

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**EFEECTO DIRECTO E INDIRECTO DEL EXCESO DE
HIERRO (FE) DISPONIBLE EN EL SUELO SOBRE EL
DESEMPEÑO DEL CULTIVO DE *LEPIDIUM MEYENII*
WALP. (MACA)**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO
DE BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTOR:

OSCAR MARTIN HEEREN DIAZ

ASESORES:

WILFREDO GONZÁLES L.

ALEJANDRA LOZANO C

LIMA-PERÚ

2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	3
HIPOTESIS.....	3
ESTADO DEL ARTE.....	4
1. Calidad del suelo agrícola y el rendimiento de un cultivo.....	4
1.1 Factores limitantes del rendimiento.....	4
1.2 Características del suelo alto-andino.....	5
2. El rol del hierro en las plantas.....	6
2.1 Mecanismos de adquisición.....	6
2.2 Efecto del exceso de hierro sobre el desempeño del cultivo.....	7
2.2.1 Efecto directo sobre la planta.....	8
2.2.2 Efecto indirecto sobre la planta.....	9
3. Sistema de estudio: <i>Lepidium meyenii</i> Walp. (maca).....	10
3.1 Biología de la especie.....	10
3.2 Microbiota asociada a la rizósfera del cultivo.....	10
3.3 Factores que limitan el rendimiento del cultivo.....	11
3.4 Efecto del cultivo sobre las propiedades del suelo.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
ESTRATEGÍA DE ABORDAJE.....	18
ANEXOS.....	21
REFERENCIAS.....	23

Resumen

Las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo (disponibilidad de nutrientes, pH, composición de la microbiota de la rizósfera, entre otros) afectan el rendimiento de los cultivos [1, 2, 3]. El hierro (Fe) es un micronutriente que regula funciones críticas de las plantas [4]. Sin embargo, el incremento del Fe disponible en el suelo, causado generalmente por el aumento de la acidez en este [11], puede reducir el rendimiento de cultivos afectando directamente el crecimiento o la supervivencia de las plantas [5,6], o indirectamente al favorecer el incremento de microorganismos patogénicos (sobre benéficos) en la microbiota de la rizósfera [7].

Lepidium meyenii Walp. (maca) es un cultivo alto-andino nativo del Perú, reconocido por sus propiedades alimenticias y farmacológicas. Sin embargo, su resiembra consecutiva (2 a 3 campañas) reduce el rendimiento del cultivo, obligando a los agricultores a abandonar los terrenos por más de 10 años [16,22]. En China, suelos resembrados consecutivamente con maca registraron acidificación (aunque ligeramente) y cambios en la composición de la microbiota [8]. En Perú, la resiembra del suelo con maca se correlacionó con el incremento marcado de la acidez ($\text{pH} < 5$) y del Fe disponible (González, datos no publicados), registrándose incluso concentraciones consideradas fito-tóxicas en otros cultivos (> 300 ppm de Fe) [9, 11]. Actualmente, se desconocen los factores que explicarían la reducción del rendimiento del cultivo de maca; particularmente, no se ha investigado el posible rol del incremento del Fe disponible sobre los cambios en la calidad del suelo. En este trabajo, proponemos indagar si la resiembra consecutiva con maca aumenta la concentración del hierro disponible en el suelo y si dicho incremento reduce directa (toxicidad) o indirectamente (recambio en microbiota de suelo) el rendimiento del cultivo de *L. meyenii*.

Palabras clave: *Lepidium meyenii*, hierro (Fe), microorganismos, maca, rendimiento

Abstract

The physical-chemical and biological soil properties (availability of nutrients, pH, rhizosphere microbiota, among others) affect crop yield [1, 2, 3]. Iron (Fe) is a micronutrient that regulates critical functions in plants [4]. However, the increase of Fe availability in the soil, generally caused by the increase in soil acidity [11], can reduce crop yield by directly affecting plant growth or survival [5,6], or indirectly by favoring the increase of pathogenic microorganisms (over beneficial) in the rhizosphere microbiota [7].

Lepidium meyenii Walp. (maca) is a high-Andean crop native to Peru, recognized for its nutritional and pharmacological properties. However, its consecutive production (2 to 3 seasons) reduces crop yield, forcing farmers to abandon the land for more than 10 years [16,22]. In China, soils consecutively replanted with maca recorded acidification (albeit slightly) and changes in microbiota composition [8]. In Peru, soils replanted with maca were correlated with a marked increase in acidity (pH <5) and available Fe (González, unpublished data), even registering concentrations considered phyto-toxic for other crops (> 300 ppm of Fe) [9, 11]. Currently, the factors that would explain the reduced yield of maca crops are unknown; particularly, the possible role of the increase in Fe availability in changes of soil quality has not been investigated. In this work, we propose to investigate whether consecutive replanting with maca increases the concentration of available iron in the soil and whether this increase directly (toxicity) or indirectly (turnover in soil microbiota) reduces the yield of *L. meyenii* crops.

Key words: *Lepidium meyenii*, iron (Fe), microorganisms, maca, yield

Pregunta de investigación:

¿En suelos alto-andinos, tras cultivo consecutivo de *L. meyenii*, el incremento de hierro disponible en el suelo reducirá el rendimiento del cultivo ya sea por efecto directo (toxicidad) o indirecto (cambios en la microbiota)?

Hipótesis:

El incremento del Fe disponible en el suelo, asociado a la siembra consecutiva de *L. meyenii*, reducirá el rendimiento del cultivo debido a un efecto directo fito-tóxico sobre las plantas o indirectamente a través de cambios en la composición de la microbiota (que favorecería a los microorganismos patogénicos en relación a los benéficos).

Estado del Arte

1. Calidad del suelo agrícola y el rendimiento de un cultivo

El suelo agrícola es una matriz compleja de materia orgánica e inorgánica que sirve como sustrato para el establecimiento y crecimiento de las plantas. Esta matriz presenta propiedades fisicoquímicas (como la textura, capacidad de intercambio catiónico, pH, entre otros) que juegan un rol clave en la disponibilidad de nutrientes del suelo y en la relación entre la microbiota del suelo y la planta [1,2]. La calidad del suelo estará determinada por la interacción entre las propiedades fisicoquímicas y los microorganismos que habitan en esta matriz, por lo que un desbalance en cualquiera de estas propiedades afectaría el desempeño de las plantas, tanto silvestres como cultivables [2].

