

**ACTIVIDAD Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE HONGOS FORMADORES DE
MICORRIZAS-ARBUSCULARES NATIVOS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE
BUENOS AIRES**

Ing. Agr. Andrea Julieta Thounon Islas

Trabajo de Tesis para ser presentado como
requisito parcial para optar al Título de
MAGISTER en PRODUCCIÓN VEGETAL

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Balcarce, Argentina

Agosto, 2016

**ACTIVIDAD Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE HONGOS FORMADORES DE
MICORRIZAS-ARBUSCULARES NATIVOS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE
BUENOS AIRES**

Andrea Julieta Thougnon Islas

Comité Consejero:

.....

Dra. Fernanda Covacevich

Directora

.....

Dr. Hernán Sainz Rozas

Co-Director

.....

Dra. Marta Cabello

Asesora

ACTIVIDAD Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE HONGOS FORMADORES DE
MICORRIZAS-ARBUSCULARES NATIVOS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE
BUENOS AIRES

Andrea Julieta Thougnon Islas

Aprobada por:

.....
Dra. Marcela Pagano

.....
Dra. Silvina Vargas Gil

.....
Ing. Agr. Hernán Echeverría (M.Sc.)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Fernanda Covacevich por todos los conocimientos transmitidos, por su constante apoyo y dedicación a lo largo del desarrollo de la Tesis.

Al Dr. Hernán Sainz Rozas y la Dra. Marta Cabello por toda la ayuda y consejos brindados en esta etapa.

A mi familia por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mis compañeros y amigos del Posgrado, que siempre me apoyaron en los buenos y malos momentos y hasta el día hoy siguen dándome ánimo para terminar este proceso.

INDICE

INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
1.- FUNDAMENTACION TEORICA	1
1.1. Simbiosis micorrícica.....	1
1.2. Hongos Micorrícicos Arbusculares	2
1.2.1. Taxonomía.....	2
1.2.2. Ocurrencia y distribución.....	4
1.2.3. Colonización	4
1.2.4. Estudio e Identificación de los hongos MA	7
1.2.5. Efectos de los hongos MA sobre las plantas y el ambiente edáfico	9
1.2.6. Efectos del ambiente edáfico sobre los hongos MA	10
1.3. Características de la Provincia de Buenos Aires.....	11
1.3.1. Geología y Geomorfología	11
1.3.2. Clima	14
1.3.3. Fertilidad de los suelos.....	15
1.4. Situación actual y análisis de alternativas	17
2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS	20
3.- MATERIALES Y METODOS	21
3.1. Multiplicación de los hongos MA mediante plantas trampa	21
3.1.1. Selección de las muestras de suelo	21
3.1.2. Determinación de la colonización micorrícica.....	25
3.1.3. Cuantificación del número de esporas.....	25
3.1.4. Cuantificación del contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), glomalina fácilmente extraíble.....	27
3.2.- Ensayos de inoculación en invernáculo	27
3.2.1. Preparación del sustrato de las macetas.....	27
3.2.2. Establecimiento de los ensayos.....	28
3.2.2.1. Ensayo en Trigo	29
3.2.2.2. Ensayo en Maíz	30
3.3.- Determinación de la diversidad de los hongos MA mediante técnicas moleculares	31

3.3.1. Extracción de ADN	31
3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	33
3.3.3. Análisis por SSCP- Cálculo de Índice de diversidad.....	34
3.3.4. Secuenciamiento	35
3.4. Análisis estadístico	37
4.- RESULTADOS.....	38
4.1. Colonización micorrícica de los hongos MA.....	38
4.2. Abundancia de esporas de hongos MA.....	41
4.3. Cuantificación del contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) en el sustrato de las plantas trampa	42
4.4. Relaciones entre parámetros de hongos MA y químicos de los suelos	43
4.5. Ensayo de Trigo en invernáculo	46
4.6. Ensayo de Maíz en invernáculo	51
4.7. Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa	55
4.8. Análisis por SSCP- Diversidad de hongos MA.....	57
4.9. Determinación molecular de hongos MA.....	61
4.10. Relación entre los parámetros químicos de los suelos y de actividad y diversidad de hongos MA.....	63
5.- DISCUSION	65
5.1. Actividad de los hongos MA y relaciones con las características edáficas	65
5.2. Eficiencia de los consorcios con hongos MA como promotores de crecimiento de trigo y maíz.....	69
5.3. Determinación de la diversidad de hongos MA mediante técnicas moleculares	73
6.- CONCLUSIONES	77
7.- CONSIDERACIONES FINALES	79
8.- BIBLIOGRAFIA.....	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación, historia de uso del suelo y características fisicoquímicas de los sitios de colecta de las muestras de suelo.....	23
Tabla 2. Análisis de varianza de los parámetros de colonización micorrícica (MA% y Ar%) de los cultivos trampa.....	38
Tabla 3. Colonización micorrícica evidenciada por la capacidad infectiva (MA%) y contenido de arbusculos (Ar%) en las raíces de las plantas trampa (raigrás-trébol blanco) crecidas en los suelos de 24 localidades de la provincia de Buenos Aires colectados bajo condiciones contrastantes.....	40
Tabla 4. Abundancia de esporas y contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), presentes en los sustratos de las plantas trampa provenientes de suelos de 24 localidades de la provincia de Buenos Aires colectados bajo condiciones contrastantes.....	42
Tabla 5. Análisis de varianza del contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), del sustrato de las plantas trampa	43
Tabla 6. Funciones de ajuste de un modelo lineal para los parámetros microbiológicos y químicos de los suelos agrícola y prístino.....	45
Tabla 7. Análisis de varianza de las variables evaluadas en trigo a los 60 DDS	46
Tabla 8. Índice de verdor (IV-60 DDS), Área foliar (AF), Peso fresco aéreo (PFA), Peso seco aéreo (PSA), Capacidad infectiva (MA%) y contenido de Arbusculos (Ar%) de plantas de trigo inoculadas con consorcios microbianos, crecidas en invernáculo por 60 días.....	50
Tabla 9. Análisis de varianza de las variables evaluadas en maíz a los 60 DDS.....	51
Tabla 10. Índice de verdor (IV-25 DDS y IV-45 DDS), Área foliar (AF), Peso fresco aéreo (PFA), Peso seco aéreo (PSA) y Peso fresco de raíces (PFR), Capacidad infectiva (MA%) y contenido de Arbusculos(Ar%) de plantas de maíz inoculadas con consorcios microbianos, crecidas en invernáculo por 60 días..	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético (secuencias del gen SSU (subunidad menor) del ARNr) aplicando los cambios más recientes en la taxonomía y la clasificación de los Glomeromycota.....	3
Figura 2. Esquema de los principales órganos morfológicos inter-radicales de hongos MA.....	6
Figura 3. Principales unidades y subunidades geomorfológicas de la Provincia de Buenos Aires.....	12
Figura 4. Distribución espacial de las distintas muestras de la provincia de Buenos Aires bajo condiciones contrastantes.....	22
Figura 5. Regiones ribosomales de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares.	33
Figura 6. Estructuras características de hongos MA registradas por observación microscópica de raíces de las plantas trampa. a: hifas y vesículas de CdA-A; b: hifas y vesículas de Lob-P; c: arbuscúlos de R-A; d: vesícula de R-A; e: hifas y vesículas de 3Arr-A; f: hifas y vesículas de Lin-A; g: hifas y arbuscúlos de Pu-A; h: hifas y vesículas de GV-P; i: hifas y vesículas de SdIV-A; j: hifas y arbuscúlos de SdIV-A.....	39
Figura 7. Respuesta a la inoculación (RI) del AF a la inoculación con consorcios con hongos MA, en plantas de trigo a los 60 DDS	47
Figura 8. Respuesta a la inoculación (RI) del PFA a la inoculación con consorcios con hongos MA, en plantas de trigo a los 60 DDS.....	48
Figura 9. Colonización tipo Paris (a y b) y Arum (c), en raíces de trigo provenientes de macetas inoculadas con consorcios con hongos MA provenientes de Mir-A (a), Pu-A (b) y Pu-P (c).....	49
Figura 10. Respuesta a la inoculación (RI) del PSA a la inoculación con consorcios con hongos MA, en plantas de maíz a los 46 DDS.....	52
Figura 11. Arbuscúlos y vesículas (a), e hifas (b), observados en raíces de maíz provenientes de macetas inoculadas con consorcios con AC-A (a) y Lob-A (b).	53
Figura 12. Corrida electroforética en gel de agarosa al 10%, del ADN extraído a partir de suelo (-s) o esporas (-sp).....	55
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa mostrando las bandas de amplificadas obtenidos por la reacción de PCR utilizando el par de primers LSU0061/LSU0599... ..	56
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa mostrando las bandas correspondientes a amplificadas por la reacción de PCR utilizando el par de primers LSUrk4f/LSUrk7r....	57

Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SSCP) mostrando los patrones de bandas correspondientes a amplificadas por la reacción de PCR utilizando el par de primers LSUrk4f/LSUrk7r.....	58
Figura 16. Número (N°) de bandas obtenidas en el perfil SSCP.....	59
Figura 17. Dendrograma de Similitud construido a partir de los patrones obtenidos por PCR-SSCP de ADN de los suelos y las esporas de hongos MA provenientes del sustrato de las plantas trampa.....	60
Figura 18. Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) de hongos MA obtenido a partir del patrón de bandas del gel SSCP.	61
Figura 19. Árbol filogenético construido utilizando el método de Neighbor-Joining y 200 repeticiones, incorporando las secuencias provenientes del gel SSCP y aquellas de especies estrechamente relacionadas obtenidas de las bases de datos.	63
Figura 20. Análisis de componentes principales (ACP) incluyendo a los parámetros químicos de los suelos nativos, los parámetros de actividad de hongos MA (capacidad infectiva -MA%-, contenido de arbusculos -Ar%-, abundancia de esporas y contenido de proteínas relacionadas con la glomalina -GRSP- de las plantas trampa) y diversidad de hongos MA (Índice de diversidad de Shannon-Weaver calculado a partir de los patrones SSCP provenientes de suelo -H-)..	64

ABREVIATURAS

A: agrícola
ACP: Análisis de componentes principales
ADN: Acido desoxirribonucleico
ADNr: Acido desoxirribonucleico ribosomal
AF: área foliar
Ar%: contenido de arbusculos
B: boro
BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool
BRSP: proteína de suelo reactiva por el metodo de Bradford
BSA: suero de albúmina bovina
C: carbono
Ca: calcio
CIC: capacidad de intercambio catiónico
CO: carbono orgánico
Co: cobalto
Cu: cobre
DDS: días desde la siembra
DGGE: electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
dNTP: nucleosido trifosfato
DTPA: Dietilentriaminopentaacetico
EDTA: Acido etilendiaminotetraacético
EE-BRSP: proteína fácilmente extraíble por el metodo de Bradford
EE-IRSP: proteína de suelo inmunorreactiva fácilmente extraíble
Fe: hierro
GRSP: proteínas relacionadas a la glomalina
H: índice de diversidad de Shannon-Weaver
Hongos MA: Hongos micorrícicos arbusculares
IRSP: proteína de suelo inmunorreactiva
ITS: regiones ribosomales variables
IV: índice de verdor
K: potasio
LSU: subunidad ribosomal mayor
MA%: capacidad infectiva

MDE: Mutation Detection Enhancement

Mg: magnesio

MO: materia orgánica

Mo: molibdeno

N: nitrógeno

Na: sodio

NJ: Neighbor-Joining

P: fósforo

P: prístino

PB: pares de bases

P-Bray: contenido de P del suelo extraído por el método de Bray y Kurtz

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFA: peso fresco aéreo

PFR: peso fresco de raíces

PSA: peso seco aéreo

PVC: policloruro de vinilo

RFLP: polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

RI: respuesta a la inoculación

SSCP: polimorfismo conformacional de cadena única

SSU: subunidad ribosomal menor

T°: temperatura

Taq Polimerasa: ADN Polimerasa Termoestable

Zn: cinc

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron analizar los cambios en la actividad y diversidad genética de hongos micorrícicos arbusculares (hongos MA) nativos de consorcios microbianos de suelos provenientes de condiciones agronómicas contrastantes, con características edáficas distintas; y evaluar su potencialidad como promotores de crecimiento. Se seleccionaron 23 sitios de la provincia de Buenos Aires con y sin historial agrícola (Agrícola y Prístino, respectivamente) a partir de sus características químicas. Se multiplicaron los hongos MA mediante plantas trampa y a las 24 semanas se determinó la capacidad infectiva (MA%). En los sitios que presentaban MA% superior al 45% se determinó la abundancia de esporas y el contenido de proteínas relacionadas con glomalina (GRSP) fácilmente extraíble, se realizaron dos ensayos de inoculación, uno en maíz y otro en trigo, extrayéndose ADN de suelo y esporas provenientes de las plantas trampa. Mediante la técnica de PCR-SSCP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo conformacional de cadena única) se generaron patrones moleculares que permitieron construir dendrogramas de similitud y calcular índices de diversidad (H) de hongos MA. Se analizaron las relaciones entre las propiedades de suelo y los parámetros microbiológicos. El contenido de GRSP, juntamente con el de materia orgánica (MO) en el suelo, fueron mayores en muestras provenientes de condiciones prístinas. Para los suelos prístinos se determinó un efecto depresor del P-Bray sobre la GRSP. Además, para los suelos con contenido de P-Bray menor a 50 mg kg^{-1} , se evidenció que la MO moduló el efecto depresor del P. En los suelos agrícolas, se determinó un efecto depresor del contenido de Fe del suelo sobre la MA%; y se observó que con niveles de Fe entre 40 y 180 mg kg^{-1} , la MO no moduló el efecto depresor del Fe. La abundancia de esporas se asoció negativamente con el contenido de Zn en el suelo, confirmando el efecto depresor que ejerce el Zn sobre la esporulación. En los ensayos de trigo y de maíz, se obtuvieron respuestas positivas por la inoculación con consorcios con hongos MA, aun cuando la colonización en las raíces de las plantas fue baja. Los inóculos más eficientes en promover el crecimiento vegetal, fueron nativos de suelos prístinos. La diversidad genética de los hongos MA evaluada mediante la estrategia de PCR-SSCP, para regiones del 28S del ADNr, se relacionó negativamente con los parámetros químicos del suelo (Zn, MO y capacidad de intercambio catiónico-CIC) y no se determinó relación con el P-Bray del suelo. Se avanzó en la determinación de hongos MA del género *Glomus* nativos de la provincia de Buenos Aires, mediante el secuenciamiento

de bandas del gel SSCP. Tanto para MA% como para la abundancia de esporas y el índice de diversidad genética de hongos MA nativos de la Provincia de Buenos Aires, no se observó un patrón que evidencie que una de las dos condiciones (suelo prístino y agrícola) haya incidido. Esto pone de manifiesto que las tres variables antes mencionadas serían independientes de la condición de uso de suelo. Estudios posteriores deberían tender a evaluar si las características del suelo, asociadas al uso del mismo, podrían ejercer cierta presión de selección sobre los hongos MA, y evaluar si permitirían seleccionar inóculos nativos de la Provincia de Buenos Aires, que sean potenciales promotores del crecimiento de las plantas.

Palabras claves. Micorrizas, ADN, manejo de suelo, promoción del crecimiento, SSCP, *Glomus*.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the changes in the activity and genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AM fungi) of soil microbial consortia indigenous from Buenos Aires province, under contrasting land use intensity, with different soil properties, and evaluate the AM fungi potential as plant growth promoters. As part of the study, 23 soil samples were selected from Buenos Aires province with and without agricultural land use (Agricultural and Pristine, respectively). The samples were selected by their differential chemical characteristics. AM fungi were multiplied in trap plants for 24 weeks and their infective capacity (MA%) was assessed. In sites that presented more than 45% of MA%, the spore abundance and easily extractable glomalin (GRSP) content were quantified. Two inoculation trials employing maize and wheat were performed, being soil and spore DNA from trap plants extracted to generate molecular patterns with PCR-SSCP method (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism), to construct similarity dendrograms and to calculate the AM fungal diversity index (H). Relationships between soil properties and microbiological parameters were analyzed. The GRSP content was higher in samples from pristine soils, which showed a higher organic matter content (MO). A depressive effect of P-Bray on the GRSP content of pristine soil was observed. For samples containing less P-Bray than 50 mg kg^{-1} , MO modulated the depressive effect of P. In agricultural soils, a depressive effect of Fe content on MA% was registered and it was found that in soils with Fe levels between 40 and 180 mg kg^{-1} , MO did not modulate the depressive effect of Fe. The abundance of spores was negatively associated with Zn content, showing a depressing effect in sporulation. In trials of maize and wheat, positive responses by inoculation with AM fungi consortia were found, even though levels of AM fungi colonization found in roots were lower than expected. The most efficient soil inocula in promoting plant growth, was indigenous from pristine soils. The genetic diversity of AM fungi assessed by SSCP strategy for regions 28S rDNA, was negatively related to soil chemical parameters (Zn, MO and cation exchange capacity-CIC) and unrelated to the soil P-Bray. A progress was made in identifying individuals *Glomus* genus native of the Buenos Aires province, by sequencing SSCP bands. No pattern was found to prove that neither of the evaluated conditions (pristine and agricultural soil) had any effect on MA%, spore abundance and diversity index. This could indicate that the MA%, spores abundance and genetic diversity of AM fungi indigenous from Buenos Aires province would be independent of the condition of land.

Further studies should aim to assess if soil characteristics could exert some selection pressure on AM fungi, and assess whether they would allow selecting native consortia with AM fungi from the Buenos Aires province, which could be potential promoters of plant growth.

Keywords. Mycorrhiza, DNA, land use, growth promotion, SSCP, *Glomus*.

1.- FUNDAMENTACION TEORICA

1.1. Simbiosis micorrícica

Los hongos edáficos, juegan un papel central en muchos procesos microbiológicos y ecológicos, que influyen en la fertilidad del suelo, en la descomposición y ciclado de minerales y materia orgánica, así como también en la sanidad y la nutrición vegetal. Los hongos edáficos son microorganismos heterótrofos, y en base a la forma en que obtienen el carbono se han adaptado a tres estrategias tróficas, pudiendo ser saprótrofos, necrótrofos o biótrofos. Esta última estrategia ocurre, entre otras, en la simbiosis micorrícica, una de las relaciones más antiguas en la superficie terrestre (Finlay, 2008) donde se asocian, de manera obligada, ciertos hongos edáficos con plantas superiores. El término 'Mykorrhiza' fue utilizado por primera vez en 1885 por Frank (Frank, 2005) para describir las estructuras modificadas de raíces de forestales y, desde entonces, se ha ampliado para cubrir una amplia gama de asociaciones simbióticas mutualistas (Smith y Read, 2008).

Actualmente, existen siete categorías diferentes de simbiosis micorrícicas (Finlay, 2008) que se han diferenciado sobre la base de sus características morfológicas y de las especies de hongos y plantas implicadas:

- Micorrizas arbusculares: son las más antiguas y extendidas en el mundo. Se caracteriza por la presencia de estructuras muy ramificadas, denominadas arbusculos, que crecen intracelularmente sin penetrar en el plasmalema del hospedante.
- Micorrizas ericoides: se forman con plantas de las familias *Empetraceae* y *Epacridaceae*, todas pertenecientes al Orden Ericales. Alrededor de 3400 especies de plantas forman este tipo de asociación con varios hongos Ascomycetes (Finlay, 2008) y recientemente se han incorporado los Basidiomycetes de la clase B Sebaciales. El hongo penetra las paredes celulares, y forma estructuras espiraladas dentro de la célula, sin penetrar en el plasmalema.
- Ectomicorrizas: se forman en plantas perennes y árboles. Los hongos, generalmente Ascomycetes y Basidiomicetes (más de 10000 especies fúngicas), se involucran con 8000 especies de plantas, en todo el mundo (Taylor y Alexander, 2005). Los hongos que forman ectomicorrizas no penetran a la célula huésped, y la simbiosis se caracteriza por la presencia de un manto fúngico alrededor de cada una de las raíces cortas de la planta, y de una red de hifas intercelulares (la Red de

Hartig), que penetran la epidermis y las células corticales (aumentando la superficie de contacto entre el hongo y la planta).

- Micorrizas orquidáceas: se presenta en plantas de la familia *Orchidaceae*. Si bien en la mayoría de las asociaciones micorrícicas, la planta cede fuentes de carbono al hongo, en las micorrizas orquidáceas esta relación puede invertirse. En estos casos, las plantas obtienen el carbono del hongo, que está colonizando simultáneamente a la orquídea y a otra planta autotrófica (Leake, 2004). Aquellas orquídeas verdes (autotróficas), se asocian con Basidiomicetes de la especie *Rhizoctonia*, caracterizados como saprófitos y parásitos de plantas.

- Micorrizas monotropódicas: ocurre con plantas mycoheterotróficas de la familia *Monotropaceae*. Estructuralmente, esta asociación presenta un manto bien desarrollado, pero con una Red de Hartig superficial, y una sola hifa creciendo en las células epidérmicas. Estas plantas aclorófitas, son totalmente dependientes de los hongos para la reducción de nutrientes y carbono del suelo, y parece que el carbono proviene indirectamente de las plantas hospedantes autótrofas que también están conectados con el mismo micelio ectomicorrícico (Leake, 2004; Bidartondo, 2005).

- Micorrizas arbutoides: esta simbiosis, se forman entre hongos que son normalmente ectomicorrícicos y plantas de los géneros *Arbutus*, *Arctostaphylos*, y de la familia *Pyrolaceae*, donde el hongo invade intracelularmente.

- Ectendomicorrizas: esta asociación tiene características tanto de las ectomicorrizas como de las endomicorrizas (presentan un manto y una red de Hartig, pero los hongos penetran intracelularmente). Algunos de los hongos que forman ectendomicorrizas con *Pinus* y *Larix*, también forman ectomicorrizas con otras especies de árboles.

1.2. Hongos Micorrícicos Arbusculares

1.2.1. Taxonomía:

Los hongos micorrícicos arbusculares (hongos MA), pertenecen al Phylum *Glomeromycota*, Clase *Glomeromycetes* (Schüßler y Walker, 2010; Oehl *et al.*, 2011). La taxonomía de los hongos MA, describe hasta el momento 265 especies en 4 órdenes, 11 familias y 22 géneros (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>) (Figura 1).

