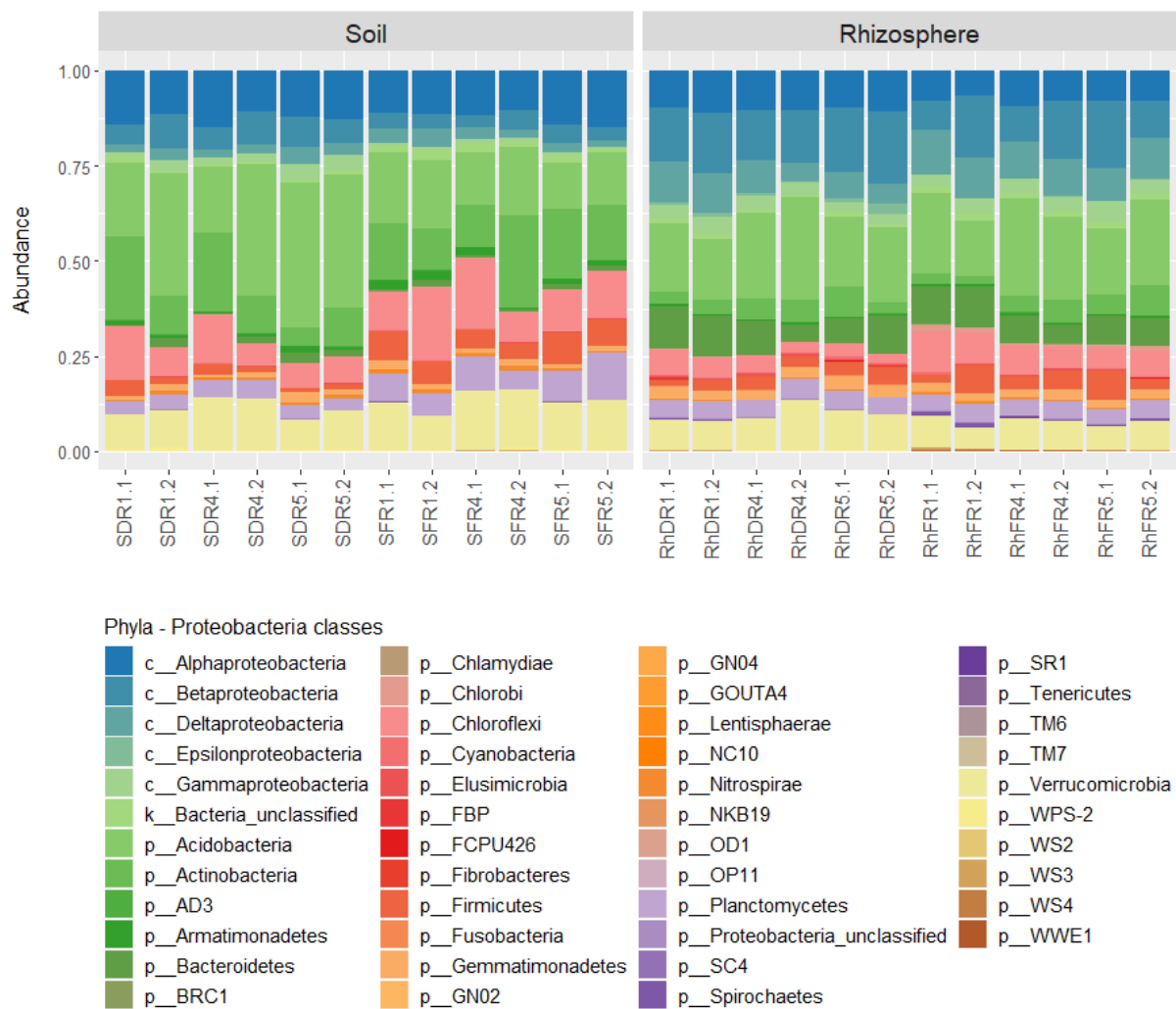


**Figura 3.6:** Ejemplo de calidad de las secuencias crudas *Reverse* obtenidas en una muestra de raíz (RDR1.1) y el número de lecturas para esta muestra.

