

El nivel de agua modula la respuesta microbiológica del suelo al ozono troposférico elevado en trigo

Water level modulates the soil microbial response to elevated tropospheric ozone in wheat

Javier González-Canales^{1,*}, Mariela Navas², Ana Moliner¹, Ignacio Mariscal-Sancho¹, Victoria Bermejo-Bermejo³, Ignacio González-Fernández³ & Chiquinquirá Hontoria¹

¹ Dpto. Producción Agraria-Unidad de Edafología. E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB). Universidad Politécnica de Madrid (UPM), España

² Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), España

³ Departamento de Medio Ambiente. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), España

(*E-mail: javier.gcanales@upm.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.28612>

RESUMEN

El nivel de agua modula el impacto del ozono troposférico sobre la planta, aunque se desconoce hasta qué punto este efecto se traslada a la microbiota del suelo. Se ha investigado si la disponibilidad de agua puede alterar la respuesta microbiana a elevadas concentraciones de ozono en una variedad de trigo sensible al ozono. Se estableció un ensayo con cámaras de techo descubiertas con cuatro niveles de ozono (Preindustrial; Actual; Actual+20 ppb; Actual+40 ppb) y dos niveles del riego (estrés y óptimo). La fracción rizosférica del suelo (0-5 cm) mostró mayor sensibilidad al nivel de ozono y de riego que la fracción de resto ("bulk"). El aire Actual fue el tratamiento menos sensible, y el Actual+20 el más sensible al riego. Independientemente del nivel de riego, el aire Actual y Actual+40 mostraron características microbiológicas bien contrastadas. El estrés hídrico altera el comportamiento intermedio de Actual+20 aumentando su cociente metabólico. El aire Preindustrial tendió a comportarse como Actual+20 en ambos niveles de riego (menor q_{Mic} y mayor q_{CO_2}), por lo que cambios de ozono con respecto al Actual provocan una menor eficiencia en el uso del C. El riego modula el efecto del ozono sobre la microbiota del suelo.

Palabras clave: Ozono, OTC, Trigo, APC, qPCR

ABSTRACT

Water level modulates the tropospheric ozone impact on the plant, although the extent to which this effect is transferred to the soil microbiota is unknown. We investigate whether water availability can alter the microbial response to elevated ozone concentrations in an ozone-sensitive wheat variety. An open-top chamber trial was set up with four ozone levels (Pre-industrial; Ambient; Ambient+20 ppb; Ambient+40 ppb) and two irrigation levels (stress and optimum). The rhizosphere fraction of the soil (0-5 cm) showed higher sensitivity to ozone and irrigation level than the bulk fraction. Ambient air was the least sensitive treatment, and Ambient+20 was the most sensitive to irrigation. Regardless of the irrigation level, Ambient and Ambient+40 air showed contrasting microbiological characteristics. Water stress alters the intermediate behaviour of Ambient+20 by increasing its metabolic quotient. Pre-industrial air tended to behave like Ambient+20 at both irrigation levels (lower q_{Mic} and higher q_{CO_2}), so changes in ozone with respect to Ambient lead to lower efficiency of C use. Irrigation modulates the effect of ozone on soil microbiota.

Keywords: Ozone, OTC, wheat, PCA, qPCR

INTRODUCCIÓN

Los agrosistemas y los ecosistemas terrestres en general se ven afectados negativamente por elevadas concentraciones de ozono troposférico (Agathokleous *et al.*, 2020). El ozono es un potente oxidante que causa daños en las plantas y altera la transferencia de recursos a las raíces, causando cambios en su composición y en la de sus exudados. La restricción de recursos puede afectar a la composición, abundancia y metabolismo de los microorganismos heterótrofos de la rizosfera, con efectos potenciales sobre los procesos que llevan a cabo, como los ciclos biogeoquímicos del C y N del suelo (Hu *et al.*, 2022). Los efectos son muchas veces inconsistentes y dependen de factores como la variedad cultivada, la dosis de ozono, el tipo de suelo, etc. (Agathokleous *et al.*, 2020). La disponibilidad de agua es también un factor a considerar ya que modula la respuesta de las plantas al ozono. En algunos casos, el estrés hídrico refuerza el efecto adverso del ozono en el cultivo (Ghosh *et al.*, 2020), mientras que, en otros, el riego deficitario se aplica como estrategia para mitigar el impacto del ozono troposférico en el cultivo (Harmens *et al.*, 2019). Aunque la humedad del suelo resulta un factor relevante para explicar la composición de la microbiota del suelo bajo condiciones de ozono elevado (Bao *et al.*, 2015), pocos estudios han investigado hasta qué punto el efecto modulador del riego se traslada a la microbiota del suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el nivel de disponibilidad de agua en el suelo podía alterar la respuesta microbiológica del suelo a niveles elevados de ozono troposférico en un cultivar de trigo sensible al ozono.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estableció un ensayo con cámaras de techo descubiertas (OTCs) en la finca experimental “La Higuera” (MNCN-CSIC; Toledo), con un clima mediterráneo semiárido (Bsk según Köppen) y un suelo Calcic Haploxeralf. Se aplicó un diseño de parcelas divididas en bloques al azar con tres repeticiones. Como factor principal se aplicaron cuatro niveles de ozono: Preindustrial o aire filtrado, Actual o no filtrado, Actual+20 ppb y Actual+40 ppb de ozono, que se distribuyeron al azar en las OTC de cada bloque. Cada OTC se dividió a la mitad y