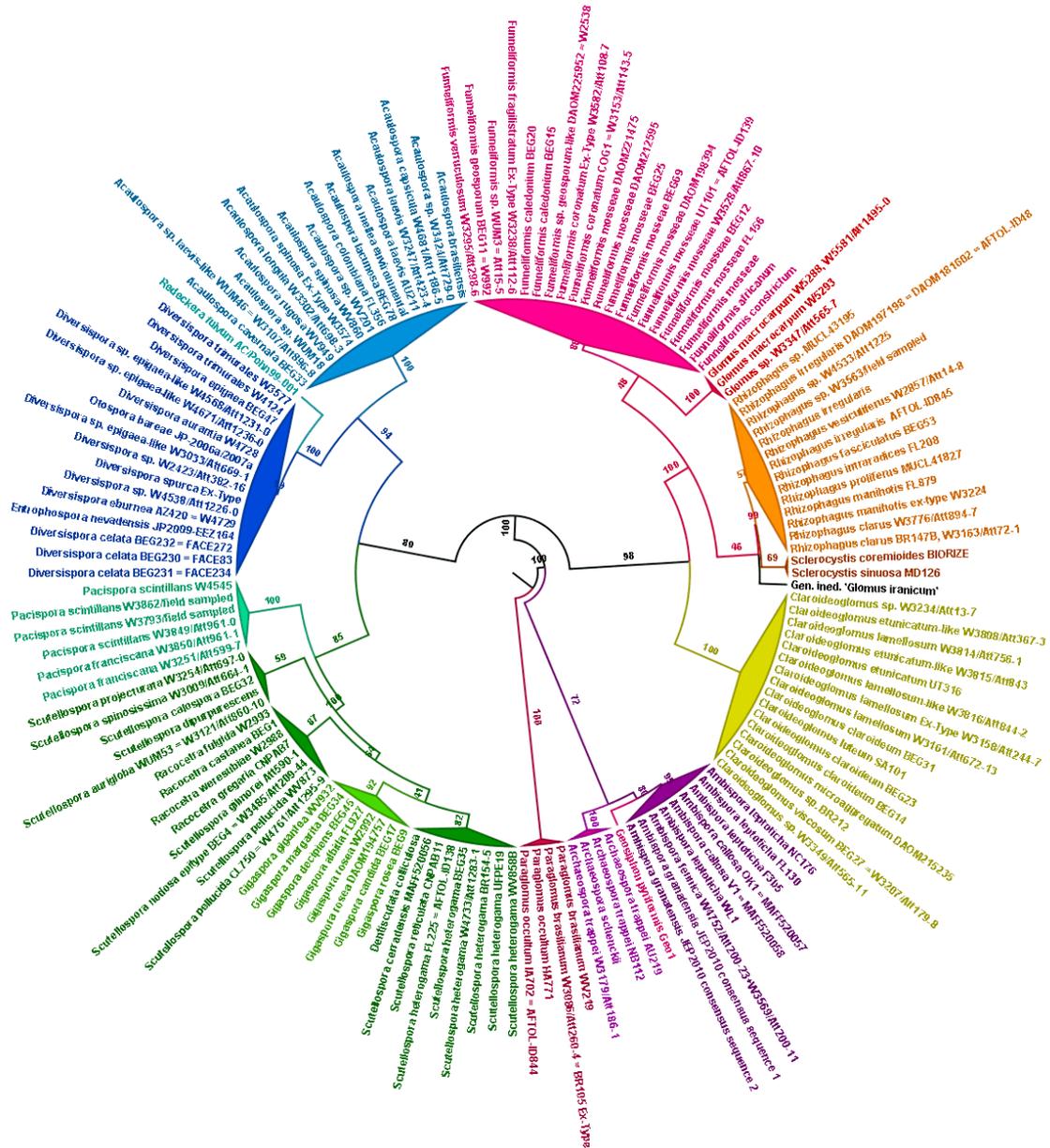


Figura 1. Árbol filogenético (secuencias del gen SSU (subunidad menor) del ARNr) aplicando los cambios más recientes en la taxonomía y la clasificación de los Glomeromycota (tomado de <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>).

Los hongos MA han coevolucionado con sus hospedadores desde que las plantas conquistaron la superficie terrestre durante el periodo Ordoviciano, en la era Paleozoica, hace más de 460 millones de años (Simon *et al.*, 1993a; Redecker *et al.*, 2000b). Los primeros registros fósiles, en la formación Rhynie Chert, Escocia, reportan órganos subterráneos de plantas fósiles como *Aglaophyton major*, con estructuras que se asemejaban a arbuscúlos formados por especies de hongos MA existentes (Remy *et al.*, 1994). Además, Taylor *et al.* (1995) describieron una especie fósil basándose en la morfología de estructuras semejantes a esporas y micelio de principios del

Devónico; y Stubblefield *et al.* (1987) observaron estructuras semejantes a hifas, vesículas, y esporas en las raíces de plantas que se conservaron desde el Triásico. Todos estos hallazgos fueron confirmados posteriormente por estudios moleculares (Simon *et al.*, 1993b), estableciendo el origen de hongos MA entre los períodos Ordovícico y el Devónico.

La asociación de micorrizas apareció antes que las plantas hubieran evolucionado hacia raíces verdaderas (Dotzler *et al.*, 2009; Bonfante y Selosse, 2010). Por esta razón, y considerando la gran coevolución de estos hongos con sus hospedantes, no es sorprendente su amplia distribución entre las distintas plantas.

1.2.2. Ocurrencia y distribución:

La formación de micorrizas es la simbiosis más extendida en la naturaleza y se encuentra en todos los hábitats de la tierra (Kivlin *et al.*, 2011), incluyendo bosques tropicales a templados (Zhao *et al.*, 2001; Gaur y Adholeya, 2002), dunas, desiertos (Dalpé *et al.*, 2000; Titus *et al.*, 2002), praderas, ambientes acuáticos (Khan, 1993), y también agroecosistemas (Brundrett, 1991), aun con suelos salinos (Carvalho *et al.*, 2001; Sengupta y Chaudhuri, 2002), gípsicos o sódicos (Landwehr *et al.*, 2002).

Entre el 80-90% de las plantas forma simbiosis con hongos MA (Honrubia *et al.*, 1992; Wang y Qiu, 2006), colonizando desde las briofitas (musgos, hepáticas) hasta las pteridofitas, gimnospermas y angiospermas (Willis *et al.*, 2013). Casi todas las plantas tropicales son típicamente micotróficas (Janos, 1987) y esto puede estar relacionado con la rápida descomposición de la hojarasca y el alto reciclaje del carbono en esos ecosistemas (Cornelissen *et al.*, 2001). Sólo las plantas de las familias *Chenopodiaceae*, *Polygonaceae*, *Juncaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae* y *Proteaceae*, no son hospedantes de los hongos MA (Smith y Read, 2008).

1.2.3. Colonización:

El ciclo de vida de los hongos MA consta de dos etapas principales: una fase asimbiótica, y una fase simbiótica con las plantas (Willis *et al.*, 2013). La fase asimbiótica, es el único estado del hongo que muestra limitado desarrollo saprofito por una baja tasa metabólica (Azcón-Aguilar y Barea, 1995). En esta fase, la espora del hongo MA produce un tubo germinativo que puede crecer hasta 20 y 30 mm. Esta fase es clave dado que si el tubo germinativo no entra en contacto con la raíz de una planta hospedadora en al menos 15-20 días, el crecimiento cesa. En este caso, la espora puede producir otro tubo germinativo, o permanecer quiescente hasta que la

germinación sea provocada por la cercanía de una raíz, estrategia que le permite conservar los recursos energéticos de las esporas (Willis *et al.*, 2013).

Antes de la fase simbiótica ocurre un estado pre-simbiótico, en el que los exudados de las raíces provocan el crecimiento de los tubos germinativos hacia la raíz (Sbrana y Giovannetti, 2005) y la bifurcación del tubo germinativo en distintos brazos, formando un abanico que permite tener una mayor cantidad de puntos de entrada a la raíz.

La fase simbiótica es cuando ocurre efectivamente ingreso de las hifas a las células de la raíz. En cada sitio específico de entrada, donde la raíz ha respondido a las señales del hongo, se forman apresorios, mediante los cuales el hongo penetra la superficie radical, hacia la corteza que invade intercelularmente (Strack *et al.*, 2003). Luego, la hifa penetra las paredes celulares y se desarrolla dentro de las células de la corteza ramificándose dicotómicamente, y formando estructuras tipo árboles, llamadas arbusculos, que presentan una membrana periarbuscular donde se produce el intercambio de nutrientes.

Existen dos tipos de colonización: tipo *Paris*, donde el desarrollo de la hifa es exclusivamente intracelular, formando *coils* (espirales) en las células corticales de las plantas hospedantes; y la colonización de tipo *Arum* donde la hifa se desarrolla, mayoritariamente intercelularmente, formando las estructuras similares a árboles en las células corticales (Willis *et al.*, 2013) (Figura 2). Entre estos dos extremos, existen formas intermedias (Dickson, 2004), como los coils-arbusculados (Figura 2). Algunos géneros en las familias *Gigasporaceae*, *Paraglomaceae*, y *Archaesporaceae*, producen además, unas estructuras ricas en lípidos, llamadas vesículas que actúan como órganos temporales de almacenamiento del hongo (Willis *et al.*, 2013) (Figura 2).

Los arbusculos, se desarrollan de 1-6 días luego de la penetración de las hifas en las células corticales (Harley y Smith, 1983), y su formación provoca cambios morfológicos en las células hospedantes: la vacuola central se fragmenta, se incrementa el número de organelas celulares y el volumen del citoplasma, el núcleo se mueve hacia una posición central y se produce hipertrofia (Balestrini *et al.*, 1994). Luego de 4-15 días los arbusculos degeneran y la célula hospedante vuelve a su estado original (Harley y Smith, 1983). A medida que las hifas crecen intercelularmente y van penetrando en células corticales receptoras, otros arbusculos se van formando, pudiendo penetrar en células que han sido invadidas previamente (Willis *et al.*, 2013).

El largo total de las raíces ocupadas por arbusculos, puede variar entre especies fúngicas (Fitter, 1985), estaciones del año (Bohrer *et al.*, 2004), factores edáficos (Clark y Zeto, 1996; Posada *et al.*, 2008), contenido de agua del suelo (Schreiner *et*

al., 2007) y temperatura del suelo (Smith y Read, 2008), entre otros. De la misma manera, el largo total de la raíz colonizada, ya sea por hifas o arbusculos, puede variar, por la especie hospedante (Klironomos, 2003), por el estado fenológico de la planta (Pongrac *et al.*, 2007), por interacciones con la biota del suelo (Dauber *et al.*, 2008) o por la ubicación del carbono en el suelo (Muthukumar y Udaiyan, 2000).

Cuando los arbusculos se han formado, y ocurre el intercambio de nutrientes a través de la membrana periarbuscular, el micelio extraradical crece y se extiende más allá de la zona rizosférica (Smith y Read, 2008), pudiendo re-inocular la raíz. Las hifas, absorben nutrientes del suelo, extendiéndose más allá de las zonas de agotamiento de los nutrientes de la rizósfera. Pueden ramificarse dicotómicamente, y estrechar su diámetro hasta 8 veces (de 20 a 8 μm) (Friese y Allen, 1991) permitiendo la captación de nutrientes de las partículas del suelo más pequeñas e inaccesibles para los pelos radicales. La extensa red de micelio formado interconecta los sistemas de raíces de las plantas de diferentes especies, géneros y familias, directamente o a través de anastomosis hifal (Giovannetti *et al.*, 2006). El ciclo de vida se completa con la producción de esporas.

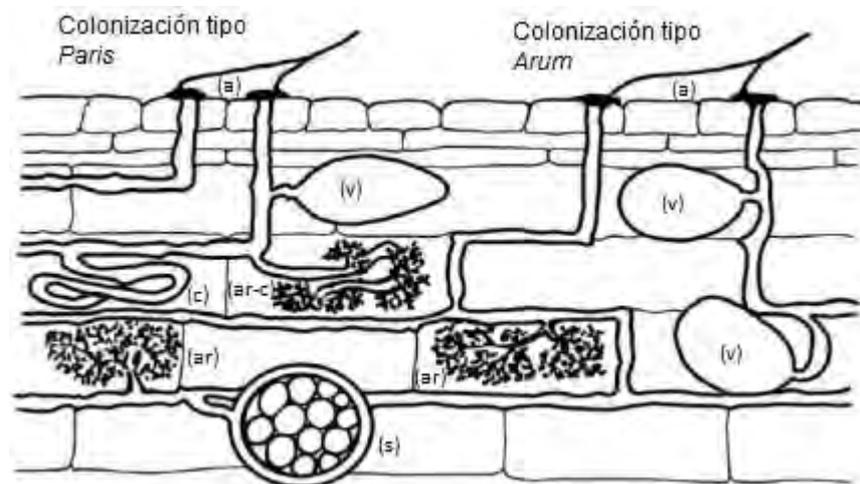


Figura 2. Esquema de los principales órganos morfológicos inter-radicales de hongos MA (Tomado de Willis *et al.* (2013)). Referencia: (a): apresorios, (ar): colonización del tipo Arum, (ar-c): coils-arbusculados, (c): coils del tipo Paris, (s): espora intraradical, (v): vesículas.

Las esporas de los *Glomeromycetes*, son multinucleadas, heterocarióticas (Hijri y Sanders, 2005) y se forman asexualmente (Pawlowska, 2005). Presentan una pared múltiple y son grandes, generalmente visibles a ojo desnudo las de mayor tamaño, con

un tamaño que va desde $< 40 \mu\text{m}$ en las especies más pequeñas, a $> 800 \mu\text{m}$ en la especie más grande, *Gigaspora gigantea*. Todas las esporas presentan desde cientos a miles de núcleos que pueden no ser genéticamente idénticos; además, contienen glóbulos lipídicos que sirven como fuente inicial de energía para producir el tubo germinativo en el estado pre-simbiótico. Las esporas pueden producirse solas, en fascículos, o en esporocarpos, mayoritariamente en el suelo, aunque en algunas especies también ocurre entre los tejidos radicales (Willis *et al.*, 2013).

1.2.4. Estudio e Identificación de los hongos MA:

El estudio de la taxonomía, filogenia, simbiosis, ecología y genética de los hongos MA encuentra en muchos casos, variadas dificultades: i) al ser los hongos MA biótrofos obligados, no pueden ser cultivados axénicamente en laboratorio; ii) las técnicas convencionales de identificación de las especies de hongos MA basadas en la observación microscópica de la morfología de las esporas, y de los esporocarpos, (tales como variaciones en la morfología de la pared, forma, color y tamaño de la espora, así como también a la reacción a la tinción con compuestos como el Reactivo de Melzer o Sudan Black B) pueden dejar muchas especies sin resolver; iii) los hongos MA son muy diversos en sus requerimientos y habilidad de esporulación, y en su posterior colonización, por lo que los métodos basados en la morfología de las esporas no siempre reflejan la riqueza de especies de hongos MA en un ecosistema determinado (Sharmah *et al.*, 2010); iv) una correcta identificación de esporas de hongos MA, es un proceso laborioso y el tiempo necesario para llevarlo a cabo va a depender del nivel de experiencia del investigador (Sharmah *et al.*, 2010). Por las mencionadas, y probablemente más razones, en las últimas décadas los estudios clásicos aislados de esporas de hongos MA no proporcionaron un panorama real de la diversidad *in situ* de las comunidades de hongos MA. Por ello se comenzó a cuestionar la subestimación de la diversidad y riqueza de las especies de hongos presentes (Sharmah *et al.*, 2010) y se requirieron nuevas metodologías que complementaran las clásicas.

Actualmente, las técnicas de biología molecular, especialmente aquellas basadas en estudios de los ácidos nucleicos -ADN-, han contribuido en la identificación de estos hongos. Esto ha resultado en avances importantes que permitieron comprender mejor la filogenia (Schüßler *et al.*, 2001; Schwarzott *et al.*, 2001; Hibbett *et al.*, 2007), ecología (Helgason *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 2002; Appoloni *et al.*, 2008), genética (Gandolfi *et al.*, 2003; Rosendahl y Matzen, 2008), evolución (Gandolfi *et al.*, 2003) y simbiosis (Parniske, 2008) de los hongos MA. Durante los últimos 25 años, las técnicas

moleculares se basaron principalmente en la exploración de la variación genética (de Souza *et al.*, 2004), permitiendo la identificación de hongos MA en raíces de las plantas o directamente en el suelo, sin necesidad de la formación de esporas.

En estas técnicas, se ha establecido al ADN ribosomal (ADNr), como una herramienta para caracterizar a los hongos MA, tanto en el laboratorio así como en ambientes naturales (Clapp *et al.*, 2003), ya que están presentes en múltiples copias y presentan regiones conservadas (subunidad menor –SSU-, y subunidad mayor –LSU-) y regiones variables (ITS1) (Sharmah *et al.*, 2010). La caracterización de los genes ribosomales SSU ADNr, LSU ADNr y ITS1 y ITS2, es una herramienta importante para revelar las relaciones filogenéticas y desarrollar pruebas moleculares para identificar hongos MA (Schüßler, 1999; Redecker, 2000a).

El primer paso en la mayoría de los estudios moleculares, es la extracción de ADN. Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado kits de extracción de ADN, que permiten la extracción de material de alta calidad, con la eliminación de inhibidores potenciales de la enzima clave en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la Taq polimerasa. La mayor parte de las técnicas moleculares utilizan a la PCR como paso principal para amplificar el material genético. En hongos MA, se ha utilizado la estrategia de PCR-anidada, un procedimiento en el que se realizan dos reacciones de PCR consecutivas, en las que, en general se utiliza un par de cebadores (=primers) universales para amplificar el ADN en la primera reacción y luego un par específico para amplificar parte del producto de la primera reacción. Para los estudios de hongos MA esta estrategia es de uso frecuente (Kjøller y Rosendahl, 2000; Renker *et al.*, 2003; Rosendahl y Matzen, 2008). Los productos de PCR obtenidos a partir de ADN de suelo, raíces o esporas de hongos MA, pueden ser secuenciados y de esta manera llegar a nivel de especie. Existen numerosas técnicas para estudiar la diversidad de hongos MA que no requieren de secuenciación de los productos (Covacevich, 2010). En general son técnicas de *fingerprinting* como: polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002); terminal (t)-RFLP (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003); polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP) (Kjøller y Rosendahl, 2000; Jansa *et al.*, 2002); electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (Kowalchuk *et al.*, 2002; de Souza *et al.*, 2004); y minisatélites.

Entre las mencionadas, la técnica de PCR, acoplada a SSCP, consiste en la corrida electroforética en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante de los productos de PCR previamente desnaturalizados. Luego de una tinción, se obtienen patrones en los cuales las bandas permiten diferenciar genotipos con mínimas diferencias (un nucleótido). Esta

técnica ha permitido detectar cambios en el material genético de hongos MA de una sola base (Kjøller y Rosendahl, 2000; Jansa *et al.*, 2002), ya sea en 99% o 89% de los productos de PCR que tenían entre de 100-300 o 300-450 pares de bases, respectivamente. Esto revela un posible uso de esta técnica para evaluar la variabilidad genética de la región del ADNr estudiado.

Resultados previos han determinado que la provincia de Buenos Aires, presenta elevada variabilidad genética de hongos MA nativos a través de la técnica PCR-SSCP (Covacevich *et al.*, 2012b; Thougnon Islas *et al.*, 2016) y se ha avanzado en la confirmación de su identidad genética a través de la secuenciación de las bandas de los perfiles generados (Thougnon Islas *et al.*, 2016).

1.2.5. Efectos de los hongos MA sobre las plantas y el ambiente edáfico:

Si bien la mayoría de los cultivos agrícolas son colonizados por hongos MA y esta simbiosis ocurre en la mayoría de los suelos, existe variabilidad en la abundancia de especies, distribución temporal y composición, que difiere entre los tipos de suelo y prácticas de manejo (Abbott y Robson, 1991; Merryweather y Fitter, 1998). Algunos estudios (Fitter, 1985; Jakobsen, 1994; Jakobsen *et al.*, 2002) han reportado el beneficio de los hongos MA nativos como promotores del crecimiento vegetal, aunque es difícil determinar su contribución en condiciones de campo. Para poder entender la gran diversidad de hongos MA y optimizar sus beneficios en los ambientes con agricultura (Dodd *et al.*, 1996) es necesaria la evaluación de la ecología y dinámica poblacional de la simbiosis con hongos MA.

La principal función de los hongos MA es contribuir a la nutrición de las plantas, particularmente de nutrientes poco móviles, como el P y el Zn (Bucher, 2007), aunque también se han reportado efectos en molibdeno (Mo), cobalto (Co) (Mosse, 1973), cobre (Cu) y nitrógeno (N) (Dodd y Thomson, 1994). Además, los hongos MA pueden reducir la invasión de las raíces por patógenos de suelo (Newsham *et al.*, 1995), disminuir la absorción de metales pesados fitotóxicos (Göhre y Paszkowski, 2006), reducir la herbivoría de insectos por inducción de respuestas en la planta hospedadora (Bennett *et al.*, 2009), e incrementar el contenido de clorofila de la planta hospedante (Colla *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008), entre otros. Hay evidencias que sugieren que los hongos MA pueden jugar un papel importante en los ciclos de N y carbono (C) del suelo (Govindarajulu *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2009) y hacer una considerable contribución a los reservorios de C de los ecosistemas terrestres (Wright y Upadhyaya, 1998). Además de las funciones anteriores, los hongos MA pueden también influir y

organizar la estructura de los patrones de la comunidad vegetal (Van Der Heijden *et al.*, 2008) y las poblaciones de la comunidad microbiótica del suelo (Mummey y Rillig, 2006; Toljander *et al.*, 2007).

Los hongos MA mejoran también la eficiencia del uso del agua en las plantas (Henderson y Davies, 1990; Bryla y Duniway, 1997). La tolerancia a la sequía y la mejor recuperación por parte de las plantas micorrizadas se ha relacionado con la mejora de la absorción de P (Fitter, 1988). La micorrización puede también aumentar la densidad y longitud de la raíz o alterar la morfología del sistema radical, permitiendo a las plantas colonizadas explorar más volumen de suelo y extraer más agua que las plantas no colonizadas durante la sequía (Davies *et al.*, 1996).

Una función importante de los hongos MA en el suelo, es su contribución a mejorar la agregación de las partículas del suelo por la acción cohesiva de una glicoproteína insoluble en agua, muy estable, y que es producida en forma abundante por las hifas de hongos MA, la glomalina (Rillig y Mummey, 2006). Esta proteína es producida como un componente de la pared hifal (Driver *et al.*, 2005) y es cuantificada desde el suelo como proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) fácilmente extraíble. Si bien existe evidencia de una relación entre la GRSP y el estado de agregación del suelo (Rillig y Mummey, 2006), esto solo se ve reflejado a través de correlaciones entre las variables, ya que involucra mecanismos que aún no fueron dilucidados. Sin embargo, debido a que la GRSP del suelo tiene un ciclaje lento (6 a 42 años), ya que permanece en el suelo más tiempo que las paredes de las hifas de los hongos MA (Steinberg y Rillig, 2003), la incorporación del contenido de GRSP en muestras ambientales, podría ser considerado como un buen indicador de la calidad del suelo y de la actividad de los hongos MA (Purin y Rillig, 2007).

1.2.6. Efectos del ambiente edáfico sobre los hongos MA:

Las características edáficas afectan el desarrollo y la efectividad de los hongos MA (Djuuna *et al.*, 2010). La acidez del suelo es un factor que puede deprimir el desarrollo de la simbiosis micorrícica (Kittiworawat *et al.*, 2010). Incrementos en los niveles de P disponible por la aplicación de fertilizantes fosfatados, han promovido una retroalimentación negativa, reduciendo la diversidad y abundancia de las comunidades de hongos MA y se ha informado que elevados contenidos de P y también de Zn en el suelo deprimen a los hongos MA (Siddiqui *et al.*, 2008; Astiz Imaz *et al.*, 2014). Covacevich *et al.* (2007), determinaron que contenidos de P-Bray desde niveles muy bajos hasta 27 mg kg^{-1} , deprimen la colonización micorrícica a razón de $2,8\% \text{ mg P}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

¹, y por encima de 27 mg kg⁻¹ la colonización se estabilizaba al 10%. En este sentido, Covacevich *et al.* (2012a) determinaron para algunos suelos de la provincia de Buenos Aires, que la elevada disponibilidad de P y Fe de suelos de aptitud agrícola de la Provincia de Buenos Aires deprimen la capacidad infectiva en mayor medida que la condición de uso del suelo, y evidenciaron que la materia orgánica (MO) actuaría como amortiguadora de esos efectos depresivos. Astiz Imaz *et al.* (2014), determinaron la depresión de la colonización micorrícica de hongos MA nativos de sitios agrícolas y prístinos de Balcarce y Coronel Dorrego por la fertilización con Zn. Thougnon Islas *et al.* (2014), confirmaron los efectos del P y Fe sobre la colonización micorrícica determinándolo también sobre la capacidad de esporulación, pero solo para algunos sitios de la provincia de Buenos Aires, detectando algunos consorcios con hongos MA que podrían resultar promisorios.

