



## **INFORME FINAL DE PROYECTO**

**Contribución de la diversidad microbiana de los suelos a la eficiencia de la fertilización de la caña de azúcar en un escenario de cambio climático.**

**Número del Proyecto: 18.33.16.20**

**Organismo Responsable:** Grupo Empresarial AZCUBA. (República de Cuba) con la colaboración ejecutora del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA)

**Contraparte Extranjera:**

Laboratorio de Agroenergía, Universidad de Chile

Universidad Tecnológica Izúcar de Matamoros. Puebla, México

### **CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.**

#### **1. Líneas de Acción.**

Caracterización de la diversidad microbiológica de suelos cañeros
---

Desarrollo humano sostenible con el apoyo a procesos dinamizadores e innovadores de la economía potenciando el desarrollo de sectores clave y el estímulo al comercio exterior

## **2. Entidad local cubana responsable.**

**Nombre y Dirección:** Grupo Empresarial AZCUBA Calle 23 y P,  
Vedado, La Habana, Cuba

**Nombre del responsable y sus funciones:** Dra. Dolores del Rosario  
Piñón Gómez, Jefe de Proyecto. Académica e investigadora Titular.

## **2. Objetivo General.**

Evaluar la diversidad microbiológica de los suelos cañeros en Cuba y su posible relación con la fertilidad.

## **3. Objetivos Específicos**

Caracterizar la microbiota presente en la rizósfera de la caña de azúcar y su actividad metabólica en suelos fertilizados con diferentes dosis de nitrógeno.

Evaluar las posibles relaciones existentes entre la presencia y composición de los microorganismos en la rizósfera con las variables físico- químicas del suelo, meteorológicas y el rendimiento agroindustrial del cultivo.

Determinar la posible utilidad de la biodiversidad de microorganismos de la rizósfera o de su actividad metabólica como indicador de la calidad del suelo (especialmente de su fertilidad).

## **4. Presupuesto inicial: 20 000.00 USD**

Fecha de inicio de proyecto: enero 2021

Fecha de finalización de proyecto: diciembre 2022

Los cambios fundamentales que ejercerán los resultados de este proyecto están dados en:

1. Conocimiento de las bases científicas de la diversidad microbiana de los suelos y fertilidad lo que podrá contribuir a la disminución de la contaminación del medio ambiente por el uso de agroquímicos.
2. Definición de fundamentos científicos sobre nuevos indicadores de la calidad del suelo que podrán contribuir al perfeccionamiento de los criterios agrícolas sobre este recurso natural.
3. Mejor formación integral de investigadores, técnicos y productores relacionados con los suelos y su productividad agrícola.

**Período del informe:** El informe comprende todo el período de desarrollo del Proyecto, desde el inicio del mismo hasta su culminación con ajustes de tiempo debido a la pandemia de la covid19 .

## INFORME TÉCNICO

Históricamente para garantizar buenos rendimientos en los cultivos, los agricultores a nivel internacional han aplicado fertilizantes minerales de forma indiscriminada, lo que ha conducido a una contaminación de los mantos freáticos por eutrofización de los mismos (por ejemplo, el nitrógeno no utilizado es lixiviado) lo cual pone en peligro la salud humana y animal por contenidos de nitratos en el agua por encima de los valores normalmente tolerados.

Durante muchos años en Cuba la fertilización de los suelos con productos minerales en caña se ha realizado a través de fórmulas fijas de nitrógeno, fósforo y potasio que no garantizaba la aceptada contribución al suelo de estos nutrientes minerales, y trajo como consecuencia que una buena parte de los nutrientes aplicados no hayan sido asimilados por las plantas provocando la contaminación del medio ambiente, ya que estos residuos han permanecido en los mantos freáticos. En otros casos los nutrientes aplicados eran deficitarios con relación a las necesidades de las plantas generando detrimento en los rendimientos agrícolas e industriales.

Actualmente en Cuba y en particular para la caña de azúcar existe un Servicio de Recomendaciones de Fertilizantes (SERFE) que, basado en análisis químicos de los suelos, recomienda las dosis de fertilizantes a aplicar. Sobre estos datos se calcula la cantidad de fertilizantes que el país debe comprar, casi en su totalidad de importación y a altos costos. Unido a esto, la poca sincronización entre la aplicación de los fertilizantes minerales y la demanda en tiempo y espacio de este elemento por la caña de azúcar implica también pérdidas económicas ya que otra parte de esos fertilizantes se volatiliza, causando daños al ambiente.

Los algoritmos actuales de fertilización, no tienen en cuenta la acción que los microorganismos del suelo pueden tener sobre la nutrición de las plantas y hoy en día existen varias interrogantes que no tienen respuesta. Tal es el caso de la no respuesta a la fertilización nitrogenada de cepas de caña planta; se ha detectado por ejemplo, en 451 experimentos relacionados con la eficiencia de la fertilización de nitrógeno mineral en caña de azúcar, que el 65 % de ellos no tiene respuesta a este tratamiento. Por otra parte, existe una marcada diferencia entre las respuestas

productivas de diferentes cepas del cultivo a este tipo de fertilización. Existe en nuestros días un insuficiente conocimiento sobre la interacción de los cambios del clima con la vida biológica del suelo y con otros microorganismos de interés (fitopatógenos o benéficos) que habitan en las plantas.

Lo antes mencionado demanda de estrategias encaminadas a mejorar la eficiencia de la nutrición del cultivo con la incorporación de nuevos criterios basados en los beneficios que pueden aportar los microorganismos del suelo, reducir los costos y el impacto negativo en los agroecosistemas de la fertilización con agroquímicos a favor de la sostenibilidad agrícola y ambiental. En esta dirección el estudio de comunidades microbianas que comparten un nicho específico o microbiota (Lederberg y McCray, 2001) ha ido en constante aumento a lo largo de los años. Este aumento responde al desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva, las que con el paso del tiempo han obtenido un mayor rendimiento y han bajado considerablemente los costos (Metzker, 2010; Mardis, 2011).

Los microorganismos que están asociados a las plantas, específicamente a las raíces componen la rizosfera o la microbiota de las raíces.. Esta rizosfera es capaz de favorecer la habilidad de las plantas para capturar agua, nutrientes y fuentes de carbono generando un nicho estable de microorganismos (Qin *et al.*, 2016; Soussi *et al.*, 2016; Otlewska *et al.*, 2020).

Debido a lo anterior, es de interés evaluar la composición de estos microorganismos con el fin de dilucidar cuáles de ellos podrían jugar un rol central en el crecimiento y/o el rendimiento de la planta de caña de azúcar

La experiencia actual en Cuba sobre los estudios de microbiología de suelos son escasos, se utilizan las técnicas tradicionales de cultivo in vitro de los microorganismos y otras que enlentecen y entorpecen los tiempos en la obtención de los necesarios resultados esperados y su contribución a la eficiencia de cultivos agrícolas.

Los elementos antes expuestos tienen entre sus causales el no contar con una metodología científicamente argumentada que determine la influencia de la microbiota del suelo sobre la fertilidad de éste y sobre la nutrición de las plantas, la carencia de personal preparado asociado al desarrollo de las tecnologías

modernas (biología molecular aplicada al suelo) para abordar esta temática debido a su complejidad en un escenario cambiante del clima.

Todo lo anterior deriva en que los criterios actuales para la fertilización de los suelos continúan basándose en algoritmos que tienen en cuenta los elementos químicos y no considera la influencia de los microorganismos que viven en él y que pueden tener una incidencia vital en estos procesos.

RESULTADOS Y PLANIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PRINCIPALES				
Resultados Planificados	Actividades Principales	Inicio	Térm.	Indicadores verificables.
Caracterización de la biodiversidad de los suelos bajo diferentes dosis de fertilizantes químicos	Actividad respiratoria de los suelos Obtención de patrones de ADN relacionados con la biodiversidad de los suelos en áreas experimentales de fertilización mineral.	03/2022	10/2022	Evidencias gráficas y registros de laboratorio
	Estandarizada una técnica para la medición de la respiración en suelos.	01/2021	06/2021	Valores de actividad respiratoria
Determinación de las variables físico químicas del suelo y meteorológicas de la localidad experimental.	Evaluación de variables físicoquímicas del suelo de las áreas seleccionadas			Registro de las evaluaciones y Base de datos

	Medición de las variables			Registro de las evaluaciones y Base de datos
		01/2021	09/2021	Análisis estadísticos de los resultados.

Postular posibles indicadores biológicos de la calidad del suelo	<p>Aplicar análisis estadísticos uni y multivariados para establecer las posibles relaciones entre variables.</p> <p>Analizar integralmente las relaciones entre variables del suelo, la contribución de la diversidad biológica y la eficiencia de la fertilización</p> <p>Considerar posibles indicadores biológicos de calidad del suelo.</p>			Registro de las evaluaciones, bases de datos y paquetes estadísticos
Capacitación y socialización de resultados	Realización de talleres, charlas sobre los resultados	10/2021	03/2022	Actas de participación

	Informe final y presentación de resultados en eventos y revistas científicas	08/2022	12/2022	Certificados y cartas editoriales
--	--	---------	---------	-----------------------------------

## Resultados

Para la obtención de los resultados planificados se utilizó el experimento que se describe a continuación e identificado como UNPK-6

### Descripción del experimento UNPK-6 con diferentes niveles de nitrógeno, fósforo y potasio

El experimento UNPK-6 forma parte de la base experimental del proyecto **Evolución de la fertilidad del suelo a largo plazo bajo diferentes tipos de usos y manejo**, aprobado para su desarrollo por el Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente y que se encuentra en ejecución. Está localizado en el Bloque Experimental de la Estación de Investigaciones de la Caña de Azúcar de la provincia Santiago de Cuba, ubicado a 300 m al norte de la tarja que marca el km 921 de la Carretera Central dirección Habana–Santiago de Cuba, en las coordenadas 20°22´06.97´´N y -76° 01´89.31´´ W, próximo al poblado del Central Dos Ríos (Fig.1). Este experimento se plantó con el objetivo de determinar el efecto de diferentes combinaciones de dosis de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) sobre el rendimiento agrícola de la caña de azúcar y sus componentes, bajo las condiciones edáficas de los suelos Pardo con carbonatos plastogénico de la parte suroriental de Cuba acorde a la clasificación Soil Taxonomy (de Estados Unidos) según Hernández *et al.*( 2006) y World Reference Base (I USS Working Group, WRB, 2008). La plantación inicial del ensayo se realizó el 8 de octubre de 1998 (24 años) y la fertilización se realizó a los quince días posteriores a la cosecha del experimento, con dosis única de fertilizantes, sin fraccionamiento. La variedad actual es la C8612 (cepa segundo retoño).



Figura 1. Ubicación satelital del experimento

Para esta investigación se seleccionaron los tratamientos descritos en la Tabla 1

Tabla 1. Tratamientos seleccionados con diferentes niveles de fertilizantes

Tratamiento*	NPK (kg ha <sup>-1</sup> )	Característica muestras rizomáticas
I Test	N <sub>0</sub> P <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	Blanco
-	N <sub>0</sub> P <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	Testigo (sin presencia de rizoma)
II Test-N	N <sub>0</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación nula de nitrógeno
III	N <sub>50</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación baja de N
IV	N <sub>100</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación media de N
V	N <sub>150</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación alta de N

VI	N <sub>200</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación muy alta de N
X	N <sub>50</sub> P <sub>100</sub> K <sub>50</sub>	Concentrado en P
XV	N <sub>50</sub> P <sub>25</sub> K <sub>300</sub>	Concentrado en K

N (Nitrógeno), P (Fósforo) y K (Potasio). Medidas tomadas en kilogramos por hectárea (kg ha<sup>-1</sup>)

**RESULTADO PLANIFICADO I:** Caracterización de la biodiversidad de los suelos bajo diferentes dosis de fertilizantes químicos.