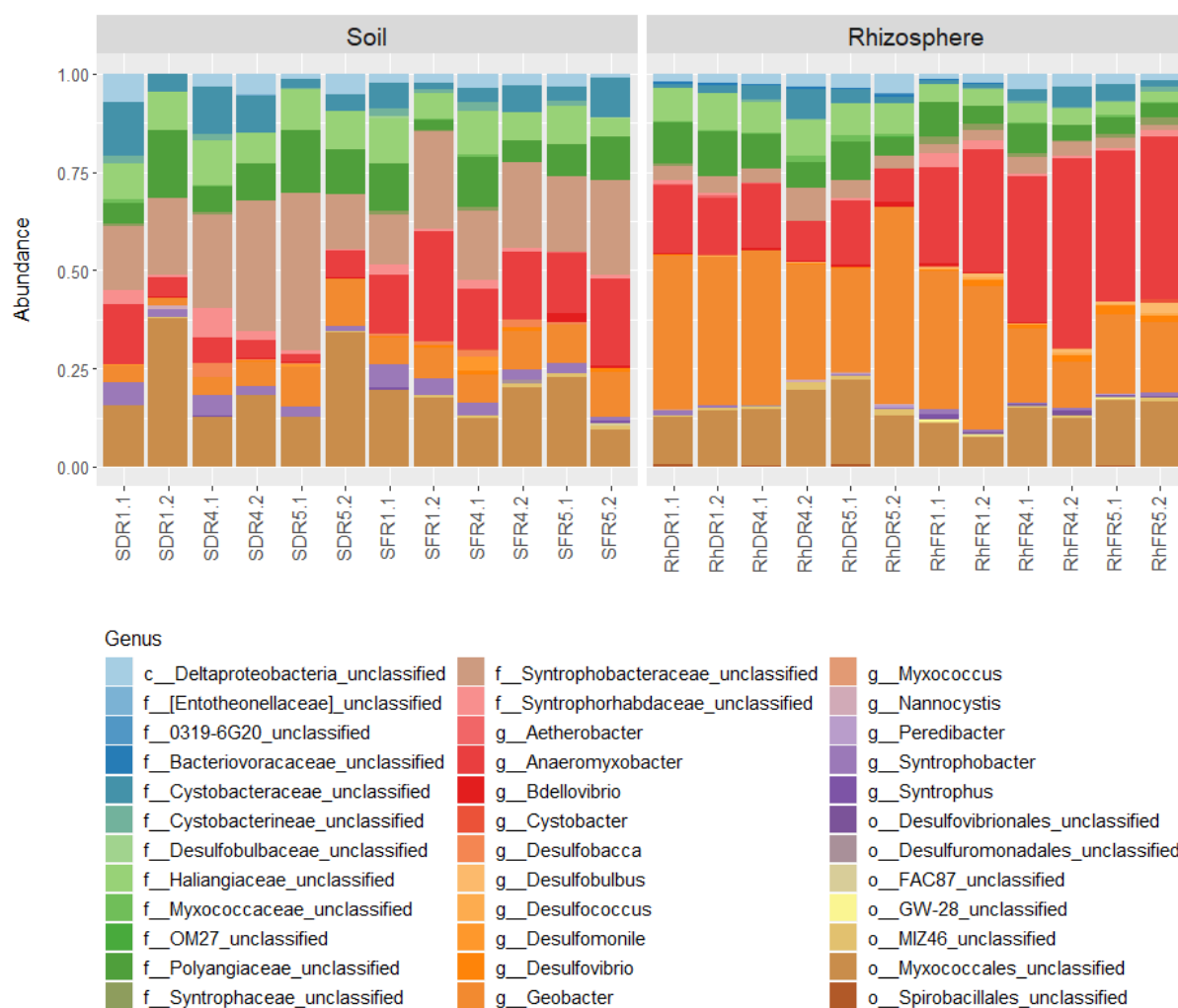


## Anexo 4

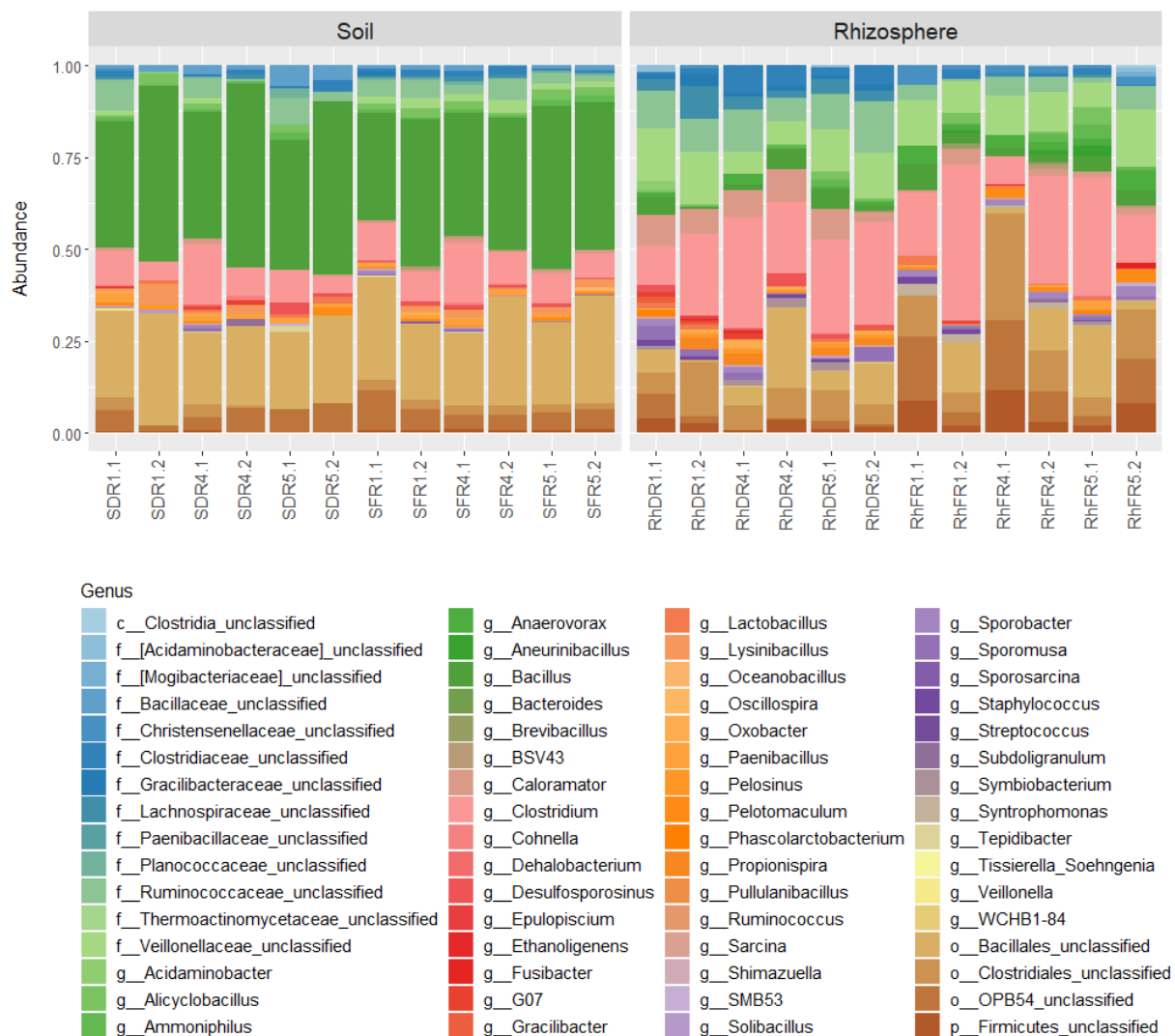
Resultados del análisis *Phyloseq* alternativo realizado sobre los datos de secuenciación masiva de genes 16S rRNA: estructura de las comunidades bacterianas de suelo y rizósfera.



**Figura 4.1:** Composición taxonómica a nivel de phylum de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de suelo y rizósfera de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir del análisis *Phyloseq* alternativo de los datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA. El phylum *Proteobacteria* fue dividido en sus respectivas clases.



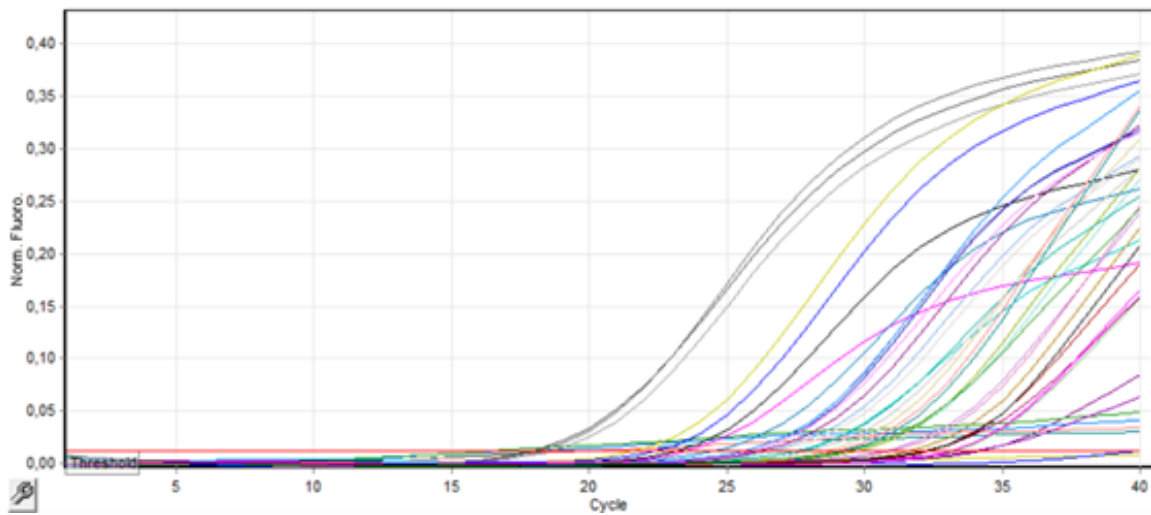
**Figura 4.2:** Composición taxonómica a nivel de género de la clase *Deltaproteobacteria* en las muestras de suelo y rizósfera de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir del análisis *Phyloseq* alternativo de los datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA.



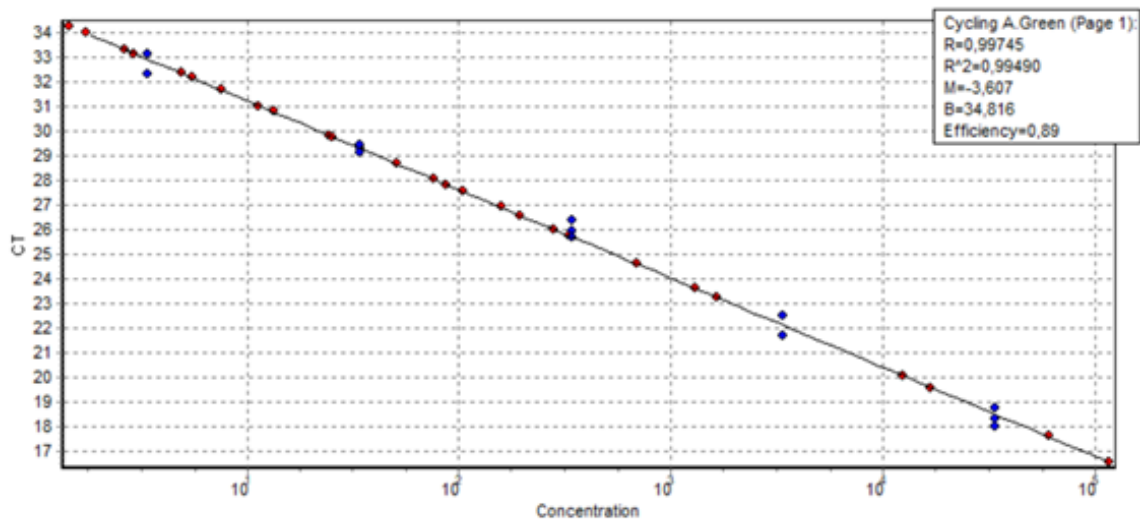
**Figura 4.3:** Composición taxonómica a nivel de género del phylum *Firmicutes* en las muestras de suelo y rizósfera de arroz en las dos etapas del cultivo, a partir del análisis *Phyloseq* alternativo de los datos de secuenciación masiva del gen 16S rRNA.