En cuanto a las condiciones de uso de los suelos, prácticas de manejo de agricultura con labranzas convencionales y con alta intensidad de uso de la tierra, han provocado reducción en el número de esporas de hongos MA y en la diversidad de especies (Douds Jr y Millner, 1999; Oehl *et al.*, 2003). El monocultivo continuo de maíz, y en menor medida la rotación de cultivos, también mostró una reducción de la diversidad (Willis *et al.*, 2013). Por otro lado, los suelos que quedan en barbecho o bajo sistemas agrícolas sostenibles u orgánicos han mostrado significativamente mayor diversidad de hongos MA (Oehl *et al.*, 2003; Oehl *et al.*, 2004; Hijri *et al.*, 2006), encontrándose la mayor diversidad en pastizales seminaturales. Esto puede sugerir que la diversidad y abundancia de especies de hongos MA podría ser un indicador del estado de salud de los suelos. En este sentido, aún no se ha dilucidado si la condición de uso del suelo, sus propiedades químicas o las características climáticas son las que modularían la capacidad promotora de crecimiento de las plantas.

1.3. Características de la Provincia de Buenos Aires

1.3.1. Geología y Geomorfología:

La Provincia de Buenos Aires, es una región ubicada en el centro este de la Argentina que abarca 307.571 km². La mayor parte de la provincia, es principalmente una amplia llanura, cuya superficie está formada por sedimentos no consolidados de la edad cuaternaria (Loess), que se originó en la región norte de la Patagonia, y que fue transportado por acción eólica ingresando a la provincia por el extremo sudoeste (textura más gruesa por depósito de partículas más pesadas), y dirigiéndose en

sentido noreste (donde se depositaron partículas más finas). Este sedimento, luego se redistribuyó por acción hídrica. Por otra parte, los sectores adyacentes a la costa se originaron a partir de depósitos de origen marino (Salazar Lea Plaza y Moscatelli, 1989).

Dentro de la gran llanura, se encuentran dos sistemas serranos principales, que son el Sistema de Tandilia (centro de la provincia), y el Sistema de Ventania (centro-sur de la provincia), y a partir de los cuales afloran rocas consolidadas de edad precámbrica y paleozoica (Salazar Lea Plaza y Moscatelli, 1989). Las características geológicas difieren entre sí, e influyen en los suelos que se desarrollan a partir de ellas.

Dentro de la provincia, podemos encontrar 8 unidades geomorfológicas principales (Delta del Paraná, Pampa Arenosa, Pampa Deprimida, Pampa Interserrana, Pampa Ondulada, Mesetas, Depresión Lagunar y Sistema de Tandilia y Ventania) (Salazar Lea Plaza y Moscatelli, 1989) (Figura 3). Cada una de las regiones y subregiones, presenta distintos tipos de suelos, y por lo tanto, distintas limitaciones y capacidad de su uso.

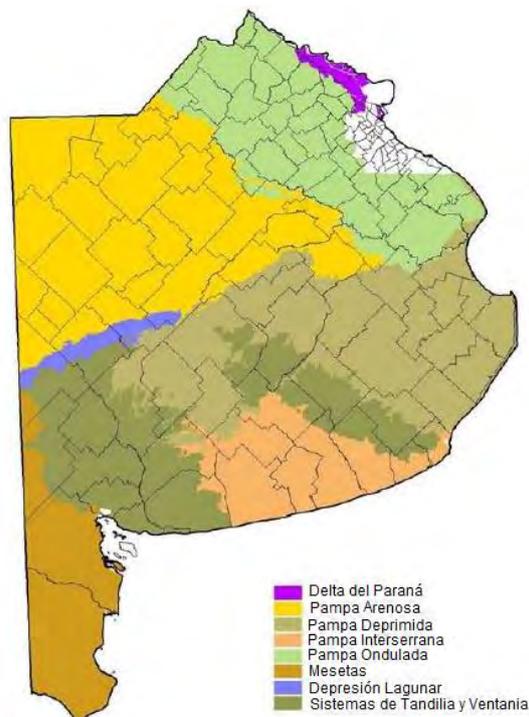


Figura 3. Principales unidades y subunidades geomorfológicas de la Provincia de Buenos Aires. Tomado de Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires.

Las Sierras, presentan suelos someros, con limitaciones de profundidad por presencia de roca (*Hapludoles líticos*) en la zona de relieve *escarpado* y suelos bien drenados, que pueden estar limitados en profundidad por la presencia de tosca (*Hapludoles petrocálcicos* y *Argiudoles típicos someros*) en la zona de *relieve ondulado o pedemontes*.

Las Mesetas, en su parte alta presentan una superficie plana y cubierta por tosca, generando suelos someros (*Haplustol petrocálcico*), mientras que en los valles, hay perfiles profundos debido a que el espesor de los sedimentos recientes es mayor (*Haplustol típico*). En toda la región oriental, aparecen suelos someros y limitados por costras calcáreas o conglomerados (*Calciortid típico*).

La Pampa Ondulada es una zona de relieve ondulado, con loess espeso, y cuya granulometría decrece de sudoeste a noreste. Se encuentran *Argiudoles vérticos* y *Cromudertes típicos* en la parte del noreste, desarrollados sobre materiales más finos, y *Argiudoles típicos*, donde el material es franco-limoso y el relieve ondulado. Donde el relieve se hace más plano y el drenaje menos definido, se encuentran *Argialboles argiácuicos*, *Argiudoles ácuicos* y otros suelos hidromórficos.

La Pampa Arenosa, presenta un relieve medanoso con arenas finas predominantemente, que fueron depositadas por acción del viento. Debido a los factores climáticos, la región del este, presenta una mayor estabilidad del paisaje, ya que hay un mayor contenido de humedad, con un mayor desarrollo de la vegetación y suelos *Hapludoles tpto-árgico* o *tpto-nátrico*, según el horizonte B sea argílico o nátrico. En el oeste de la región, es más común la presencia de medanos “vivos”, ya que hay una constante remoción de los materiales superficiales y presenta *Hapludoles énticos*, *Hapludoles típicos*, y *Haplustoles énticos*.

La Pampa Deprimida, presenta un relieve plano-cóncavo con limos y arcillas, donde no existe una red de drenaje definida, por lo que en épocas de grandes lluvias, pueden producirse anegamientos. Los suelos se caracterizan por tener horizontes sódicos superficiales o subsuperficiales (*Natracuoles típicos* y *Natracualfes típicos*), por la presencia de tosca, ya sea en forma de plancha continua o de concreciones, y por la presencia de condiciones de drenaje interno deficientes, principalmente por presentar la capa freática a menos de 2 m de profundidad. Solo están libres de limitaciones aquellos suelos presentes en las zonas más elevadas, donde los perfiles son moderadamente bien drenados, y las condiciones nocivas de sodio se registran por debajo de 1 m de profundidad. Es común encontrar perfiles con discontinuidades litológicas como *Hapludoles tpto-nátricos*.

La Pampa Interserrana, está formada por una capa de loess de más de 1,5 m de profundidad que se apoya sobre tosca. La textura de los suelos es franca y presenta un buen sistema de drenaje. En aquellos suelos donde la capa loésica es mayor a 2 m de profundidad, la tosca deja de ser limitante para la producción y se forman suelos profundos. En la mayor parte del sector predominan *Argiudoles típicos*, aunque también pueden encontrarse *Argiustoles típicos* en la zona entre Coronel Dorrego y Bahía Blanca, donde el régimen de humedad de los suelos pasa de Udico a Ustico.

El Delta del Rio Paraná, es una zona insular surcada por numerosos y pequeños brazos del río. Las islas están formadas por sedimentos areno-limosos, en los que se intercalan delgadas lentes de arcillas. Las islas presentan superficies cóncavas en su interior y albardones en su perímetro, donde se favorece el crecimiento de abundante material vegetal hidrófilo, y con un ambiente anaeróbico donde permite el desarrollo de un horizonte con alta acumulación de materia orgánica pero que tiene una lenta descomposición. Los suelos que predominan, tienen en su perfil una sucesión de capas de distinto espesor y granulometría, que presentan hidromorfismo y anegamiento periódico (*Haplacuoil hístico* y *Haplacuent aérico*).

La Depresión lacunar, es una depresión alargada en dirección SW-NE, que separa el pedemonte de Ventania de la llanura arenosa del noroeste de la provincia. Los materiales que ocupan esta depresión son principalmente arenosos al oeste y hacia el este va aumentando la proporción de limos y arcillas. Los suelos de los flancos de la depresión tienen poca diferenciación de horizontes, son muy impermeables y susceptibles a la erosión (tanto eólica como hídrica). Los suelos de la parte central son por lo general salinos o salinos-sódicos y sufren anegamientos periódicos.

1.3.2. Clima:

La Provincia de Buenos Aires presenta un clima templado, que a comparación de otras regiones con similar latitud, genera condiciones climáticas más favorables por el efecto moderador que ejerce la cercanía con el océano (Salazar Lea Plaza y Moscatelli, 1989). Esto provoca una escasa amplitud térmica diaria y anual en la zona oriental (diferencia térmica entre el mes más cálido y el más frío: 12-13°C), y mayor en la zona centro y oeste de la provincia (diferencia térmica: 16°C). La Temperatura (T°) disminuye de Norte a Sur, con una diferencia de 2-4°C entre sus extremos, siendo la T° media anual de 18°C al norte y 14°C al sur. Uno de los factores adversos más importante para la producción agrícola son las heladas, aunque en la provincia se detecta variabilidad entre zonas. En la mayor parte de la provincia, (excepto San Clemente del Tuyu, según De Fina, 1970), las mayores precipitaciones se registran en

verano, con un máximo en el mes de marzo, y las menores en junio. Los mayores valores de precipitación se registran en el noreste, donde superan los 900 mm anuales, y disminuye hacia el sudoeste llegando a valores máximos de 400 mm anuales en esa región. La evapotranspiración oscila entre 850 mm anuales en el norte y 750 mm anuales en el sur de la provincia. El análisis hídrico indica que la época con mayor volumen de agua almacenada en el suelo es el invierno, y a pesar de que durante el verano se registran las mayores precipitaciones, en esta época se registran deficiencias hídricas debido a la mayor demanda por evapotranspiración (Salazar Lea Plaza y Moscatelli, 1989). En esta región, la época con mayor intensidad de vientos es de septiembre a enero, proviniendo principalmente de la dirección norte, noreste y noroeste; en verano, por efecto del anticiclón del Atlántico y la baja presión continental, se incrementan los vientos del este y noreste, mientras que en invierno predominan los vientos del oeste y sudoeste ya que se establece un centro de alta presión en el continente.

1.3.3. Fertilidad de los suelos:

Las propiedades químicas de los suelos varían entre las distintas regiones de la provincia. Sainz Rozas *et al.* (2011), encontraron valores del contenido de carbono orgánico (CO) entre 5,5 a 38,0 g kg⁻¹ en la región pampeana, presentando valores más bajos al oeste, y más elevados al sudeste de la provincia de Buenos Aires. A nivel regional los niveles de CO de suelos prístinos (suelos vírgenes o que no han ingresado en las rotaciones agrícola-ganaderas) están regulados por el clima, dado que el mismo incide en el balance de C al afectar el ingreso del mismo al suelo y su salida por respiración microbiana (Alvarez y Steinbach, 2006). Además, el CO es mayor al aumentar la proporción de partículas finas, aumentando de esta manera la protección contra el ataque microbiano (Six *et al.*, 2002) y la capacidad de almacenamiento de agua útil. En los suelos agrícolas, se observa una disminución de los niveles de CO, que en algunos casos llega a representar el 50% del nivel original, debido principalmente a la intensificación de la agricultura y la falta de rotaciones con pasturas (Lavado, 2006). Eyherabide (2015) no observó diferencias en la capacidad de intercambio catiónico (CIC) entre suelos bajo condiciones prístinas y agrícolas de la provincia de Buenos Aires, debido a que, si bien la agricultura ha producido una disminución en los contenidos de MO del suelo, esa caída sería principalmente a expensas de la fracción activa de la MO, que no está relacionada con la CIC (Brady y Weil, 2008).

En cuanto al contenido de P-Bray, Sainz Rozas *et al.* (2012) reportaron entre 12,9 y 13,6 mg kg⁻¹ de P-Bray, para el sur-sureste y norte-oeste de la provincia de Buenos Aires, respectivamente. En los últimos 25 años, el contenido de P-Bray ha disminuido, principalmente en el oeste y norte, y con disminuciones de menor magnitud en el sur de la región Pampeana (Sainz Rozas *et al.*, 2012). El mayor uso agrícola de los suelos y la baja reposición del P por fertilización, así como el aumento en la frecuencia del cultivo de soja en la rotación, que presenta un elevado requerimiento e índice de cosecha de P (García, 2001) podrían explicar al menos parcialmente dichas disminuciones. Sin embargo, en los suelos del sur y sudeste bonaerense, la concentración de P-Bray se ha mantenido o ha pasado de niveles bajos a medios de P-Bray. Esto podría ser atribuido a la amplia adopción de la práctica de fertilización y al uso de dosis de P más elevadas respecto de otras áreas con mayores niveles de P nativo (Sainz Rozas *et al.*, 2012).

El contenido de Zinc (Zn) en suelos prístinos de la región pampeana fue reportado por Eyherabide *et al.* (2012) con valores de 6,13 mg kg⁻¹ para el norte, 3,45 mg kg⁻¹ para el oeste, y 2,94 mg kg⁻¹ para el sur de la provincia de Buenos Aires. Al igual que lo que ocurre en otros nutrientes, la actividad agrícola disminuye los niveles de Zn en los suelos en todas las zonas de la región pampeana, encontrándose su concentración próxima o por debajo de los niveles críticos para el adecuado crecimiento de los cultivos en la zona norte de la provincia de Buenos Aires (Eyherabide, 2015).

El contenido de Boro (B) para suelos prístinos presenta valores medios de 1,76 mg kg⁻¹, para toda la región. La agricultura redujo significativamente la disponibilidad de B respecto de los suelos prístinos (31% menos de B en suelos agrícolas), siendo los suelos del noreste y suroeste de la provincia, las regiones con menor contenido de B (Sainz Rozas *et al.*, 2013).

En cuanto al contenido de Hierro (Fe), Sainz Rozas, *et al.* (2013), obtuvo valores medios de 74 mg kg⁻¹ para suelos agrícolas y 76 mg kg⁻¹, para suelos prístinos. Eyherabide (2015), determinó un leve aumento de los niveles de Fe extraído con DTPA, por la actividad agrícola, debido probablemente a la acidificación de los suelos. Además, las concentraciones son superiores a los umbrales críticos citados por Sims y Johnson (1991), por lo que no se esperaría deficiencia de este nutriente en el mediano y largo plazo (Eyherabide, 2015).

1.4. Situación actual y análisis de alternativas:

Si bien la provincia de Buenos Aires presenta características edáficas y climáticas apropiadas para el desarrollo de la agricultura, hay una dependencia actual a la fertilización, que incrementa los costos de producción. Debido a la alta extracción de nutrientes por parte de los cultivos, y que en la mayoría de los casos la fertilización se realiza sin previo análisis de suelo para evaluar el estado del cultivo, puede ocurrir que no se alcancen a reponer los nutrientes exportados, llevando a una disminución paulatina de la fertilidad del suelo (Cruzate y Casas, 2012). En otros casos, aplicaciones en exceso, sin considerar los requerimientos del cultivo en los distintos estadios de crecimiento, puede llevar a riesgos de contaminación ambiental, y a una disminución y deterioro de la biodiversidad microbiana afectando el ciclo de nutrientes (Marshall *et al.*, 2011). El desafío es entonces lograr un uso más eficiente de los fertilizantes y la fertilidad del suelo. Esto podría lograrse implementando alternativas sustentables tales como el uso de ciertos microorganismos edáficos que cumplen roles en el ciclo de los nutrientes del suelo cuyas capacidades aún han sido poco dilucidadas. En este sentido, los hongos MA podrían ser una alternativa económicamente atractiva y ecológicamente aceptable.

La infectividad de los hongos MA ha sido relacionada con prácticas de manejo agronómico como: sistemas de cultivo (Johnson *et al.*, 1991; Thompson, 1991; Bagayoko *et al.*, 2000); aplicación de fertilizantes (Joner, 2000; Liu *et al.*, 2000; Covacevich *et al.*, 2006; Astiz Imaz *et al.*, 2014); labranzas (Douds *et al.*, 1995; Kabir *et al.*, 1997; McGonigle y Miller, 2000), e intensidad de uso de la tierra (Oehl *et al.*, 2003; Oehl *et al.*, 2004). Además, el tipo de planta hospedante y su densidad, también pueden afectar la abundancia y diversidad de hongos MA en el suelo (Daniell *et al.*, 2001; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2002; Troeh y Loynachan, 2003).

Estudios en Argentina han informado sobre la presencia de hongos MA nativos. En el sudeste Bonaerense se ha descrito colonización micorrícica espontánea en gramíneas de grano tales como trigo (Covacevich *et al.*, 2007), en pasturas de gramíneas y leguminosas (Covacevich y Echeverría, 2000) y en gramíneas forrajeras como agropiro y festuca (Covacevich *et al.*, 2006). En La Plata, Schalamuk *et al.* (2006, 2007), han determinado una elevada biodiversidad natural de los hongos MA asociados a cultivos de trigo de larga duración tanto en siembra directa como el labranza convencional. En condiciones controladas, la inoculación con cepas no nativas de hongos MA (*Acaulospora* y *Glomus*), juntamente con la fertilización moderada ha incrementado el crecimiento de plantas de trigo y de pasturas de

agropiro y festuca (Covacevich y Echeverría, 2008; 2009). Estudios en condiciones controladas, han reportado efectos benéficos por la formación de micorrizas sobre el crecimiento de cultivos de importancia agrícola (Al-Karaki *et al.*, 2004; Covacevich *et al.*; 2007; Astiz Imaz *et al.*, 2014; Perez, 2014; Thounon Islas *et al.*, 2014; Saia *et al.*, 2015).

Estudios en el Sudeste Bonaerense evidenciaron la presencia de consorcios microbianos con hongos MA nativos, que podrían ser promisorios para promover el crecimiento vegetal. Astiz Imaz *et al.* (2014) determinaron que un consorcio con hongos MA proveniente de un suelo agrícola de Balcarce (provincia de Buenos Aires) con moderados contenidos de P disponible ($18,3 \text{ mg kg}^{-1}$), bajos contenidos de Zn ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) y medios de materia orgánica (5%) incrementó la absorción de Zn y crecimiento de plantas de maíz, más que los consorcios provenientes de sitios prístinos. Por su parte, Thounon Islas *et al.* (2014), determinaron que la inoculación con un consorcio microbiano con hongos MA nativos de un sitio agrícola de Lobería (provincia de Buenos Aires), promovió el crecimiento vegetal temprano en plantas de maíz y tomate. En trigo, Perez (2014), reportó aumentos en el crecimiento aéreo, en plantas inoculadas con dos consorcios con hongos MA nativos de suelos prístinos de la provincia de Buenos Aires. Si bien estos ensayos permitieron evaluar la potencialidad de algunos consorcios microbianos con hongos MA de incrementar el crecimiento vegetal, los mismos fueron exploratorios, testeándose la potencialidad de no más de 2 o 3 consorcios y, en la mayoría de los casos, en períodos cortos de tiempo con una micorrización a veces incipiente. Sería de interés entonces, confirmar la potencialidad de los hongos MA nativos como promotores de crecimiento vegetal en cultivos de importancia agrícola a una escala que cubra la mayor parte de la provincia de Buenos Aires y en períodos de tiempo más prolongados.

Como se mencionó, en las últimas décadas, el incremento en el uso de las técnicas moleculares permitió comprender mejor la filogenia (Schüßler *et al.*, 2001; Schwarzott *et al.*, 2001; Hibbett *et al.*, 2007), ecología (Helgason *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 2002; Appoloni *et al.*, 2008), genética (Gandolfi *et al.*, 2003; Rosendahl y Matzen, 2008), la evolución (Gandolfi *et al.*, 2003) y la simbiosis (Parniske, 2008) de los hongos MA. Las técnicas moleculares han contribuido a la identificación de los hongos MA. Particularmente la técnica de PCR, acoplada a SSCP (Kjøller y Rosendahl, 2000; Jansa *et al.*, 2002; Covacevich, 2010), ha permitido evaluar la variabilidad genética de la región del ADNr a través de polimorfismos conformacionales de cadena única y ha permitido avanzar en la determinación de la diversidad e identidad genética de hongos MA. Los

primeros resultados en nuestro país indicarían que la técnica permite analizar la diversidad de hongos MA pertenecientes a algunos representantes del género *Funneliformis* (= *Glomus*), siendo sensible a pequeños cambios genéticos entre los individuos, permitiendo confirmar la identidad genética de hongos MA, representantes de este género, nativos de la Provincia de Buenos Aires (Thougnon Islas *et al.*, 2016). Si bien Thougnon Islas *et al.* (2016) analizaron la diversidad comparando entre ADN extraído de suelo y de esporas de 7 sitios de la provincia de Buenos Aires bajo condiciones contrastantes, no observaron, contrariamente a lo que se esperaba, diferencias significativas en la diversidad asociada al material genético inicial, ni a la condición de uso de los suelos. Es por esto que aún quedan dudas sobre la potencialidad de la técnica en detectar variaciones en la diversidad de hongos MA asociados a cambios en el uso del suelo y/o sus propiedades edáficas.

Por otra parte, si bien se han reportado efectos depresivos de P y Fe sobre la colonización micorrícica y la abundancia de esporas (Covacevich *et al.*, 2007; Astiz Imaz *et al.*, 2014; Thougnon Islas *et al.*, 2014), no se han encontrado relaciones negativas entre el P y Fe del suelo y el contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) en suelos de la provincia de Buenos Aires (Thougnon Islas *et al.*, 2016). Por otra parte, Covacevich *et al.* (2012a) evidenció que la MO del suelo podría actuar como amortiguadora de los efectos depresivos del P y Fe sobre la capacidad infectiva.

Sería de interés entonces, dilucidar las relaciones entre las características edáficas y los parámetros de actividad (colonización micorrícica, abundancia de esporas y GRSP) y diversidad de hongos MA, confirmando algunos resultados previos, y abarcando una mayor superficie de la provincia de Buenos Aires bajo condiciones de uso de suelo contrastantes.

2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Las **Hipótesis de trabajo** son:

1) El contenido de P y Fe en el suelo se asocian negativamente con la capacidad infectiva, el contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), y la abundancia de esporas de hongos MA nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires, y dichos efectos negativos podrían ser modulados por la MO del suelo.

2) Los consorcios con hongos MA nativos de la provincia de Buenos Aires provenientes de suelos agrícolas son más eficientes para incrementar el crecimiento y nutrición mineral de plantas de interés agronómico, que los provenientes de suelos prístinos.

3) La diversidad genética de hongos MA nativos de la provincia de Buenos Aires es independiente de la condición de uso de suelo.

El **Objetivo General** de este estudio es:

Analizar los cambios en la actividad y diversidad genética de hongos MA nativos de consorcios microbianos de suelos de la provincia de Buenos Aires provenientes de condiciones de uso de suelo contrastantes, con características edáficas distintas, y evaluar su potencialidad como promotores de crecimiento vegetal.

Para cumplir el Objetivo General, se plantean los siguientes **Objetivos Específicos**:

1) Seleccionar a través de la capacidad infectiva, consorcios con hongos MA multiplicados, y evaluar la producción de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) y el número de esporas, y su potencial importancia para incrementar la nutrición y el crecimiento de plantas de interés agronómico.

2) Establecer patrones moleculares para los hongos MA que hayan evidenciado una mayor eficiencia en la promoción de crecimiento vegetal y analizar cambios en su diversidad genética asociados a parámetros edáficos y/o de uso de suelo.

3) Avanzar en la identificación genética de los hongos MA nativos de la Provincia de Buenos Aires.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1. Multiplicación de los hongos MA mediante plantas trampa

3.1.1. Selección de las muestras de suelo

Se seleccionaron muestras de suelo que fueron colectadas (colecta a cargo del Dr. Sainz Rozas, coordinador módulo Caracterización y exploración de deficiencias de meso y micronutrientes en suelos agrícolas, proyecto INTA AERN-295561) de sitios con aptitud agrícola de la provincia de Buenos Aires, cada sitio presentó una condición con y sin actividad agrícola (prístinos). Las muestras fueron colectadas de los primeros 0-20 cm y estuvieron compuestas por 10 submuestras. Las muestras se colectaron del área más representativa de cada lote y fueron georeferenciadas. Para cada sitio, los suelos agrícolas y prístinos seleccionados se encontraban en similar posición de relieve y las sub-muestras se tomaron a no más de 50 m de radio del punto de georeferencia.