Para la caracterización de la diversidad microbiana de los suelos se incluyeron tres variantes de muestras de suelo (un testigo de suelo no rizomático y otras dos con dosis altas de fósforo (X) y potasio (XV) respectivamente además de las variantes con diferentes dosis de nitrógeno y el testigo

Se obtuvieron muestras rizomáticas de tres plantas por tratamiento. Para cada tratamiento y condición colectada, se consideró un total de tres réplicas, obteniendo un total de 27 muestras.

Las muestras se tomaron de las parcelas centrales del experimento para eliminar efecto de borde según los protocolos publicados por Edwards y colaboradores (Edwards *et al.*, 2015). Las plantas de caña de azúcar fueron removidas de cada punto de extracción con una pala y con el uso de guantes apropiados para cada extracción, dejando las raíces expuestas. Éstas se sacudieron levemente para eliminar el exceso de suelo, y luego se colectó la fracción adherida a las raíces haciendo uso de materiales estériles para cada planta (Figura 2)

Se obtuvo como mínimo 1.0 g de suelo rizosférico por planta. Este contenido fue depositado en tubos falcon de 15.0 ml estériles, rotulados y luego almacenados en un contenedor con hielo hasta el laboratorio para su posterior procesamiento.



**Figura 2. Recolección de muestras de rizósfera de caña de azúcar en el campo experimental**

### **2.2.3 Extracción de ADN**

El suelo rizosférico de caña de azúcar almacenado en tubos de 15mL se sometió a extracción de ADN total con el kit *DNeasy PowerSoil* (Qiagen). La concentración del ADN extraído se midió usando *Qubit dsDNA HS Assay Kit* en un fluorómetro Qubit 3.0 (*Thermo Fisher Scientific*). El ADN extraído cumplió con una concentración mayor o igual a  $4.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para la creación de librerías y su secuenciación masiva (Apéndice ).

### **2.2.4 Secuenciación de ADN rizosférico de las muestras**

La preparación de librerías genómicas y la secuenciación de las regiones ribosomales hipervariables V3-V4 e ITS fue realizado utilizando la tecnología de secuenciación masiva *Illumina Miseq*, servicio provisto por Austral-Omics perteneciente a la Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile). Un resumen del protocolo utilizado se describe a continuación.

- Inicialmente, las muestras de ADN fueron nuevamente cuantificadas mediante fluorimetría usando el fluorómetro Qubit 4.
- Luego, se verificó la calidad del ADN total extraído usando geles de agarosa 2.0%.
- Para la elaboración de las bibliotecas, se siguió el protocolo basado en el *Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*, utilizando partidores para el gen del ARN ribosomal 16S y la región *Internal Transcribed Spacer*, ITS usando los siguientes partidores:

a. 16S (región V3-V4):

Forward: 5'CCTACGGGNGGCWGCAG 3'

Reverse: 5'GACTACHVGGGTATCTAATCC 3'

(Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.).

b. ITS (ITS1-ITS2):

Forward: 5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3'

Reverse: 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'

(Orgiazzi, A., Lumini, E., Nilsson, R. H., Girlanda, M., Vizzini, A., Bonfante, P., & Bianciotto, V. (2012). Unravelling soil fungal communities from different Mediterranean land-use backgrounds. *PloS one*, 7(4), e34847).

- La secuenciación fue realizada usando el Kit Miseq Reagent Kit v3 600-cycles (2x250 pair-end).

Al término del proceso de secuenciación se obtuvieron un total de 2,238,092 y 2,974,873 lecturas, para 16S e ITS, respectivamente.

## **Análisis de datos, bioinformática y asignación taxonómica**

Los archivos *fastqs* suministrados por Austral-Omics fueron procesados haciendo uso de *amplicon sequence variant* en DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Las lecturas se recortaron a 240 pb y su calidad se estableció y mantuvo en PHRED 20. Las nuevas secuencias unificadas (Amplicon Sequence Variant; ASV) y MAFFT se usaron para realizar el alineamiento múltiple (Kato y Standley, 2013). El árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) se infirió con *FastTree* (Price *et al.*, 2010).

Las abundancias, la taxonomía, la filogenia y los metadatos de ASV se integraron en un objeto *phyloseq* para análisis posteriores con el paquete Phyloseq v1.38.0 (Mc Murdie y Holmes, 2013). Se aplicaron filtros de control de calidad (Callahan *et al.*, 2016). Se excluyeron los siguientes: i. Muestras con < 1,000 lecturas; ii. ASV no asignados; iii. Muestras en las que el número medio de lecturas por taxón fue >  $1.0 \times 10^{-5}$ ; y iv. ASV no detectadas más de dos veces en  $\geq 10.0\%$  de todas las muestras

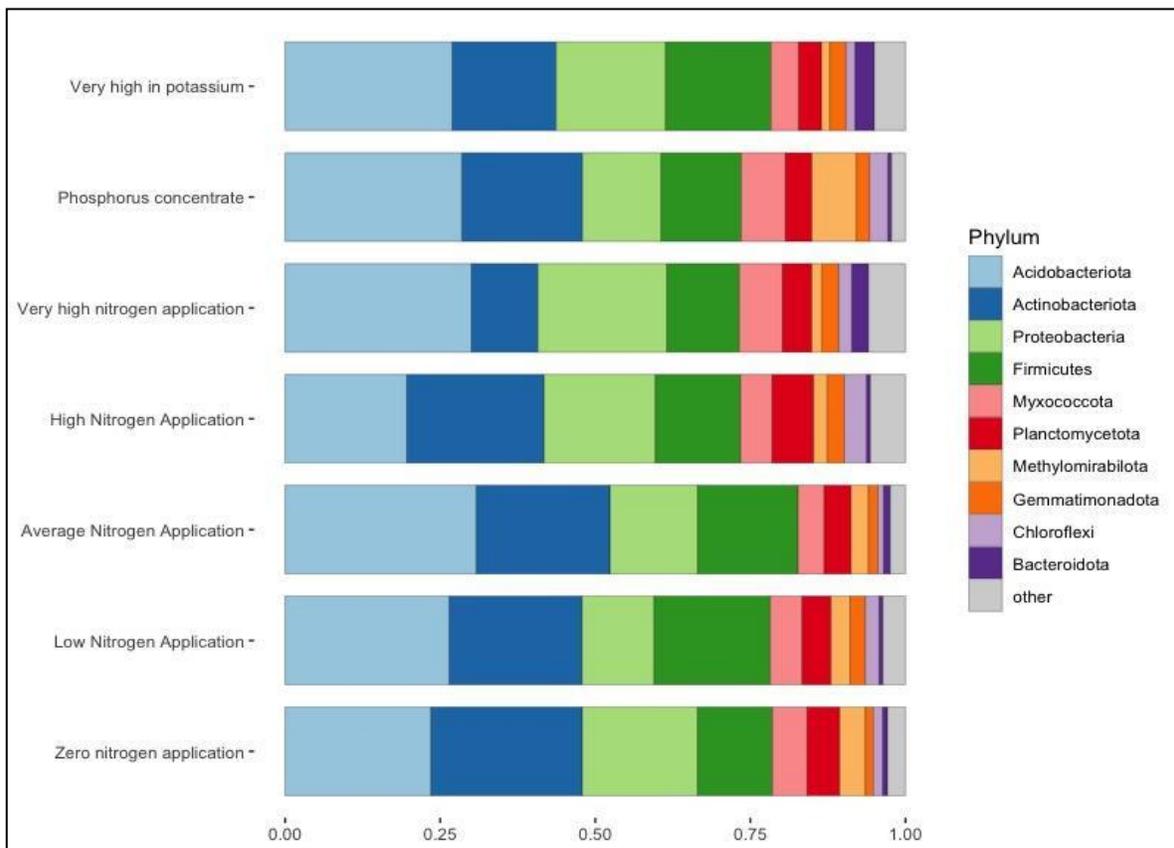
A las muestras testigo (suelo sin rizosfera ) y blanco rizosférico (sin aplicación de fertilizante), se les identificaron las taxas presentes. Estas taxas, luego fueron eliminadas a las demás muestras para conservar la microbiota bacteriana y la micobiota pertenecientes únicamente a los tratamientos analizados (Tabla 1).

La disimilitud de la diversidad- $\beta$  (Jaccard, Bray-Curtis y UniFrac filogenético ponderado y no ponderado) para las muestras, se evaluó mediante el análisis de coordenadas principales. Cada índice se comparó mediante un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) en el paquete "vegan" v2.5-7 en R (Oksanen *et al.*, 2007) utilizando la función *adonis2* directamente basada en el algoritmo de Anderson (Anderson, 2001). Se determinó la importancia para 10,000 permutaciones.

Para evaluar la microbiota bacteriana y micobiota del rizoma de caña de azúcar, también se utilizaron métricas para revelar las diferencias entre los diferentes tratamientos estudiados. Para ello se utilizó el análisis de diversidad- $\beta$ .

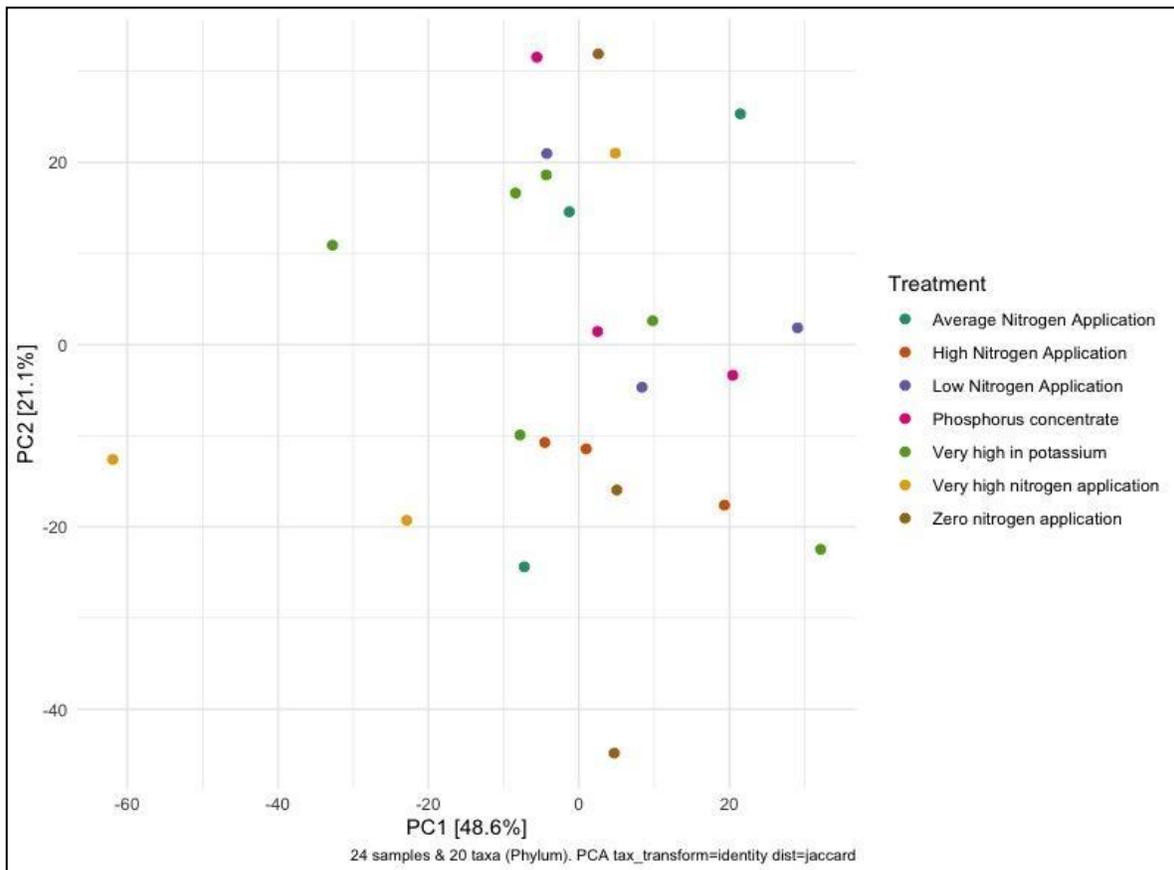
## **Resultados**

Las asignaciones taxonómicas a nivel de 16S se realizaron a nivel del reino (100.0%), filos (phylum en inglés) (100.0%), clase (100.0%), orden (100.0%), familia (100.0%) y género (100.0%). En 16S se obtuvieron 2,722 ASVs identificados post-filtros en 21 muestras, con una media 10,052 lecturas y un promedio de 10,426 lecturas por muestra (Apéndice 2). La microbiota de la rizósfera de la caña de azúcar estuvo principalmente compuesta por los filos bacterianos (>1.0%) *Acidobacteriota* (26.7%), *Actinobacteriota* (19.1%), *Proteobacteria* (16.2%), *Firmicutes* (15.1%), *Myxococcota* (5.3%), *Plantomycetota* (4.7%), *Methylomirabilota* (3.0%), *Gemmatimonadota* (2.3%), *Chloroflexi* (2.0%) y *Bacteroidota* (1.6%); (Figura 3)