Los microorganismos de la rizósfera son cruciales para brindarle la calidad al suelo y permitir el crecimiento óptimo de las plantas. Estos incluyen especies que permiten adquirir nutrientes, reducir el ataque de los patógenos del suelo, modificar el crecimiento de las plantas y establecer relaciones mutualistas con las raíces [2,10, 25]. La rizósfera también puede verse alterada por los propios exudados de la planta, que modifican las propiedades químicas del suelo y aumentan la actividad biológica, modulando la diversidad microbiana [2, 34].

1.1 Factores limitantes del rendimiento

La pérdida del rendimiento de los cultivos es un problema mundial asociado a diversos factores, como la reducción de nutrientes, valores extremos de pH, auto-toxicidad, cambios en las comunidades bacterianas, toxicidad por exceso de metales, entre otros. Además, se ha encontrado que la interacción de los factores podría exacerbar los efectos negativos sobre el rendimiento de los cultivos [3, 30].

Esta ampliamente reportado que la acidificación del suelo es uno de los principales factores que afectan a los cultivos y que aproximadamente el 40% de los suelos cultivables del planeta tienen $\text{pH} < 5.5$. A su vez, los suelos ácidos disminuyen la disponibilidad de los nutrientes esenciales (N, P, K), y aumentan la disponibilidad de metales tóxicos, los cuales en elevadas concentraciones podrían afectar el desempeño de las plantas [23]. Además, debido a que los microorganismos tienen un rango de pH óptimo muy pequeño, la acidificación del suelo tiene un efecto sobre la composición de la microbiota de la rizósfera [10].

1.2 Características del suelo alto-andino

La zona alto-andina se caracteriza por tener suelos frágiles, ácidos ($\text{pH} < 5.5$) y generalmente infértiles, a pesar de contar con altas concentraciones de carbono orgánico [16,21]. Estos suelos se ven afectados por una alta tasa de erosión condicionada por la topografía, tipo de suelos y el clima (lluvias estacionales prominentes y bajas temperaturas), el cual retarda el reciclaje de nutrientes y limita su disponibilidad hacia las plantas [16, 24]. Por estas condiciones edáficas y climáticas, solo un pequeño número de especies vegetales han logrado ser domesticadas para su cultivo en estos ecosistemas.

La agricultura en la zona alto-andina es una actividad económica crucial para los pobladores del lugar. Debido a esto, la intensificación de la siembra de cultivos se ha vuelto una actividad muy frecuente, lo cual trae como consecuencia la degradación del suelo debido a una pérdida de la fertilidad, oxidación de la materia orgánica y erosión del suelo, que se traduce en una reducción de la calidad [16].

2 El rol del hierro en las plantas

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para las plantas que cumple un rol activo en la regulación de funciones críticas como la respiración mitocondrial, fotosíntesis, asimilación de nitrógeno, regulación hormonal, entre otras. Además, al ser un cofactor enzimático, facilita las reacciones químicas y regula la estabilización de proteínas [4,11]. Más del 90% del Fe absorbido es almacenado en los cloroplastos, donde se utiliza para mantener la integridad estructural y funcional de la membrana del tilacoide, para así poder realizar la fotosíntesis de manera eficiente. Gracias a estas funciones, el Fe es considerado un nutriente clave en el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas [11].

En suelos aeróbicos con buena oxigenación, el Fe se encuentra de forma abundante en su estado de oxidación Fe^{+3} (férrico); sin embargo, en este estado no es soluble y por ende no puede ser asimilado por las plantas, lo que puede llevar a una deficiencia de hierro [9,11]. Ante esto, las plantas han desarrollado mecanismos para asegurar la homeostasis de este nutriente en su organismo.

2.1 Mecanismos de adquisición del hierro

La deficiencia de Fe en el suelo trae consigo efectos negativos para las plantas y problemas en su crecimiento y rendimiento [11]. Las plantas han desarrollado dos estrategias para la absorción de Fe del suelo. La primera estrategia es utilizada por no-gramíneas y dicotiledóneas, la cual consiste en reducir el hierro de Fe^{+3} a Fe^{+2} y utiliza una reductasa (FRO2) y un transportador (IRT1). La segunda estrategia es utilizada por gramíneas y consiste en la liberación de fito-sideróforos a la rizósfera, los cuales quelan el Fe^{+3} y forman un complejo que es transportado mediante YSL (canal transportador específico para este complejo formado) al interior de la planta [7, 12,13, 34]

Por otro lado, se tiene evidencias que la microbiota del suelo tiene un papel importante en la adquisición del Fe. De manera directa, los microorganismos pueden cambiar la estructura de las raíces y liberar protones (H^+) para reducir el Fe [20]. De manera indirecta, inducen en la planta una respuesta a la deficiencia de Fe, lo que genera que la planta libere más sideróforos, desarrolle pelos radiculares y acidifique la rizósfera [13, 20]. Asimismo, se ha reportado que la liberación de exudados por las raíces de las plantas en condiciones de deficiencia de Fe puede promover el crecimiento de microorganismos que ayudan de manera directa e indirecta a la absorción del Fe [20].

2.2 Efecto del exceso de hierro disponible en el suelo sobre el desempeño del cultivo

Los casos de toxicidad de Fe han sido reportados en suelos con valores de $pH < 5$. En estos suelos, las concentraciones de Fe llegan a superar los 300 ppm, valor considerado tóxico para la mayoría de cultivos vegetales [9, 11]. Cuando el suelo se acidifica, se puede modificar la disponibilidad de nutrientes haciendo más disponible el Fe como también otros metales [23]. Además, los microorganismos empiezan la reducción de los componentes del suelo, lo que reduce el hierro a su estado ferroso (Fe^{+2}) [9]. En su estado ferroso, el hierro es soluble y asimilable por la planta, lo que puede generar un aumento en la concentración de Fe disponible en el suelo (generando posibles situaciones de exceso). Asimismo, la disponibilidad de otros nutrientes disminuye, intensificando el efecto negativo causado por la toxicidad [9, 14]. Como resultado de este incremento en su concentración, el Fe puede afectar el rendimiento de los cultivos directamente mediante un efecto tóxico por un exceso, o indirectamente al generar cambios en la microbiota del suelo (favoreciendo el incremento de patógenos) [4,7].