en cada mitad se aplicó aleatoriamente uno de los dos niveles del factor riego, estrés hídrico y nivel óptimo de agua en el suelo. Como cultivo se eligió la variedad de trigo de primavera Califa Sur, sensible al ozono, que se trasplantó a las OTCs en el estadio de 4ª hoja verdadera. Las plantas se expusieron a las diferentes dosis de ozono de febrero a junio de 2020 y se regaron desde la fase de elongación del tallo hasta su madurez.

El muestreo del suelo se realizó en mayo de 2020 con el trigo en fase de llenado del grano. En cada tratamiento se seleccionaron dos plantas al azar y, tras separar la parte aérea, se extrajo la parte radical con su suelo con ayuda de un muestreador cilíndrico de 8 cm de diámetro y 20 cm de profundidad. Las muestras se fraccionaron en dos porciones, 0-5 cm y 5-20 cm y se conservaron en frío hasta su traslado al laboratorio. Cada muestra se procesó cuidadosamente para separar las raíces, la rizosfera del suelo (~2 mm en torno a las raíces) y el resto del suelo “bulk”. Las muestras de suelo de las dos extracciones se mezclaron para dar una muestra por tratamiento y se prepararon y conservaron hasta su posterior análisis.

El análisis de suelo se realizó en la capa 0-5 cm, que es donde se encontró la mayoría de la biomasa radical. En cada fracción, rizosfera y “bulk”, se midieron varias propiedades químicas y microbiológicas del suelo, de las que se han seleccionado para este estudio las siguientes: C y N total (TOC y TN) por combustión total, Respiración basal (BR) y Respiración inducida por sustrato (SIR) medidas con trampa alcalina (Alef & Nannipieri, 1995), C y N de la biomasa microbiana (MBC y MBN) por el método fumigación-extracción (Vance *et al.*, 1987). Basados en estos parámetros se calcularon dos coeficientes, el coeficiente metabólico qCO_2 (Anderson & Domsch, 1993), y el coeficiente microbiano $qMic$ (Sparling, 1992). La extracción de ADN del suelo se realizó utilizando el kit PowerSoil® DNA isolation kit (Mo-Bio laboratories, Carlsbad, CA, USA). Mediante PCR cuantitativa se estimó la abundancia de hongos, bacterias y arqueas totales utilizando marcadores específicos para cada grupo filogenético: 16rRNA para bacterias y arqueas e ITS para hongos (Ulcuango *et al.*, 2021).

En este trabajo se presentan los resultados de la aplicación de un análisis de componentes principales

(ACP) a las variables seleccionadas. El análisis se realizó por separado en la fracción rizosférica y la fracción "bulk" del suelo, considerando conjuntamente los dos factores de estudio. Los datos se analizaron con el software R (R Core Team, 2021), utilizando los paquetes factoextra corrplot). Elipses separadas en el biplot muestran diferencias entre los tratamientos con un nivel de confianza de 0.95.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fracción rizosférica del suelo mostró mayor sensibilidad que la fracción "bulk" tanto al nivel de ozono como a la disponibilidad de agua. Lo cual confirma que el efecto del ozono sobre la microbiota del suelo tiene lugar principalmente a través de los efectos sufridos por el cultivo (Andersen, 2003). El ACP para la rizosfera muestra que los tres primeros componentes principales (CP) (eigenvalores ≥ 1) explican en conjunto cerca del 80% de la variabilidad en los datos, explicando los dos primeros casi un 68% (Tabla 1).