**Figura 3. Composición de la microbiota bacteriana asociada con tratamiento. El gráfico de barras muestra los 10 filos bacterianos más abundantes y sus respectivas abundancias relativas.**

Los resultados indicaron que las plantas de caña de azúcar sometidas a diferentes tratamientos de fertilización, no presentaron cambios composicionales en las bacterias presentes en el rizoma. Esto se comprobó con los valores obtenidos en el análisis permutacional multivariado de varianza usando matrices de distancia (PERMANOVA) para el amplicon 16S, que presentó en composición/abundancia asociado a distancias filogenéticas (Unifrac  $p = 0.3114$ ), composición asociado a distancias filogenéticas (Wunifrac  $p = 0.8041$ ), composición/abundancia (Bray-Curtis  $p = 0.9388$ ) y composición (Jaccard  $p = 0.941$ ) (Figura 4 ).

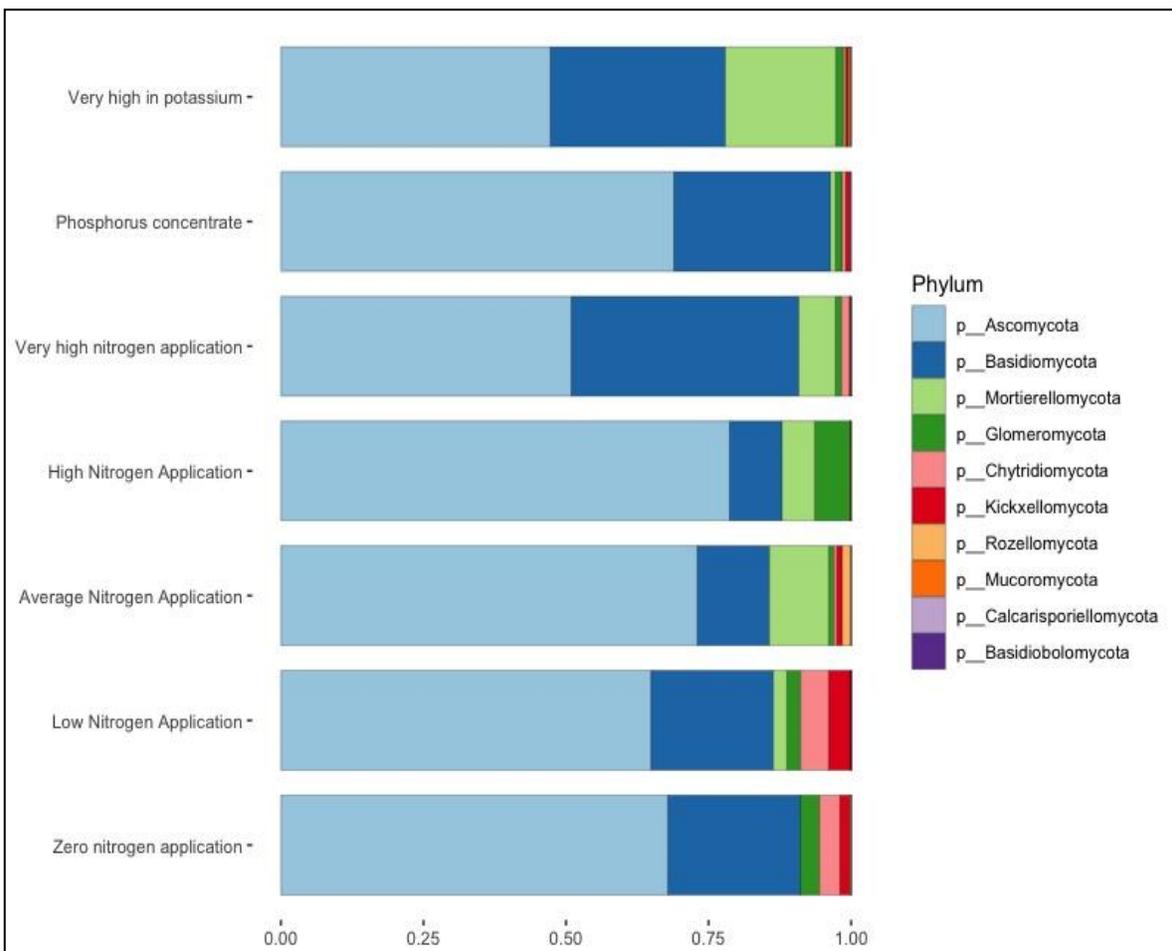


**Figura 4. Gráfica de análisis de coordenadas principales de muestras por tipo de tratamiento amplicon 16S. Prueba de análisis de varianza multivariant permutacional (Adonis)  $Pr (> F) = 0.941$ ; 10.000 permutaciones.**

## Resultados de micobiota

En el caso de ITS, las asignaciones taxonómicas también se realizaron a nivel del reino (100.0%), phylum (100.0%), clase (100.0%), orden (100.0%), familia (100.0%) y género (100.0%).

Se obtuvieron 931 ASVs identificados post filtros en 21 muestras, con una media 2,053 lecturas y un promedio de 3,147 lecturas por muestra (Apéndice.1). La micobiota de la rizosfera de la caña de azúcar estuvo compuesta, en promedio, por los filos (>1.0%) *Ascomycota* (66.2%), *Basidiomycota* (21.9%), *Mortierellomycota* (6.3%), *Glomeromycota* (2.3%), *Chytridiomycota* (1.5%) y *Kichxellomycota* (1.4%) ( Figura 5).