2.2.1 Efecto directo sobre la planta

Como se mencionó anteriormente, como resultado de la toxicidad de Fe disponible, las plantas sufren cambios morfológicos y fisiológicos que podrían afectar su crecimiento. En condición de exceso, el Fe actúa como un catalizador de las reacciones Fenton, las cuales forman especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan daño oxidativo y celular [5, 11]. A nivel fisiológico, ocurre una reducción de la conductancia estomática. Esto afectará el intercambio gaseoso y la fotosíntesis, lo que resultará en una disminución del crecimiento [5]. También se ha encontrado que el exceso de Fe puede afectar el proceso de fotosíntesis al foto-inhibir el fotosistema II y generar clorosis en las hojas [5].

A nivel morfológico, el exceso de Fe disponible en el suelo disminuye la elongación y crecimiento celular de la raíz principal deteniendo su crecimiento [6, 15]. A su vez, limita el crecimiento de raíces laterales en las raíces nuevas. Sin embargo, en las especies más tolerantes a la toxicidad de Fe se ve el crecimiento de raíces laterales que permiten continuar la absorción de nutrientes [5, 6]. Otros mecanismos para aliviar la toxicidad de Fe son la liberación de oxígeno molecular (O_2) a la rizósfera a través de las raíces para oxidar el Fe a su estado de oxidación Fe^{+3} (férrico), como también almacenar el Fe absorbido en ciertos compartimentos como la vacuola y hojas viejas donde no genera tanto daño [15].

También se ha reportado en experimentos de campo que los niveles elevados de hierro en el suelo pueden afectar el rendimiento de cultivos (disminución de la biomasa y de la altura de la planta), como es el caso de los cultivos de arroz [39, 40]. Asimismo, se ha reportado que la toxicidad por Fe puede ser enmendada con la aplicación de nutrientes como N, P y K debido a que se reduce la absorción de Fe, incrementando el rendimiento de los cultivos [37, 38].

2.2.2 Efecto Indirecto sobre la planta

Dentro de la matriz del suelo se encuentran microorganismos (bacterias y hongos) benéficos y patogénicos para las plantas. Al igual que las plantas, estos necesitan el Fe para un buen desarrollo, por lo que habrá una competencia entre estos tipos de microorganismos para la adquisición del Fe disponible en el suelo [7, 31].

De la misma manera que las gramíneas, los microorganismos del suelo utilizan la segunda estrategia mencionada para la adquisición de Fe. Estos microorganismos producen y secretan sideróforos los cuales varían en su especificidad y afinidad por el Fe, siendo los más específicos reconocidos solo por el organismo que los secretó. La microbiota benéfica suele secretar sideróforos muy específicos y con alta afinidad, de esta manera puede limitar y reducir el crecimiento de patógenos en el suelo al apropiarse de la mayoría del Fe disponible en este [7, 31]. Cuando ocurre un incremento de Fe en el suelo, hay suficiente disponibilidad de este micro-nutriente para satisfacer la demanda de Fe para ambos tipos de microorganismos, por lo que la competencia entre éstos se reduce drásticamente. La absorción suficiente de Fe es esencial para la virulencia de patógenos. Se ha visto que altos niveles de Fe aumenta la cantidad de microorganismos patógenos en el suelo [7], lo cual tendrá un efecto negativo en el crecimiento de las plantas y podría afectar el rendimiento de cultivos. Este efecto se ha observado en experimentos de invernadero, donde se incrementó la disponibilidad de Fe a través de la aplicación de hierro quelado (Fe-EDTA) a muestras de suelo sembrado con semillas de *Linum usitatissimum* [35]. Se evidenció un aumento en las incidencias de enfermedades causadas por el patógeno *Fusarium* sp., en las muestras donde se aplicó Fe-EDTA, demostrando que una mayor disponibilidad de hierro puede aumentar la cantidad de patógenos en el suelo [35].

3. Sistema de estudio: *Lepidium meyenii* Walp. (maca)

3.1 Biología de la especie

Lepidium meyenii, mejor conocida como maca, es una especie vegetal de la familia Brassicaceae que es cultivada en la zona alto-andina (principalmente en Junín y Pasco) sobre los 4000 m.s.n.m. Esta especie es bastante apreciada por su órgano de reserva subterráneo (hipocotilo), el cual presenta una gran variedad de colores a los que se le han atribuido diversas propiedades farmacológicas [17,18].

Esta especie es considerada bienal, ya que presenta una fase vegetativa seguida de una fase reproductiva. Para la obtención del hipocotilo, se sigue un proceso productivo tradicional y artesanal. Previo a la siembra (2 a 3 meses antes) el terreno se remueve (rotura) para airear el suelo, favorecer la descomposición de materia orgánica y mejorar la textura. Posteriormente, durante los meses de septiembre y octubre (inicio de temporada de lluvias), se lleva a cabo la siembra de semillas bajo una técnica denominada “al voleo”. La cosecha se lleva a cabo a los 260-280 días cuando el hipocotilo está en su máximo tamaño (alrededor de 5 cm de diámetro) [17,18].

3.2 Microbiota asociada a la rizósfera del cultivo

Los cultivos de maca tienen diversos microorganismos asociados a su rizósfera. Entre estos se han reportado algunas bacterias capaces de crecer bajo condiciones de estrés, como en medio ácido, baja temperatura e incluso pueden tolerar altas concentraciones de algunos metales [25, 27]. También se han encontrado como microorganismos de la rizósfera a bacterias diazotróficas (fijadoras de nitrógeno), actinomicetos, así como

bacterias del género *Paenarthrobacter*, *Paenibacillus* y *Cupriavidus*. Además, se ha reportado a *Bacillus* y *Pseudomonas*, como los géneros de bacterias más frecuentes [25, 27]. En ambos géneros se han encontrado bacterias promotoras de crecimiento y bio-controladores de patógenos [25, 26]. Por ejemplo, mediante otros estudios se sabe que excluyen a los patógenos e inducen la resistencia sistémica por parte de la planta a través de mecanismos como la producción de sideróforos, metabolitos secundarios, antibióticos, compuestos anti-fúngicos, entre otros [28, 29], como también fue reportado en los experimentos con las bacterias aisladas de la rizósfera de maca [26]. Sin embargo, en estos trabajos no se estudiaron potenciales patógenos para maca ni tampoco si los cambios en las propiedades del suelo debido a su cultivo sucesivo pueden modificar la interacción entre microorganismos benéficos y patogénicos.