## Anexo 5

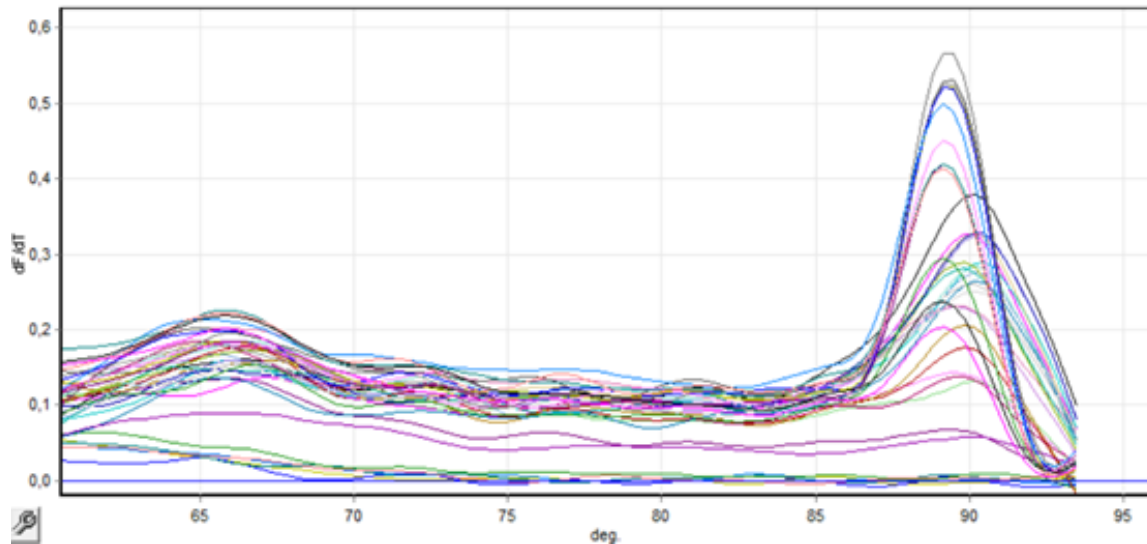
Curvas de cuantificación, estándar y de temperatura de melting obtenidas en las qPCR de genes *mcrA*, *nirS* y *nirK*



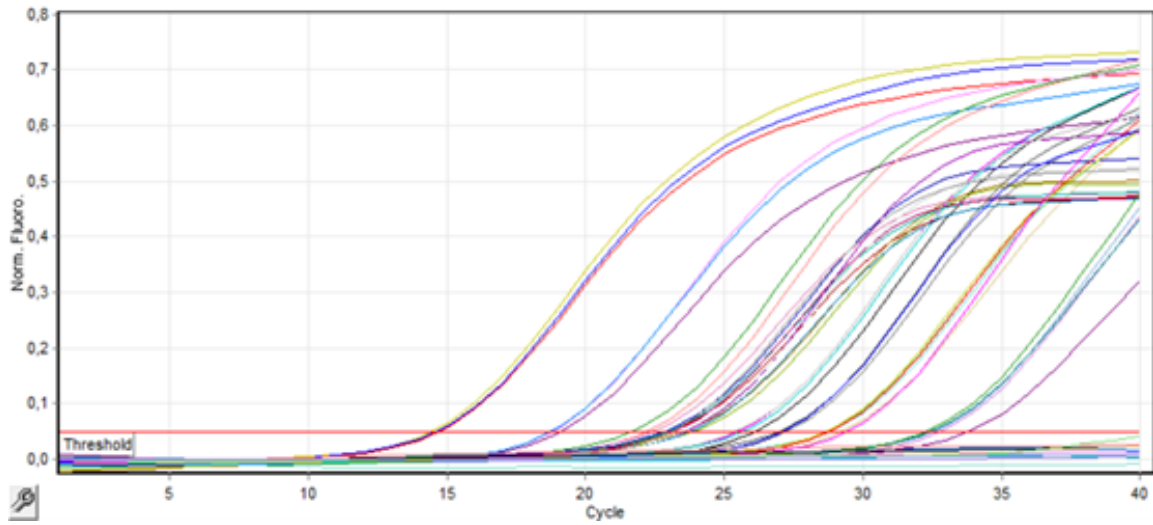
**Figura 5.1:** Curva de cuantificación del gen *mcrA* por qPCR para las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-9}$ ), muestras de suelo, rizósfera y raíces, y controles negativos (no superan el umbral). Se representa Fluorescencia vs. N° de ciclos.



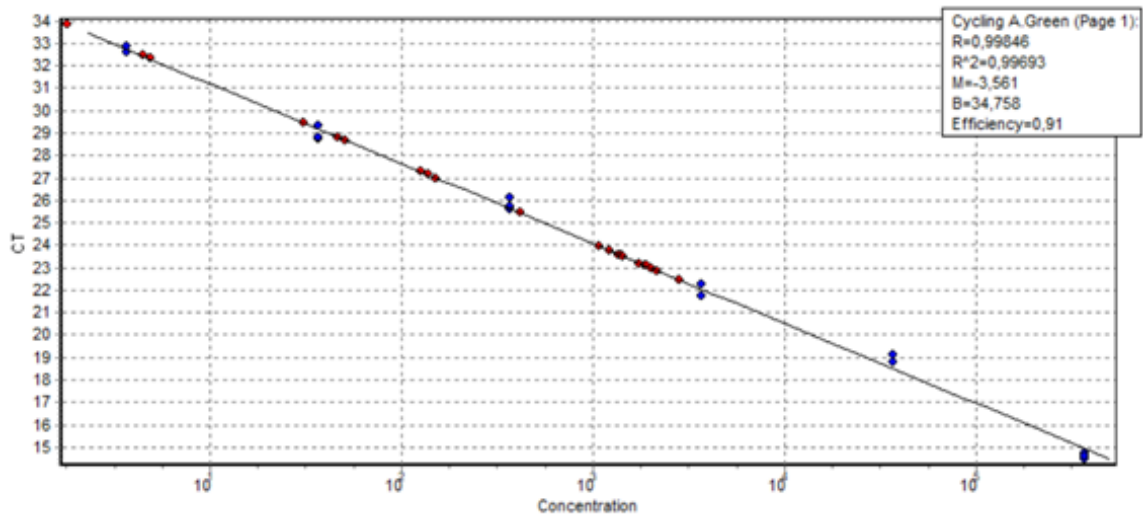
**Figura 5.2:** Curva estándar obtenida para qPCR del gen *mcrA*. Se representa CT vs concentración (copias. $\mu\text{l}^{-1}$ ). Los puntos azules corresponden a las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-9}$ ) y los puntos rojos a muestras de suelo, rizósfera y raíces.