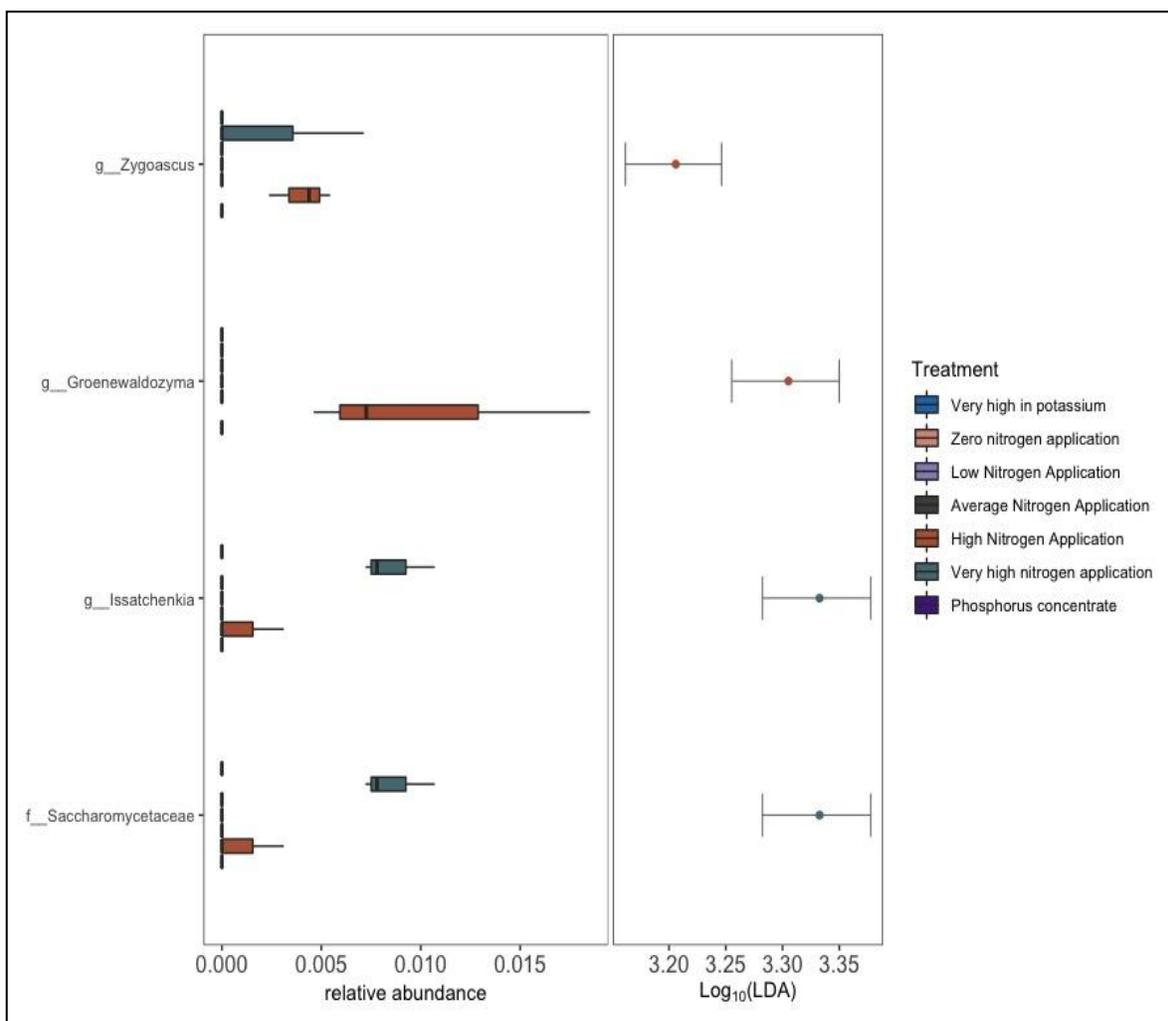


**Figura 5. Composición de la micobiota asociada a los tratamientos evaluados.**

**El gráfico de barras muestra los 10 filos asociados a hongos más abundantes y sus respectivas abundancias relativas.**

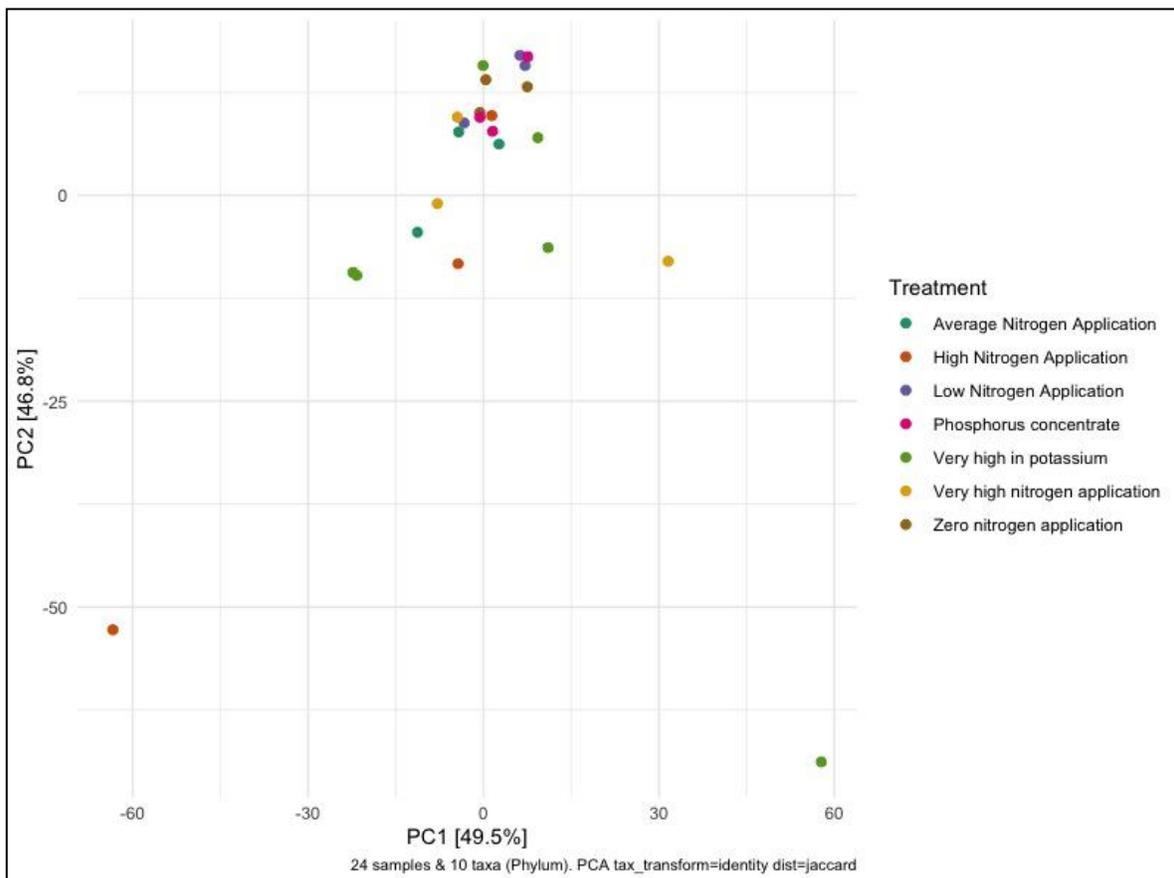
Los filos que mostraron abundancia diferencial, estadísticamente significativa, entre los tratamientos fueron los géneros *Groenewaldozyma*, familia *Saccharomycetaceae*, género *Issatchenkia* y género *Zygoascus* (Kruskal-Wallis;  $p > 0.01$ ). Las taxa *Saccharomycetaceae* e *Issatchenkia* se encontraron más enriquecidos en los tratamientos con muy alta fertilización de nitrógeno (Figura 6).

De la misma forma los géneros *Groenewaldozyma* y *Zygoascus* se encontraron más enriquecidos en el tratamiento clasificado como alto en nitrógeno (Figura 6).



**Figura 6. Hongos con abundancia diferencial entre tratamientos.  
Prueba a nivel de género (Kruskal-Wallis;  $p > 0.01$ ).**

En el caso de la micobiota, los análisis de diversidad- $\beta$  presentaron diferencias estadísticamente significativas, tanto en composición/abundancia asociado a distancias filogenéticas (Unifrac  $p \leq 0.01$ ), como en composición y abundancia (Bray-Curtis  $p \leq 0.01$ ) y en composición (Jaccard  $p \leq 0.05$ ). Mientras, en composición asociado a distancias filogenéticas (Wunifrac  $p = 0.2057$ ), no se obtuvo significancia estadística (Figura 7).



**Figura 7. Gráfica de análisis de coordenadas principales de muestras por tipo de tratamiento aplicaron ITS. Prueba de análisis de varianza multivariante permutacional (Adonis)  $Pr (> F) \leq 0.05$ ; 10.000 permutaciones.**

**RESULTADO PLANIFICADO II:** Determinación de las variables físico químicas del suelo y meteorológicas de la localidad experimental

En los mismos puntos de muestreo referidos en el acápite anterior se tomaron cinco submuestras ( 20 cm de profundidad) las que fueron mezcladas para formar una muestra única de 1 kg de suelo por tratamiento. En el momento de la toma de muestras, se midieron la temperatura y humedad del suelo a 20 cm de profundidad con higrómetro IMIKO, de procedencia japonesa.

Las determinaciones de las variables físico químicas del suelo se realizaron en el Laboratorio de Análisis Químico de Suelo, Agua y Tejido Vegetal. Los métodos empleados, fueron los establecidos por el Manual de Procedimientos para Laboratorios de Análisis Químico del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA, 2000).

Las variables analizadas fueron: Fosforo y Potasio asimilables, pH H<sub>2</sub>O y KCl, cationes cambiabiles (Calcio, Magnesio, Sodio y Potasio Extracción con NH<sub>4</sub>Ac 1 mol/L, pH 7) y materia orgánica.

Para las determinaciones de los componentes del rendimiento industrial se evaluaron: Pol en jugo, en caña, Brix calculado y pureza acorde a lo descrito en el Manual de Procedimientos de Métodos Analíticos para Azúcar Crudo (Pérez y Fernández, 2006).

El rendimiento agrícola por parcela se determinó con el pesaje directo de la producción de caña al momento de la cosecha, mediante dinamómetro conectado a una alzadora (Figura 8). La producción de caña de cada parcela se dividió entre el área (0.48 m<sup>2</sup>) y se realizó la conversión a hectáreas.

Los valores obtenidos de estas variables fueron empleados para su relación con la actividad respiratoria y análisis de la diversidad biológica



**Figura 8. Cosecha del experimento y medición del rendimiento agrícola por pesaje**

**RESULTADO PLANIFICADO III:** Postular posibles indicadores biológicos de la calidad del suelo.

Fueron evaluados los 6 tratamientos con diferentes dosis de fertilización nitrogenada con fondo fijo de fósforo y potasio expuestos en la Tabla 1 ( T1 N<sub>0</sub>P<sub>0</sub>K<sub>0</sub>, T2 N<sub>0</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>, T3 N<sub>50</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>, T4 N<sub>100</sub> P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>, T5 N<sub>150</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>, T6 N<sub>200</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>). Las mediciones de la respiración microbiana (R) se realizaron en el laboratorio de Fitopatología de la ETICA Santiago de Cuba. Se determinó por el método de incubación en medio cerrado inducida por sustrato (Anderson y Domsch, 1978; Haney *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2012) previo a trabajos de estandarización de la técnica. La respiración microbiana se midió en tres momentos: a los cuatro, ocho y doce meses de edad de la planta (M1, M2 y M3 que corresponden a los meses de agosto, noviembre-2021 y febrero-2022 respectivamente); en este último momento se realizó la cosecha del experimento. Las muestras de suelo fueron secadas al aire y desmenuzadas con rodillo.

Las unidades experimentales fueron frascos plásticos con tapas, a las que fueron adicionadas 50 g de suelo, humedecidos hasta el 50 % de la capacidad total de retención de agua (CTR-H<sub>2</sub>O), y un gramo de sacarosa. En el interior de los frascos plásticos y encima de las muestras de suelo se ubicaron tubos de ensayos de 20 mL, con 5 mL de solución colectora de NaOH 1 mol/L. Cada unidad experimental se replicó dos veces. Se prepararon dos recipientes controles por cada muestra (blancos) sin adición sacarosa. Las unidades experimentales se incubaron a 30 °C.

Los frascos se abrieron cada 24 h y se depositó la solución colectora en erlenmeyers de 100 mL. Esta solución se valoró con HCl 1 mol/L, en presencia de tres gotas de fenoftaleína al 1 %, luego de la precipitación de los carbonatos con 3 mL de BaCl<sub>2</sub> 0.5 mol/L. La respiración microbiana se determinó según la ecuación 1:

$$R = (B-M) \cdot 2.2 \quad (1)$$

donde:

R = respiración microbiana en mg CO<sub>2</sub>

B = volumen de ácido (HCl) necesario para titular el NaOH del promedio de los blancos (en mL)

M = cantidad de ácido necesaria para titular el NaOH de la muestra (en mL)

2.2 es un factor (mL de ácido gastado equivalentes a 2.2 mg de CO<sub>2</sub>)

La acumulación de CO<sub>2</sub> se estableció como la suma del CO<sub>2</sub> producido durante nueve días. Se expresó en mg de CO<sub>2</sub>.

Se comprobó la normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos originales de las variables analizadas, mediante pruebas de Chí cuadrado y Bartlett-Box F y no fue necesario realizar su transformación.

Se realizaron análisis de varianza de clasificación simple y prueba de Tukey (grupos homogéneos) con la respiración microbiana acumulada para todos los momentos de muestreo, días de incubación (del uno al nueve), respiración acumulada promedio (mg de CO<sub>2</sub>) y conteo de bacterias totales (UFC/mL), por tratamientos. Éste análisis se realizó para la respiración microbiana por tratamientos para cada

uno de los momentos M1-M3 por separado y además se determinó la interacción entre los momentos del muestreo y días de incubación.

Para establecer las principales relaciones entre variables, se comprobó la dependencia entre conteo de bacterias totales (UFC/ml), respiración microbiana y conteo de bacterias totales (UFC/mL) por tratamientos. Se consideró una dependencia moderada cuyo valor fuera igual o superior a 0.5 y menor a 0.7, y alta cuyo valor fuera igual o superior a 0.7.

Se efectuó análisis de Componentes Principales (ACP) con los datos de los análisis físico químicos del suelo, componentes del rendimiento por tratamientos y variables meteorológicas. El paquete estadístico empleado en el procesamiento de los datos fue STATISTICA versión 8 (StatSoft, 2007).

## **Resultados**

El análisis de varianza factorial (Tabla 2) para la variable respiración microbiana ( $\text{mg CO}_2$ ), parámetro indicador de la cantidad de microorganismos en el suelo, detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos, etapas fenológicas del cultivo (4, 8 y 12 meses de edad) y la interacción entre ambos. Existió una respuesta diferencial de la respiración microbiana acumulada por niveles de N y etapas fenológicas del cultivo. La mayor fuente de variación correspondió a los tratamientos.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos con diferentes niveles de N y etapas fenológicas de la caña de azúcar sobre la respiración microbiana y las interacciones entre ambos.