Tabla 1 - Varianza que explica cada componente y coeficientes de correlación con las variables. Donde: Respiración basal e inducida por sustrato (BR; SIR), C y N de la masa microbiana (MBC; MBN), coeficiente metabólico (qCO_2), coeficiente microbiano ($qMic$), abundancia de bacterias, hongos y arqueas (BAC; FUN; ARC), Ratio Hongos:Bacterias (F:B)

	CP.1	CP.2	CP.3
Varianza explicada	51,21	16,09	12,04
BR	0.14	0.83	0.46
SIR	0.32	-0.52	0.25
MBC	-0.77	-0.12	0.44
MBN	-0.64	-0.06	0.54
qCO_2	0.70	0.70	0.05
$qMic$	-0.90	-0.06	0.28
BAC	0.83	-0.18	0.03
FUN	0.93	-0.19	0.16
ARC	0.70	-0.22	0.52
F:B	0.80	-0.16	0.27

El CP1 presenta una correlación positiva con hongos totales, bacterias totales, el ratio Hongos: Bacterias, arqueas totales y qCO_2 , y una correlación negativa con $qMic$, MBC y MBN. El CP2 muestra una correlación positiva con la respiración basal y qCO_2 y una negativa con SIR (Tabla 1). Atendiendo a ambos CP, el riego modula de manera diferente la respuesta de las variables microbiológicas a los distintos niveles de ozono estudiados. El aire Actual resulta el tratamiento menos sensible al nivel de riego, mientras que el Actual+20 seguido del aire filtrado o Preindustrial serían los más sensibles. La adaptación de la microbiota del suelo a las condiciones meteorológicas cambiantes del clima mediterráneo en los niveles actuales de ozono, explican la menor sensibilidad del aire Actual. Por otra parte, la biomasa radical en Actual+20 tendió a ser más sensible al nivel de riego que en los otros niveles de ozono (datos no mostrados), lo que puede haber trasladado este efecto a la microbiota del suelo.

En el biplot (Figura 1) los tratamientos Actual y Actual+40 producen efectos bien contrastados entre sí en las variables microbiológicas analizadas y estas diferencias se mantienen independientemente del nivel de riego. Mientras que Actual presenta mayores valores de MBC, MBN y $qMic$, Actual+40 destaca por valores más altos de SIR, mayor abundancia de hongos y bacterias totales y mayor qCO_2 . Lo que sugiere cambios en la composición microbiana hacia comunidades jóvenes, estresadas, con alto requerimiento energético para su mantenimiento (Anderson & Domsch, 1993).

El tratamiento Actual+20 tiende a mantener una posición intermedia entre Actual y Actual+40 en el CP1, especialmente en condiciones óptimas de agua, donde se solapa con ambos. Hu *et al.* (2018) también observaron una disminución progresiva del MBC y MBN al aumentar la concentración de ozono. Sin embargo, en estrés hídrico, Actual+20 se diferencia por el aumento en la respiración basal y el qCO_2 . El tratamiento Preindustrial no se diferencia del Actual+20 en ningún nivel de riego. Ambos tienden a aumentar qCO_2 y disminuir $qMic$ con respecto al aire Actual. Cambios en el nivel habitual de ozono, independientemente de su sentido, parecen generar un estrés metabólico en los microorganismos con un uso menos eficiente del carbono orgánico del suelo (Dilly, 2005).