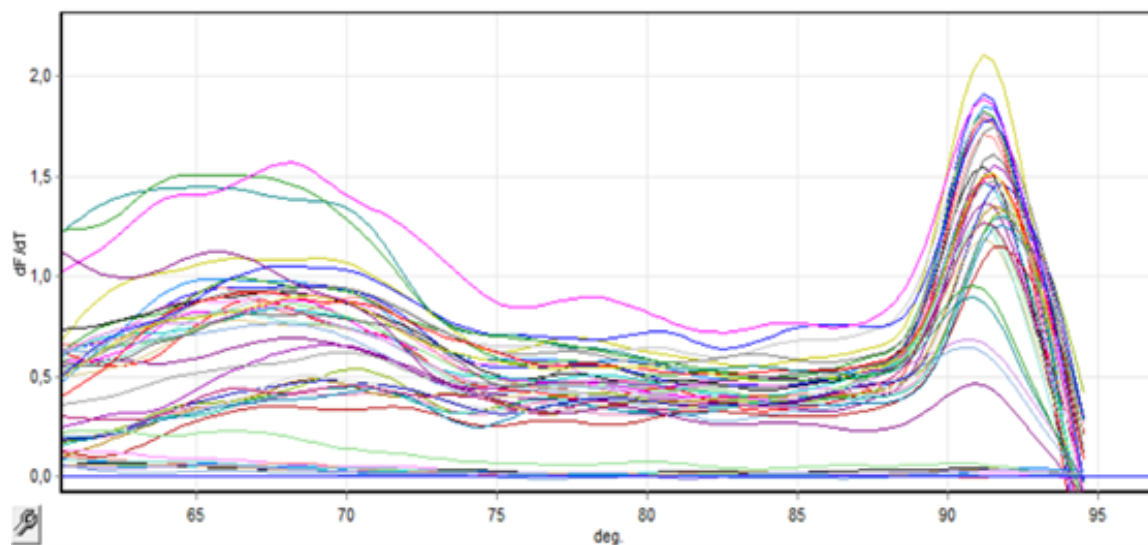
**Figura 5.3:** Curva de temperatura melting obtenida para qPCR del gen *mcrA*. Se muestran los gráficos para los diferentes estándares de la curva de calibración, muestras de suelo, rizósfera y raíces, y controles negativos.



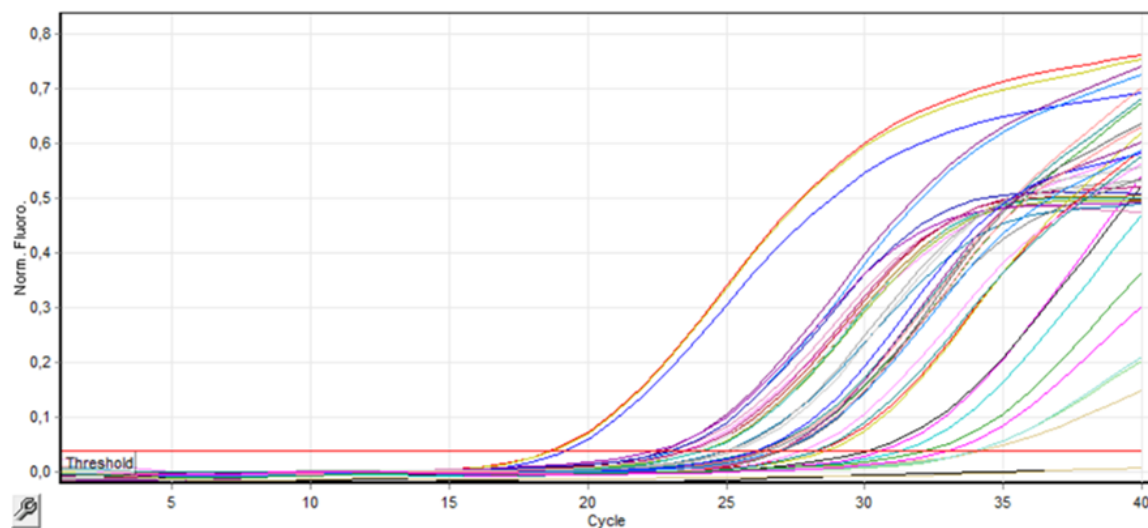
**Figura 5.4:** Curva de cuantificación del gen *nirS* por qPCR para las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-10}$ ), muestras de suelo, rizósfera y raíces, y controles negativos (no superan el umbral). Se representa Fluorescencia vs. N° de ciclos.



**Figura 5.5:** Curva estándar obtenida para qPCR del gen *nirS*. Se representa CT vs concentración (copias. $\mu\text{l}^{-1}$ ). Los puntos azules corresponden a las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-10}$ ) y los puntos rojos a muestras de suelo, rizósfera y raíces.

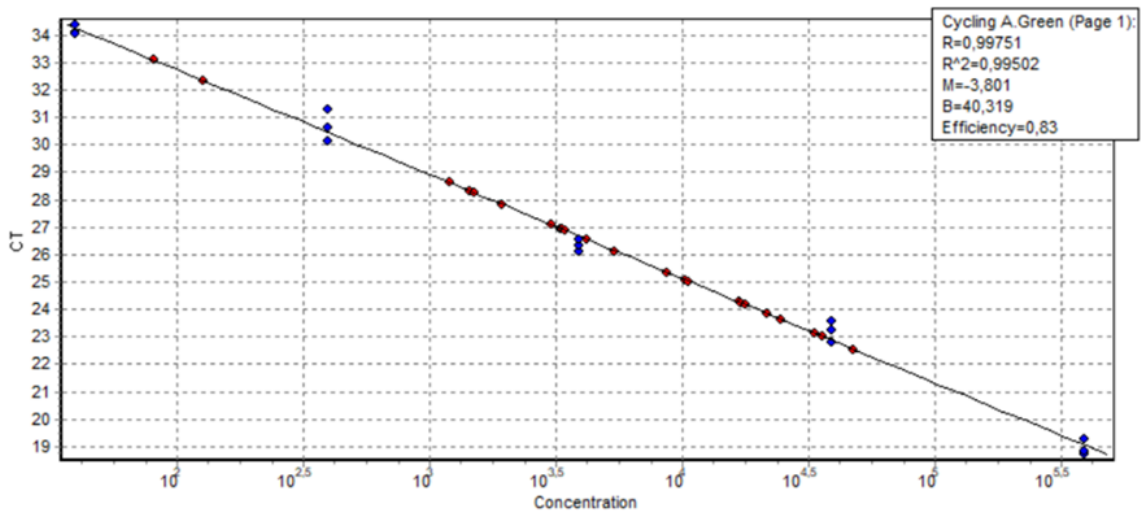


**Figura 5.6:** Curva de temperatura melting obtenida para qPCR del gen *nirS*. Se muestran los gráficos para los diferentes estándares de la curva de calibración, muestras de suelo, rizósfera y raíces, y controles negativos.

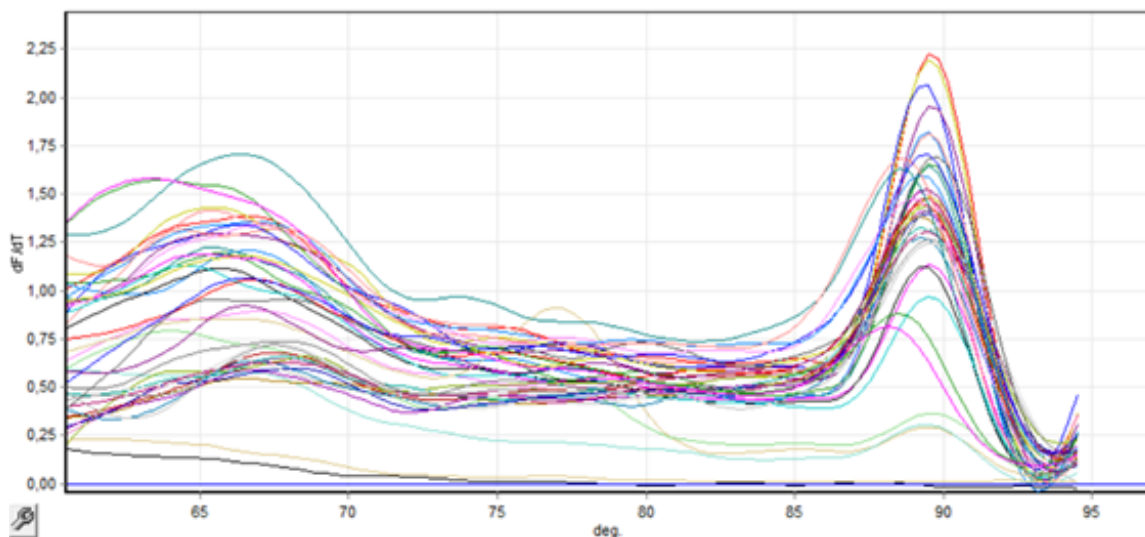


**Figura 5.7:** Curva de cuantificación del gen *nirK* por qPCR para las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-9}$ ), muestras de suelo, rizósfera y raíces, y controles negativos (no superan el umbral). Se representa Fluorescencia vs. N° de ciclos.