---

Variable. Respiración microbiana

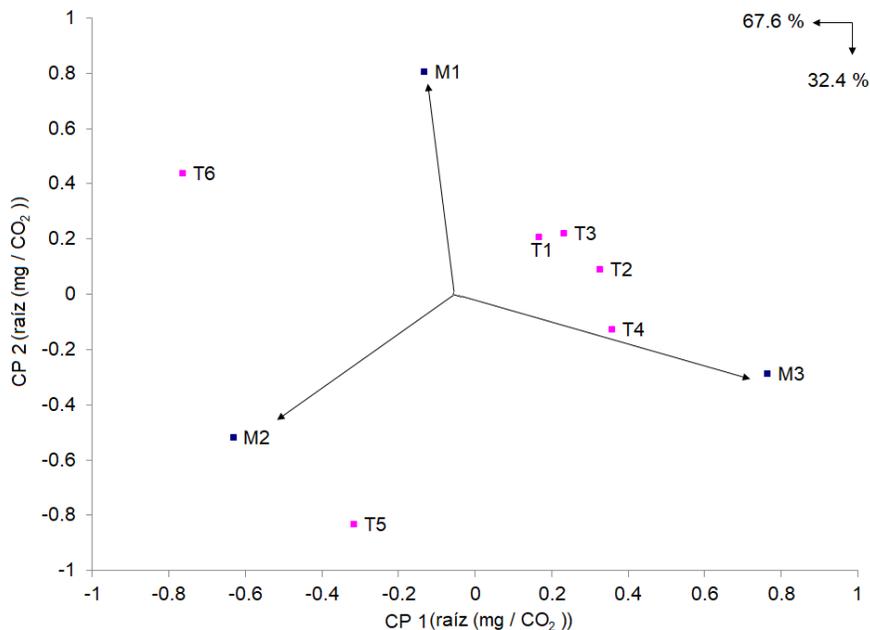
---

Fuentes de variación	SS	GL	MS	f	p
Tratamientos (T)	4.99E+05	5.00E+00	9.98E+04	46.62	***
Etapas fenológicas (EF)	1.72E+05	2.00E+00	8.60E+04	40.17	***
T.*EF .	1.22E+05	1.00E+01	1.22E+04	5.7	***
Error	8.55E+02	0.90E+01	0.95E+01		

SS. Suma de cuadrados. GL. Grados de Libertad. MS. Cuadrados Medios

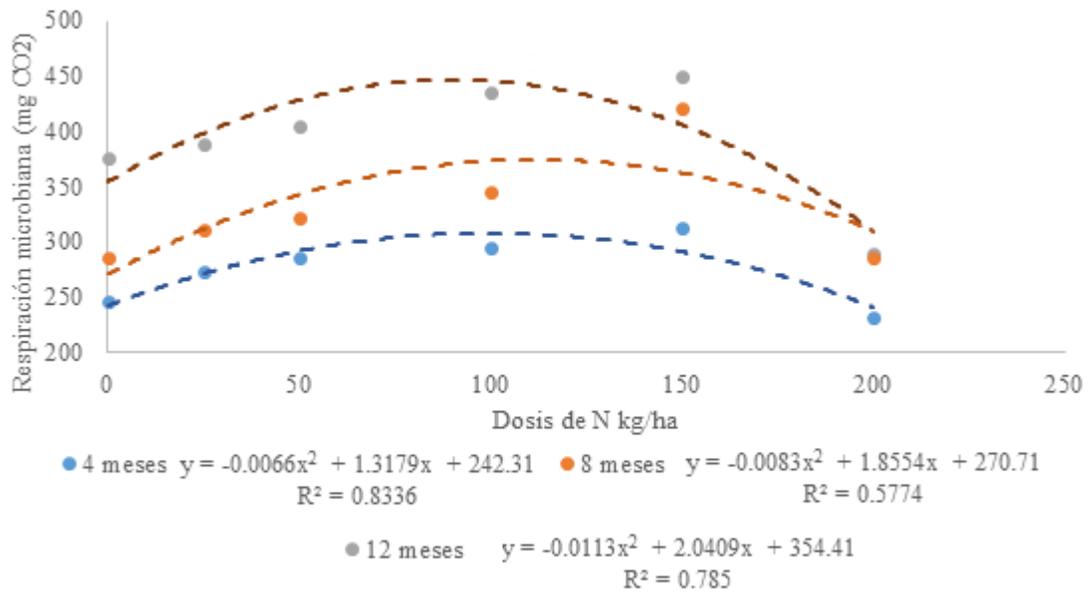
p. Significación \*\*\* diferencias altamente significativas para  $p < 0.01$

La existencia de diferencias altamente significativas en la interacción respiración microbiana por tratamientos de N justifica la aplicación del modelo AMMI (Figura 9), para explicar la interacción detectada entre dosis de N y etapas fenológicas. La representación gráfica Biplot muestra que los mayores valores de respiración microbiana se alcanzan en los 12 meses del cultivo para los tratamientos T1, T2, T3 y T4, mientras que a los 8 meses del cultivo T5 alcanza el máximo de esta variable. El tratamiento T6 es el de menores valores en todo el ciclo del cultivo.



**Figura 9.** Representación Biplot, AMMI del nivel de respuesta de los tratamientos por etapas fenológicas del cultivo. Leyenda. M- etapas fenológicas del cultivo; T- tratamientos.

El análisis de la dinámica de la respiración microbiana en función de las dosis de nitrógeno muestra una respuesta polinómica de segundo orden en todas las etapas fenológicas del cultivo (Figura 10). Existen incrementos de la respiración microbiana en la medida que aumentan las dosis de N hasta los 150 kg/ha del fertilizante. Dosis superiores a los 150 kg /ha de N para este tipo de suelo y las condiciones de la investigación estudio, inciden negativamente en el comportamiento de esta variable.



**Figura 10.** Comportamiento de la respiración microbiana (mg CO<sub>2</sub>) por tratamientos en diferentes etapas fenológicas del cultivo

Según las ecuaciones derivadas, los máximos valores de respiración microbiana obtenidos son de 308.10; 374.40 y 446.56 mg CO<sub>2</sub> por etapas fenológicas del cultivo (4, 8 y 12 meses respectivamente). Las dosis máximas de N que coinciden con estos valores respiratorios son: 99.8, 111.77 y 90.30 kg/ha de N respectivamente, con un valor promedio de 100.6 kg/ha de N. Este valor concuerda

con las recomendaciones de N referidas para retoño bajo las condiciones de Cuba y otros países cañeros para obtener rendimientos agrícolas entre 90 – 100 ton ha<sup>-1</sup> (Pablos, 2008; de León *et al.*, 2013).

El análisis de correlación entre la respiración microbiana y las variables meteorológicas temperatura (°C) y precipitaciones (mm) mostró que existe una relación moderada con ambas variables, pero negativa en el caso de la primera y positiva para la segunda. (Tabla 3). El comportamiento de la respiración microbiana fue modulado no sólo por las dosis de N sino también por variables meteorológicas, aspectos que deben ser evaluados de conjunto para determinar la eficiencia de la fertilización nitrogenada en caña de azúcar.

Tabla 3. Relación entre la respiración microbiana acumulada (mg CO<sub>2</sub>) con las temperaturas y precipitaciones

Variable X	Variable Y	r	R <sup>2</sup>	adjusted R <sup>2</sup>	p
Respiración	Temperatura suelo	- 0.76	0.57	0.14	0.45
	Precipitaciones	0.64	0.41	0.17	0.56

El cuarto mes después de la cosecha, coincidió con el mes de agosto, cálido (según clasificación de Köppen del clima de Cuba) y el menos lluvioso dentro de los momentos evaluados. La combinación de temperaturas superiores a los 32 °C y precipitaciones inferiores a los 60 mm influyeron de forma negativa en la respiración microbiana del tratamiento sin fertilizantes y los de mayores dosis de N.

La Figura 11 muestra la dinámica de la respiración microbiana promedio de todas las etapas fenológicas y el rendimiento agrícola en función de las dosis de nitrógeno. Ambas curvas presentan similar respuesta con un máximo de sus valores con una dosis de N promedio de 114.2 kg/ha. Este resultado demuestra la

utilidad de la valoración de los indicadores biológicos del suelo ante la recomendación de fertilizantes inorgánicos.

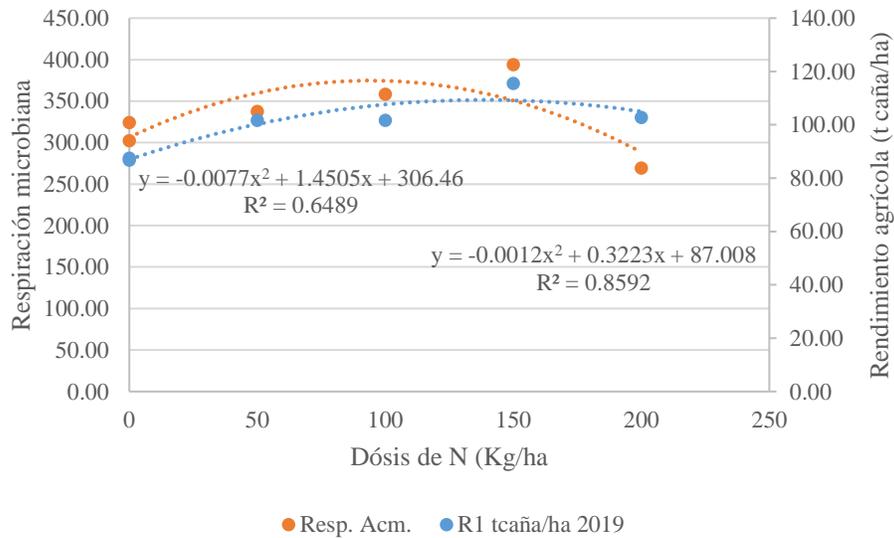


Figura 11. Relación entre el rendimiento agrícola y respiración microbiana

Steciow (2000) afirmó que se puede relacionar directamente la productividad de los cultivos con la actividad microbiológica del suelo, ya que al proporcionar condiciones óptimas para el desarrollo de la vida microbiana se puedan obtener rendimientos satisfactorios con un mejor equilibrio del agroecosistema. La presencia de determinado tipo de bacteria produce efectos positivos en el crecimiento de las plantas. La aplicación combinada de microorganismos podría generar una potenciación o aumento de sus habilidades solubilizadoras (Leaungvutiviroj *et al.* 2010). Este fenómeno demuestra que el estudio de bioindicadores resulta sensible para determinar el grado de calidad y los cambios ocurridos en la materia orgánica del suelo.

Con el comportamiento microbiológico (unido a otras variables) se puede precisar el grado de fertilidad del suelo y por ende su calidad. La relación C/N, tiene también un papel fundamental en este proceso, un valor de 8 se considera óptimo para una buena mineralización de la materia orgánica (Bragado, 2017).

Existen microorganismos responsables de la solubilización de nutrientes como P y K. Asimismo, el incremento en profundidad y superficie del sistema radical permite

una mejor adquisición del agua (Aung *et al.* 2018). El fósforo representa una porción importante de P orgánico en la biomasa de células microbianas presentes en los suelos. Del fósforo presente en los microorganismos del 30 al 50 % está en el ARN (Pérez *et al.* 2012). Estos fosfatos pueden actuar como índice biológico potencial de la disponibilidad de fósforo en los suelos (Guang-Can *et al.* 2008). Los fosfatos solubles son absorbidos por la planta, lo cual mejora su crecimiento y productividad. Al utilizar esas reservas de fosfato presentes en los suelos, se disminuye la aplicación de fertilizantes químicos (Satyaprakash *et al.* 2017). Por su parte el potasio regula la absorción de CO<sub>2</sub> en las plantas.

Los resultados indican que hay una asociación entre la respiración microbiana, las dosis de nitrógeno y el rendimiento agrícola. La evaluación de las interacciones caña de azúcar microorganismos del suelo puede ser útil para identificar un nivel óptimo de fertilización, así como nuevas fuentes de fertilizantes. Se enfatiza la necesidad de avanzar en el conocimiento sobre el uso de la comunidad microbiana del suelo en el manejo adecuado de sistemas agrícolas.