También se han probado los efectos tóxicos de algunos metales como cadmio, plomo, mercurio y cobalto (pero no hierro), sobre el crecimiento de estos microorganismos, encontrándose que el efecto tóxico puede variar dependiendo del pH y de la concentración de microorganismos del medio [25].

3.3 Factores que limitan el rendimiento del cultivo

El cultivo de maca presenta varias limitaciones agronómicas (asociadas a las condiciones climáticas y a las características del suelo) que limitan su rendimiento. Las temperaturas fluctúan mucho durante el día y las heladas nocturnas son muy comunes. Se han registrado temperaturas mínimas que alcanzan grados bajo cero y máximas de 10°C [17,18]. Asimismo, la región alto-andina se caracteriza por tener un suelo considerado infértil. A pesar de ser suelos con gran reserva de nutrientes, las bajas temperaturas retardan el proceso de descomposición de materia orgánica, lo cual genera que la bio-

disponibilidad de nutrientes para las plantas se vea limitada. Por otro lado, los suelos altoandinos se caracterizan por ser ácidos (el pH varía entre 4.5 y 6.5), con menor disponibilidad de nutrientes (especialmente nitrógeno y fósforo) y mayor disponibilidad de metales (como aluminio y hierro) [17, 19].

Otra limitación agronómica relevante es la pérdida de rendimiento del cultivo después de 2 a 3 campañas agrícolas consecutivas, pese a las prácticas de laboreo y enmiendas que los agricultores aplican para restablecer la calidad del suelo. Este hecho, obliga a los agricultores a abandonar los campos de cultivo por un periodo de 7-10 años y fomenta la búsqueda de nuevos terrenos para la siembra. De hecho, la intensificación del cultivo se ha incrementado con los años; entre el 2014 y 2015 se triplicaron las hectáreas (ha) destinadas al cultivo (a 6500 ha) e incluso se ha reportado que entre 1987 y el 2013 cerca del 30% de los pastos nativos fueron destinados a cultivo de maca. Como resultado de esta intensificación del cultivo, los terrenos sin uso han aumentado considerablemente lo cual reducirá a futuro los espacios destinados a este cultivo y a los pastos para la ganadería local [16,22]

3.4 Efecto del cultivo sobre las propiedades del suelo

Estudios preliminares sugieren que el cultivo de maca modifica algunas propiedades fisicoquímicas del suelo (González WL, datos no publicados – Laboratorio de Ecología Evolutiva - UPCH). Luego de evaluar suelos con diferente tiempo de uso (virgen, en uso, descanso de 1 - 3 años, y descanso de 4 a más años), se registró una mayor acidificación con el uso del suelo y una recuperación (pH mayores) con el mayor tiempo de descanso del suelo (Fig. 1a). La concentración de Fe disponible se correlacionó positivamente con la acidez, incluso registrándose suelos con más de 300 ppm de Fe (Fig. 1b). Experimentos de laboratorio (en placa) sobre la germinación de semillas de maca, no evidenciaron un

efecto negativo de la acidez ($\text{pH} = 4$), pero si una reducción del crecimiento radicular de las plántulas debido al incremento de la concentración de Fe (Carrasco y Gonzáles, datos no publicados, Fig. 2).

Del mismo modo, en un estudio realizado en China, se reportó que el cultivo de maca acidificaba el suelo luego de 2-3 cosechas y al mismo tiempo se evidenciaba una disminución de la concentración de fósforo, nitrógeno y potasio en el suelo [8]. También se evidenció la reducción del rendimiento del cultivo y cambios en la composición de la microbiota de la rizósfera de maca asociada al cultivo sucesivo de maca. La abundancia de bacterias y hongos disminuyó luego de 3 cosechas; sin embargo, la cantidad de microorganismos metabólicamente activos aumentó. Es importante mencionar que en el estudio no señalan si estos microorganismos son benéficos o patógenos, aun así, se puede evidenciar un cambio en la microbiota [8].

Planteamiento del problema

La calidad del suelo es uno de los principales factores que afecta el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Cambios en sus propiedades biológicas y fisicoquímicas podrían tener efectos adversos sobre el desarrollo de las plantas [1, 2]. Por ejemplo, en suelos ácidos ($\text{pH} < 5$), la disponibilidad de iones metálicos aumenta, llegando a niveles que pueden ser considerados fito-tóxicos [11].

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial que cumple diversos roles cruciales en la regulación de procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas [4, 11]. Se ha reportado que la acidificación del suelo incrementa la disponibilidad de Fe [11], este incremento puede afectar negativamente el rendimiento de las plantas de forma directa o indirecta. De forma directa, mediante la absorción y acumulación de altas concentraciones de Fe en los tejidos (raíces y hojas), lo cual afecta negativamente el crecimiento e incluso la supervivencia de las plantas, como se ha reportado cuando los niveles de Fe disponible superan los 300 ppm [4, 11,15]. De forma indirecta, el incremento de Fe puede generar cambios en la microbiota del suelo, favoreciendo la predominancia de microorganismos fitopatogénicos (i.e. *Phytophthora sp*, *Fusarium sp*, *Ustilago maydis*, *Dickeya dadantii*) sobre benéficos (i.e. *Bacillus* y *Pseudomonas*, bacterias promotoras del crecimiento o biocontroladores), lo cual afectaría negativamente el desempeño de las plantas [7, 31].