**Figura 5.8:** Curva estándar obtenida para qPCR del gen *nirK*. Se representa CT vs concentración (copias. $\mu\text{l}^{-1}$ ). Los puntos azules corresponden a las diluciones del estándar (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-9}$ ) y los puntos rojos a muestras de suelo, rizósfera y raíces.



**Figura 5.9:** Curva de temperatura melting obtenida para qPCR del gen *nirK*. Se muestran los gráficos para los diferentes estándares de la curva de calibración, muestras de suelo, rizósfera y raíces, y controles negativos. Se observa formación de dímeros de primers en estándares más diluidos ( $10^{-9}$ ) a una  $T_m = 77^\circ\text{C}$

# Anexo 6

Cuantificación de genes marcadores funcionales en suelos, rizósferas y raíces mediante qPCR: valores de abundancia y comparaciones estadísticas

log <sub>10</sub> copias del gen.ng de ADN <sup>-1</sup>				log <sub>10</sub> copias del gen.ng de ADN <sup>-1</sup>				log <sub>10</sub> copias del gen.ng de ADN <sup>-1</sup>						
Suelo	<i>dsrA</i>	<i>mcrA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	Rizósfera	<i>dsrA</i>	<i>mcrA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	Raíz	<i>dsrA</i>	<i>mcrA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>
SDR1.1	2.40	1.45	2.42	3.70	RhDDR1.1	2.63	2.18	2.46	3.44	RDR1.1	1.70	<LC	1.32	3.93
SDR1.2	2.50	1.89	2.29	3.41	RhDDR1.2	2.66	2.15	2.52	3.53	RDR1.2	1.44	<LC	1.31	3.10
SDR1.3	3.46	1.84	2.21	3.59	RhDDR1.3	2.47	1.87	2.26	3.35	RDR1.3	1.72	<LC	1.99	3.83
SDR4.1	2.38	0.86	2.52	3.28	RhDDR4.1	2.54	0.93	2.25	3.54	RDR4.1	1.10	<LC	1.01	3.12
SDR4.2	2.55	0.47	2.21	2.86	RhDDR4.2	2.40	0.24	2.16	3.36	RDR4.2	1.20	<LC	0.91	2.91
SDR4.3	0.88	1.00	1.47	4.61	RhDDR4.3	2.12	0.36	2.17	3.47	RDR4.3	1.28	<LC	1.31	3.06
SDR5.1	2.40	2.38	1.89	5.38	RhDR5.1	2.61	1.24	2.46	3.63	RDR5.1	1.40	<LC	1.30	3.25
SDR5.2	2.14	2.18	1.84	4.85	RhDR5.2	2.41	1.74	2.36	3.63	RDR5.2	1.36	<LC	1.11	2.89
SDR5.3	2.64	2.45	2.27	4.75	RhDR5.3	2.54	<LC	3.12	3.71	RDR5.3	1.11	<LC	1.13	2.90
SFR1.1	2.81	2.28	2.13	4.48	RhFR1.1	2.98	2.87	2.20	3.39	RFR1.1	1.85	0.82	1.48	3.96
SFR1.2	2.95	2.23	1.63	4.11	RhFR1.2	3.42	2.83	2.10	3.35	RFR1.2	1.77	1.59	1.64	3.73
SFR1.3	2.62	1.92	2.54	4.46	RhFR1.3	3.29	2.61	2.94	3.34	RFR1.3	1.89	<LC	1.21	3.18
SFR4.1	2.42	2.09	1.99	5.51	RhFR4.1	2.83	2.86	2.26	3.56	RFR4.1	1.77	1.09	1.60	3.75
SFR4.2	1.82	2.51	1.91	4.29	RhFR4.2	2.86	2.49	2.15	3.38	RFR4.2	1.66	0.97	1.05	3.54
SFR4.3	1.97	1.77	1.60	4.48	RhFR4.3	2.56	2.56	2.27	3.40	RFR4.3	2.29	<LC	1.93	3.46
SFR5.1	2.43	2.18	2.32	5.07	RhFR5.1	2.67	<LC	2.55	3.54	RFR5.1	1.95	1.31	1.74	3.94
SFR5.2	2.22	2.21	1.51	4.72	RhFR5.2	2.92	3.22	2.20	3.44	RFR5.2	1.97	0.90	1.19	3.45
SFR5.3	2.63	2.22	2.38	5.43	RhFR5.3	2.92	2.89	2.60	3.52	RFR5.3	2.09	<LC	1.46	3.50

**Tabla 6.1:** Abundancia de genes *dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK* en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5), en ambos muestreos (diciembre y febrero) y en cada uno de los bloques (n=3). Valores expresados en log<sub>10</sub> del número de copias del gen por ng de ADN total extraído. LC: límite de cuantificación. LC *mcrA* raíces = 4.2 copias de *mcrA*.ng ADN<sup>-1</sup>. LC *mcrA* rizósfera = 0.68 copias de *mcrA*.ng ADN<sup>-1</sup>

Suelo	log <sub>10</sub> copias del gen.g suelo seco <sup>-1</sup>				log <sub>10</sub> copias del gen.g rizósfera seca <sup>-1</sup>				log <sub>10</sub> copias del gen.g raíz fresca <sup>-1</sup>					
	<i>dsrA</i>	<i>mcrA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	Rizósfera	<i>dsrA</i>	<i>mcrA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	Raíz	<i>dsrA</i>	<i>mcrA</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>
SDR1.1	5.24	5.14	5.25	6.49	RhDDR1.1	6.75	6.30	6.58	6.97	RDR1.1	5.17	<LC	4.79	7.40
SDR1.2	5.34	5.84	5.38	6.09	RhDDR1.2	6.78	6.40	6.77	7.51	RDR1.2	4.75	<LC	4.62	6.41
SDR1.3	6.29	5.32	5.69	6.60	RhDDR1.3	6.58	5.86	6.38	7.11	RDR1.3	5.09	<LC	5.36	7.20
SDR4.1	5.79	4.34	5.94	6.36	RhDDR4.1	6.65	5.04	6.36	7.65	RDR4.1	4.34	<LC	4.24	6.35
SDR4.2	5.97	3.97	5.66	6.31	RhDDR4.2	6.52	4.27	6.19	7.47	RDR4.2	4.31	<LC	4.02	6.02
SDR4.3	4.29	4.47	4.83	7.19	RhDDR4.3	6.24	4.14	6.28	7.37	RDR4.3	4.59	<LC	4.62	6.37
SDR5.1	5.40	5.38	4.89	8.91	RhDDR5.1	6.51	5.14	6.36	6.20	RDR5.1	4.60	<LC	4.51	6.46
SDR5.2	5.14	4.77	4.42	8.84	RhDDR5.2	6.31	5.49	6.11	6.69	RDR5.2	4.61	<LC	4.36	6.13
SDR5.3	5.64	5.44	5.27	8.51	RhDDR5.3	6.45	<LC	6.93	6.56	RDR5.3	4.38	<LC	4.39	6.16
SFR1.1	5.38	5.72	4.70	8.60	RhFR1.1	6.51	6.40	5.73	6.22	RFR1.1	5.28	4.25	4.91	7.38
SFR1.2	5.52	5.92	4.42	8.22	RhFR1.2	6.95	6.86	6.14	6.76	RFR1.2	5.46	5.28	5.33	7.42
SFR1.3	5.19	5.61	5.11	7.46	RhFR1.3	6.81	6.71	6.47	7.09	RFR1.3	5.21	<LC	4.52	6.30
SFR4.1	5.49	5.83	5.05	8.08	RhFR4.1	6.81	6.84	6.25	7.60	RFR4.1	5.25	4.57	5.08	7.23
SFR4.2	4.89	5.66	4.59	7.35	RhFR4.2	6.85	6.51	6.16	7.40	RFR4.2	5.19	4.45	4.58	7.07
SFR4.3	5.03	5.30	4.66	8.38	RhFR4.3	6.54	6.48	6.25	6.40	RFR4.3	5.43	<LC	5.07	6.77
SFR5.1	5.27	5.03	5.17	7.91	RhFR5.1	6.44	<LC	6.31	7.79	RFR5.1	4.91	4.27	4.70	6.90
SFR5.2	5.07	5.22	4.52	8.14	RhFR5.2	6.69	6.96	5.94	7.47	RFR5.2	5.33	4.25	4.55	6.81
SFR5.3	5.48	5.43	5.59	8.28	RhFR5.3	6.68	6.71	6.36	7.26	RFR5.3	5.21	<LC	4.57	6.64