La serie de datos por tratamientos, muestra el testigo absoluto sin fertilizantes y las dosis más altas de N (T1 y T6) ubicados en cuadrantes opuestos (Gráfico 10). El T6 con dosis superiores a los 150 kg/ha de nitrógeno se encuentra asociado a las variables Pol-jugo, potasio y Carbono. En situaciones de saturación, los microorganismos comienzan a utilizar nitratos en vez de O<sub>2</sub> para la descomposición de materia orgánica, lo que lleva a la desnitrificación y pérdidas de N<sub>2</sub> en forma gaseosa. La relación C/N, tiene también un papel fundamental en estos procesos, siendo relaciones C/N de 8 las óptimas para una buena mineralización de la materia orgánica (Bagrado, 2017). Se aprecia que dosis por encima de 150 kg provocan afectación de los indicadores microbiológicos estudiados y la obtención de menores rendimientos; lo que puede estar asociado a una disminución de los microorganismos como consecuencia de la aplicación continuada de altas dosis de este elemento, para éste tipo de suelo.

Los tratamientos con dosis de 100 y 150 kg /ha de N se asocian a la respiración microbiana, cantidad de bacterias totales, pH H<sub>2</sub>O, MO %, cationes cambiabiles, pol en caña, rendimiento agrícola, y a factores del clima, tales como, las precipitaciones, temperatura (T) y humedad (H) del suelo en 20 cm. Las variables antes mencionadas favorecen el incremento en los rendimientos agrícolas e industriales. De esta manera se puede relacionar de forma directa la productividad de los cultivos con la actividad microbiológica del suelo, ya que proporcionando las condiciones óptimas para el desarrollo de la vida microbiana se puedan obtener los rendimientos satisfactorios con un mejor equilibrio del agroecosistema (Steciow, 2000). La presencia de determinado tipo de bacteria produce efectos positivos en el crecimiento de las plantas. Esto resulta promisorio en la medida que la aplicación combinada de microorganismos podría generar una potenciación o aumento de sus habilidades solubilizadoras (Leaungvutiviroj *et al.* 2010). Este fenómeno demuestra que el estudio de bioindicadores resulta sensible para determinar el grado de calidad y los cambios ocurridos en la materia orgánica del suelo. De esta forma, con el comportamiento microbiológico (unido a otros parámetros) se puede precisar el grado de fertilidad del suelo y por ende su

calidad.

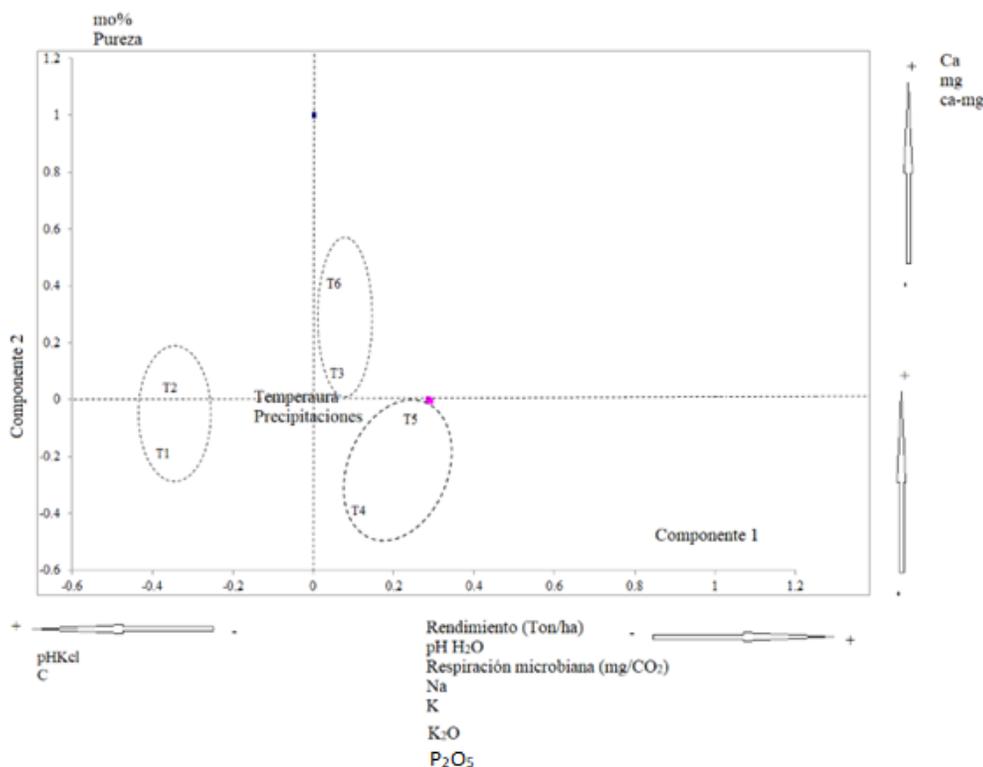


Figura 12. Representación del ambiente evaluado en el plano de los dos primeros componentes principales

Los tratamientos 2-3, el primero sin nitrógeno y fondo fijo de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O y el segundo con la dosis más baja de nitrógeno aplicada, se asocian a las variables Pol-caña y Brix y como era de esperar el nitrógeno va en contra de la maduración de la caña (Figura 12)

En general los resultados obtenidos apuntan a que existe una respuesta diferencial de la respiración microbiana acumulada por niveles de N, las etapas fenológicas del cultivo y la interacción entre ambos.

Existen incrementos de la respiración microbiana en la medida que aumentan las dosis de N hasta los 150 kg/ha del fertilizante. El valor máximo de respiración microbiana se obtiene con una dosis de N de 100.6 kg/ha como promedio.

Existe una relación moderada entre la respiración microbiana con la temperatura y las precipitaciones, negativa en el caso de la primera y positiva para la segunda.

Las dinámicas de la respiración microbiana y el rendimiento agrícola en función de las dosis de nitrógeno presentan similar respuesta con un máximo de sus valores con una dosis promedio de 114.2 kg/ha.

### Relación entre la micro y microbiota con las variables químico físicas, respiración microbiana y rendimiento agroindustrial

La evaluación de la relación de la microbiota bacteriana (asociada a bacterias y arqueas (16S)) con las variables físico-químicas evaluadas, arrojó que las principales relaciones positivas se presentaron entre el P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (r = 0.5) y la materia orgánica (r = 0.4) asociados a *Acidobacterias* y *Bacteroidotas*, respectivamente. Sumado a esto, las principales relaciones negativas fueron la pureza (r = -0.6) con *Acidobacterias*, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (r = -0.5) con *Actinobacteriota*, pH (H<sub>2</sub>O) (r = -0.5) con *Gemmatimonadota* y Mg (r0.5) con *Entotheonellaeota* (Figura 13).

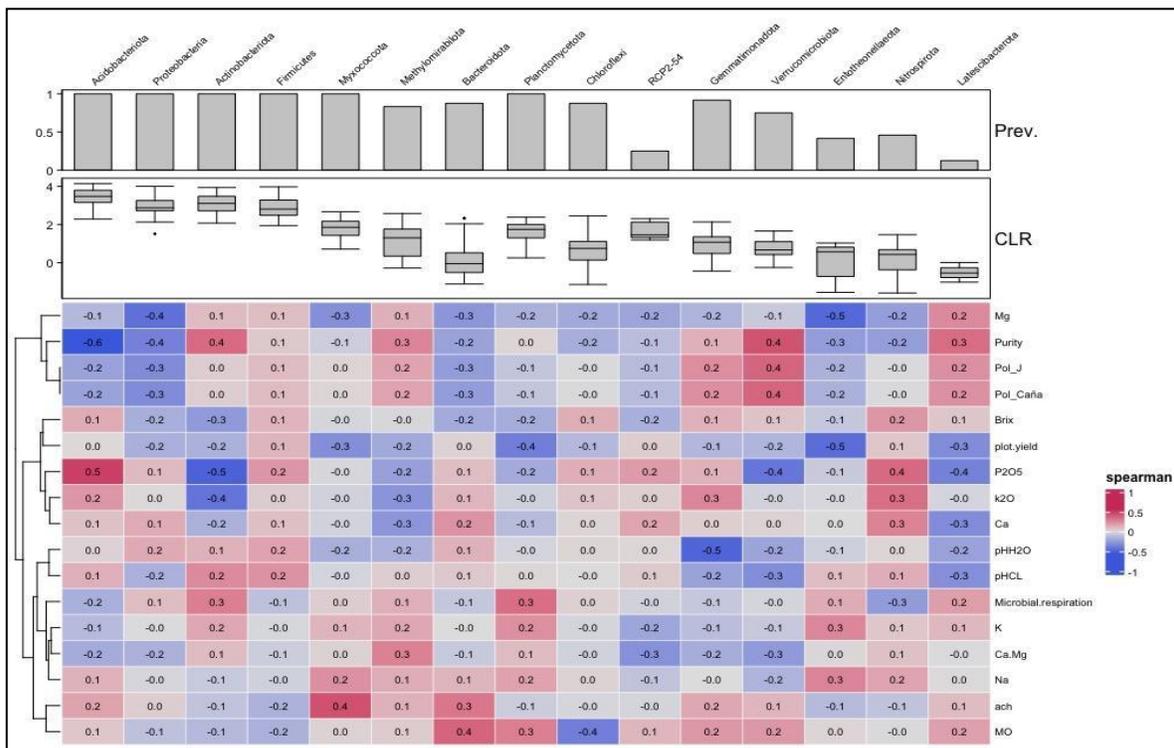


Figura 13. Análisis de rangos de correlación de Spearman de la microbiota y las variables fisicoquímicas respectivas. Rango taxonómico a nivel de filo.



En el caso de los hongos (ITS) las 17 variables físico-químicas fueron relacionadas a través del índice de rangos de correlación de Spearman con los diferentes filos encontrados en la rizosfera de la caña de azúcar. Los resultados indicaron que filo *Mucoromycota* fue uno de los que presentó una relación negativa moderada a las concentraciones de Ca, Mg, K y Na evaluadas ( $r = -0.5$ ). No se evidenciaron otras relaciones determinantes entre otras variables físico-químicas y filos (Figura 14).

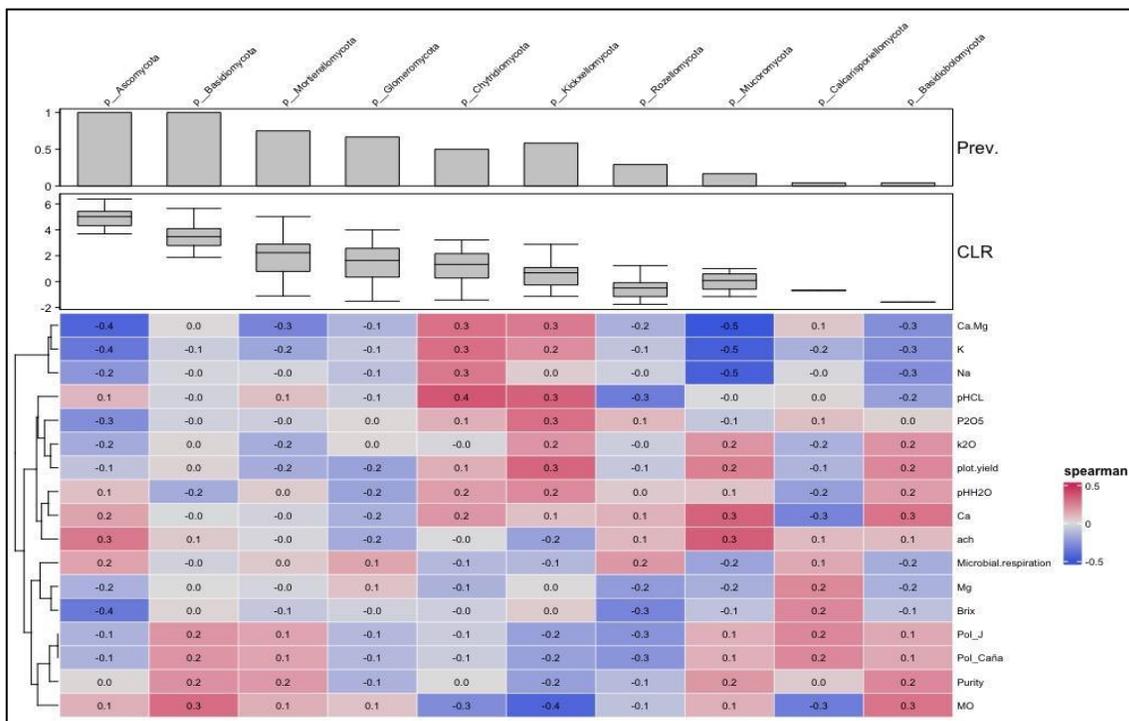


Figura 14. Análisis de rangos de correlación de Spearman de la microbiota y las variables fisicoquímicas respectivas. Rango taxonómico a nivel de filo

---

El estudio de los microorganismos asociados a las plantas ha ido en aumento durante los últimos años dada las múltiples posibilidades que ofrece para mejorar el rendimiento de las plantas. Por ejemplo, Hardoin y colaboradores descubrieron que las bacterias transmitidas por las semillas podrían mejorar la aptitud del arroz (Hardoim *et al.*, 2012).