Los suelos alto-andinos peruanos (aprox. 4000 m.s.n.m) se caracterizan por tener condiciones climáticas (lluvias estacionales, alta radiación, bajas temperaturas) y edáficas (baja disponibilidad de nutrientes, acidez y presencia de metales), consideradas limitantes para el crecimiento de las plantas [16,21]. En esta zona se cultiva la brasicácea nativa *Lepidium meyenii*, conocida como maca, una de las pocas especies que crece en condiciones de monocultivo y que está adaptada a estos ambientes. *L. meyenii* es

actualmente muy valorada por las propiedades nutricionales y farmacológicas de su órgano de reserva (hipocotilo), generando una gran demanda internacional que ha intensificado su cultivo en los últimos años. Sin embargo, tras 2 o 3 campañas consecutivas de siembra, la productividad del cultivo decrece drásticamente. Esto obliga a los agricultores a dejar los terrenos en descanso por lo menos hasta 10 años, lo cual trae consigo la expansión e intensificación de las áreas de cultivo, contribuyendo al desgaste de los suelos altoandinos [16,22]. Hasta el momento, no se ha propuesto un mecanismo que explique el bajo rendimiento en los suelos donde se haya sembrado consecutivamente *L. meyenii*. Comúnmente se ha propuesto que el cultivo de maca “agota” los nutrientes del suelo; pero la evidencia no es concluyente, ya que los agricultores realizan prácticas de laboreo y enmiendas antes de la siembra de maca sin lograr una recuperación sustancial en la calidad del suelo.

Un estudio preliminar en zonas alto-andinas, cuyos datos no han sido publicados, sugirieron que la siembra consecutiva de maca acidifica el suelo y que luego de aproximadamente 10 años de reposo, el pH del suelo se recupera hasta valores similares al pH de suelos vírgenes. Además, la acidez del suelo se asoció positivamente con la concentración de Fe disponible [González WL, datos no publicados, Fig. 1a, b], y los suelos muy ácidos alcanzaron concentraciones de Fe consideradas fitotóxicas para otros cultivos (> 300 ppm) [11]. Estos resultados preliminares sugieren que el exceso de Fe disponible podría explicar (en parte) la reducción del rendimiento del cultivo tras campañas de siembra sucesivas. Sin embargo, esta hipótesis debe ser corroborada experimentalmente en campo.

Por otro lado, mediante experimentos piloto in vitro se evidenció una relación negativa entre la concentración de Fe disponible y el crecimiento radicular de plántulas de maca,

siendo la reducción del crecimiento muy severa a 300 ppm de Fe, sugiriendo un efecto negativo directo del exceso de Fe disponible sobre el desempeño de las plántulas de maca [Carrasco y González WL, datos no publicados, Fig. 2]. Sin embargo, se requiere mayor investigación para evidenciar si el Fe disponible tiene un efecto directo sobre el rendimiento del cultivo mediante experimentos en campo.

Por otro lado, en los suelos alto-andinos cultivados con maca, se han identificado bacterias promotoras de crecimiento asociadas a la rizósfera (principalmente del género *Bacillus* y *Pseudomonas* [25, 27] que también pueden actuar como bio-controladores de patógenos (*A. alternaría* o *F. solani*) de otras especies cultivables, tales como el tomate [25, 26]. Asimismo, se ha reportado que algunas de estas bacterias son tolerantes a metales pesados, pero no se ha indagado el efecto del Fe (especialmente sobre la composición de la microbiota) a pesar de ser un metal presente en los suelos de maca y que puede alcanzar niveles elevados. Además, en un estudio realizado en China, se reportó que, tras 3 campañas consecutivas de maca, la abundancia de bacterias y hongos del suelo disminuyó, pero la cantidad de microorganismos metabólicamente activos aumentó [8]. Estos resultados, sugieren cambios en las propiedades biológicas asociadas al cultivo de maca, pero no evidencian si el Fe puede estar mediando estos cambios ni tampoco reportan si la composición de la microbiota del suelo sufre cambios asociados al monocultivo consecutivo de maca, como se ha reportado en otros sistemas como pepino [33] y colza [30].

A pesar de estas evidencias, no hay estudios que evalúen el efecto del Fe disponible en el suelo sobre el desempeño del cultivo. Esto nos lleva a formular como pregunta de investigación si ¿En suelos alto-andinos, tras cultivo consecutivo de *L. meyenii*, el

incremento de hierro disponible en el suelo reduce el rendimiento del cultivo ya sea por efecto directo (toxicidad) o indirecto (cambios en la microbiota)?

Buscaremos indagar de manera correlacional y experimental, si la reducción del rendimiento en suelos resembrados consecutivamente con maca puede explicarse por el incremento de Fe disponible en el suelo, ya sea por un efecto directo (fito-toxicidad) o indirecto (a través de la microbiota).

Los resultados de este estudio permitirán proponer un posible mecanismo por el cual, el cultivo sucesivo de maca reduce la calidad del suelo donde se cultiva y permitirá obtener nuevos conocimientos acerca del rol del Fe disponible sobre el rendimiento del cultivo, lo cual ayudará a los agricultores a identificar un factor limitante para el rendimiento y así se podrán plantear aproximaciones para contrarrestarlo.

Estrategia de abordaje

Para responder la pregunta de investigación se tendrán dos aproximaciones:

(I) Aproximación correlacional:

En zonas-altoandinas de Junín cultivadas con maca, se tomarán muestras de suelo de la rizósfera de maca antes de la cosecha en campos de tres categorías: (1) primera cosecha, (2) segunda cosecha, (3) tercera cosecha. Estas muestras serán caracterizadas fisicoquímicamente y se determinará la composición de microorganismos. Los parámetros fisicoquímicos a registrar (i.e pH, N, P, K e iones metálicos, incluyendo las concentraciones de Fe disponible), se realizarán a través de métodos estándar establecidos por la FAO [32]. La identificación de microorganismos se realizará siguiendo la metodología propuesta por Hilton et al (utilizando el gen 16S ARNn para bacterias y la región ITS para hongos) [30]. Se obtendrán índices de diversidad (riqueza y dominancia) y se establecerá un ratio patógenos/total de microorganismos por muestra. Finalmente se evaluará el recambio en la diversidad y ratio de microorganismos asociado a las concentraciones de Fe disponible del suelo.

Para analizar si existen diferencias entre las categorías de suelo en relación a los parámetros físico-químicos se realizará un MANOVA seguido por ANOVAs de un factor para evaluar cada parámetro fisicoquímico. Posteriormente se realizará un PCA para ver si se establece un ordenamiento entre las categorías de suelo en función de las características del suelo. Para determinar si hay cambios en la microbiota según el uso de suelo se empleará el análisis nMDS, el cual permite evidenciar cualquier ordenamiento entre las categorías de suelo en función a la diversidad de microorganismos. Luego de este análisis se hará una prueba de ANOSIM (o PERMANOVA) para evaluar diferencias significativas entre las categorías de suelo.