Las muestras de suelo fueron caracterizadas químicamente (Laboratorio de Suelos EEA INTA, Balcarce): se determinó el contenido de materia orgánica (MO) (Walkley y Black, 1934), P-Bray (Bray y Kurtz, 1945) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) para los cationes Ca, Mg, Na y K (Chapman, 1965). La determinación del contenido de Fe y Zn disponible con el ácido Dietilentriaminopentaacético-DTPA (Lindsay y Norvell, 1978) con cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica y el B disponible (soluble en agua) determinado según la metodología propuesta por (Bingham, 1982) estuvieron a cargo del Laboratorio Suelo fértil del ACA Pergamino.

A partir de los resultados de los análisis químicos de los suelos, se seleccionaron 23 de un total de 120 sitios de colecta. Las propiedades químicas de las muestras seleccionadas se presentan en la Tabla 1. La selección se realizó a partir de sitios con ubicación espacial diferente de la provincia de Buenos Aires (Figura 4), y con características edáficas contrastantes, particularmente en relación al contenido de P-Bray, MO, Fe y Zn.

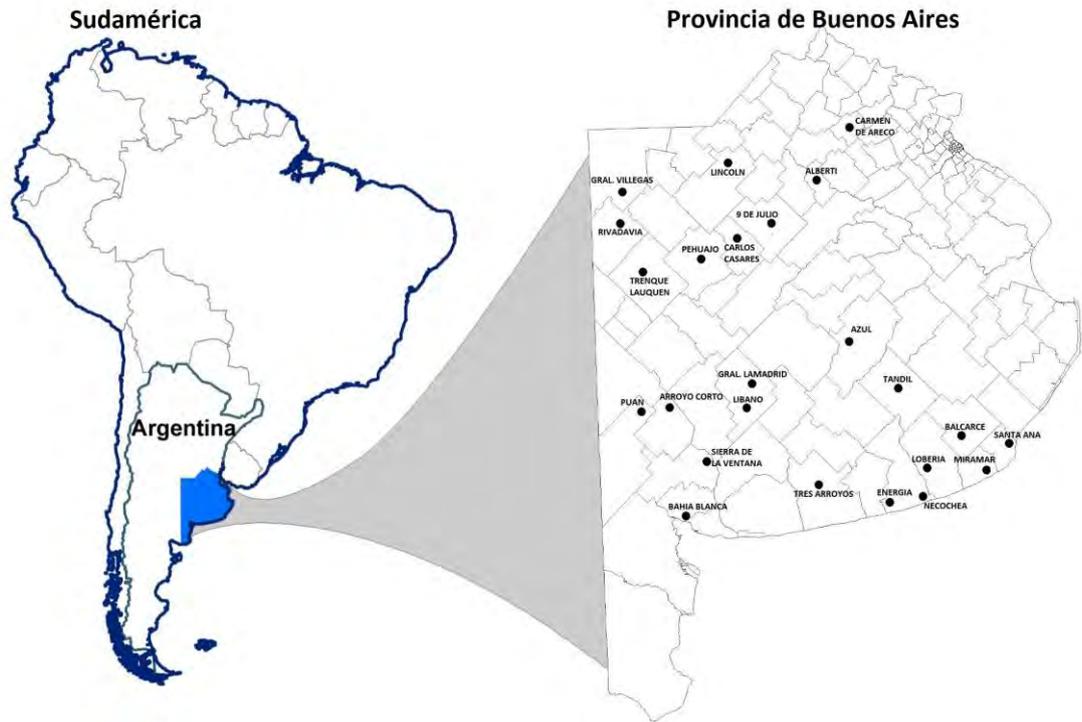


Figura 4. Distribución espacial de las distintas muestras de la provincia de Buenos Aires bajo condiciones contrastantes.

Tabla 1. Ubicación, historia de uso del suelo y características fisicoquímicas de los sitios de colecta de las muestras de suelo. A: agrícola; P: prístino. Análisis químicos: CIC: capacidad de intercambio catiónico; MO: materia orgánica, Zn: contenido de Zn en suelo, Fe: contenido de Fe en suelo, B: contenido de B en suelo, P-Bray: contenido de P-Bray en suelo.

Sitio	Condición	Denominación	Latitud --Grados decimales--	Longitud	CIC (cmol ckg ⁻¹)	Zn ------(mg kg ⁻¹)-----	Fe	B	P-Bray	MO (%)
9 de Julio	A	9dJ-A	-35,545	-60,994	15,2	1,4	94,0	1,8	8,8	2,9
9 de julio	P	9dJ-P	-35,335	-60,902	18,4	4,3	128,6	2,4	35,1	4,9
Alberti	A	Alb-A	-35,019	-60,015	17,2	1,8	106,9	1,9	54,4	3,8
Alberti	P	Alb-P	-35,019	-60,015	16,6	1,7	127,0	2,2	32,9	4,2
Arroyo Corto	A	AC-A	-37,536	-62,220	21,4	1,0	50,8	0,9	29,9	4,0
Arroyo Corto	P	AC-P	-37,536	-62,220	24,8	2,0	58,7	1,2	46,8	5,0
Azul	A	Az-A	-37,144	-59,779	27,6	1,3	122,4	2,4	9,1	6,8
Azul	P	Az-P	-37,144	-59,781	27,2	9,5	44,7	4,1	26,3	7,8
Bahía Blanca	A	BB-A	-38,493	-62,288	17,8	0,9	72,6	0,9	13,7	3,6
Bahía Blanca	P	BB-P	-38,693	-62,161	19,6	0,8	83,5	0,8	58,7	3,5
Balcarce	A	Bal-A	-38,036	-58,252	27,0	0,7	118,9	2,2	14,6	6,9
Balcarce	P	Bal-P	-38,038	-58,258	25,8	1,2	179,3	1,9	17,2	8,0
Carlos Casares	A	CC-A	-35,762	-61,221	17,0	1,5	85,0	2,0	20,0	3,8
Carlos Casares	P	CC-P	-35,759	-61,225	19,0	2,6	97,8	1,7	27,8	5,0
Energía	A	En-A	-38,552	-59,302	21,0	1,0	101,8	1,1	22,2	4,4
Energía	P	En-P	-38,552	-59,302	19,4	3,9	49,1	1,8	12,6	4,9
General Villegas	A	GV-A	-35,093	-62,809	13,0	1,0	45,6	1,5	141,9	2,5
General Villegas	P	GV-P	-35,094	-62,809	13,2	3,0	93,4	1,8	146,7	3,6
Lamadrid	A	Lam-A	-37,039	-61,121	20,8	0,8	86,6	1,2	7,5	3,9
Lamadrid	P	Lam-P	-37,039	-61,121	17,8	5,3	152,4	2,1	21,5	5,4
Libano	A	Lib-A	-37,600	-61,083	23,4	0,7	43,4	0,8	12,9	3,1
Libano	P	Lib-P	-37,579	-61,355	21,8	8,3	142,0	2,3	47,9	7,6
Lincoln	A	Lin-A	-34,749	-61,193	12,8	1,7	101,2	1,2	24,5	2,7
Lincoln	P	Lin-P	-34,749	-61,193	17,4	12,9	32,0	4,1	246,7	2,9

(Continúa)

Tabla 1 (Continuación)

Sitio	Condición	Denominación	Latitud --Grados decimales--	Longitud	CIC (cmol ckg ⁻¹)	Zn -----	Fe (mg kg ⁻¹)	B -----	P-Bray -----	MO (%)
Lobería	A	Lob-A	-37,917	-58,676	27,8	1,6	124,5	2,3	40,6	5,6
Lobería	P	Lob-P	-37,891	-58,665	27,6	1,9	175,4	2,8	31,4	6,8
Miramar	A	Mir-A	-38,299	-58,215	16,2	1,7	233,0	2,1	10,2	4,4
Miramar	P	Mir-P	-38,289	-58,216	29,6	5,6	75,9	2,2	39,9	6,6
Necochea	A	Nec-A	-38,364	-58,633	31,4	1,5	167,5	3,0	18,1	5,2
Necochea	P	Nec-P	-38,377	-58,527	22,6	1,9	173,6	3,0	18,8	6,0
Pehuajo	A	Pe-A	-35,956	-62,227	13,8	1,0	176,5	2,5	34,2	3,1
Pehuajo	P	Pe-P	-35,949	-62,230	14,2	1,5	88,2	2,4	29,1	5,2
Puán	A	Pu-A	-37,997	-63,042	29,6	0,8	41,7	1,0	30,5	4,0
Puán	P	Pu-P	-37,997	-63,042	22,0	0,8	17,2	1,7	39,4	3,2
Rivadavia	A	R-A	-35,956	-63,227	11,8	0,9	45,8	1,9	27,2	1,9
Rivadavia	P	R-P	-35,960	-63,215	7,4	0,6	53,4	1,7	74,2	1,7
Santa Ana	A	SA-A	-37,907	-57,627	24,6	2,7	190,9	1,6	34,0	5,7
Santa Ana	P	SA-P	-37,912	-57,631	24,2	9,9	172,7	2,2	113,9	7,2
Sierra de la Ventana	A	SdIV-A	-38,110	-61,807	18,2	1,0	87,3	0,9	27,3	2,7
Sierra de la Ventana	P	SdIV-P	-38,110	-61,807	17,6	1,9	45,6	0,9	56,6	3,8
Tandil	A	Ta-A	-37,451	-58,943	25,2	1,5	153,5	2,5	19,1	5,4
Tandil	P	Ta-P	-37,451	-58,939	21,2	1,4	113,1	2,2	36,4	6,0
Trenque Lauquen	A	TL-A	-36,053	-62,914	11,8	0,7	101,9	2,3	18,6	2,2
Trenque Lauquen	P	TL-P	-36,045	-62,905	13,6	1,1	123,4	3,1	32,8	2,9
Tres Arroyos	A	3Arr-A	-38,260	-60,245	19,8	0,6	75,0	1,0	18,5	3,5
Tres Arroyos	P	3Arr-P	-38,260	-60,245	20,8	3,1	104,1	1,6	26,4	6,1

3.1.2. Determinación de la Colonización micorrícica:

Se realizó un Diseño Completamente Aleatorizado con arreglo factorial (23 localidades, 2 condiciones) y 4 repeticiones, donde el suelo nativo fue utilizado para la multiplicación de propágulos de hongos MA (esporas, segmentos de hifas, raíces micorrizadas) y microbiota acompañante mediante la estrategia de plantas trampa. Se utilizaron macetas de 100 mL compuestas por una mezcla de raigrás (*Lolium multiflorum* Lam.) y trébol blanco (*Trifolium repens*) (2:1 v:v) esterilizadas (3 enjuagues; etanol 90% 3 min, 3 enjuagues; NaClO al 3,5% , enjuague y secado a 20°C, 48 h; todos los enjuagues con H₂O destilada estéril, 2 min c/u), crecidas en sustrato compuesto por suelo (nativo): perlita (autoclavada 1 h, 120°C): vermiculita (autoclavada 1 h, 120°C) (2:1:1 v:v:v). Una vez emergidas, las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento (Laboratorio de Microbiología de Suelos-Unidad Integrada Facultad de Ciencias Agrarias - Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce 12 h luz/12 h oscuridad; 23°C) y regadas diariamente con agua destilada y con solución Hoagland (P al 50%) cada dos semanas. Luego de 24 semanas las plantas fueron desmontadas, parte de las raíces lavadas con agua y procesadas para la tinción con Azul tripán usando una modificación de la metodología propuesta por Phillips y Hayman (1970), en la que se ha omitido la utilización de fenol en los reactivos. Para ello, las raíces limpias fueron clarificadas con KOH 10% (30 min, 60°C), enjuagadas con agua, acidificadas (HCl 0,1 N), enjuagadas con agua y teñidas con azul tripán (0,05%) en lactoglicerol (ácido láctico, glicerol, agua destilada 1:1:1, 15 min, 50°C). Las raíces teñidas fueron cortadas en segmentos de 1cm y montadas en portaobjetos. Se realizó la cuantificación microscópica (Trouvelot, 1986) del grado de colonización micorrícica presente en las raíces registrando los segmentos de raíz colonizados con estructuras de hongos MA (hifas, arbusculos). A partir de la relación entre las observaciones donde se registraron estructuras de hongos MA y las observaciones totales, se calculó contenido de Arbusculos (Ar%) y la Capacidad Infectiva (MA%) de acuerdo a los cálculos descriptos en http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html.

El sustrato y las raíces restante fueron secados (oscuridad, temperatura ambiente) y conservados para posteriores usos y determinaciones.

3.1.3. Cuantificación del número de esporas:

Del sustrato proveniente de las plantas trampa, se seleccionaron aquellos sitios que presentaran MA% mayor al 45% en alguna de las dos condiciones evaluadas. En total,

se seleccionaron 11 sitios, cada uno con su condición agrícola y prístina, dando un total de 22 muestras (consorcios multiplicados en planta trampa).

Los sitios seleccionados fueron los siguientes:

- Arroyo Corto: - Condición Agrícola (AC-A)
- Condición Prístina (AC-P)
- Azul: - Condición Agrícola (Az-A)
- Condición Prístina (Az-P)
- Bahía Blanca: - Condición Agrícola (BB-A)
- Condición Prístina (BB-P)
- Libano: - Condición Agrícola (Lib-A)
- Condición Prístina (Lib-P)
- Lobería: - Condición Agrícola (Lob-A)
- Condición Prístina (Lob-P)
- Miramar:- Condición Agrícola (Mir-A)
- Condición Prístina (Mir-P)
- Necochea:- Condición Agrícola (Nec-A)
- Condición Prístina (Nec-P)
- Puán: - Condición Agrícola (Pu-A)
- Condición Prístina (Pu-P)
- Rivadavia - Condición Agrícola (R-A)
- Condición Prístina (R-P)
- Trenque Lauquen: - Condición Agrícola (TL-A)
- Condición Prístina (TL-P)
- Tres Arroyos: - Condición Agrícola (3Arr-A)
- Condición Prístina (3Arr-P)

De cada una de las muestras se tomó una submuestra de 40 g de sustrato, que fue procesada para la extracción de esporas de hongos MA mediante la técnica de tamizado en húmedo y decantado (Gerdemann y Nicolson, 1963) empleando tamices de distinto tamaño de malla: 450, 124, 53 y 37 μm , y centrifugación en gradiente de sacarosa al 60% (http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fma_metodos_extracao_de_esporos.html).

Se observó en lupa estereoscópica, se contabilizó el número de esporas de hongos MA presente en cada muestra que evidenciaron contenido interno y se calculó la abundancia (A_x) de acuerdo a la siguiente relación:

$Ax = n^{\circ}$ de esporas /100 g de suelo

Las esporas colectadas fueron conservadas a -20°C en agua destilada estéril para su utilización en posteriores análisis moleculares.

3.1.4. Cuantificación del contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), glomalina fácilmente extraíble:

Los sustratos de los sitios a los cuales se les extrajeron las esporas fueron utilizados para determinar el contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), fácilmente extraíble (Wright y Upadhyaya, 1996). Para ello, 1 g del sustrato, proveniente de las plantas trampa, fue mezclado con 8 mL de citrato de sodio tribásico dihidratado 20 mM ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH}=7.0$) en tubos tipo falcon de 50 mL. Los tubos fueron autoclavados por 30 min a 121°C e inmediatamente centrifugados (3500 rpm; 15 min). El contenido de proteínas en el sobrenadante fue determinado por el método de Bradford (reacción colorimétrica) y luego cuantificado por espectrometría (absorbancia a 595 nm), usando suero de albúmina bovina (BSA) como estándar (Gadkar y Rillig, 2006; Rosier *et al.*, 2006).

3.2.- Ensayos de inoculación en invernáculo

Se seleccionaron 10 sitios cuya microbiota fue multiplicada en plantas trampa, que hubieran presentado capacidad infectiva superior al 45% en al menos uno de las dos condiciones estudiadas. Los consorcios (a partir de ahora denominados inóculos) fueron utilizados en dos ensayos en invernáculo destinado a evaluar la capacidad promotora de crecimiento en maíz y trigo.

3.2.1. Preparación del sustrato de las macetas:

Cada una de las macetas (volumen=3 L) utilizadas en los ensayos de eficiencia en invernáculo, fueron llenadas con un sustrato compuesto por suelo:arena:perlita estériles.

Para obtener el suelo esterilizado, se erradicaron los propágulos de hongos MA de acuerdo a Covacevich y Echeverría (2003). Se utilizaron bolsas de polietileno que contenían suelo perteneciente al horizonte superficial de un Argiudol típico extraído de la EEA INTA Balcarce a los cuales se les adicionó solución acuosa de formaldehído a una proporción 10 μL de formaldehído/g. Transcurridas 24 horas, el suelo fue ventilado (40 días a temperatura ambiente) hasta la completa evaporación del formaldehído luego de lo cual fue molido manualmente y tamizado (malla: 2 mm). La arena utilizada

consistió en arena de río, que fue lavada tres veces con agua corriente, y luego junto con la perlita, autoclavada (15 minutos a 121°C y 1 atm). El suelo formolizado fue mezclado con la arena y perlita estériles en proporción 2:1:1 (suelo:perlita:arena).

3.2.2. Establecimiento de los ensayos:

Las unidades experimentales consistieron en tubos de PVC (10 cm de diámetro y 40 cm de longitud, volumen=3 L) que fueron llenados con el sustrato (acondicionado según fue indicado en el punto 3.2.1).

El ensayo de Trigo se instaló el 1 de Julio de 2014, en un invernáculo de la EEA INTA Balcarce. En el mismo invernáculo, el 31 de Octubre de 2014 se instaló el ensayo de maíz. En ambos casos, se utilizó un diseño en Bloques completos aleatorizados, con 22 tratamientos (20 inóculos (10 localidades x 2 condiciones) y dos testigos (uno para cada condición)) y 3 bloques, dando un total de 66 unidades experimentales. Los inóculos seleccionados, fueron remultiplicados por 12 semanas en macetas de 500 mL en cámara de crecimiento.

Los tratamientos en ambos ensayos quedaron conformados de la siguiente manera:

- Trigo o Maíz inoculado con Arroyo Corto-Agrícola (AC-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Arroyo Corto-Prístino (AC-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Azul-Agrícola (Az-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Azul- Prístino (Az-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Bahía Blanca-Agrícola (BB-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Bahía Blanca-Prístino (BB-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Libano-Agrícola (Lib-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Libano-Prístino (Lib-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Lobería-Agrícola (Lob-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Lobería-Prístino (Lob-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Miramar-Agrícola (Mir-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Miramar-Prístino (Mir-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Puán-Agrícola (Pu-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Puán-Prístino (Pu-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Rivadavia-Agrícola (R-A)
- Trigo o Maíz inoculado con Rivadavia-Prístino (R-P)
- Trigo o Maíz inoculado con Trenque Lauquen-Agrícola (TLA)
- Trigo o Maíz inoculado con Trenque Lauquen-Prístino (TLP)
- Trigo o Maíz inoculado con Tres Arroyos-Agrícola (3Arr-A)

- Trigo o Maíz inoculado con Tres Arroyos-Prístino (3Arr-P)
- Trigo o Maíz no inoculado (testigo) - Agrícola (No Inoc-A)
- Trigo o Maíz no inoculado (testigo) - Prístino (No Inoc-P)

3.2.2.1. Ensayo en Trigo:

En el ensayo de Trigo, se sembraron tres semillas (Buck SY 300) por maceta en tres repeticiones. Una vez emergidas, las plantas fueron raleadas a 1 planta por maceta. La inoculación con los consorcios con hongos MA se realizó en dos etapas: a la siembra y a los 20 días después de la siembra (DDS). En la inoculación a la siembra, se colocaron 15 g de inóculo en los 5 cm superiores antes de finalizar el llenado de las macetas y sobre el cual se colocó la semilla, finalmente se completó el llenado de las macetas con el sustrato utilizado en todas las unidades experimentales. En la inoculación posterior, se colocaron 5 g de inóculo en la superficie del sustrato de las macetas.

Los tratamientos no inoculados recibieron a los 20 DDS un filtrado bacteriano resultante de la combinación de los inóculos proveniente de cada condición, destinado a equilibrar la carga bacteriana con los tratamientos inoculados. Para ello se realizaron dos filtrados separadamente (uno proveniente de los inóculos agrícolas y otro de los prístinos) como se describe: 2 g de cada inóculo fueron homogeneizados por agitación (10 minutos) en 100 mL de agua destilada estéril. La suspensión fue filtrada (filtro Whatman N° 2) obteniéndose al menos 90 mL de filtrado, el que fue distribuido equitativamente en cada maceta no inoculada (13 mL maceta⁻¹). En este sentido, los testigos No Inoculado-A y No Inoculado-P solo recibieron filtrado bacteriano resultante de la mezcla de los inóculos de las situaciones agrícola y prístina, respectivamente. El ensayo se regó con agua destilada cada 48 h, y a los 25 DDS, fueron regadas con 25 mL con solución Hoagland (P al 50%).

A los 60 DDS se realizó la medición del Índice de verdor (IV-60DDS) registrando 5 lecturas de SPAD en cada planta individual utilizando un SPAD MINOLTA 502 (KONIKA MINOLTA, JAPAN). Luego, las plantas fueron desmontadas y se separó la parte aérea, de la radical y del sustrato.

En parte aérea, se realizó la determinación del Área foliar (AF), Peso fresco aéreo (PFA) y Peso seco aéreo (PSA). Para la determinación del AF, hojas y tallos frescos fueron procesados utilizando un planímetro LI-3100 AREA METER (LI-COR, USA). Posteriormente el material vegetal fue pesado, y luego llevado a estufa a 60°C durante 72 h y se realizó la cuantificación de PSA por gravimetría.

En el material radical, se determinó la colonización micorrícica (MA% y Ar%). Para ello, las raíces fueron lavadas con agua a efectos de eliminar todas las partículas de suelo, conservadas en alcohol 70% hasta su procesamiento y luego fueron teñidas y cuantificadas de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.2.

Para aquellas variables donde hubo efecto de los tratamientos, se calculó la respuesta a la inoculación (RI), de acuerdo a Cavagnaro *et al.* (2003). En la siguiente ecuación se presenta, a modo de ejemplo, la RI para un parámetro:

$$RI_{(PAmi)} = \frac{(PAmi(I_{mi}) - \text{media } PAmi(\text{No Inoc}_{mi}))}{\text{media } PAmi(\text{No Inoc}_{mi})} \times 100$$

Donde:

- $PAmi(I)$ corresponde al parámetro individual de las plantas inoculadas con cada uno de los inóculos con hongos MA correspondiente a una de las dos condiciones testeadas (mi),

- $\text{media } PAmi(\text{No Inoc}_{mi})$ corresponde al valor promedio del parámetro individual de las plantas No Inoculadas correspondiente a una de los dos condiciones testeados (mi),

3.2.2.2. Ensayo en Maíz:

Se sembraron tres semillas de maíz (hibrido DK 670) por maceta. Una vez emergidas, las plantas fueron raleadas a 1 planta por maceta.

La inoculación con los consorcios con hongos MA se realizó en dos etapas: a la siembra y a los 20 DDS. Debido a que la colonización obtenida del ensayo de trigo fue menor a la esperada, se adicionó una mayor cantidad de inóculo (10 g más que en trigo) a las macetas de maíz. En la inoculación de la siembra, se procedió a colocar 20 g del inóculo en los 5 cm superiores antes de finalizar el llenado de las macetas y sobre el cual se colocó la semilla, finalmente se completó el llenado de las macetas con el sustrato utilizado en todas las unidades experimentales. En la inoculación posterior, se colocaron 10 g del inóculo en la superficie del sustrato de las macetas.

Al igual que en el trigo, los sustratos-plantas de los tratamientos no inoculados recibieron un filtrado bacteriano a los 20 DDS proveniente de cada condición de uso del suelo, destinado a equilibrar la carga bacteriana con los tratamientos inoculados.