La manipulación de la microbiota de las plantas puede desencadenar rutas biosintéticas y de señalización del huésped (Berg *et al.*, 2016; Pascale *et al.*, 2019); brindando oportunidades para incrementar el rendimiento de las plantas, una mayor eficiencia en el uso de nutrientes y una limitación del uso de los fertilizantes químicos y los gases de efecto invernadero (Adesemoye *et al.*, 2009; Berg, 2009; Singh y Trivedi, 2017; Ahmed y Hijri, 2021).

La composición de la microbiota de la rizosfera de la caña de azúcar está pobremente reportada. Sin embargo, estudios focalizados han establecido la microbiota relacionada con caña de azúcar en otros tipos de suelo y variedades cañeras. La microbiota descrita por Pang *et al.* (2021) en China, mostró un predominio de los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Cyanobacterias*, *Gemmatimonadetes* y *Verrucomicrobia*. En contraste, la microbiota descrita en este trabajo mostró predominios de los filos *Myxococcota*, *Plantomycetota* y *Methylomirabilota* (Figura 3). Estas diferencias son esperables, incluso en un mismo cultivo, y se pueden atribuir a diferentes factores como el agua de riego (Loganathachetti *et al.*, 2022), la acidez de los suelos (Li *et al.*, 2022), así como otros factores de suelo. Por lo tanto, las características particulares del suelo evaluado hacen que la microbiota sea diferente a lo reportado en otras investigaciones.

Las diferencias de composición de microbiota también se han observado el cultivo del arroz. Se ha visto que plantas que generan granos más perfumados poseen cambios en la microbiota rizosférica en comparación con plantas cuyos granos no son perfumados (Dhondge *et al.*, 2022). Esto se debe a que la microbiota de las plantas con granos perfumados posee mayor producción de precursores de 2-acetil-1-pirrolina (2AP) el cual está asociado al aroma. Un futuro estudio, donde se comparen diferentes variedades de caña de azúcar podría dilucidar cuáles pudieran ser los microorganismos que confieren ciertas características deseadas.

---

---

En términos de microbiota y micobiota benéfica, o que tenga efectos significativos sobre el rendimiento o propiedades industriales relevantes, se evidenció a través de los resultados la presencia del género *Myxococcota* (Figura 3), el cual ha sido asociado a características fenotípicas deseables de frutas comerciales (Xiao *et al.*, 2022). También, el género *Methylomirabilota* (Figura 3) relacionado con la secreción de ácidos orgánicos y compuestos de aminoácidos para disminuir la contaminación de metales pesados, como el cadmio (Zhu *et al.*, 2022). De la misma forma el género *Bacillus* reportado en numerosos estudios como un microorganismos beneficioso para las plantas, como el arroz (Prasanna *et al.*, 2009; Anas *et al.*, 2011; Mwajita *et al.*, 2013; Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

Otro filo importante de hongo es *Mucoromycotina*, encontrado en muy baja abundancia (0.1-0.3%) en los tratamientos con muy alta concentración de nitrógeno (Figura 5). Este tipo de hongos provee a las plantas de nitrógeno y fósforo a cambio de carbono (Field *et al.*, 2015; Almario *et al.*, 2022). Este hongo parece verse afectado negativamente por la presencia de sales en el suelo (Spearman = -0.5; Figura 14). Esto sugiere que modulando las concentraciones de sales en el suelo, aumentaría la abundancia relativa de este hongo, y consecuentemente aportaría en el aumento de asimilación de nitrógeno y fósforo por parte de la caña.

En contraste, cabe destacar que el orden *Pleosporales* (hongos) ha sido detectado dentro de la micobiota. Este es un tipo de hongo relacionado principalmente con enfermedades en otros tipos de plantas como el maíz y el trigo (Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2022), por lo que debe ser tomado con atención y consideración en futuros estudios.

**RESULTADO PLANIFICADO IV:** Capacitación y socialización de resultados (evidencias fotográficas). Se realizaron varias acciones de capacitación y socialización de los resultados:

Taller de intercambios científico técnicos en la ETICA Santiago de Cuba con científicos, técnicos y productores así como con dirigentes del municipio Palma Soriano y provincia Santiago de Cuba

Dos seminarios técnicos con especialistas chilenos, mexicanos y cubanos en AZCUBA.

---

---

Un seminario científico en el laboratorio Agroenergía de Chile

Encuentros técnicos con dirigentes, científicos y personal administrativo del INICA

Video conferencia con la Agencia de Cooperación de Chile sobre cooperación científica Chile\_ Cuba, experiencias y aportes a partir de la ejecución del presente proyecto.

Presentación de tema de tesis doctoral y resultados parciales en la Universidad de Oriente de la aspirante MSc.Mónica Tamayo.

Tres publicaciones científicas en diferentes fases de preparación y entrega a revistas de impacto. Presentación de trabajo en el congreso Diversificación 2020

## **Conclusiones**

- Se determinaron los principales componentes de la microbiota tanto de bacterias como hongos y sus abundancias relativas en el rizoma de las plantas de caña de azúcar sometidas a diferentes tratamientos de investigación de fertilidad en suelo Pardo con carbonato plastogénico cultivado con caña de azúcar en la región de Palma Soriano, Cuba. Los hongos, en lugar de las bacterias, podrían tener un rol esencial en la caña de azúcar, ya que poseen cambios significativos en su composición y abundancia en función de los diferentes tratamientos.
  - Tanto en la microbiota como en la micobiota se detectó la presencia de microorganismos benéficos. Aunque la presencia de ellos ha sido en baja abundancia, como el género *Bacillus* (bacteria) o *Mucoromycotina* (hongo), los resultados sugieren que su abundancia podría ser potenciada modulando algunos parámetros químicos de los suelos, incentivando en consecuencia la incorporación de nitrógeno y fósforo a la planta y su correspondencia en términos de rendimiento.
  - La actividad respiratoria del suelo pudiera considerarse un indicador biológico de su calidad por lo que será necesario profundizar en las investigaciones sobre esta variable.
-

---

Se sugiere evaluar nuevos tratamientos químico-biológicos que consistan en modular las concentraciones salinas y potenciar la abundancia de *Bacillus* y *Mucoromycotina* en el suelo, para evaluar la respuesta en términos de rendimiento por efectos simbióticos en la caña de azúcar. Esto permitiría reducir la dependencia a fertilizantes de origen químico y su consecuente reducción de costos, sin afectar negativamente el rendimiento de la caña en términos industriales.

## **INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE**

### 1. Resumen de la situación financiera.

Del presupuesto recibido que fueron 20 000 USD, se han ejecutado hasta el momento 17833 que constituye el 89.1 % de lo planificado.



**Firma Directora proyecto    Nombre: Dolores Piñón Gómez**

---

---

## 1. REFERENCIAS FUNDAMENTALES

Adesemoye, A. O., H. A. Torbert, and J. W. Kloepper. 2009. "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers." *Microbial Ecology* 58 (4): 921–29.

Ahmed, Bulbul, and Mohamed Hijri. 2021. "Potential Impacts of Soil Microbiota Manipulation on Secondary Metabolites Production in Cannabis." *Journal of Cannabis Research* 3 (1): 25.

Almario, J., I. Fabiańska, G. Saridis, and M. Bucher. 2022. "Unearthing the Plant–microbe Quid pro Quo in Root Associations with Beneficial Fungi." *The New Phytologist*. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.18061>.

Anas, Iswandi, O. P. Rupela, T. M. Thiyagarajan, and Norman Uphoff. 2011. "A Review of Studies on SRI Effects on Beneficial Organisms in Rice Soil Rhizospheres." *Paddy and Water Environment* 9 (1): 53–64.

Anderson, Marti J. 2001. "A New Method for Non-Parametric Multivariate Analysis of Variance." *Austral Ecology* 26 (1): 32–46.

Barnett, David, Ilja Arts, and John Penders. 2021. "microViz: An R Package for Microbiome Data Visualization and Statistics." *Journal of Open Source Software* 6 (63): 3201.

Berg, Gabriele. 2009. "Plant-Microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture." *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (1): 11–18.

Berg, Gabriele, Daria Rybakova, Martin Grube, and Martina Köberl. 2016. "The Plant Microbiome Explored: Implications for Experimental Botany." *Journal of Experimental Botany* 67 (4): 995–1002.

Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, Michael J. Rosen, Andrew W. Han, Amy Jo A. Johnson, and Susan P. Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data." *Nature Methods* 13 (7): 581–83.

Callahan, Ben J., Kris Sankaran, Julia A. Fukuyama, Paul J. McMurdie, and Susan P. Holmes. 2016. "Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: From Raw Reads to

---

---

Community Analyses.” *F1000Research* 5 (1492): 1492.

Dhondge, Harshal V., Vitthal T. Barvkar, Dhiraj Paul, Syed G. Dastager, Anupama A. Pable, and Altafhusain B. Nadaf. 2022. “Exploring the Core Microbiota in Scented Rice (*Oryza Sativa* L.) Rhizosphere through Metagenomics Approach.” *Microbiological Research* 263 (October): 127157.

Edwards, Joseph, Cameron Johnson, Christian Santos-Medellín, Eugene Lurie, Natraj Kumar Podishetty, Srijak Bhatnagar, Jonathan A. Eisen, and Venkatesan Sundaresan. 2015. “Structure, Variation, and Assembly of the Root-Associated Microbiomes of Rice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (8): E911–20.

Field, Katie J., William R. Rimington, Martin I. Bidartondo, Kate E. Allinson, David J. Beerling, Duncan D. Cameron, Jeffrey G. Duckett, Jonathan R. Leake, and Silvia Pressel. 2015. “First Evidence of Mutualism between Ancient Plant Lineages (Haplomitriopsida Liverworts) and Mucoromycotina Fungi and Its Response to Simulated Palaeozoic Changes in Atmospheric CO<sub>2</sub>.” *The New Phytologist* 205 (2): 743–56.

Gopalakrishnan, Subramaniam, R. Mahender Kumar, Pagidi Humayun, V. Srinivas, B. Ratna Kumari, R. Vijayabharathi, Amit Singh, et al. 2014. “Assessment of Different Methods of Rice (*Oryza Sativa*. L) Cultivation Affecting Growth Parameters, Soil Chemical, Biological, and Microbiological Properties, Water Saving, and Grain Yield in Rice–rice System.” *Paddy and Water Environment* 12 (1): 79–87.