(II) Aproximación experimental:

Se implementará un diseño experimental en campo ya que, si bien bajo condiciones de laboratorio o invernadero podemos tener un mejor control de variables, buscamos evidenciar el efecto del hierro disponible (directo o indirecto) bajo las mismas condiciones que las empleadas durante la siembra convencional de este cultivo; en particular, para evidenciar los cambios sobre la composición de la microbiota del suelo asociada a la rizósfera de la planta.

Se propone un diseño experimental de parcelas divididas teniendo como parcelas las categorías de suelo (suelos destinados a 1^{ra}, 2^{da} y 3^{ra} campaña de siembra) y como sub-parcelas los tratamientos de adición de hierro: 0 (control), 100, 200 y 300 ppm, el hierro será aplicado utilizando el quelante Fe-EDTA como se ha realizado en estudios previos [35, 36]. Los tratamientos serán distribuidos de forma aleatoria en cada parcela y se tendrán tres réplicas por cada tratamiento (ver Figura 3). Este diseño será implementado en 4 sitios (productores) a manera de bloques, distribuidos en la zona de Junín. En cada réplica se sembrarán semillas de maca al voleo y se monitoreará el crecimiento de las plantas hasta la cosecha. Adicionalmente, se aplicarán las mismas prácticas de manejo agronómico (roturar el terreno previo a la siembra, desmalezar a la campaña, no se aplicará riego adicional ya que se trata de un cultivo en seco, no se emplearán fertilizantes ni pesticidas) en todas las parcelas experimentales y se registrarán como co-variables la altitud, variables ambientales (temperatura y humedad) y las características fisicoquímicas del suelo.

Se registrarán los niveles de Fe disponible en el suelo previo a la siembra y a la cosecha. Asimismo, se identificará la microbiota de la rizósfera de maca al inicio del crecimiento de la planta y previo a la cosecha con la finalidad de evidenciar cambios a nivel de

categoría de suelo y tratamiento de hierro. Para la identificación se seguirá el procedimiento mencionado previamente en la aproximación correlacional [30] y se reportarán las mismas variables que expliquen un cambio en la composición de la microbiota. Por otro lado, evaluaremos parámetros indicadores del desempeño de la planta (morfológicos y fisiológicos y el rendimiento final en cosecha). El efecto sobre la planta se analizará a través de un ANOVA teniendo como factores la adición de Fe (0, 100, 200 y 300 ppm), la categoría de suelo (suelos destinados a 1^{ra}, 2^{da} y 3^{ra} campaña de siembra) y un efecto de bloque (sitios).

Anexos

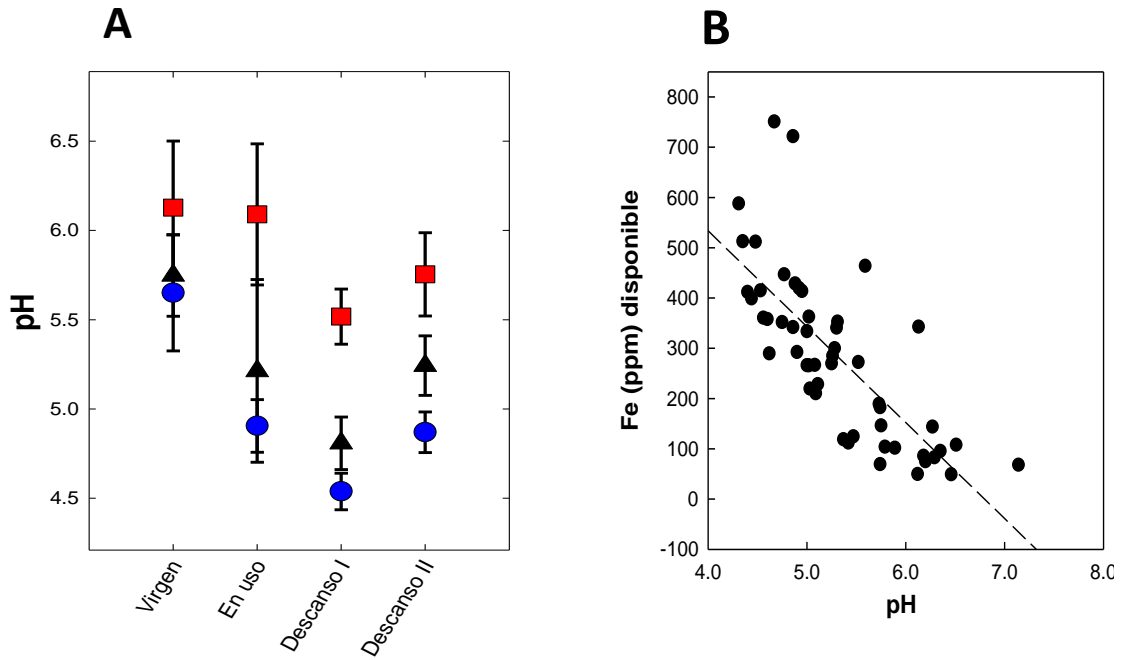


Figura 1. (A) Variación del pH del suelo en condición de suelo virgen, en uso, con descanso I (1 a 3 años de descanso), (4 a más años de descanso) en 3 zonas de cultivo de maca: ▲ (Carhuamayo), ● (Ondores) ■ (Ninacaca). (B) Relación entre el pH y la concentración de Fe disponible en el suelo