El ensayo se regó con agua destilada cada 48 h, y a los 25 DDS, fueron regadas con 25 mL con solución Hoagland (P al 50%).

A los 25 DDS y 46 DDS, se realizó la medición del Índice de verdor (IV-25DDS y IV-46DDS, respectivamente) registrando 5 lecturas de SPAD en cada planta individual de cada maceta utilizando un SPAD MINOLTA 502 (KONIKA MINOLTA, JAPAN).

A los 46 DDS, las plantas fueron desmontadas y se separó la parte aérea, de la radical y del suelo.

En parte aérea, se realizó la determinación del AF, PFA y PSA, mientras que en parte radical la determinación de MA% y Ar% procediendo como fue descrito para el ensayo de trigo (sección punto 3.2.2.1). En parte radical, además se determinó peso fresco de raíces (PFR).

Para aquellas variables donde hubo efecto de los tratamientos, se calculó la respuesta a la inoculación (RI), de acuerdo a Cavagnaro *et al.* (2003) de manera similar a lo descrito en la sección 3.2.2.1.

3.3.- Determinación de la diversidad de los hongos MA mediante técnicas moleculares

3.3.1. Extracción de ADN:

Se realizó la extracción del ADN tanto de las muestras de suelo provenientes de las plantas trampa (sección 3.1.2) como de las esporas de hongos MA colectadas en la sección 3.1.3. La extracción de ADN de las muestras de suelo, se realizó en aquellos inóculos (22) que presentaron MA% superior al 45%. A continuación se describen las 22 muestras de suelo de planta trampa a las que se les realizó extracción de ADN:

- Arroyo Corto: - Condición Agrícola (ACA-s)
 - Condición Prístina (ACP-s)
- Azul: - Condición Agrícola (AzA-s)
 - Condición Prístina (AzP-s)
- Bahía Blanca: - Condición Agrícola (BBA-s)
 - Condición Prístina (BBP-s)
- Libano: - Condición Agrícola (LibA-s)
 - Condición Prístina (LibP-s)
- Lobería: - Condición Agrícola (LobA-s)
 - Condición Prístina (LobP-s)
- Miramar:- Condición Agrícola (MirA-s)
 - Condición Prístina (MirP-s)
- Necochea:- Condición Agrícola (NecA-s)

- Condición Prístina (NecP-s)
- Puán: - Condición Agrícola (PuA-s)
 - Condición Prístina (PuP-s)
- Rivadavia - Condición Agrícola (RA-s)
 - Condición Prístina (RP-s)
- Trenque Lauquen: - Condición Agrícola (TLA-s)
 - Condición Prístina (TLP-s)
- Tres Arroyos: - Condición Agrícola (3ArrA-s)
 - Condición Prístina (3ArrP-s)

La extracción del ADN de las esporas se realizó en 7 muestras, las que resultaron de los tratamientos cuyos inóculos ocasionaron las mayores respuestas de crecimiento en los ensayos de maíz y trigo, según se detalla:

- Azul: Condición Prístina (AzP-sp)
- Bahía Blanca: Condición Prístina (BBP-sp)
- Libano: Condición Prístina (LibP-sp)
- Lobería: Condición Prístina (LobP-sp)
- Necochea: Condición Prístina (NecP-sp)
- Puán: Condición Prístina (PuP-sp)
- Trenque Lauquen: Condición Prístina (TLP-sp)

Para la extracción del ADN del suelo, se utilizó el kit comercial de extracción de ADN para suelo *MO BIO Power Soil DNA Isolation Kit*, donde 250 mg del suelo seco y mezclado proveniente de las plantas trampa fueron utilizados según las instrucciones descriptas por el fabricante.

Para la extracción del ADN de las esporas, de cada muestra se colectaron al menos 100 esporas de aspecto viable. El ADN de las esporas fue extraído utilizando el *kit MO BIO Power Soil DNA Isolation Kit* modificado. Previo al protocolo indicado por el fabricante, las esporas fueron maceradas utilizando un micropistilo estéril en el primer buffer de extracción del protocolo. Posteriormente se continuó con el procedimiento indicado por el fabricante.

Se visualizó bajo luz UV la integridad del ADN en geles de agarosa a 1%, buffer TBE, teñidos con GelRed®.

3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa:

Las muestras de ADN fueron amplificadas en la región ribosomal mayor (LSU, Figura 5) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizó la estrategia de PCR anidada (*nested PCR*), lo cual es habitual para la amplificación de sectores del genoma de hongos MA (Sharmah *et al.*, 2010). En la primera reacción de PCR se amplificó parte de la subunidad ribosomal mayor (28S ADNr) de Hongos utilizando el par de primer LSU0061/LSU0599 (5'-AGCATATCAATAAGCGGAGGA-3'/5'-TGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'), con el objetivo de obtener un fragmento amplificado de la subunidad ribosomal mayor (28S ADNr) de Hongos de aproximadamente 750 pb (Van Tuinen *et al.*, 1998). Mientras que en la segunda reacción se amplificó parte de la subunidad ribosomal mayor (28S ADNr) del genero *Glomus* usando el par de primers LSURk4f/LSURk7r (5'-GGGAGGTAAATTTCTCCTAAGGC-3'/5'-ATCGAAGCTACATTCCTCC-3') reportados por amplificar fragmentos de aproximadamente 300 pb de la subunidad ribosomal mayor (28S ADNr) de individuos pertenecientes al género *Glomus* (*Funneliformis mosseae* = *Glomus mosseae*; *Glomus caledonium* y *Glomus geosporum*) (Kjøller y Rosendahl, 2000; Rosendahl y Stukenbrock, 2004).

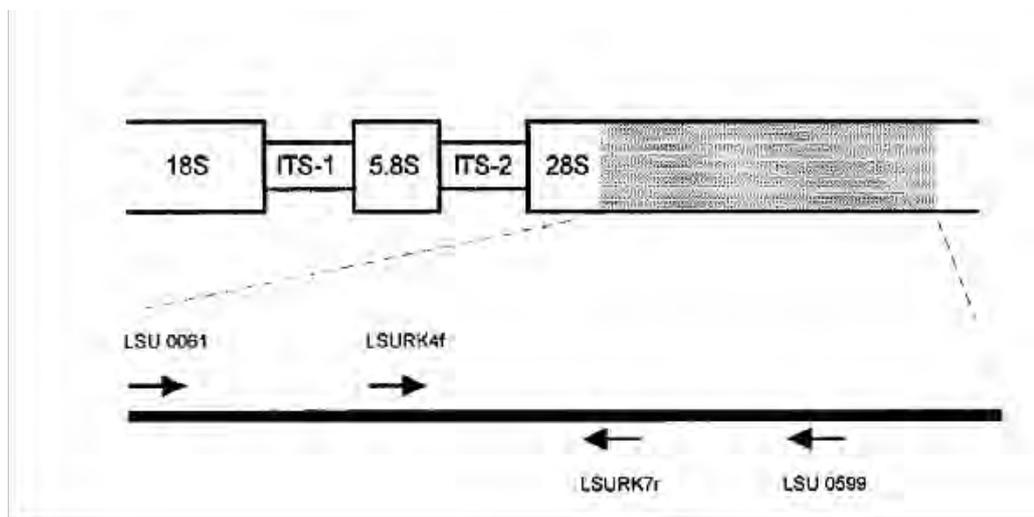


Figura 5. Regiones ribosomales de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares. 18S: región ribosomal menor, ITS: región intergénica, 28S: región ribosomal mayor. Se indica localización aproximada de hibridación de los primers utilizados en este estudio. (Extraído de Kjøller y Rosendahl, 2000).

Tanto para la primera como para la segunda reacción de PCR, las reacciones fueron preparadas con el templado (5 µL), MgCl₂ Buffer (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), Primer f (0,03 µM), Primer r (0,03 µM), Taq Polimerasa 1 U (GoTaq® DNA Polymerase Promega) y luego fueron ajustadas a un volumen final de 25 µL con agua ultrapura.

Controles negativos en cada reacción fueron utilizados agregando 3 μ L de agua ultrapura como templado, de manera de detectar cualquier posible contaminación.

La reacción de PCR fue realizada en el Laboratorio de Patología Vegetal, de la EEA INTA Balcarce. El programa utilizado para la primer reacción de PCR consistió en: una desnaturalización inicial (2 min a 94 °C); 30 ciclos de: desnaturalización (1 min a 94 °C), hibridación (1 min a 53 °C) y extensión (5 min a 72 °C); y una extensión final (7 min a 72 °C, con enfriamiento a 4 °C una vez terminado el programa).

Debido a que la cantidad de producto amplificado en la primera reacción de PCR fue variable entre muestras, se procedió a realizar diluciones para ser usadas luego como templado en la segunda reacción. Para todas las muestras provenientes de esporas se utilizaron 3 μ L de producto de PCR sin diluir (por presentar bajo contenido de ADN). Para las muestras que presentaban bandas de intensidad media (todas las provenientes de suelo excepto ACP-s, NecA-s y NecP-s), se realizó una dilución 1/5, mientras que para aquellas muestras que presentaban mayores contenidos de ADN se realizó una dilución 1/20 y luego fueron utilizados 5 μ L de esa dilución (ACP-s y NecP-s) y 1 μ L de esa dilución (NecA-s, que presentó la banda de mayor intensidad y por lo tanto mayor contenido de ADN).

Las condiciones de la segunda reacción en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial (2 min a 94 °C); 25 ciclos de: desnaturalización (1 min a 94 °C), hibridación (1 min a 60 °C) y extensión (1 min a 72 °C); y una extensión final (7 min a 72 °C, con enfriamiento a 4 °C una vez terminado el programa). Todos los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (1,0% w/v agarosa; 100 V, 45 min) teñidos con Gel Red®, y luego visualizados bajo luz UV. Se consideraron resultados positivos, para cada muestra y par de primer utilizado, la aparición de bandas en los geles de agarosa ubicadas en posición correspondiente al tamaño esperado, de acuerdo a comparación marcador de peso molecular, por observación bajo luz UV.

3.3.3. Análisis por SSCP- Cálculo de Índice de diversidad:

Los productos de la PCR (denominados amplificados) generados por los primers LSUrk4f y LSUrk7r, fueron posteriormente corridos por electroforesis vertical en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida de acuerdo a la estrategia SSCP, usando el Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, USA). Para ello, 5 μ L del producto amplificado resultante de la segunda reacción de PCR fueron mezclados con 3 μ L de loading buffer (95% formamida; 0,05% azul bromo fenol; 0,05% xylene cyanol

FF; y 20 mM EDTA), desnaturalizadas por 5 min a 95 °C y mantenidas en hielo hasta su uso (aproximadamente 10 min más tarde). Las muestras fueron sembradas en un gel de 1mm de espesor de 0,5X MDE Cambrex, Rockland ME, USA. La corrida electroforética fue realizada a 10°C, por 4 min a 8 W, 2000 V y luego por 4 horas a 8 W, 300 V. Los geles de SSCP fueron teñidos con plata de acuerdo a lo descrito por Benbouza *et al.* (2006) escaneados y luego analizados utilizando el software Phoretix 1D PRO (Nonlinear Dynamics, United Kingdom). Con los patrones de bandas obtenidos de los geles SSCP se realizaron matrices binarias (construidas a partir de presencia o ausencia de bandas), considerando sus posiciones e intensidad en el gel. Luego, con el software Darwin v.6.0.10 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) se calculó el Índice de Disimilitud utilizando el algoritmo Dice para la presencia / ausencia de las bandas, con 100 bootstraps. Luego, se construyó un árbol de similitudes por método NJ (Neighbor-joining) utilizando el mismo software. El patrón de bandas del gel SSCP fue también utilizado para calcular la diversidad de los hongos MA mediante el índice de Shannon-Weaver (H) (Mingguí *et al.*, 2012) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

donde $P_i = N_i/N$,

- N_i es la abundancia del *i-ésimo* ribotipo,
- N es la abundancia total de todos los ribotipos en la muestra (Línea-columna del gel SSCP).

La abundancia de las bandas en el gel SSCP, fueron obtenidas por el software Phoretix 1D PRO de acuerdo a la intensidad que tenía cada banda.

3.3.4. Secuenciamiento:

Algunas bandas de interés del gel SSCP fueron cortadas, resuspendidas en 30 μ L de agua ultrapura por 1 hora a 60°C y centrifugadas por 1 min at 10000 rpm, con el fin de liberar el ADN contenido en el gel. 5 μ L del sobrenadante de cada muestra (banda cortada-ADN extraído) se utilizaron como templado de una reacción de amplificación por PCR en la que se utilizó el par de primers LSU Rk4f/LSU Rk7r y las condiciones previamente descritas (sección 3.3.2). El éxito de la re amplificación fue verificado mediante corrida electroforética de los productos de PCR en gel de agarosa como fue previamente descrito (sección 3.3.2). Las muestras que evidenciaron amplificación

positiva y tamaño de banda esperado fueron purificados mediante el kit Wizard® Sr Gel and PCR Clean-up System (Promega). El producto amplificado y purificado fue enviado a servicio de secuenciamiento (Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología CICVyA - CNIA - INTA). El secuenciamiento se realizó mediante electroforesis capilar en un Secuenciador Genetic Analyzer 3500 xl (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente mediante el software Bioedit Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html/bioedit.com) y luego fueron comparadas con secuencias presentes en la base de datos GenBank que presentaban alto porcentaje de similitud, mediante el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) ([://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Las secuencias de hongos MA obtenidas, fueron depositadas en la EMBL Nucleotide Sequence Database bajo los números de acceso KT950816 a KT950826 (disponibles online).

Las secuencias con alta similitud, que representaban a las clases más importantes de hongos MA fueron descargadas: Uncultured Glomeromycota clone S_C311.01 (KM879816); Uncultured *Rhizophagus* clone GT002-13 (HF970313); Uncultured Glomus clone FW4-10 (HE858415); Uncultured *Glomus* clone YJ1510 (HQ680447); Uncultured Glomeromycota clone IIO126 (HQ12668); Uncultured Glomeromycota clone RHC2_8 (KM208177); Glomeromycota sp. JB-2014d (KJ564156); *Glomus microaggregatum* (AF389021); Uncultured Glomerales clone H3_42 (KC410961); Glomus sp. ISC-2014 (HG938304); Uncultured *Glomus* clone ZHwq2-391 (HQ243183); *Rhizophagus intraradices* (KF836955); *Glomus intraradices* (= *Rhizophagus intraradices*) (X99640); Uncultured Glomeromycete clone CSN-R67 (AM947899); *Rhizophagus* sp. JB-2014 (KJ210828); y Uncultured Glomeromycota clone TLSA3 (KJ920202). Secuencias de *Acaulospora lacunosa* (AJ510231), *Gigaspora margarita* (AJ852014) y *Scutellospora calospora* (AJ510230) fueron utilizados como outgroups.

Se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias de genes mediante el software MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). El método biparamétrico de Kimura se utilizó para estimar las distancias y la historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor-Joining, obteniendo un árbol consenso de 1000 réplicas.

3.4. Análisis estadístico:

Los resultados de capacidad infectiva, abundancia de esporas, GRSP y de las variables cuantificadas en los distintos de ensayos de eficiencia, fueron analizados por Análisis de la Varianza (ANOVA). Cuando los p-valores fueron significativos, las diferencias de medias fueron comparadas mediante el Test de Tukey utilizando el procedimiento *HSD.test* del paquete *agricolae* del software R (R Core Team, 2012).

Se establecieron relaciones lineales entre los parámetros microbiológicos obtenidos (MA%, Ar%, Esporas y GRSP), y los parámetros de suelos originales de las muestras.

Se establecieron relaciones lineales entre las variables medidas en las plantas de maíz y trigo y la MA% y el Ar% de las raíces de las mismas.

Se realizó el Análisis de Componentes Principales (ACP) incluyendo los parámetros químicos de los suelos, de actividad (MA%, Ar%, Esporas y GRSP) y diversidad (H) de hongos MA utilizando el programa CANOCO (CANOCO for Windows v4.0; Microcomputer Power, Ithaca, NY).

4.- RESULTADOS

4.1. Colonización micorrícica de los hongos MA

En todas las localidades y bajo las distintas condiciones de uso de suelo se comprobó la colonización micorrícica en la raíces de las planta trampa por observación de estructuras características de hongos MA (hifas, arbusculos y vesículas) en las células corticales de la raíz (Figura 6).

El análisis estadístico evidenció interacciones Localidad x Condición para la capacidad infectiva y el contenido de arbusculos (Tabla 2). Por esta razón se analizaron, para ambas variables, las diferencias entre condiciones para cada localidad, así como entre localidades para cada una de las condiciones.

Tabla 2. Análisis de varianza de los parámetros de colonización micorrícica (MA% y Ar%) de los cultivos trampa.

VARIABLE	FUENTE	GL	ANOVA SS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	P-valor
MA%	LOCALIDAD	22	22693,2	1031,5	4,9606	1,86.10 ⁻⁹ ***
	CONDICION	1	186,2	186,2	0,8954	0,3457
	LOC*COND	22	30622,5	1391,9	6,6939	4,48.10 ⁻¹³ ***
	ERROR	136	28280	207,9		
Ar%	LOCALIDAD	22	5060,7	230,0	4,052	1,97.10 ⁻⁷ ***
	CONDICION	1	81,0	81,0	1,4267	0,2344
	LOC*COND	22	6585,7	299,3	5,2731	3,93.10 ⁻¹⁰ ***
	ERROR	136	7720,1	56,7		

El porcentaje de micorrización (indicador de la capacidad infectiva) se mantuvo entre el rango de 0,9% a 72,8% de MA%, siendo los mayores valores registrados para las plantas crecidas en suelo de Nec-P y los menores en los de Bal-A (Tabla 3).

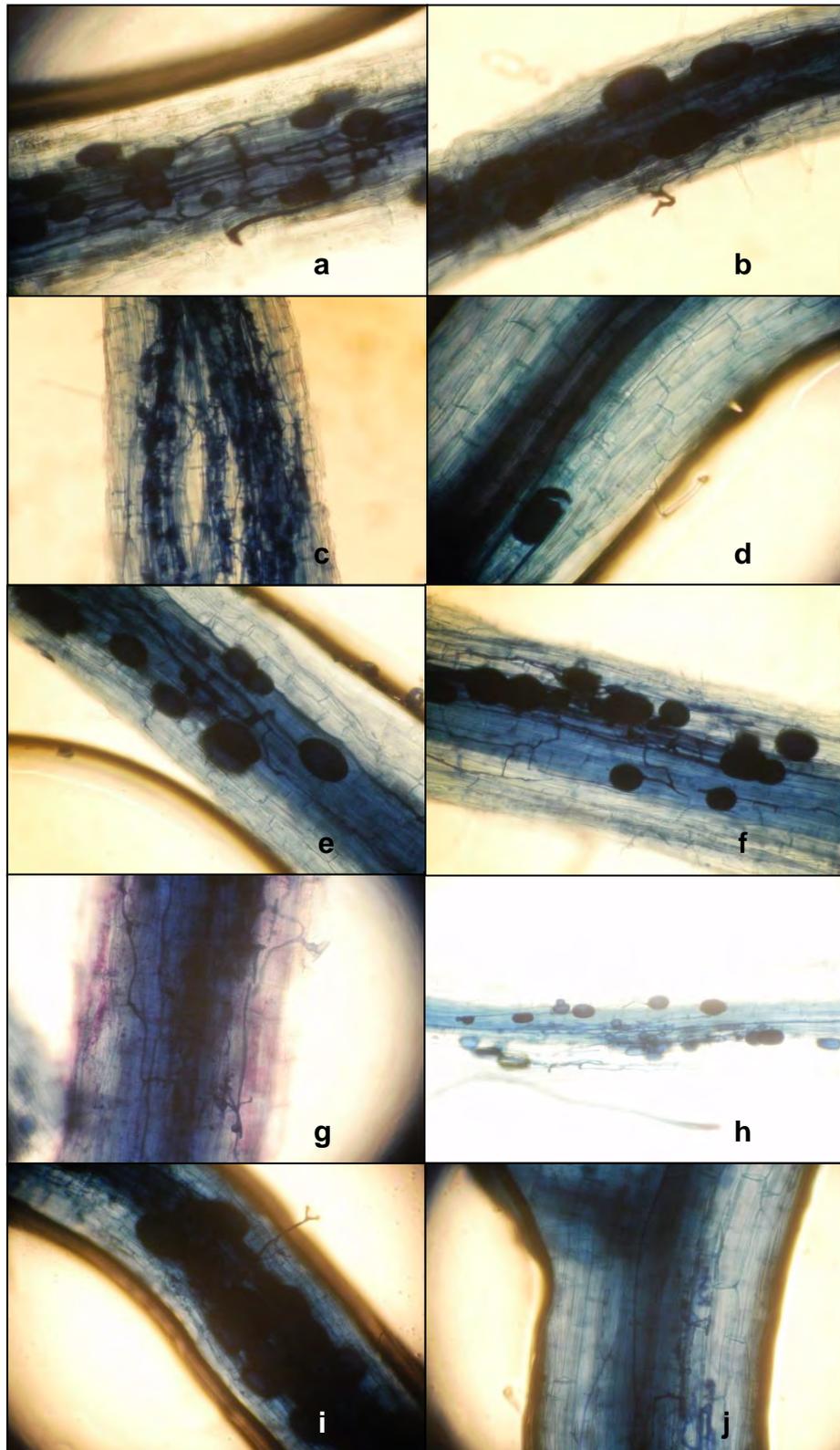


Figura 6. Estructuras características de hongos MA registradas por observación microscópica de raíces de las plantas trampa. **a:** hifas y vesículas de CdA-A; **b:** hifas y vesículas de Lob-P; **c:** arbusculos de R-A; **d:** vesícula de R-A; **e:** hifas y vesículas de 3Arr-A; **f:** hifas y vesículas de Lin-A; **g:** hifas y arbusculos de Pu-A; **h:** hifas y vesículas de GV-P; **i:** hifas y vesículas de SdIV-A; **j:** hifas y arbusculos de SdIV-A.

Tabla 3. Colonización micorrícica evidenciada por la capacidad infectiva (MA%) y contenido de arbusculos (Ar%) en las raíces de las plantas trampa (raigrás-trébol blanco) crecidas en los suelos de 24 localidades de la provincia de Buenos Aires colectados bajo condiciones contrastantes (A: agrícola; P: prístino).