Hardoim, Pablo R., Cristiane C. P. Hardoim, Leonard S. van Overbeek, and Jan Dirk van Elsas. 2012. “Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages.” *PloS One* 7 (2): e30438.

Jariwala, Hiral, Rafael M. Santos, John D. Lauzon, Animesh Dutta, and Yi Wai Chiang. 2022. “Controlled Release Fertilizers (CRFs) for Climate-Smart Agriculture Practices: A Comprehensive Review on Release Mechanism, Materials, Methods of Preparation, and Effect on Environmental Parameters.” *Environmental Science and Pollution Research International* 29 (36): 53967–95.

Katoh, Kazutaka, and Daron M. Standley. 2013. “MAFFT Multiple Sequence Alignment

---

---

Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.” *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772–80.

Kearl, Jennifer, Caitlyn McNary, J. Scott Lowman, Chuansheng Mei, Zachary T. Aanderud, Steven T. Smith, Jason West, Emily Colton, Michelle Hamson, and Brent L. Nielsen. 2019. “Salt-Tolerant Halophyte Rhizosphere Bacteria Stimulate Growth of Alfalfa in Salty Soil.” *Frontiers in Microbiology* 10 (August): 1849.

Lederberg, Joshua, and Alexa T. McCray. 2001. “Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words.” *Scientist* 15 (7): 8–8.

Leontidou, Kleopatra, Savvas Genitsaris, Anastasia Papadopoulou, Nathalie Kamou, Irene Bosmali, Theodora Matsi, Panagiotis Madesis, Despoina Vokou, Katerina Karamanoli, and Ifigeneia Mellidou. 2020. “Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Halophytes and Drought-Tolerant Plants: Genomic Characterisation and Exploration of Phyto-Beneficial Traits.” *Scientific Reports* 10 (1): 14857.

Li, Bo, Yanan Wang, Tongle Hu, Dewen Qiu, Frédéric Francis, Shuangchao Wang, and Shutong Wang. 2022. “Root-Associated Microbiota Response to Ecological Factors: Role of Soil Acidity in Enhancing Citrus Tolerance to Huanglongbing.” *Frontiers in Plant Science* 13 (July): 937414.

Liu, Junping, Yujie Tang, Jiashu Bao, Hankun Wang, Fangren Peng, Pengpeng Tan, Guolin Chu, and Shuai Liu. 2022. “A Stronger Rhizosphere Impact on the Fungal Communities Compared to the Bacterial Communities in Pecan Plantations.” *Frontiers in Microbiology* 13 (June): 899801.

Loganathachetti, Dinesh Sanka, Fardous Alhashmi, Subha Chandran, and Sunil Mundra. 2022. “Irrigation Water Salinity Structures the Bacterial Communities of Date Palm (*Phoenix Dactylifera*)-Associated Bulk Soil.” *Frontiers in Plant Science* 13 (August): 944637.

Mardis, Elaine R. 2011. “A Decade’s Perspective on DNA Sequencing Technology.” *Nature* 470 (7333): 198–203.

McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2013. “Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data.” *PloS One* 8 (4): e61217.

---

---

Metzker, Michael L. 2010. "Sequencing Technologies - the next Generation." *Nature Reviews. Genetics* 11 (1): 31–46.

Mwajita, Mwashasha Rashid, Hunja Murage, Akio Tani, and Esther M. Kahangi. 2013. "Evaluation of Rhizosphere, Rhizoplane and Phyllosphere Bacteria and Fungi Isolated from Rice in Kenya for Plant Growth Promoters." *SpringerPlus* 2 (November): 606.

Oksanen, J., R. Kindt, P. Legendre, and B. O'Hara. 2007. "The Vegan Package." *Community Ecology*.

[https://www.researchgate.net/profile/Gavin\\_Simpson/publication/228339454\\_The\\_vegan\\_Package/links/0912f50be86bc29a7f000000/The-vegan-Package.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Gavin_Simpson/publication/228339454_The_vegan_Package/links/0912f50be86bc29a7f000000/The-vegan-Package.pdf).

Otlewska, Anna, Melania Migliore, Katarzyna Dybka-Stępień, Andrea Manfredini, Katarzyna Struszczyk-Świta, Rosario Napoli, Aneta Białkowska, Loredana Canfora, and Flavia Pinzari. 2020. "When Salt Meddles Between Plant, Soil, and Microorganisms." *Frontiers in Plant Science* 11 (September): 553087.

Pang, Ziqin, Nyumah Fallah, Peiying Weng, Yongmei Zhou, Xiumei Tang, Muhammad Tayyab, Yueming Liu, et al. 2021. "Sugarcane-Peanut Intercropping System Enhances Bacteria Abundance, Diversity, and Sugarcane Parameters in Rhizospheric and Bulk Soils." *Frontiers in Microbiology* 12: 815129.

Pascale, Alberto, Silvia Proietti, Iakovos S. Pantelides, and Ioannis A. Stringlis. 2019. "Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion." *Frontiers in Plant Science* 10: 1741.

Patel, Naveen, Arun Lal Srivastav, Akansha Patel, Anurag Singh, Shailendra Kumar Singh, Vinod Kumar Chaudhary, Prabhat Kumar Singh, and Biswanath Bhunia. 2022. "Nitrate Contamination in Water Resources, Human Health Risks and Its Remediation through Adsorption: A Focused Review." *Environmental Science and Pollution Research International*, August. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22377-2>.

Pérez, Hipólito, and Irán Rodríguez. 2015. "Fundamentos para el empleo eficiente de los fertilizantes nitrogenados en la caña de azúcar en Cuba." *Cumbres* 1 (1): 09–15.

Prasanna, Radha, Pranita Jaiswal, Saswati Nayak, Anjuli Sood, and Brahma D. Kaushik.

---

---

2009. "Cyanobacterial Diversity in the Rhizosphere of Rice and Its Ecological Significance." *Indian Journal of Microbiology* 49 (1): 89–97.

Price, Morgan N., Paramvir S. Dehal, and Adam P. Arkin. 2010. "FastTree 2--Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments." *PloS One* 5 (3): e9490.

Qin, Yuan, Irina S. Druzhinina, Xueyu Pan, and Zhilin Yuan. 2016. "Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-Based Solutions for Saline Agriculture." *Biotechnology Advances* 34 (7): 1245–59.

Singh, Brajesh K., and Pankaj Trivedi. 2017. "Microbiome and the Future for Food and Nutrient Security." *Microbial Biotechnology* 10 (1): 50–53.

Soussi, Asma, Raoudha Ferjani, Ramona Marasco, Amel Guesmi, Hanene Cherif, Eleonora Rolli, Francesca Mapelli, Hadda Imene Ouzari, Daniele Daffonchio, and Ameer Cherif. 2016. "Plant-Associated Microbiomes in Arid Lands: Diversity, Ecology and Biotechnological Potential." *Plant and Soil* 405 (1-2): 357–70.

Spearman, C. 1961. "The Proof and Measurement of Association Between Two Things." In *Studies in Individual Differences: The Search for Intelligence*, (pp, edited by James J. Jenkins, 774:45–58.

Tian, Hanqin, Rongting Xu, Josep G. Canadell, Rona L. Thompson, Wilfried Winiwarter, Parvatha Suntharalingam, Eric A. Davidson, et al. 2020. "A Comprehensive Quantification of Global Nitrous Oxide Sources and Sinks." *Nature* 586 (7828): 248–56.

Weiss, Sophie, Will Van Treuren, Catherine Lozupone, Karoline Faust, Jonathan Friedman, Ye Deng, Li Charlie Xia, et al. 2016. "Correlation Detection Strategies in Microbial Data Sets Vary Widely in Sensitivity and Precision." *The ISME Journal* 10 (7): 1669–81.

Xiao, Jian, Si-Yu Chen, Yan Sun, Shang-Dong Yang, and Yi He. 2022. "Differences of Rhizospheric and Endophytic Bacteria Are Recruited by Different Watermelon Phenotypes Relating to Rind Colors Formation." *Scientific Reports* 12 (1): 6360.

Zhang, Ying, Pedro W. Crous, Conrad L. Schoch, and Kevin D. Hyde. 2012. "Pleosporales." *Fungal Diversity* 53 (1): 1–221.

---

---

Zhu, Yongqi, Mingtao Zhong, Weidi Li, Yue Qiu, Haijiang Wang, and Xin Lv. 2022. "Cotton Straw Biochar and Bacillus Compound Biofertilizer Decreased Cd Migration in Alkaline Soil: Insights from Relationship between Soil Key Metabolites and Key Bacteria." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 232 (March): 113293.

---

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Cuantificación de ADN de muestras rizomáticas por fluorometría (Qubit 3).

NPK (kg ha <sup>-1</sup> )	Característica muestras rizomáticas	Código muestra	Concentración (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )
N <sub>0</sub> P <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	Blanco	BA	24.8
		BB	4.4
		BC	19.0
N <sub>0</sub> P <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	Testigo (sin presencia de rizoma)	TA	11.3
		TB	7.92
		TC	6.38
N <sub>0</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación nula de nitrógeno	N0A	52.0
		N0B	29.1
		N0C	47.8
N <sub>50</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación baja de N	N1A	56.0
		N1B	44.0
		N1C	42.1
N <sub>100</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación media de N	N2A	47.4
		N2B	28.1
		N2C	28.2
N <sub>150</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación alta de N	N3A	15.3
		N3B	30.8
		N3C	31.0
N <sub>200</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	Aplicación muy alta de N	N4A	48.2
		N4B	68.4
		N4C	53.0

N <sub>50</sub> P <sub>100</sub> K <sub>50</sub>	Concentrado en P	P2-A	16.1
		P2-B	26.3
		P2-C	27.8
N <sub>50</sub> P <sub>25</sub> K <sub>300</sub>	Concentrado en K	K4-A	26.0
		K4-B	54.0
		K4-C	114.0

B (Blanco), T (testigo) N (Nitrógeno), P (Fósforo) y K (Potasio). Medidas tomadas en kilogramos por hectárea (kg ha<sup>-1</sup>).

**Apéndice.1. Lecturas crudas provenientes el proceso de secuenciación para cada amplicón.**

<b>NPK (kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Código muestra</b>	<b>Lecturas brutas 16S</b>	<b>Lecturas brutas ITS</b>
N <sub>0</sub> P <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	BA	78,748	123,864
	BB	77,775	121,828
	BC	82,777	117,568
N <sub>0</sub> P <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	TA	88,167	117,895
	TB	65,084	112,372
	TC	61,105	123,852
N <sub>0</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	N0A	70,703	104,926
	N0B	89,660	95,629
	N0C	88,145	109,241
N <sub>50</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	N1A	74,721	108,304
	N1B	55,155	104,315
	N1C	77,946	122,351
N <sub>100</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	N2A	61,518	49,203
	N2B	58,666	111,767
	N2C	81,449	93,187
N <sub>150</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	N3A	86,685	100,258
	N3B	81,644	93,201
	N3C	76,766	84,521
N <sub>200</sub> P <sub>25</sub> K <sub>50</sub>	N4A	95,810	70,109
	N4B	100,906	100,891
	N4C	65,855	92,748
N <sub>50</sub> P <sub>100</sub> K <sub>50</sub>	P2-A	76,154	87,697

	P2-B	79,790	85,862
	P2-C	80,905	82,079
N <sub>50</sub> P <sub>25</sub> K <sub>300</sub>	K4-A	74,563	107,383
	K4-B	67,222	130,591
	K4-C	87,741	93,532
<b>Total</b>		<b>2,085,660</b>	<b>2,745,174</b>

---

---