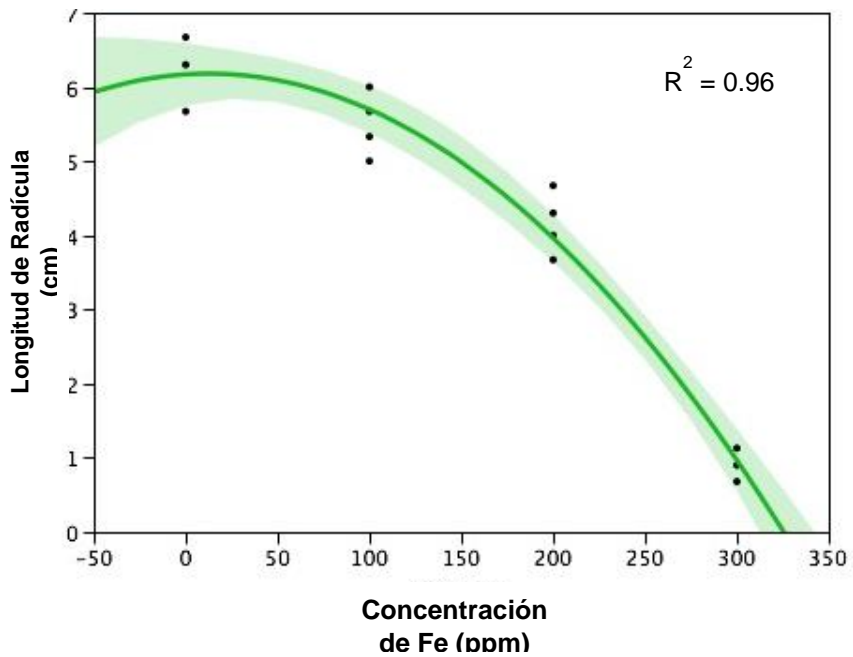


Figura 2: Variación en la longitud de Radícula (cm) de plántulas de maca en relación a la concentración de hierro (Fe) (ppm)

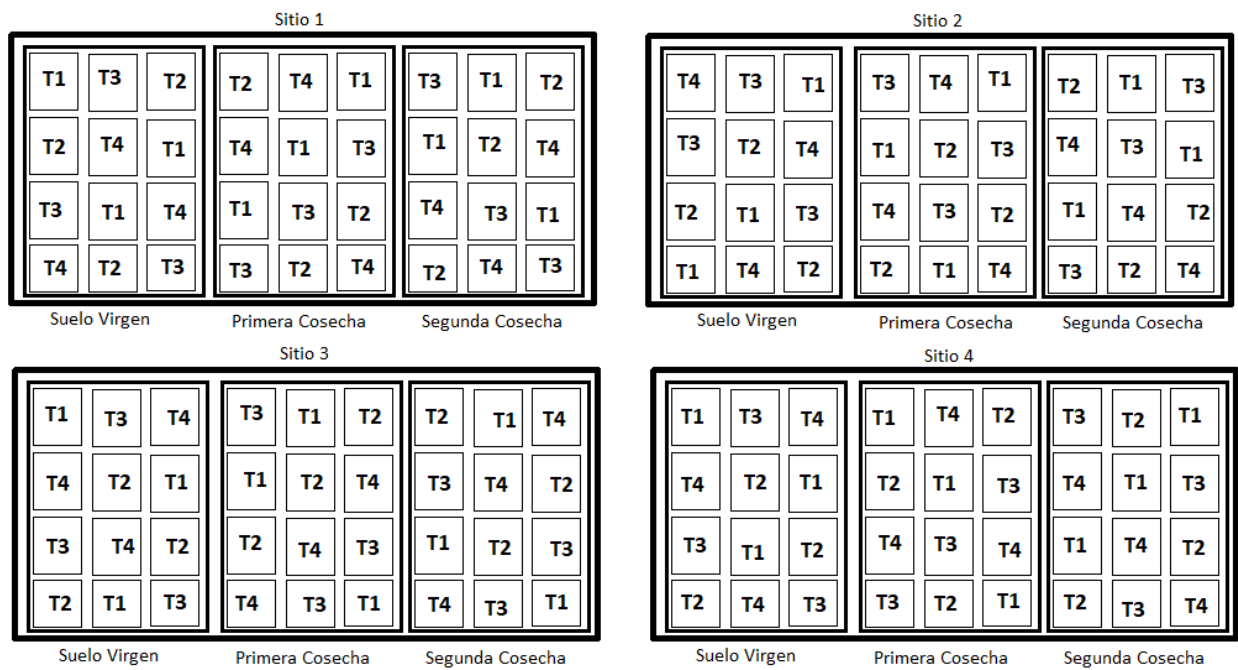


Figura 3. Diseño experimental de las parcelas experimentales en los 4 sitios. Los tratamientos corresponden a: T1: 0 ppm, T2: 100 ppm, T3: 200 ppm y T4: 300 ppm de Fe.

Referencias

1. Parr, J. F., Papendick, R. I., Hornick, S. B., & Meyer, R. E. (1992). Soil quality: attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture*, 5-11.
2. Swami, Sanjay. (2017). Effect of Soil Biological Properties on Crop Production. In: *Natural Resource Management for Climate Smart Sustainable Agriculture*, SCSI
3. Bennett A, Bending G, Chandler D, Hilton S, Mills P. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. *Biological Reviews*. 2011;87(1):52-71.
4. Connorton J, Balk J, Rodríguez-Celma J. Iron homeostasis in plants – a brief overview. *Metallomics*. 2017;9(7):813-823.
5. Onyango D, Entila F, Dida M, Ismail A, Drame K. Mechanistic understanding of iron toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 1. Morpho-physiological and biochemical responses. *Functional Plant Biology*. 2019; 46(1):93-105.
6. Onyango D, Entila, F, Egdane J, Pacleb M, Katimbang L, Dida M, & Drame, K. N. (2020). Mechanistic understanding of iron toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 2. Root oxidation ability and oxidative stress control. *Functional Plant Biology*, 47(2), 145-155.
7. Verbon E, Trapet P, Stringlis I, Kruijs S, Bakker P, Pieterse C. Iron and Immunity. *Annual Review of Phytopathology*. 2017; 55 (1):355-375.
8. Wang S, Dong L, Luo Y, Jia W, Qu Y. Characterization of rhizosphere microbial communities in continuous cropping maca (*Lepidium meyenii*) red soil, Yunnan, China. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2019; 66 (6):805-818.
9. Suresh, S. (2005). Characteristics of soils prone to iron toxicity and management—A review. *Agricultural Reviews*, 26(1), 50-58.
10. Qi D, Wieneke X, Tao J, Zhou X, Desilva U. Soil pH Is the Primary Factor Correlating With Soil Microbiome in Karst Rocky Desertification Regions in the Wushan County, Chongqing, China. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9.
11. Mahender A, Swamy B, Anandan A, Ali J. Tolerance of Iron-Deficient and - Toxic Soil Conditions in Rice. *Plants*. 2019;8(2):31.