Sitio	MA		Ar	
	------(%)-----			
9dJ-A	31,8 (±25,4) A bcdefg		8,9 (±7,7) A	
9dJ-P	34,6 (±19,3) A abcde		11,1 (±7,4) A	
Alb-A	39,8 (±9,2) A abcdef		11,8 (±3,0) A	
Alb-P	29,3 (±12,4) A bcde		8,3 (±3,7) A	
AC-A	51,3 (±8,8) A abc		17,3 (±6,6) A	
AC-P	26,5 (±12,9) B bcde		9,7 (±8,1) A	
Az-A	22,0 (±9,9) B bcdefg		5,0 (±3,2) B	
Az-P	45,8 (±13,9) A abcd		20,9 (±6,7) A	
BB-A	34,2 (±15,3) A abcdefg		13,3 (±11,8) B	
BB-P	53,3 (±7,4) A ab		24,9 (±7,7) A	
Bal-A	0,9 (±1,1) A g		0,1 (±0,2) A	
Bal-P	5,5 (±5,8) A e		0,9 (±1,0) A	
CC-A	5,0 (±5,1) A efg		0,5 (±0,6) A	
CC-P	25,1 (±9,7) A bcde		10,8 (±2,5) A	
En-A	26,3 (±24,4) A bcdefg		8,2 (±6,5) B	
En-P	42,4 (±17,3) A abcde		19,4 (±11,9) A	
GV-A	2,6 (±1,8) A fg		0,2 (±0,2) A	
GV-P	22,6 (±12,8) A bcde		6,5 (±4,3) A	
Lam-A	36,3 (±7,6) A abcdefg		15,6 (±7,6) A	
Lam-P	33,5 (±21,4) A abcde		10,0 (±10,9) A	
Lib-A	57,8 (±15,1) A ab		22,8 (±5,7) A	
Lib-P	17,3 (±8,2) B bcde		6,2 (±3,7) B	
Lin-A	41,5 (±13,5) A abcde		18,5 (±9,2) A	
Lin-P	24,2 (±13,1) A bcde		7,6 (±6,2) B	
Lob-A	3,1 (±3,9) B fg		0,2 (±0,3) B	
Lob-P	47,2 (±9,9) A abcd		21,4 (±7,4) A	
Mir-A	21,9 (±4,6) B bcdefg		8,0 (±4,2) A	
Mir-P	54,4 (±10,7) A ab		18,5 (±6,5) A	
Nec-A	15,5 (±1,6) B cdefg		8,1 (±0,3) B	
Nec-P	72,8 (±1,5) A a		36,9 (±2,3) A	
Pe-A	9,2 (±8,1) B defg		1,3 (±0,8) B	
Pe-P	35,6 (±27,7) A abcde		15,0 (±15,1) A	
Pu-A	44,9 (±3,4) A abcd		22,3 (±5,0) A	
Pu-P	52,9 (±7,3) A abc		20,8 (±10,9) A	
R-A	51,9 (±22,1) A abc		19,8 (±4,9) A	
R-P	41,9 (±19,5) A abcde		18,8 (±14,7) A	
SA-A	37,8 (±15,3) A abcdefg		17,1 (±6,6) A	
SA-P	31,4 (±10,8) A bcde		16,1 (±8,5) A	
SdIV-A	41,2 (±19,4) A abcde		19,8 (±16,3) A	
SdIV-P	15,6 (±10,1) B cde		5,9 (±6,0) B	
Ta-A	23,7 (±23,6) A bcdefg		8,3 (±9,6) A	
Ta-P	19,4 (±30,5) A bcde		6,1 (±9,1) A	
TL-A	70,3 (±7,8) A a		25,9 (±9,9) A	
TL-P	11,2 (±16,0) B de		2,8 (±4,5) B	
3Arr-A	48,8 (±13,2) A abc		21,0 (±5,8) A	
3Arr-P	35,7 (±11,6) A abcde		13,1 (±6,6) A	

- Valores entre paréntesis corresponden a desvíos estándar.

- Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre condiciones contrastantes para cada localidad (P-valor<0,05). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades para cada condición (P-valor<0,05): letra minúscula en negrita: agrícola; letra minúscula normal: prístino.

La condición de uso del suelo afectó la capacidad infectiva en aproximadamente el 40% de las localidades evaluadas (9 de las 23 localidades). No se encontró un patrón que evidencie que una de las dos condiciones evaluadas haya incidido favorable o desfavorablemente, en la capacidad infectiva. En 4 de las 9 localidades la MA% fue mayor en las situaciones agrícolas (AC, Lib, SdIV, TL), mientras que en las 5 restantes fueron los prístinos quienes presentaron mayor capacidad infectiva (Az, Lob, Mir, Nec, Pe). Por otra parte, se registraron diferencias entre localidades para las dos condiciones analizadas. En los sitios agrícolas, la mayor capacidad infectiva se registró en TL mientras que en Bal se registró la menor. Para los sitios prístinos, la mayor capacidad infectiva se registró en Nec mientras que en Bal se registró la menor.

El Ar% presentó valores en el rango de 0,1% y 36,9%, siendo los mayores valores encontrados en Nec-P y los menores en Bal-A (Tabla 3). El Ar% varió significativamente en aproximadamente el 35% de las localidades analizadas y el mayor Ar% no siempre correspondió a las plantas que crecieron bajo situación prístina. Particularmente, en 4 (Lib, Lin, SdIV, TL) de las 8 localidades en que se registraron diferencias por la condición de suelo, el Ar% fue mayor en las situaciones agrícolas, mientras que en las 4 restantes (Az, BB, Nec, Pe) fueron las raíces de las plantas crecidas en suelos colectados bajo condiciones prístinas quienes presentaron mayor intensidad de Ar%. Cuando se analizó lo que ocurría entre localidades para cada condición, se observó que el test utilizado para la comparación de medias (Tukey), no permitió detectar diferencias entre las medias de los tratamientos debido a la alta variabilidad de los datos, por lo que en la Tabla 3 no se observan letras que diferencien a las medias de tratamiento. Sin embargo, se observó una tendencia donde la mayor intensidad de Ar% se obtuvo en TL para suelos agrícolas y en Nec para los sitios prístinos, y en ambas condiciones de uso del suelo, Bal fue quien presentó la menor abundancia de arbusculos.

4.2. Abundancia de esporas de hongos MA

Se realizó el recuento de esporas en los 11 sitios que presentaron capacidad infectiva de las plantas trampa superior al 45% en alguna de las dos condiciones evaluadas, y los resultados se presentan en la Tabla 4.

La abundancia de esporas colectadas se mantuvo en el rango de 536-5639 esporas 100 g suelo⁻¹. En 6 de las 11 localidades se registró mayor cantidad de esporas en los suelos provenientes de condiciones prístinas. La mayor abundancia de esporas se

registró en BB, localidad que presentó valores muy similares en sus dos condiciones de uso de suelo y superiores a las 5500 esporas 100 g de suelo⁻¹. La menor abundancia de esporas se registró en Az bajo condición prístina.

Tabla 4. Abundancia de esporas y contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), presentes en los sustratos de las plantas trampa provenientes de suelos de 24 localidades de la provincia de Buenos Aires colectados bajo condiciones contrastantes.

Sitio	Abundancia de esporas (n° esporas 100 g sustrato ⁻¹)	Contenido de GRSP (mg GRSP g suelo ⁻¹)
AC-A	2828	0,92 (±0,11) A cde
AC-P	2064	1,01 (±0,01) A <i>de</i>
Az-A	1471	1,29 (±0,17) B abc
Az-P	536	1,65 (±0,13) A <i>abc</i>
BB-A	5631	0,27 (±0,17) A f
BB-P	5639	0,21 (±0,02) A <i>f</i>
Lib-A	1381	0,65 (±0,09) B def
Lib-P	1121	1,72 (±0,06) A <i>ab</i>
Lob-A	666	1,69 (±0,05) A a
Lob-P	959	1,57 (±0,03) A <i>bc</i>
Mir-A	3803	1,11 (±0,00) B bcd
Mir-P	1568	1,48 (±0,17) A <i>bcd</i>
Nec-A	3824	1,57 (±0,01) A ab
Nec-P	3916	1,59 (±0,22) A <i>bc</i>
Pu-A	2243	0,64 (±0,11) A def
Pu-P	2600	0,58 (±0,32) A <i>ef</i>
Riv-A	3599	0,42 (±0,24) A f
Riv-P	4412	0,37 (±0,06) A <i>f</i>
TL-A	3242	0,56 (±0,15) B ef
TL-P	4737	1,23 (±0,08) A <i>cd</i>
3Arr-A	1503	0,65 (±0,09) B def
3Arr-P	2714	2,12 (±0,14) A a

- Valores entre paréntesis corresponden a desvíos estándar.

- Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre condiciones contrastantes para cada localidad (P-valor<0,05); letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades para cada condición (P-valor<0,05); letra en negrita: agrícola; letra en cursiva: prístino.

4.3. Cuantificación del contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) en el sustrato de las plantas trampa

Se realizó la extracción y cuantificación del contenido de GRSP fácilmente extraíble en el sustrato de crecimiento de las plantas trampa de los 11 sitios (para ambas

condiciones) que presentaron MA% superior 45% en alguna de las dos condiciones contrastantes.

El análisis estadístico evidenció interacciones Localidad x Condición (Tabla 5), por lo que se analizaron las diferencias entre condiciones para cada localidad, así como entre localidades para cada una de las condiciones.

Tabla 5. Análisis de varianza del contenido de proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP), del sustrato de las plantas trampa.

FUENTE	GL	ANOVA SS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	P-valor
LOCALIDAD	10	9,1802	0,9180	49,215	1,024e-12 ***
CONDICION	1	1,2917	1,2917	69,250	3,049e-08 ***
LOC*COND	10	2,7583	0,2758	14,787	1,416e-07 ***
ERROR	22	0,4104	0,0186		

El contenido de GRSP extraído del sustrato de las plantas trampa varió entre 0,21 y 2,12 mg GRSP por cada g de suelo, siendo los mayores valores en 3Arr-P y los menores en BB-P (Tabla 4).

En 5 de las 11 localidades (Az, Lib, Mir, TL, 3Arr), se encontraron diferencias significativas entre las dos condiciones, y a diferencia de lo determinado para la MA% y Ar%, los mayores contenidos de GRSP se registraron en los suelos prístinos en relación a los agrícolas. Por otra parte, se registraron diferencias significativas entre las localidades para cada una de las condiciones evaluadas. Para los sitios agrícolas, el mayor contenido de GRSP se registró en Lob y en los sitios prístinos en 3Arr. Los menores valores, en ambas condiciones de suelo de registraron en Riv y BB.

4.4. Relaciones entre parámetros de hongos MA y químicos de los suelos

Se identificaron algunas relaciones lineales significativas entre los parámetros microbiológicos individuales (MA%, Ar%, esporas y GRSP), y los parámetros químicos de los suelos. En la Tabla 6, se presentan las principales relaciones, separando por un lado los suelos agrícolas y por el otro los prístinos.

La abundancia de esporas no se asoció significativamente con ningún parámetro en suelos agrícolas; aunque en los suelos prístinos se obtuvo una relación negativa con la CIC, MO, Zn y GRSP, presentando los mejores ajustes con la MO ($r^2=0,63$). La relación negativa entre la abundancia de esporas y el contenido de GRSP se ve

reflejada claramente en los suelos provenientes de BB-P, donde se obtuvo el menor contenido de GRSP junto con la mayor abundancia de esporas.

Para los suelos prístinos, los parámetros de colonización micorrícica (MA% y Ar%) no se relacionaron significativamente con los restantes parámetros de hongos MA (contenido de GRSP y abundancia de esporas) ni con los edáficos. Por el contrario, en suelos agrícolas se obtuvieron relaciones negativas y significativas (P -valor $<0,05$) entre MA% y Ar%, con el contenido de Fe, MO y Zn, presentando los mejores ajustes con el Zn ($r^2=0,81$ y $r^2=0,85$, para MA% y Ar% respectivamente). Además, la MA% se asoció negativamente con el contenido de GRSP ($r^2=0,658$).

El contenido de GRSP se relacionó positiva y significativamente con la MO en las dos condiciones de uso de suelo ($r^2=0,65$ y $r^2=0,66$, para agrícola y prístino, respectivamente). En los suelos agrícolas se establecieron relaciones positivas entre el GRSP con casi todos los parámetros de suelo (B, CIC, Fe, MO y Zn), pero no se asoció con el P-Bray. En cambio en los suelos prístinos, solo se registró relación negativa del GRSP con el P-Bray.

Para responder a la primera hipótesis, en los suelos prístinos donde se evidenció un efecto depresor del P-Bray sobre el contenido de GRSP, el set de resultados obtenidos se dividió en 3 rangos de acuerdo al contenido de P ($< 20 \text{ mg kg}^{-1}$, $20\text{-}50 \text{ mg kg}^{-1}$ y $> 50 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-Bray en el suelo). Para cada rango, se analizó lo que ocurrió con la MO, y se observó que para los dos rangos más bajos, al aumentar el contenido de MO, el contenido de GRSP fue mayor. Mientras que en niveles superiores a 50 mg kg^{-1} de P-Bray no se observó este efecto.

Tabla 6. Funciones de ajuste del modelo lineal para los parámetros microbiológicos y químicos de los suelos agrícola (a la izquierda de la tabla) y prístino (a la derecha de la tabla). a: ordenada al origen, B: coeficiente lineal.

		AGRICOLA				PRISTINO			
	Modelo	a	B	P-valor	r ²	a	B	P-valor	r ²
Esporas ~ Parámetros Químicos	Espora ~ B	2681,80	37,07	0,954	-	4393,90	-737,40	0,203	-
	Espora ~ CIC	4753,34	-92,61	0,177	-	6885,61	-191,88	0,012	0,523
	Espora ~ Fe	2361,83	3,90	0,634	-	2767,42	-0,17	0,988	-
	Espora ~ MO	4128,90	-343,80	0,305	-	6158,20	-655,10	0,003	0,634
	Espora ~ P-Bray	3734,25	-47,48	0,330	-	1177,93	39,11	0,265	-
	Espora ~ Zn	2652,50	86,47	0,946	-	4011,00	-389,20	0,013	0,516
GRSP ~ Parámetros Químicos	GRSP ~ B	0,21	0,40	0,024	0,449	0,46	0,35	0,084	-
	GRSP ~ CIC	-0,07	0,04	0,031	0,421	0,22	0,05	0,124	-
	GRSP ~ Fe	0,41	0,00	0,039	0,393	0,66	0,01	0,105	-
	GRSP ~ MO	-0,17	0,26	0,003	0,651	-0,02	0,24	0,002	0,661
	GRSP ~ P-Bray	0,69	0,01	0,552	-	2,39	-0,03	0,007	0,567
	GRSP ~ Zn	-0,16	0,98	0,002	0,680	0,86	0,11	0,060	-
MA% ~ Parámetros Químicos	MA ~ B	63,32	-14,45	0,093	-	39,40	0,89	0,8939	-
	MA ~ CIC	75,44	-1,69	0,083	-	19,84	1,00	0,3038	-
	MA ~ Fe	60,98	-0,23	0,034	0,408	42,38	-0,01	0,9321	-
	MA ~ MO	86,44	-11,81	0,003	0,638	37,86	0,68	0,827	-
	MA ~ P-Bray	46,86	-0,38	0,600	-	53,40	-0,30	0,4497	-
	MA ~ Zn	90,80	-48,81	<0,001	0,807	44,07	-0,83	0,6842	-
Ar% ~ Parámetros Químicos	Ar ~ B	25,41	-6,14	0,084	-	13,48	1,53	0,663	-
	Ar ~ CIC	26,38	-0,52	0,214	-	6,23	0,49	0,336	-
	Ar ~ Fe	24,31	-0,09	0,032	0,418	15,70	0,01	0,848	-
	Ar ~ MO	34,33	-4,79	0,005	0,609	14,22	0,51	0,755	-
	Ar ~ P-Bray	16,97	-0,09	0,759	-	24,60	-0,19	0,351	-
	Ar ~ Zn	37,19	-20,84	<0,001	0,853	18,00	-0,35	0,745	-
Actividad hongos MA	MA ~ Espora	35,15	0,001	0,786	-	38,52	0,001	0,783	-
	MA ~ GRSP	71,61	-36,84	0,003	0,656	45,72	-3,522	0,737	-
	Ar ~ Espora	12,84	0,001	0,702	-	15,37	0,001	0,783	-
	Ar ~ GRSP	28,84	-15,55	0,002	0,678	18,75	-1,531	0,781	-
	Espora ~ GRSP	3876,20	-1274,20	0,209	-	4831,90	-1691,50	0,047	0,371

4.5. Ensayo de Trigo en invernáculo

El análisis estadístico, permitió detectar efecto de los tratamientos de inoculación sobre algunas de las variables medidas (P-valor<0,05) (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de varianza de las variables evaluadas en trigo a los 60 DDS.

VARIABLE	FUENTE	GL	ANOVA SS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	Pr > F
INDICE DE VERDOR	BLOQUE	2	5,984	2,992	0,899	0,4147
	TRATAMIENTO	21	83,056	3,955	1,1884	0,3089
	ERROR	42	139,783	3,328		
AREA FOLIAR	BLOQUE	2	7825	3912,5	3,7206	0,03254 *
	TRATAMIENTO	21	46642	2221,04	2,1121	0,01943 *
	ERROR	42	44167	1051,59		
PESO FRESCO AEREO	BLOQUE	2	11,163	5,5815	3,1976	0,05098
	TRATAMIENTO	21	79,087	3,7657	2,1576	0,01681 *
	ERROR	42	73,311	1,7455		
PESO SECO AEREO	BLOQUE	2	0,8148	0,4074	3,4188	0,04211*
	TRATAMIENTO	21	3,3594	0,1599	1,3424	0,20434
	ERROR	42	5,0052	0,1191		
MA%	BLOQUE	1	722,12	722,12	20,5690	0,00018*
	TRATAMIENTO	21	1592,57	75,83	2,160	0,04242*
	ERROR	21	737,24	35,11		
Ar%	BLOQUE	1	183,36	183,36	9,6340	0,00537 *
	TRATAMIENTO	21	498,81	23,75	1,2481	0,30811
	ERROR	21	399,67	16,17		

El Índice de Verdor, en trigo a los 60 DDS no fue afectado significativamente por la inoculación con los consorcios con hongos MA (P-valor>0,05) (Tabla 7).

Se detectó efecto de la inoculación en el AF (P-valor<0,05) (Tabla 7), sin embargo, el test utilizado para comparar las diferencias entre medias de tratamiento (Tukey), no permitió detectar diferencias entre los distintos tratamientos. Sin embargo, se observó una tendencia donde el AF fue mayor en aquellos tratamientos que fueron inoculados con los consorcios provenientes de Az-P, BB-P, R-A, Pu-A y Lob-P (de mayor a menor

respectivamente, Tabla 8), mientras que la menor AF se registró en el tratamiento inoculado con AC-A, con valores cercanos a $240 \text{ cm}^2 \text{ planta}^{-1}$. A diferencia de lo esperado, los testigos no inoculados se ubicaron en el tercio inferior, sin presentar los valores más bajos de AF. El AF, no siempre respondió significativamente a la inoculación con consorcios con hongos MA. Al respecto, se obtuvieron RI positivas, superiores al 10%, cuando las plantas fueron inoculadas con Az-P, BB-P, Lib-A, Lob-P, Pu-P, R-A, TL-P, 3Arr-A (Figura 7). Sin embargo, en otras localidades (Lib-P, Mir-A y AC-A) el AF de las plantas inoculadas fue menor a las plantas testigo obteniéndose RI negativas.

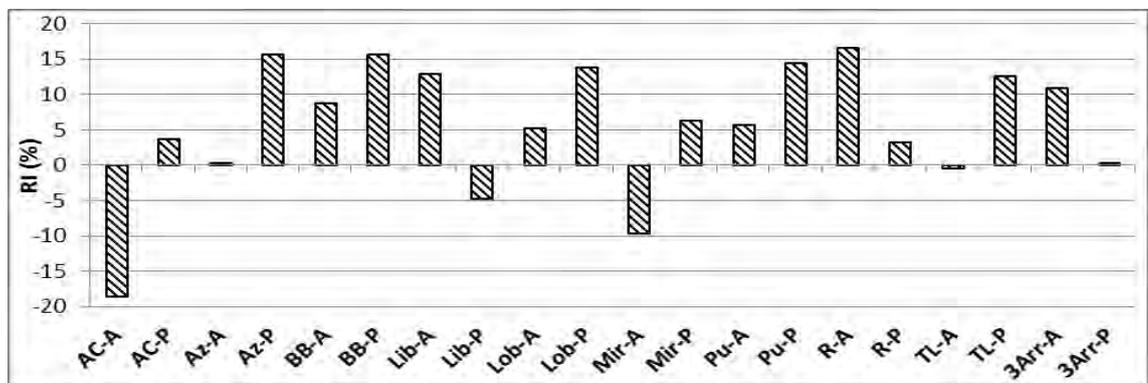


Figura 7. Respuesta a la inoculación (RI) del AF a la inoculación con consorcios con hongos MA, en plantas de trigo a los 60 DDS.

La inoculación afectó el PFA ($P\text{-valor} < 0,05$) (Tabla 7), el que fue significativamente mayor en aquellos tratamientos que fueron inoculados con Az-P, Pu-A, Lob-P y BB-P; presentando valores superiores a $12,3 \text{ g planta}^{-1}$ (Tabla 8), mientras que el menor PFA se registró en las plantas inoculadas con AC-A. A diferencia de lo esperado, los testigos no inoculados se ubicaron en el tercio inferior, pero no presentaron los valores más bajos de PFA. La mayor RI en PFA se registró en aquellas plantas inoculadas con Pu-P, donde el PFA superó en un 25,9% a aquel obtenido por los testigos, seguido por Lob-P y Az-P (25,8 y 25,6%, respectivamente) (Figura 8). De manera similar a lo mencionado para el AF, se registraron algunas RI negativas siendo los mayores valores (-20%) registrados en las plantas inoculadas con AC-A.

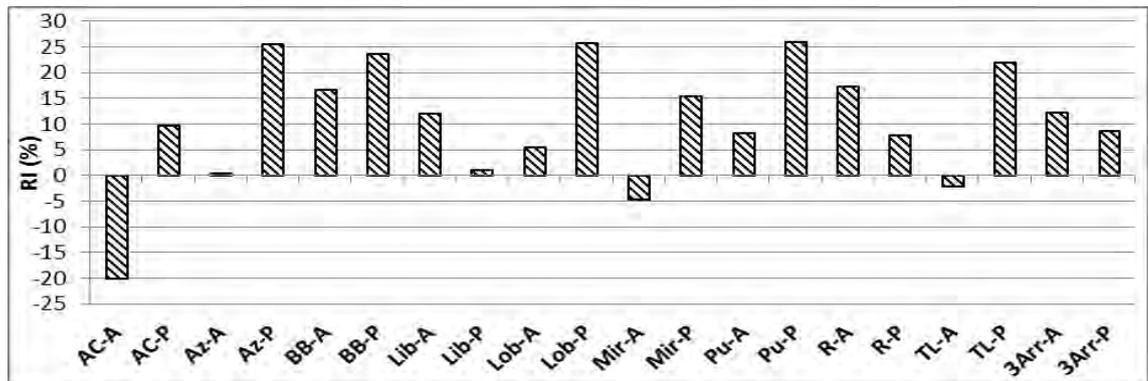


Figura 8. Respuesta a la inoculación (RI) del PFA a la inoculación con consorcios con hongos MA, en plantas de trigo a los 60 DDS.

Para el PSA de las plantas de trigo no se detectaron efectos significativos a la inoculación (P -valor $>0,05$) (Tabla 7). Si bien no se registraron diferencias estadísticamente significativas, los mayores valores de PSA fueron obtenidos en las plantas inoculadas con Pu-P, Az-P, Lob-P, BB-A y R-A (de mayor a menor respectivamente, Tabla 8); mientras que, de manera similar a lo detectado para el AF y el PFA, el menor PSA se obtuvo en el tratamiento inoculado con AC-A.

La colonización micorrícica fue evidente en las raíces de las plantas de trigo de todos los tratamientos inoculados. Si bien se observaron hifas y arbuscúlos, en ningún caso, se detectó la presencia de vesículas. Además, es de destacar que en la mayoría de los tratamientos la colonización encontrada fue del tipo *Paris* (Figura 9, a y b), mientras que en solo uno de los tratamientos, Pu-P se observó colonización del tipo *Arum* (Figura 9, c).