**Tabla 6.2:** Abundancia de genes *dsrA*, *mcrA*, *nirS* y *nirK* en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5), en ambos muestreos (diciembre y febrero) y en cada uno de los bloques (n=3). Valores expresados en log<sub>10</sub> del número de copias del gen por gramo material de partida. LC: límite de cuantificación. LC *mcrA* raíces = 1.0x10<sup>4</sup> copias de *mcrA*. g raíz fresca<sup>-1</sup>. LC *mcrA* rizósfera = 3.9x10<sup>3</sup> copias de *mcrA*. g rizósfera seca<sup>-1</sup>

Gene	p-value	Material		
		Soil	Rhizosphere	Root
<i>dsrA</i>	<0.0001	2.40 a	2.71 a	1.64 b
<i>mcrA</i>	0.0293	1.89 a	2.07 a	1.11 b
<i>nirK</i>	<0.0001	4.39 a	3.48 b	3.42 b
<i>nirS</i>	<0.0001	2.06 b	2.39 a	1.37 c

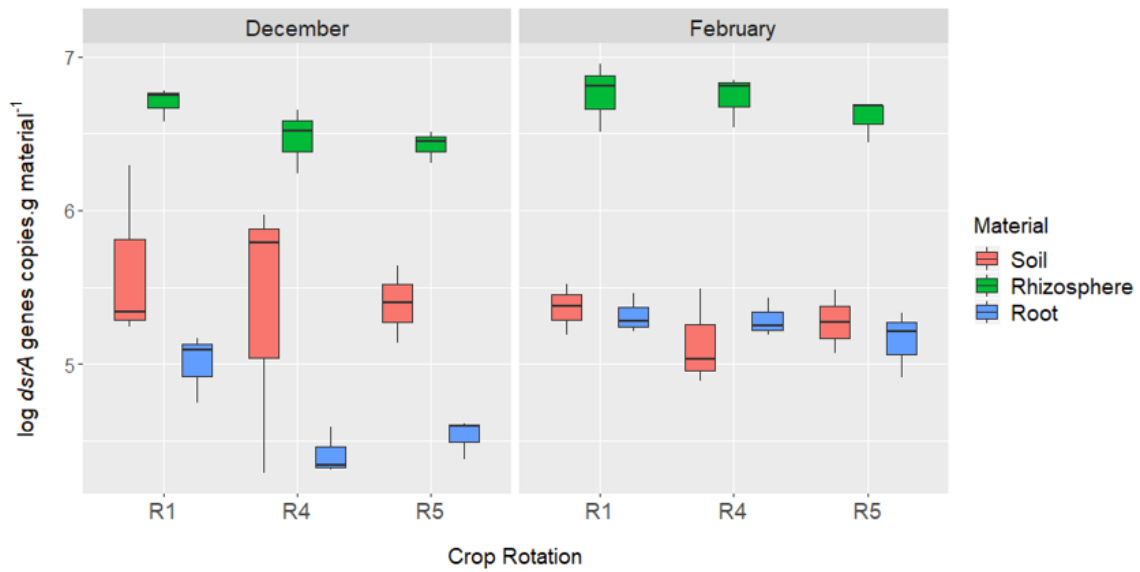
**Tabla 6.3:** P-valores de los ANOVAs y comparaciones de medias (Test de Tukey) de la abundancia de genes *dsrA*, *mcrA*, *nirK* y *nirS* entre los distintos materiales, realizados de forma independiente para cada gen. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). Los valores de abundancia se expresan en  $\log_{10}$  copias del gen.ng ADN<sup>-1</sup>.

p-value	December			February		
	Soil	Rhizosphere	Root	Soil	Rhizosphere	Root
	<0.0001			<0.0001		
mean	2.37 a	2.49 a	1.37 b	2.43 b	2.94 a	1.92 c

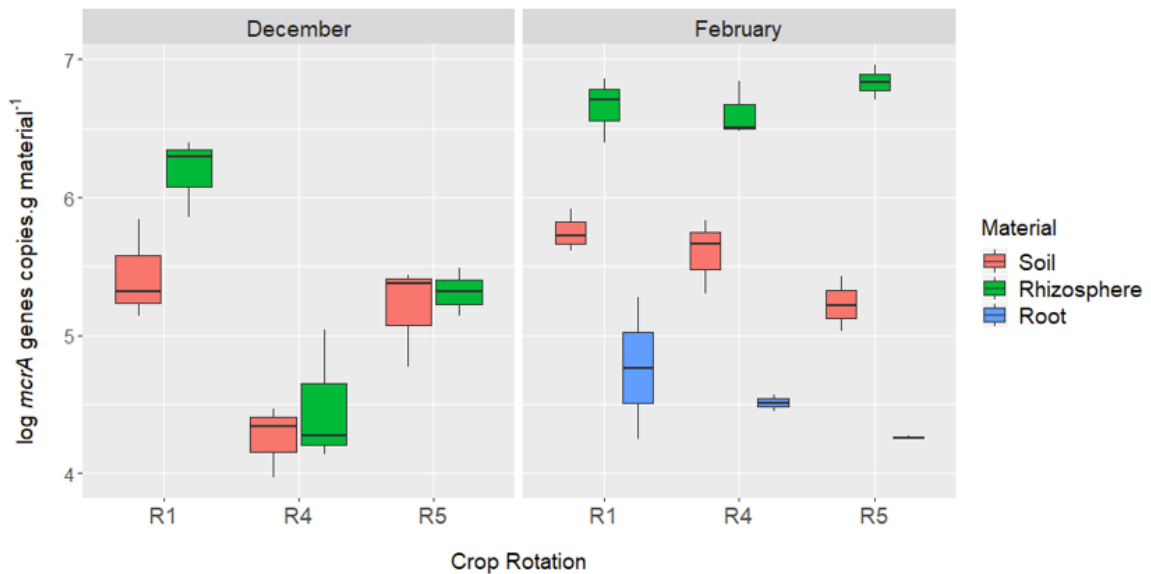
**Tabla 6.4:** P-valores de los ANOVAs y comparaciones de medias (Test de Tukey) de la abundancia de genes *dsrA* entre los distintos materiales, realizados de forma independiente para cada muestreo (diciembre y febrero). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). Los valores de abundancia se expresan en  $\log_{10}$  copias del gen.ng ADN<sup>-1</sup>. ns: p-valor del ANOVA no significativo.