12. Tsai H, Schmidt W. Mobilization of Iron by Plant-Borne Coumarins. *Trends in Plant Science*. 2017;22(6):538-548.
13. Romera F, García M, Lucena C, Martínez-Medina A, Aparicio M, Ramos J et al. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10.
14. Lal Singh A. *Recent Advances in CROP PHYSIOLOGY*. Daya Publishing House. 2015;2:203-224.
15. Li G, Kronzucker H, Shi W. The Response of the Root Apex in Plant Adaptation to Iron Heterogeneity in Soil. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7.
16. Rolando J, Turin C, Ramírez D, Mares V, Moneris J, Quiroz R. Key ecosystem services and ecological intensification of agriculture in the tropical high-Andean Puna as affected by land-use and climate changes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2017;236:221-233.
17. Hermann M. and Bernet T. 2009. The transition of maca from neglect to market prominence: Lessons for improving use strategies and market chains of minor crops [on-line]. *Agricultural Biodiversity and Livelihoods Discussion Papers 1*. Bioersivity International, Rome, Italy.
18. Hermann, M. and J. Heller, editors. 1997. *Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
19. Lozano-Canales A, Janampa-Santome M, Clark D, Gonzáles W. Seed weight predicts seedling emergence, and extremely acid soil and low availability of Phosphorus are associated with poor plant performances in *Lepidium meyenii* Walpers (maca). *Scientia Horticulturae*. 2019;253:341-348.
20. Jin C, Ye Y, Zheng S. An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. *Annals of Botany*. 2013;113(1):7-18.
21. Wilcox B, Allen B, Bryant F. Description and classification of soils of the high-elevation grasslands of central Peru. *Geoderma*. 1988;42(1):79-94.
22. Rolando J, Dubeux J, Ramirez D, Ruiz-Moreno M, Turin C, Mares V et al. Land Use Effects on Soil Fertility and Nutrient Cycling in the Peruvian High-Andean Puna Grasslands. *Soil Science Society of America Journal*. 2018;82(2):463-474.

23. Kunhikrishnan A, Thangarajan R, Bolan N.S, Xu Y, Mandal S et al. Functional Relationships of Soil Acidification, Liming, and Greenhouse Gas Flux. *Advances in Agronomy*. 2016;139:1-71.
24. Fonte S, Vanek S, Oyarzun P, Parsa S, Quintero D, Rao I et al. Pathways to Agroecological Intensification of Soil Fertility Management by Smallholder Farmers in the Andean Highlands. *Advances in Agronomy Volume 116*. 2012;;125-184.
25. Ortiz-Ojeda P, Ogata-Gutiérrez K, Zúñiga-Dávila D. Evaluation of plant growth promoting activity and heavy metal tolerance of psychrotrophic bacteria associated with maca (*Lepidium meyenii* Walp.) rhizosphere. *AIMS Microbiology*. 2017;3(2):279-292.
26. Ogata-Gutiérrez K, Chumpitaz-Segovia C, Lirio-Paredes J, Finetti-Sialer M, Zúñiga-Dávila D. Characterization and potential of plant growth promoting rhizobacteria isolated from native Andean crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;33(11).
27. Zúñiga-Davila D, Tolentino-Macalupú J, García-Wong M, Pérez-Porras W, Matsubara-Bautista M, Ogata-Gutiérrez K. Characterization of rhizospheric bacteria isolated from maca (*Lepidium meyenii* W.) in the highlands of Junin-Peru. *World Scientific*. 2011.
28. Kaul S, Gupta S, Sharma T, Dhar M. Unfolding the Role of Rhizomicrobiome Toward Sustainable Agriculture. *Soil Biology*. 2018;;341-365.
29. Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8.
30. Hilton S, Bennett A, Keane G, Bending G, Chandler D, Stobart R et al. Impact of Shortened Crop Rotation of Oilseed Rape on Soil and Rhizosphere Microbial Diversity in Relation to Yield Decline. *PLoS ONE*. 2013;8(4).
31. Robin A, Vansuyt G, Hinsinger P, Meyer J, Briat J, Lemanceau P. Chapter 4 Iron Dynamics in the Rhizosphere. *Advances in Agronomy*. 2008;;183-225.
32. Motsara M.R., Roy R.N. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome*, 2008.
33. Li Q, Wu F, Yang Yang & Xuezheng Wang (2009): Effects of rotation and interplanting on soil bacterial communities and cucumber yield, *Acta Agriculturae Scandinavica; Soil & Plant Science*, 59:5, 431-439

34. Pii Y, Borruso L, Brusetti L, Crecchio C, Cesco S, Mimmo T. The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015;99:39-48.
35. LEMANCEAU P, ALABOUVETTE C, COUTEAUDIER Y. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XIV. Modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*. 1998;8(2):155-162.
36. Andréu J.S., Jordá J., Juárez M. (1991) Reactions of FeEDTA and FeEDDHA applied to calcareous soils. In: Chen Y., Hadar Y. (eds) *Iron Nutrition and Interactions in Plants*. *Developments in Plant and Soil Sciences*, vol 43. Springer, Dordrecht.
37. Shahid M, Nayak A, Kumar Shukla A, Tripath R, Kumar A, Raja R et al. Mitigation of Iron Toxicity and Iron, Zinc, and Manganese Nutrition of Wetland Rice Cultivars (*Oryza sativa* L.) Grown in Iron-Toxic Soil. *Clean – Soil, Air, Water*. 2014;42:1-6.
38. Sahrawat K, Mulbah C, Diatta S, Delaune R, Patrick W, Singh B et al. The role of tolerant genotypes and plant nutrients in the management of iron toxicity in lowland rice. *The Journal of Agricultural Science*. 1996;126(2):143-149.
39. Onaga G, Edema R, Asea G. Tolerance of rice germplasm to iron toxicity stress and the relationship between tolerance, Fe²⁺, P and K content in the leaves and roots. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2013;59(2):213-229.
40. Olaleye A, Tabi F, Ogunkunle A, Singh B, Sahrawat K. EFFECT OF TOXIC IRON CONCENTRATIONS ON THE GROWTH OF LOWLANDS RICE. *Journal of Plant Nutrition*. 2001;24(3):441-457.