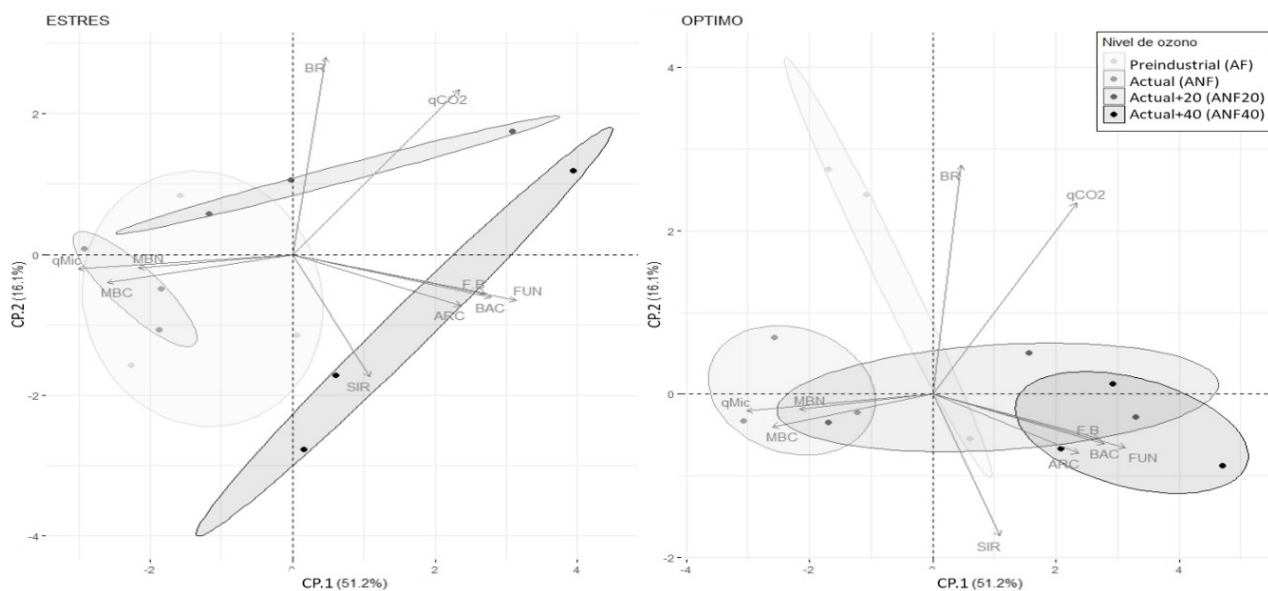


Figura 1 - Análisis de Componentes Principales por dosis de riego (Estrés y Óptimo). Las elipses representan los diferentes tratamientos. Elipses separadas indican diferencias entre tratamientos con un nivel confianza del 95%.

Nuestros resultados indican que el nivel de riego modula la respuesta microbiológica del suelo a la contaminación por ozono troposférico en un agrosistema mediterráneo de trigo y que, por tanto, puede plantearse el riego como una estrategia de mitigación.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto OZOCAM (PDR-18OZOCAM); Proyecto AGRISOST (CMS2018/BAA-4330) y Fondos estructurales 2014-2020 (ERDF and ESF); Proyecto SUSCA-PPCI2019-103521 (MCIN/AEI/10.1303/501100011033, con apoyo UE)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alef, K. & Nannipieri, P. (1995) - *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (No. 631.46 M592ma). Academic Press.
- Agathokleous, E.; Feng, Z.; Oksanen, E.; Sicard, P.; Wang, Q.; Saitanis, C.J.; Araminiene, V.; Blande, J.D.; Hayes, F.; Calatayud, V.; Domingos, M.; Veresoglou, S.D.; Peñuelas, J.; Wardle, D.A.; de Marco, A.; Li, Z.; Harmens, H.; Yuan, X.; Vitale, M. & Paoletti, E. (2020) - Ozone affects plant, insect, and soil microbial communities: A threat to terrestrial ecosystems and biodiversity. *Science Advances*, vol. 6, n. 33, art. eabc1176. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc1176>
- Andersen, C.P. (2003) - Source–sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone. *New Phytologist*, vol. 157, n. 2, p. 213-228. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00674.x>
- Anderson, T.H. & Domsch, A.K. (1993) - The metabolic quotient for CO₂ (q_{CO_2}) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 25, n. 3, p. 393-395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7)
- Bao, X.; Yu, J.; Liang, W.; Lu, C.; Zhu, J. & Li, Q. (2015) - The interactive effects of elevated ozone and wheat cultivars on soil microbial community composition and metabolic diversity. *Applied Soil Ecology*, vol. 87, p. 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.11.003>
- Dilly, O. (2005) - Microbial energetics in soils. In: *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*, p. 123-138. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ghosh, A.; Agrawal, M. & Agrawal, S.B. (2020) - Effect of water deficit stress on an Indian wheat cultivar (*Triticum aestivum* L. HD 2967) under ambient and elevated level of ozone. *Science of The Total Environment*, vol. 714, art. 136837. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136837>
- Harmens, H.; Hayes, F.; Sharps, K.; Radbourne, A. & Mills, G. (2019) - Can reduced irrigation mitigate ozone impacts on an ozone-sensitive African wheat variety? *Plants*, vol. 8, n. 7, art. 220. <https://doi.org/10.3390/plants8070220>
- Hu, E.; Yuan, Z.; Zhang, H.; Zhang, W.; Wang, X.; Jones, S.B. & Wang, N. (2018) - Impact of elevated tropospheric ozone on soil C, N and microbial dynamics of winter wheat. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 253, p. 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.010>
- Hu, E.; Ren, Z.; Wang, X.; Zhang, H. & Zhang, W. (2022) - Effect of elevated tropospheric ozone on soil carbon and nitrogen: a meta-analysis. *Environmental Research Letters*, vol. 17, n. 4, art. 043001. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac49b9>
- R Core Team (2021) - *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sparling, G.P. (1992) - Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research*, vol. 30, n. 2, p. 195-207. <https://doi.org/10.1071/SR9920195>
- Ulcuango, K.; Navas, M.; Centurión, N.; Ibañez, M.Á.; Hontoria, C. & Mariscal-Sancho, I. (2021) - Interaction of Inherited Microbiota from Cover Crops with Cash Crops. *Agronomy*, vol. 11, n. 11, art. 2199. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112199>
- Vance, E.D.; Brookes, P.C. & Jenkinson, D.S. (1987) - An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry*, vol. 19, n. 6, p. 703-707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)