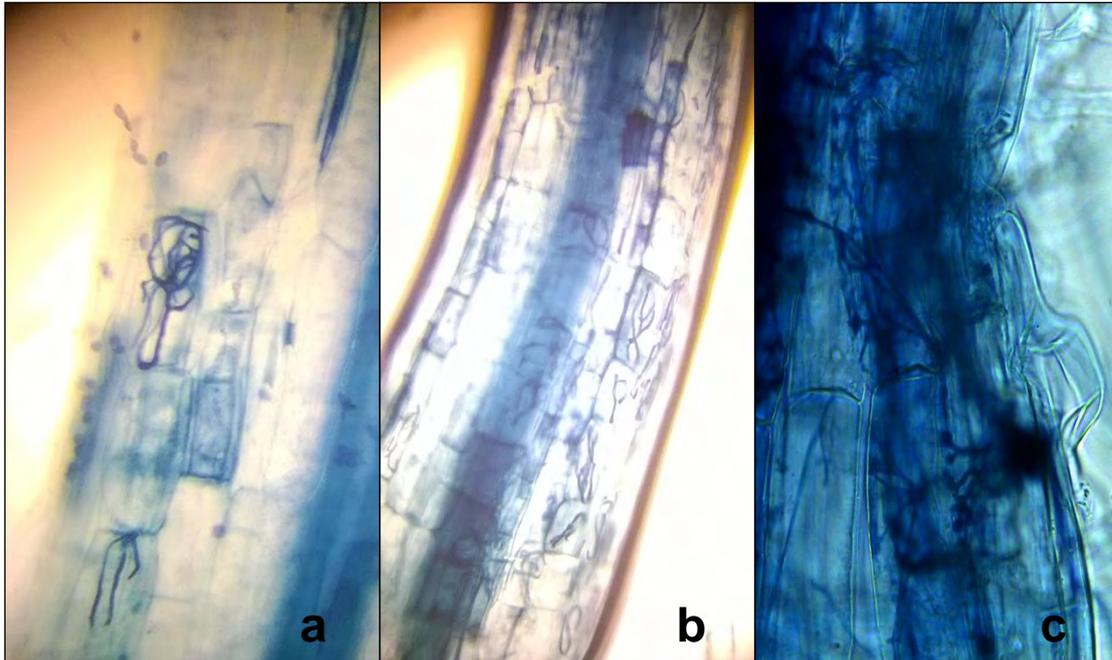


Figura 9. Colonización tipo Paris (a y b) y Arum (c), en raíces de trigo provenientes de macetas inoculadas con consorcios con hongos MA provenientes de Mir-A (a), Pu-A (b) y Pu-P (c).

Se detectó efecto significativo de la inoculación para la MA% (Tabla 7), aunque no para el contenido de Ar% (Tabla 9), sin embargo, el test utilizado para la comparación de medias de MA% (Tukey), no permitió detectar diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, se observó una tendencia donde la MA% fue mayor en las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de AC-A, seguido por Pu-A, R-P y TL-A, con valores que superaron los 15% (Tabla 8). Como era de esperarse, las raíces de las plantas testigos (no inoculadas), tanto de los tratamientos agrícola como prístino, no evidenciaron colonización micorrícica. Aun sin haberse registrado efectos significativos de la inoculación sobre el Ar% (Tabla 7), los mayores contenidos de arbusculos se registraron en las raíces de los tratamientos inoculados con AC-A, 3Arr-P y R-P, mientras que, como se esperaba, se registraron valores nulos en los testigos no inoculados (Tabla 8).

Cuando se analizaron las relaciones entre los parámetros de planta y la capacidad infectiva, se encontraron relaciones significativas entre el AF y la MA% ($y = -1,7346x + 30,627$, $r^2 = 0,1657$), el PFA y MA% ($y = -0,0747x + 11,8602$, $r^2 = 0,1797$) y el PSA y MA% ($y = -0,0147x + 2,4051$, $r^2 = 0,1159$); y las mismas relaciones fueron encontradas para AF y Ar% ($y = -3,6504x + 330,527$, $r^2 = 0,2571$), PFA y Ar%; ($y = -0,1455x + 11,742$, $r^2 = 0,2431$) y para PSA y Ar% ($y = -0,0285 + 2,3810$, $r^2 = 0,1516$).

Tabla 8. Índice de verdor (IV-60 DDS), Área foliar (AF), Peso fresco aéreo (PFA), Peso seco aéreo (PSA), Capacidad infectiva (MA%) y contenido de Arbusculos (Ar%) de plantas de trigo inoculadas con consorcios microbianos, crecidas en invernáculo por 60 días.

Tratamiento	IV-60 DDS (Un. de SPAD)	AF (cm ² planta ⁻¹)	PFA (g planta ⁻¹)	PSA (g planta ⁻¹)	MA (%)	Ar (%)
AC-A	32,67 (±1,35)	239,20 (±71,12)	8,20 (±2,05) b	1,66 (±0,45)	23,65 (±1,06)	10,56 (±4,30)
AC-P	31,77 (±1,03)	309,33 (±25,26)	10,93 (±1,25) ab	2,13 (±0,20)	2,99 (±2,71)	0,25 (±0,24)
Az-A	32,13 (±1,81)	294,83 (±13,25)	10,33 (±0,51) ab	2,10 (±0,10)	12,82 (±0,92)	4,87 (±1,19)
Az-P	30,67 (±1,44)	344,67 (±14,32)	12,56 (±0,50) a	2,53 (±0,15)	11,15 (±11,99)	1,97 (±2,66)
BB-A	32,90 (±0,96)	319,77 (±51,26)	12,00 (±1,95) ab	2,46 (±0,56)	9,78 (±11,38)	4,41 (±6,17)
BB-P	33,53 (±2,15)	344,57 (±62,22)	12,36 (±2,77) a	2,26 (±0,55)	3,77 (±3,63)	0,12 (±0,16)
Lib-A	33,27 (±0,67)	332,20 (±27,53)	11,53 (±0,75) ab	2,36 (±0,15)	7,28 (±4,82)	2,04 (±2,67)
Lib-P	32,77 (±0,93)	283,97 (±10,17)	10,10 (±0,70) ab	2,16 (±0,32)	1,85 (±2,43)	0,13 (±0,18)
Lob-A	32,47 (±0,85)	309,37 (±17,55)	10,86 (±0,85) ab	1,96 (±0,25)	4,52 (±2,52)	0,66 (±0,79)
Lob-P	34,83 (±2,26)	339,40 (±22,65)	12,56 (±1,15) a	2,46 (±0,30)	13,27 (±7,78)	5,17 (±5,18)
Mir-A	35,27 (±0,59)	265,53 (±3,09)	9,83 (±0,50) ab	2,06 (±0,30)	10,55 (±3,28)	7,35 (±4,09)
Mir-P	32,53 (±2,89)	316,80 (±29,21)	11,53 (±0,89) ab	2,40 (±0,17)	5,55 (±5,44)	2,52 (±3,56)
Pu-A	32,40 (±1,49)	310,50 (±10,79)	11,13 (±0,60) ab	2,23 (±0,11)	16,77 (±5,99)	5,52 (±1,96)
Pu-P	31,70 (±2,36)	340,90 (±17,39)	12,56 (±0,76) a	2,63 (±0,32)	5,50 (±6,55)	2,61 (±3,69)
R-A	33,33 (±1,11)	342,70 (±18,40)	12,06 (±0,49) ab	2,43 (±0,37)	4,40 (±5,19)	2,06 (±2,88)
R-P	31,47 (±4,24)	307,30 (±39,59)	10,76 (±2,02) ab	2,26 (±0,32)	16,57 (±16,31)	9,06 (±11,91)
TL-A	33,33 (±2,14)	292,70 (±36,80)	10,06 (±1,70) ab	2,03 (±0,50)	15,07 (±16,92)	7,92 (±9,69)
TL-P	31,47 (±0,50)	335,53 (±33,17)	12,16 (±0,92) ab	2,40 (±0,43)	2,59 (±0,69)	0,14 (±0,19)
3Arr-A	32,40 (±0,46)	326,30 (±18,97)	11,53 (±1,04) ab	2,33 (±0,25)	8,65 (±1,63)	2,87 (±0,71)
3Arr-P	33,83 (±0,84)	298,70 (±63,11)	10,80 (±3,00) ab	2,16 (±0,80)	13,69 (±19,11)	9,79 (±13,85)
No Inoc-A	33,80 (±1,81)	293,83 (±41,34)	10,26 (±1,01) ab	2,06 (±0,25)	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)
No Inoc-P	31,10 (±2,70)	297,90 (±6,60)	10,00 (±0,30) ab	1,90 (±0,10)	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)

- Valores entre paréntesis corresponden a desvíos estándar.

- Valores en columnas con distintas indican diferencias significativas (P-valor<0,05).

4.6. Ensayo de Maíz en invernáculo

El análisis estadístico, permitió detectar efecto de los tratamientos de inoculación sobre algunas de las variables medidas (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza de las variables evaluadas en maíz a los 60 DDS.

VARIABLE	FUENTE	GL	ANOVA SS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	P-valor
INDICE DE VERDOR 25 DDS	BLOQUE	2	34,696	17,348	8,6605	0,00070*
	TRATAMIENTO	21	56,436	2,687	1,3416	0,20475
	ERROR	42	84,129	2,003		
INDICE DE VERDOR 46 DDS	BLOQUE	2	10,79	5,399	1,530	0,22790
	TRATAMIENTO	21	90,60	4,314	1,224	0,28140
	ERROR	42	148,00	3,523		
AREA FOLIAR	BLOQUE	2	7214	3607,00	1,8218	0,17429
	TRATAMIENTO	21	68236	3249,33	1,641	0,08501
	ERROR	42	83158	1979,95		
PESO FRESCO AEREO	BLOQUE	2	26,46	13,23	1,5637	0,2213
	TRATAMIENTO	21	205,82	9,800	1,1584	0,3332
	ERROR	42	355,35	8,460		
PESO SECO AEREO	BLOQUE	2	44,442	22,221	8,3981	0,00085*
	TRATAMIENTO	21	135,557	6,455	2,4396	0,00686*
	ERROR	42	111,13	2,645		
PESO FRESCO RAICES	BLOQUE	2	451,02	225,51	21,0027	4,76.10 ⁻⁷
	TRATAMIENTO	21	137,64	6,554	0,6104	0,8875
	ERROR	42	450,96	10,737		
MA%	BLOQUE	1	0,0015	0,0015	0,0001	0,99367
	TRATAMIENTO	21	1695,79	80,75	3,3843	0,00365*
	ERROR	21	501,08	23,86		
Ar%	BLOQUE	1	0,15	0,15	0,0094	0,923739
	TRATAMIENTO	21	1292,57	61,55	3,7603	0,001865*
	ERROR	21	343,74	16,36		

Tanto para el IV-25DDS como para el IV-46DDS, obtenido en condiciones de invernáculo en plantas de maíz, no se encontraron efectos significativos por la

inoculación (P -valor $>0,05$) (Tabla 9). Aun así, a los 25 DDS, el mayor IV fue obtenido en el testigo No Inoculado-A (Tabla 10), mientras que valores más bajos en las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de AC-A, seguidos por el testigo No Inoculado-P. A los 46DDS, aun sin diferencias significativas, la situación se revirtió y los mayores valores fueron obtenidos en las plantas inoculadas con R-P, AC-P y Lib-P, mientras que el menor IV correspondió al tratamiento testigo No Inoculado-A.

La inoculación no afectó significativamente el AF de las plantas (P -valor $>0,05$) (Tabla 9). Aun así, los mayores valores se registraron en las plantas inoculadas con BB-P (Tabla 10), las plantas testigos se ubicaron en el tercio inferior, sin presentar los menores valores, y el menor AF se registró en AC-P.

La inoculación no afectó significativamente el PFA de las plantas de maíz (P -valor $>0,05$) (Tabla 9). Aun así, el mayor PFA correspondió al testigo No Inoculado-A (Tabla 10), mientras que los menores a las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de Mir-P y R-P.

La inoculación afectó significativamente el PSA de las plantas de maíz (P -valor $<0,05$) (Tabla 9). El mayor PSA se registró en las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de BB-P (Tabla 10), diferenciándose de las inoculadas con los consorcios de Riv-A, AC-P y Mir-P, que presentaron los menores valores. Los testigos se ubicaron en el tercio inferior, con PSA relativamente bajos y cercanos a los 20 g. Se detectaron RI positivas en producción de PSA en 8 de los 20 tratamientos inoculados (Figura 10), siendo el mayor valor correspondiente a BB-P, quien superó en un 23% en PSA en relación al testigo No Inoculado-P. Se registraron varias RI negativas en PSA, siendo la mayor en las plantas inoculadas con R-A, con un PSA 13% menor que el testigo No Inoculado-A.

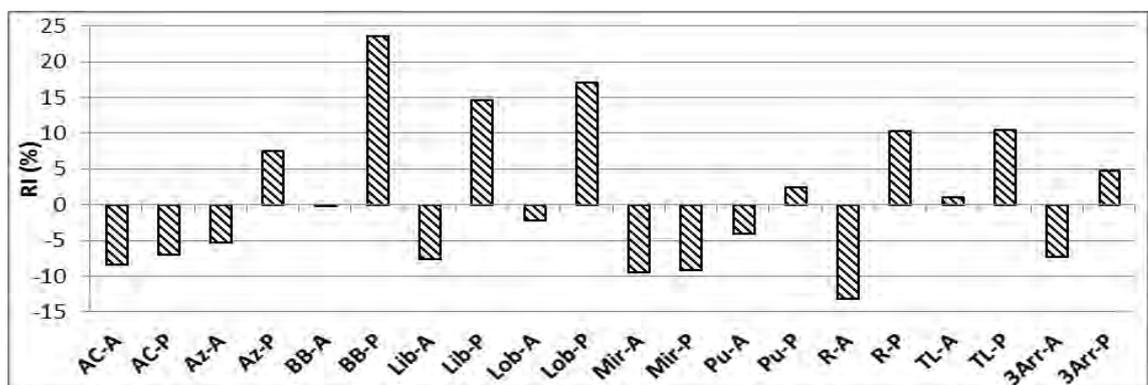


Figura 10. Respuesta a la inoculación (RI) del PSA a la inoculación con consorcios con hongos MA, en plantas de maíz a los 46 DDS.

La inoculación no afectó el PFR de las plantas de maíz ($P\text{-valor}>0,05$) (Tabla 9). Aun así, las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de Pu-A alcanzaron el mayor PFR, mientras que las inoculadas con R-A el menor (Tabla 10).

Se observó colonización micorrícica (hifas, vesículas y arbuscúlos, Figura 11) en todos los tratamiento inoculados y, como se esperaba, ausencia de esta en las plantas que no recibieron consorcios con hongos MA (Tabla 10).

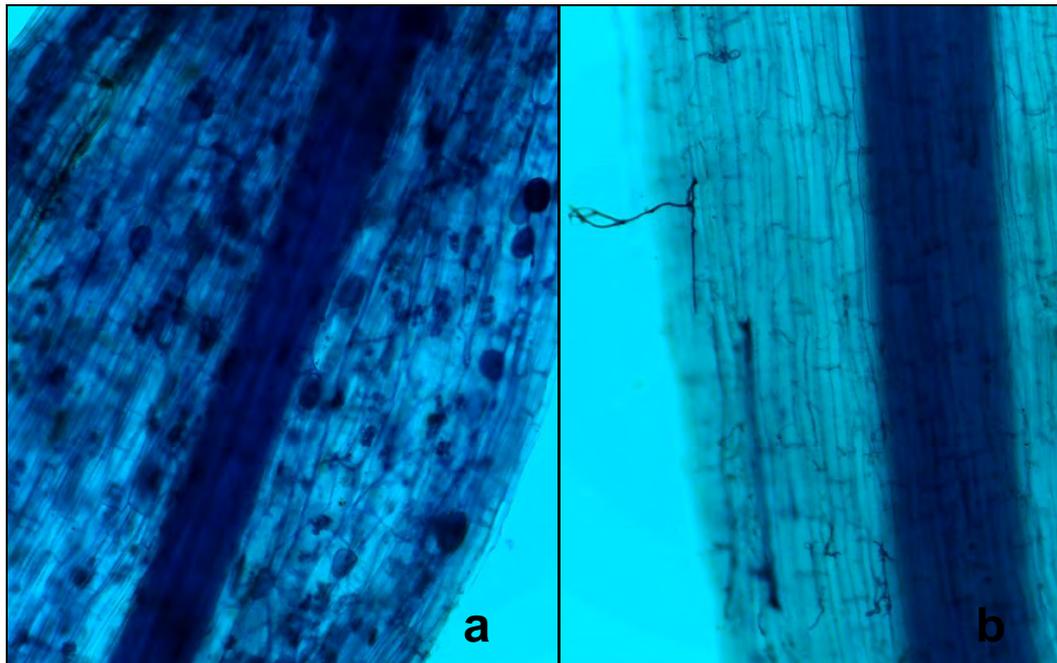


Figura 11. Arbuscúlos y vesículas (a), e Hifas (b), en raíces de maíz provenientes de macetas inoculadas con consorcios con hongos MA provenientes de AC-A (a) y Lob-A (b).

La inoculación afectó significativamente ($P\text{-valor}<0,05$) la capacidad infectiva (MA%) y el contenido de arbuscúlos (Ar%) en las raíces de plantas de maíz a los 46 DDS (Tabla 9). La mayor MA% y contenido de Ar% se registró en las raíces de las plantas inoculadas con el consorcio proveniente de AC-A con valores cercanos al 28 y 25%, respectivamente (Tabla 10), mientras que el resto de los tratamientos presentó una menor colonización con valores que en la mayor parte de los casos fue inferior al 10%.

Tabla 10. Índice de verdor (IV-25 DDS y IV-46 DDS), Área foliar (AF), Peso fresco aéreo (PFA), Peso seco aéreo (PSA) y Peso fresco de raíces (PFR), Capacidad infectiva (MA%) y contenido de Arbusculos (Ar%) de plantas de maíz inoculadas con consorcios microbianos, crecidas en invernáculo por 60 días.

Trat.	IV-25 DDS (Unidades de SPAD)	IV-46 DDS	AF (cm ² planta ⁻¹)	PFA (g planta ⁻¹)	PSA (g planta ⁻¹)	PFR (g planta ⁻¹)	MA (%)	Ar (%)
AC-A	29,43 (±2,57)*	24,53 (±2,04)	522,86 (±37,61)	36,62 (±1,19)	18,93 (±1,43) ab	22,59 (±2,95)	27,54 (±8,72) a	24,98 (±6,29) a
AC-P	30,77 (±2,78)	26,53 (±1,29)	473,08 (±63,55)	35,34 (±4,32)	17,49 (±1,73) b	24,32 (±10,42)	7,73 (±9,05) b	5,57 (±7,72) b
Az-A	31,30 (±0,78)	25,37 (±2,23)	510,81 (±14,67)	37,52 (±1,00)	19,54 (±1,15) ab	24,73 (±5,03)	2,5 (±1,08) b	1,09 (±0,82) b
Az-P	31,63 (±1,92)	24,50 (±2,21)	519,93 (±39,49)	36,98 (±2,72)	20,22 (±2,14) ab	24,16 (±2,04)	0,70 (±0,75) b	0,00 (±0,00) b
BB-A	30,70 (±1,95)	25,37 (±2,85)	560,84 (±78,96)	40,37 (±4,75)	20,62 (±1,81) ab	24,64 (±5,69)	3,04 (±3,73) b	2,34 (±3,30) b
BB-P	29,93 (±1,57)	24,03 (±1,96)	566,68 (±61,77)	40,26 (±3,20)	23,24 (±3,28) a	24,67 (±7,19)	4,27 (±0,71) b	1,26 (±0,37) b
Lib-A	30,00 (±1,45)	25,53 (±1,84)	529,12 (±39,65)	37,54 (±2,20)	19,07 (±0,56) ab	26,15 (±3,53)	8,49 (±0,69) a	7,18 (±2,23) b
Lib-P	29,97 (±1,21)	26,50 (±1,23)	535,89 (±56,93)	38,23 (±4,43)	21,56 (±2,52) ab	25,01 (±4,46)	0,77 (±0,99)b	0,00 (±0,00) b
Lob-A	31,70 (±0,85)	25,53 (±2,38)	519,07 (±45,12)	38,08 (±1,55)	20,21 (±0,39) ab	25,16 (±3,34)	2,28 (±0,78) b	1,46 (±1,27) b
Lob-P	30,03 (±0,23)	25,70 (±1,66)	528,56 (±91,91)	37,74 (±4,58)	22,02 (±3,80) ab	24,69 (±3,43)	3,48 (±3,46) b	2,23 (±2,44) b
Mir-A	31,17 (±2,06)	24,23 (±1,16)	502,80 (±21,73)	37,55 (±1,86)	18,68 (±0,48) ab	22,97 (±3,05)	1,77 (±0,66) b	0,26 (±0,37) b
Mir-P	30,55 (±1,05)	22,45 (±0,65)	473,66 (±8,23)	34,35 (±0,76)	17,09 (±0,43) b	22,78 (±1,16)	3,69 (±2,28) b	1,69 (±2,36) b
Pu-A	30,73 (±0,67)	24,77 (±1,10)	474,38 (±12,88)	37,94 (±2,96)	19,81 (±0,09) ab	26,46 (±3,72)	10,62 (±5,25) ab	3,14 (±0,48) b
Pu-P	31,00 (±1,61)	24,30 (±2,12)	550,53 (±5,32)	37,36 (±2,58)	19,26 (±2,68) ab	26,10 (±2,65)	13,37 (±2,97) ab	4,32 (±2,88) b
R-A	30,87 (±0,35)	25,90 (±1,64)	485,74 (±36,57)	38,05 (±4,28)	17,91 (±0,66) b	21,24 (±2,06)	2,02 (±0,87) b	0,03 (±0,01) b
R-P	28,03 (±2,44)	26,87 (±4,08)	462,10 (±26,69)	34,90 (±2,24)	20,76 (±2,28) ab	22,37 (±2,07)	4,03 (±5,52) b	2,83 (±4,00) b
TL-A	31,27 (±0,47)	25,20 (±0,46)	544,77 (±11,81)	39,25 (±1,06)	20,87 (±0,54) ab	26,39 (±2,43)	9,42 (±3,94) ab	8,26 (±5,08) b
TL-P	31,17 (±0,32)	23,53 (±1,46)	556,56 (±5,16)	39,01 (±0,28)	20,77 (±2,82) ab	23,71 (±4,04)	2,72 (±3,27) b	1,85 (±2,58) b
3Arr-A	30,00 (±1,15)	25,07 (±0,74)	501,26 (±59,21)	37,17 (±3,22)	19,12 (±0,64) ab	22,77 (±5,92)	15,77 (±13,63) ab	11,04 (±11,60) ab
3Arr-P	31,67 (±2,42)	24,93 (±1,01)	460,83 (±34,98)	35,50 (±3,14)	19,68 (±2,43) ab	24,023 (±7,17)	4,45 (±4,31) b	3,23 (±4,53) b
No Inoc-A	32,27 (±1,19)	24,50 (±2,42)	534,52 (±61,61)	41,92 (±3,93)	20,64 (±1,22) ab	24,17 (±2,72)	0,00 (±0,00) b	0,00 (±0,00) b
No Inoc-P	29,63 (±2,60)	22,03 (±1,36)	487,25 (±33,73)	36,82 (±1,29)	18,80 (±1,42) ab	21,83 (±2,80)	0,00 (±0,00) b	0,00 (±0,00) b

- Valores entre paréntesis corresponden a desvíos estándar.

- Valores en columnas con letras distintas indican diferencias significativas (P-valor<0,05).

Cuando se analizaron las relaciones entre los parámetros de planta y la colonización micorrícica, solo se encontraron relaciones significativas entre el IV-25 DDS y la MA% ($y = -0,0763x + 30,627$) y entre el IV-25 DDS y el Ar% ($y = -0,0877 + 30,503$), aunque en ambos casos el ajuste fue bajo ($r^2 = 0,1057$ y $r^2 = 0,104$, respectivamente).

4.7. Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa

Se obtuvo ADN tanto a partir de suelo como de esporas de buena calidad e integridad (Figura 12), aunque la cantidad extraída no fue similar en todas las muestras (evidenciado por distinta intensidad de las bandas). El contenido de ADN extraído a partir de las esporas recolectadas de 50 g de suelo, fue menor que aquel obtenido de 0,5 g de suelo; esto se evidencia por menor intensidad en las bandas de esporas que de suelo, las bandas de esporas son casi imperceptibles a simple vista (Figura 12).