p-value	December		February	
	Soil	Rhizosphere	Soil	Rhizosphere
	0.4900		<0.0001	
mean	1.61	1.34	2.13 b	2.80 a

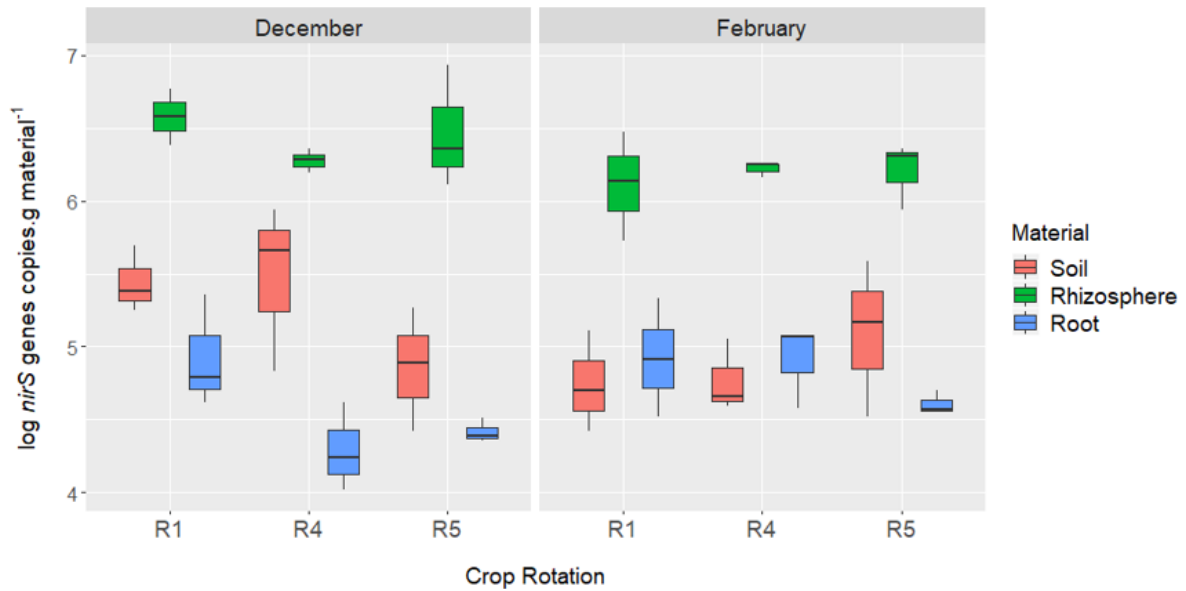
**Tabla 6.5:** P-valores de los ANOVAs y comparaciones de medias (Test de Tukey) de la abundancia de genes *mcrA* entre suelos y rizósferas, realizados de forma independiente para cada muestreo (diciembre y febrero). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). Los valores de abundancia se expresan en  $\log_{10}$  copias del gen.ng ADN<sup>-1</sup>.



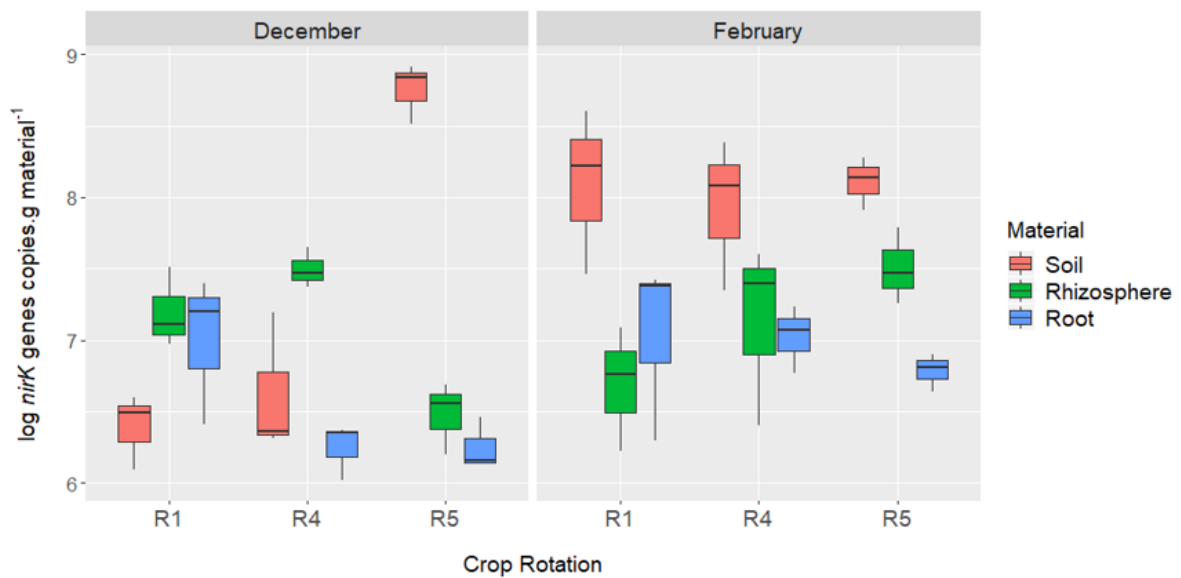
**Figura 6.1:** Abundancia de genes *dsrA* en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero). Los resultados se expresan en  $\log_{10}$  del número de copias del gen por gramo material de partida. Para suelo y rizósfera, gramos de material seco; para raíz, gramos de tejido fresco.



**Figura 6.2:** Abundancia de genes *mcrA* en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero). Los resultados se expresan en  $\log_{10}$  del número de copias del gen por gramo material de partida. Para suelo y rizósfera, gramos de material seco; para raíz, gramos de tejido fresco.



(a) *nirS*



(b) *nirK*

**Figura 6.3:** Abundancia de genes *nirS* (a) y *nirK* (b) en suelos, rizósferas y raíces provenientes de las tres rotaciones en estudio (R1, R4 y R5) en ambos muestreos (diciembre y febrero). Los resultados se expresan en  $\log_{10}$  del número de copias del gen por gramo material de partida. Para suelo y rizósfera, gramos de material seco; para raíz, gramos de tejido fresco.

Gene	Soil			Rhizosphere			Root		
	R1	R4	R5	R1	R4	R5	R1	R4	R5
<i>dsrA</i>	ns	ns	ns	2.92 a	2.55 b	2.67 b	ns	ns	ns
<i>mcrA</i>	1.94 a	1.45 b	2.25 a	2.42 a	1.57 b	2.27 a	ns	ns	ns
<i>nirK</i>	3.96 b	4.33 ab	4.87 a	3.41 b	3.47 ab	3.55 a	3.67 a	3.31 b	3.27 b
<i>nirS</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabla 6.6:** Comparaciones de medias (Test de Tukey) de la abundancia de genes *dsrA*, *mcrA*, *nirK* y *nirS* según el factor rotación, realizados de forma independiente para cada material (suelo, rizósfera y raíces). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). Los valores de abundancia se expresan en  $\log_{10}$  copias del gen.ng ADN<sup>-1</sup>. ns: p-valor del ANOVA no significativo.

Gene	Soil		Rhizosphere		Root	
	December	February	December	February	December	February
<i>dsrA</i>	ns	ns	2.48 b	2.94 a	1.37 b	1.92 a
<i>mcrA</i>	1.61 b	2.15 a	1.34 b	2.79 a	nd	nd
<i>nirK</i>	3.22 b	3.61 a	3.52 a	3.44 b	4.05 b	4.73 a
<i>nirS</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabla 6.7:** Comparaciones de medias (Test de Tukey) de la abundancia de genes *dsrA*, *mcrA*, *nirK* y *nirS* según el factor muestreo, realizados de forma independiente para cada material (suelo, rizósfera y raíces). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). Los valores de abundancia se expresan en  $\log_{10}$  copias del gen.ng ADN<sup>-1</sup>. ns: p-valor del ANOVA no significativo.



Gene	Soil															Rhizosphere															Root																																			
	December					February					December					February					December					February																																								
	R1	R4	R5	R1	R5	R1	R4	R5	R1	R5	R1	R4	R5	R1	R5	R1	R4	R5	R1	R5	R1	R4	R5	R1	R5	R1	R4	R5	R1	R5																																				
<i>dsrA</i>	2.80	1.97	2.37	2.77	2.40	2.07	2.12	2.07	2.60	2.33	2.50	3.23	2.77	2.83	1.62	ab	1.19	b	1.29	b	1.84	ab	1.91	a	2.00	a	2.80	1.97	2.37	2.77	2.40	2.07	2.12	2.07	2.60	2.33	2.50	3.23	2.77	2.83	1.62	ab	1.19	b	1.29	b	1.84	ab	1.91	a	2.00	a														
<i>mcrA</i>	1.73	0.78	2.34	2.14	2.20	2.12	2.14	2.20	2.07	bc	0.51	d	1.49	*	c	2.77	ab	2.64	ab	3.06	*	a	<LC	3.06	*	a	<LC	1.21	*	1.03	*	1.10	*	1.73	0.78	2.34	2.14	2.20	2.12	2.14	2.20	2.07	bc	0.51	d	1.49	*	c	2.77	ab	2.64	ab	3.06	*	a	<LC	3.06	*	a	<LC	1.21	*	1.03	*	1.10	*
<i>nirK</i>	3.57	3.58	4.99	4.36	5.08	5.08	4.36	5.08	3.44	3.46	3.66	3.38	3.49	3.44	3.62	3.01	3.03	3.03	3.01	3.01	3.72	3.60	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.57	3.58	4.99	4.36	5.08	5.08	4.36	5.08	3.44	3.46	3.66	3.38	3.49	3.44	3.62	3.01	3.03	3.03	3.01	3.01	3.72	3.60	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52				
<i>nirS</i>	2.31	2.07	2.00	2.10	1.83	1.83	2.10	1.83	2.41	2.19	2.65	2.41	2.23	2.45	1.54	1.18	1.08	1.08	1.18	1.18	1.44	1.53	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	2.31	2.07	2.00	2.10	1.83	1.83	2.10	1.83	2.41	2.19	2.65	2.41	2.23	2.45	1.54	1.18	1.08	1.08	1.18	1.18	1.44	1.53	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46				

**Tabla 6.8:** Comparaciones de medias (Test de Tukey) de la abundancia de genes *dsrA*, *mcrA*, *nirK* y *nirS* según interacción rotación x muestreo, realizados de forma independiente para cada material (suelo, rizósfera y raíces). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). Los valores de abundancia se expresan en  $\log_{10}$  copias del gen.ng ADN<sup>-1</sup>. n= 3 bloques. \*n=2 bloques.

## Anexo 7

Composición y diversidad de las comunidades sulfato reductoras y desnitrificantes: comparaciones de medias de los índices de diversidad calculados a partir de de los T-RFLP de los genes *dsrAB* y *nirS*, y total de fragmentos obtenidos mediante T-RFLP del gen *nirK*

	Rhizosphere		
Diversity index	R1	R4	R5
Richness	6.17 ab	4.50 b	8.50 a
Shannon	ns	ns	ns
Simpson	ns	ns	ns

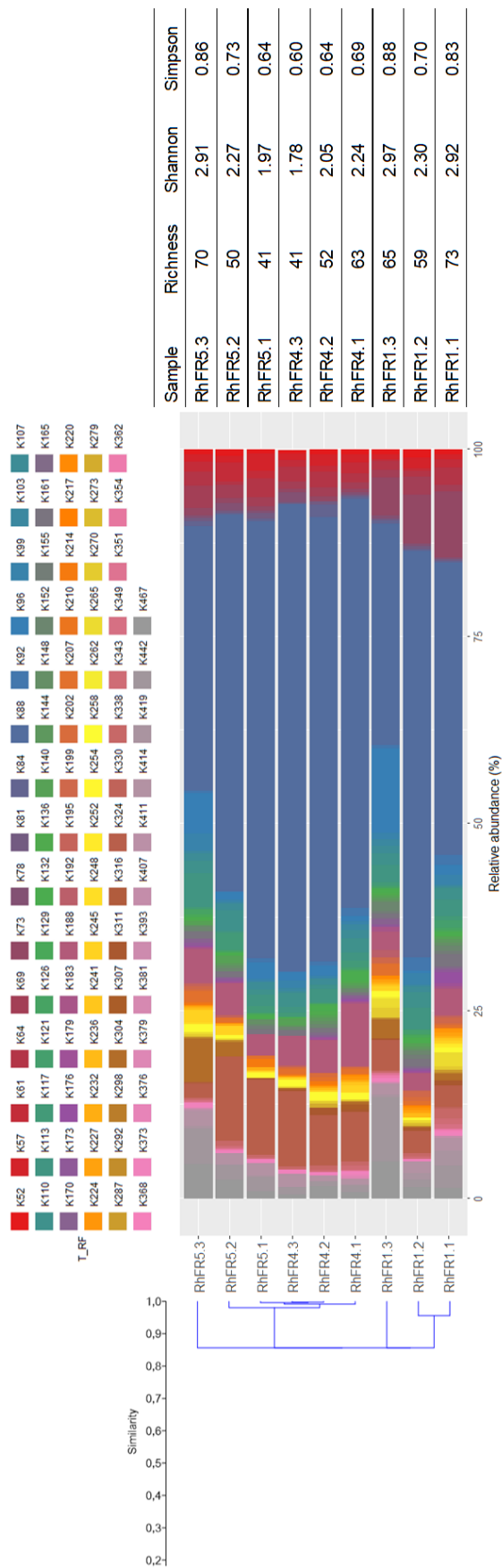
**Tabla 7.1:** Comparaciones de medias (Test de Tukey) de los índices de diversidad calculados a partir del T-RFLP del gen *dsrAB* en rizósfera, según el factor rotación. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). ns: p-valor del ANOVA no significativo.

	Root		
Diversity index	R1	R4	R5
Richness	ns	ns	ns
Shannon	2.12 b	2.38 a	2.55 a
Simpson	0.82 b	0.87 ab	0.90 a

**Tabla 7.2:** Comparaciones de medias (Test de Tukey) de los índices de diversidad calculados a partir del T-RFLP del gen *nirS* en raíces, según el factor rotación. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). ns: p-valor del ANOVA no significativo.

Diversity index	Root					
	December			February		
	R1	R4	R5	R1	R4	R5
Richness	19.33 abc	29.00 a	13.00 bc	11.33 c	12.50 c	27.33 ab
Shannon	2.29 bc	2.54 ab	2.28 bc	1.59 c	2.15 bc	2.83 a
Simpson	ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabla 7.3:** Comparaciones de medias (Test de Tukey) de los índices de diversidad calculados a partir del T-RFLP del gen *nirS* en raíces, según la combinación de factores rotación x muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). ns: p-valor del ANOVA no significativo



(a) Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad

	Rhizosphere - February
Diversity index	Crop Rotation
Richness	0.4702
Shannon	0.2250
Simpson	0.2030

(b) P-valores de ANOVAs por rotación

**Figura 7.1:** Composición y diversidad de las comunidades desnitrificantes tipo *nirK* de rizósfera en el muestreo de febrero, a partir de los perfiles de T-RFLP de este gen, considerando el total de los T-RFs obtenidos. Abundancia relativa de los T-RFs, Análisis de Cluster (UPGMA, índice Morisita) e índices de diversidad (a). P-valores de los ANOVAs por rotación ( $\alpha=0.05$ ) para cada índice (b).