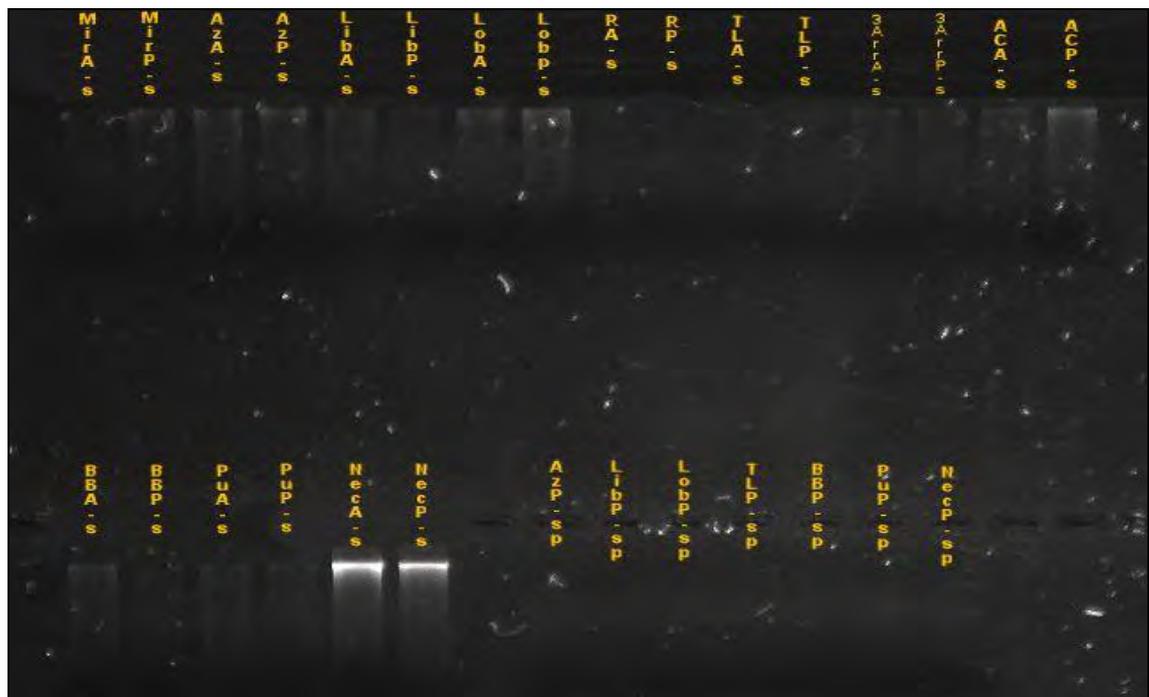


Figura 12. Corrida electroforética en gel de agarosa al 10%, del ADN extraído a partir de suelo (-s) o esporas (-sp).

Debido a que el contenido de ADN en cada muestra fue distinto, la primera reacción de PCR no fue realizada con igual cantidad de ADN para cada muestra, y se realizaron diluciones del material genético.

Se logró la amplificación positiva en la primera reacción de PCR, con primers para amplificar parte de la región 28S ADNr de hongos generales (Figura 13). Por comparación con el marcador de peso molecular, se evidenció que el tamaño de amplificado fue el esperado, de aproximadamente 750 pb. Aunque algunas bandas fueron muy tenues, experiencia en nuestro laboratorio nos indica que, aunque en menor cantidad, se obtuvo el amplificado esperado, el que en ocasiones es de difícil visualización por el ojo humano. Por esta razón, se realizaron algunas diluciones del amplificado-templado de la segunda reacción de PCR.

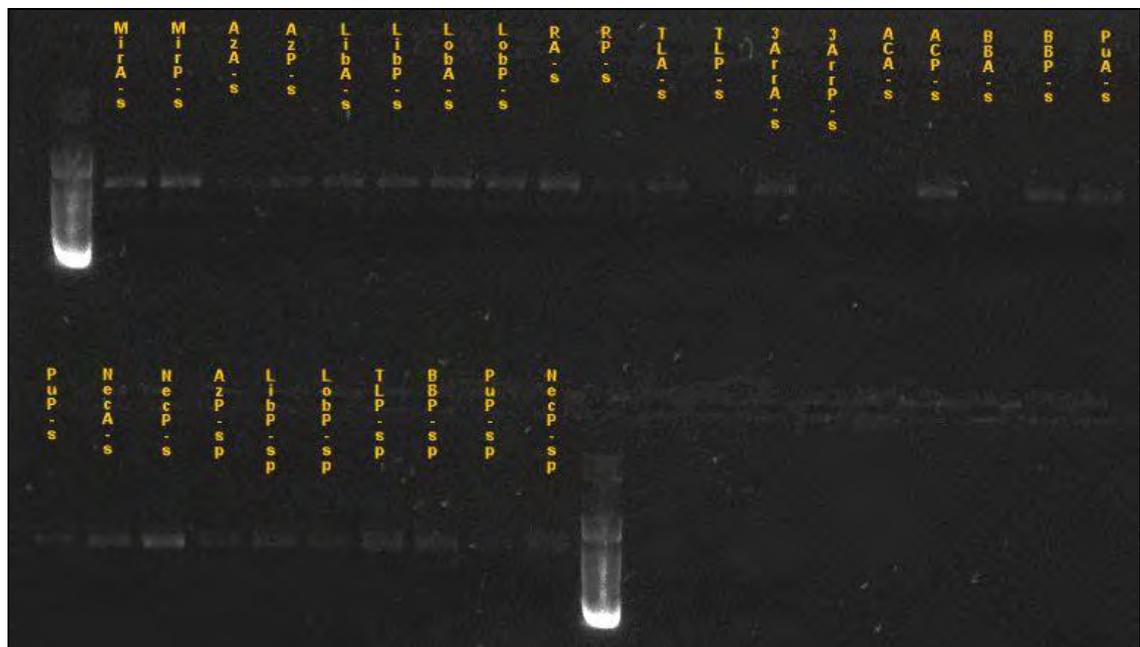


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa mostrando las bandas de amplificados obtenidos por la reacción de PCR utilizando el par de primers LSU0061/LSU0599. La primer y última calle corresponden al marcador de peso molecular.

Como resultado de la segunda reacción de PCR, se obtuvo en casi todas las muestras amplificados de tamaño esperado (aproximadamente 300 pb) (Figura 14). Una excepción fue AC-A quien presento una banda muy tenue con muy poco contenido de ADN amplificado, por lo que se decidió descartar la muestra de dicho sitio (tanto para la condición A como P) para el resto de las determinaciones.

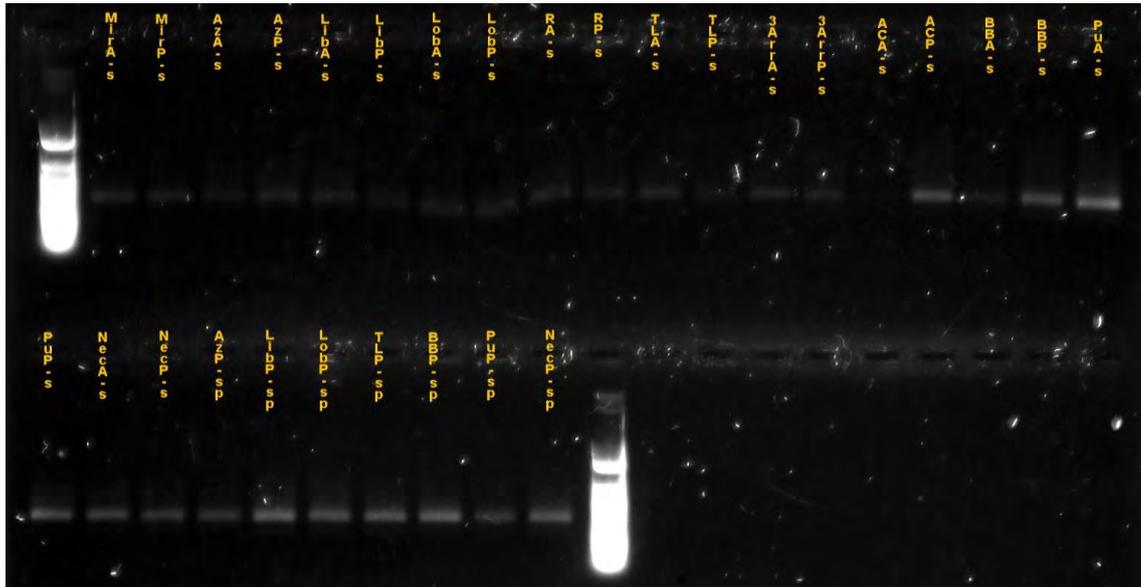


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa mostrando las bandas correspondientes a amplificados por la reacción de PCR utilizando el par de primers LSUrk4f/LSUrk7r. La primer y última calle corresponde al marcador de peso molecular.

4.8. Análisis por SSCP- Diversidad de hongos MA

Luego de la corrida electroforética en gel MDE de los amplificados de la segunda reacción de PCR, se obtuvo un patrón de bandas utilizando la estrategia SSCP (Figura 15). El número de bandas obtenidas se mantuvo en el rango de 13 a 22, para las muestras provenientes de ADN de suelo, presentando un mayor número 3ArrP-s. Para las muestras provenientes de ADN de esporas, el número de bandas fue similar, presentando un rango de valores entre 11 y 18, correspondiendo el mayor valor para NecP-sp (Figura 16).

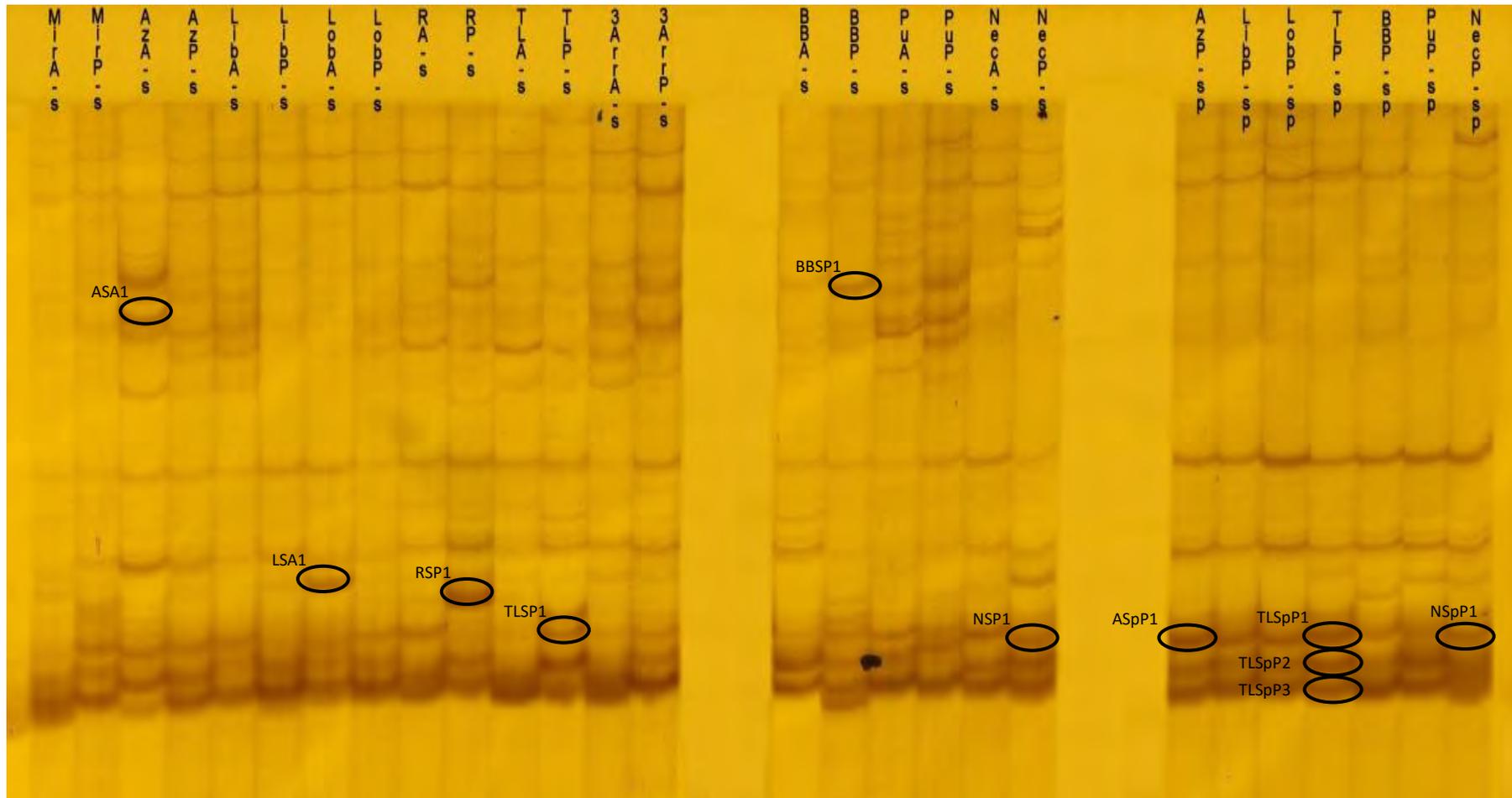


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SSCP) mostrando los patrones de bandas correspondientes a amplificadas por la reacción de PCR utilizando el par de primers LSUrk4f/LSUrk7r. En círculos, se observan bandas que fueron cortadas, reamplificadas y enviadas a servicio de secuenciación.

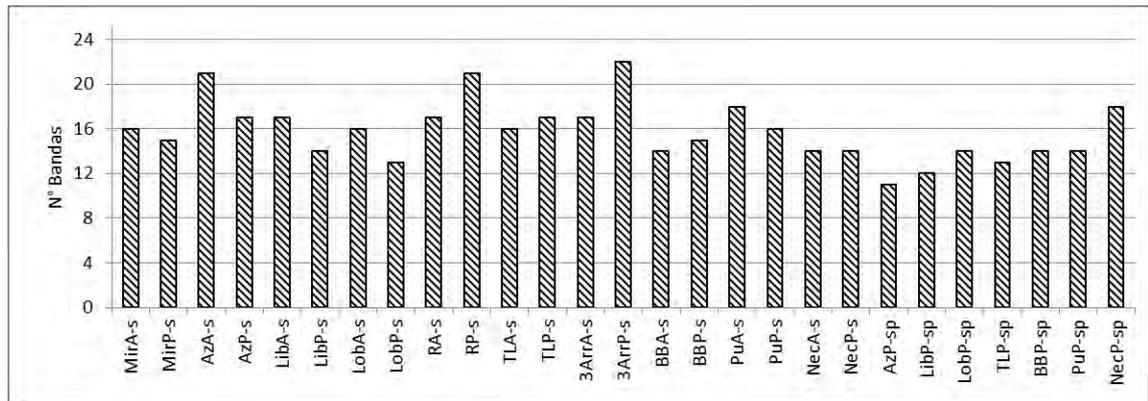


Figura 16. Número (N°) de bandas obtenidas en el perfil SSCP.

Con el patrón de bandas SSCP se obtuvieron arboles de similitud, los que fueron calculados separadamente para las muestras que provenían de suelo (Figura 17.A), así como para todas las muestras (tanto las de suelo como las de esporas (Figura 17.B)).

Las muestras provenientes de suelo (Figura 17.A) se agruparon principalmente por localidad y no por condición, obteniéndose 3 Clusters (brazos) principales. Dicho agrupamiento, sin embargo, no fue evidente para todas las muestras. Si bien en algunos Clusters se agruparon ambas condiciones de una misma localidad, una excepción fue Puan (Pu), donde sus condiciones se agruparon separadamente entre los Cluster 1 y 3.

Cuando todas las muestras (de suelo y de esporas) fueron analizadas juntas, estas se agruparon en 4 Clusters (Figura 17.B). Las muestras de esporas se ubicaron juntas en un mismo Cluster (Cluster 3), y próximas al Cluster 2. El agrupamiento de las muestras de suelo difirió cuando el análisis fue realizado para las muestras de suelo solas. En los Cluster 1, 2 y 4, la mayoría de las muestras de cada localidad se agruparon de a pares con sus dos condiciones (A y P), siendo excepciones Pu y 3Arr, en que sus dos condiciones se ubicaron en Clusters separados.

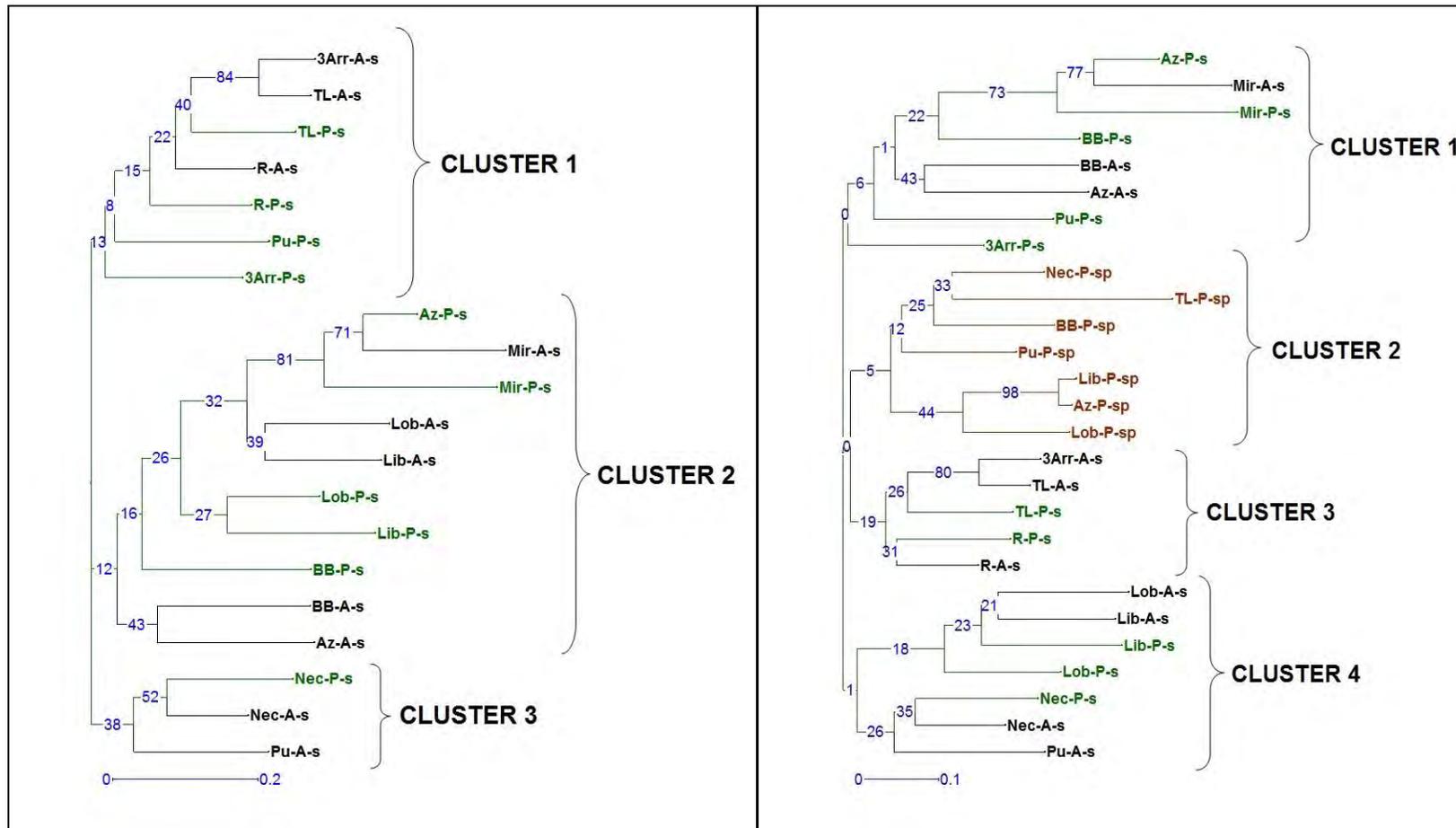


Figura 17. Dendrograma de Similitud construido a partir de los patrones obtenidos por PCR-SSCP de ADN de los suelos y las esporas de hongos MA provenientes del sustrato de las plantas trampa. Figura de la izquierda: ADN de suelo -s-; Figura de la derecha: el ADN de las esporas -sp-, junto con el de suelo -S. Uso del suelo: agrícola (A); prístina (P).

El Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) de hongos MA calculado a partir del patrón de bandas SSCP (Figura 18) presentó valores entre 1,40 y 2,27, correspondiendo los menores valores a LobP-s y los mayores a AzA-s. Cabe destacar, que la mayor variación entre los sitios se determinó en las muestras provenientes de suelo, ya que las de esporas, presentaron valores más parejos.

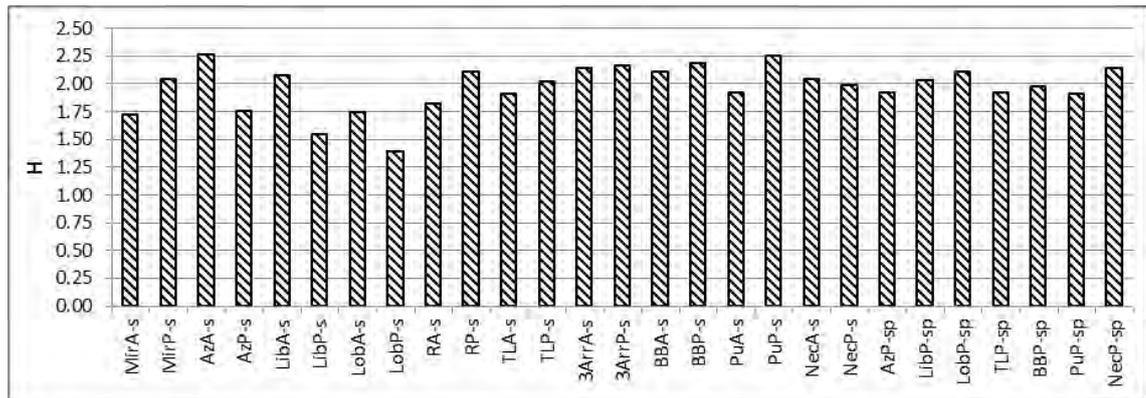


Figura 18. Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) de hongos MA obtenido a partir del patrón de bandas del gel SSCP.

Los valores de diversidad fueron similares cuando las muestras correspondieron a suelo o esporas, determinándose que en algunos casos, la diversidad fue mayor en aquellos sitios con ADN de suelo (TLP, BBP y PuP), mientras que en el resto de los sitios (AzP, LibP, LobP y NecP) la diversidad fue mayor cuando el ADN provino de esporas. No se observó un patrón que evidencie que una de las dos condiciones evaluadas haya incidido favorable o desfavorablemente sobre la diversidad de hongos MA, ni tampoco se evidenció un patrón geográfico.

4.9. Determinación molecular de hongos MA

Para confirmar la identidad de los hongos MA estudiados, se procedió a cortar algunas bandas aisladas provenientes del gel SSCP de distintas localidades, posiciones y ADN inicial (suelo o esporas). A pesar de que 26 bandas fueron cortadas y procesadas para la extracción de ADN, se logró una recuperación del 42% y sólo 11 bandas fueron amplificadas y secuenciadas (ver bandas marcadas con un óvalo en la Figura 15). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank bajo los números de acceso TLSP1 (KT950816), NSpP1 (KT950817), TLSpP3 (KT950818), TLSpP2 (KT950819), ASpP1 (KT950820), NSP1 (KT950821), BBSP1 (KT950822), TLSpP1 (KT950823), RSP1 (KT950824), LSA1 (KT950825) y ASA1 (KT950826) (disponibles online en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todas las bandas reamplificadas

presentaron secuencias distintas. El análisis de Neighbor-Joining (Figura 19) evidenció que las secuencias obtenidas se agruparon junto con secuencias obtenidas del NCBI de representantes del género *Glomus*; además que éstas se ubicaron separadamente de secuencias de otros géneros de hongos MA (*Acaulospora*, *Gigaspora* o *Scutellospora*). Tanto ASA1 y BBSP1, que se ubicaban en posiciones similares en el gel SSCP, se presentaron juntas en el dendrograma, es decir que sus secuencias presentaban similitud. Sin embargo, estas secuencias se agruparon cercanamente a TLSP1, que se ubicaba más distante en el gel. Si bien NSpP1, TLSpP1, ASpP1 y NSP1 parecieron ubicarse en posición similar en el gel, el secuenciamiento reveló secuencias distintas. Las secuencias de NSpP1 y TLSpP1, se ubicaron de forma más cercana, mientras que el resto fueron ubicadas en el dendrograma como derivando del brazo que contenía a las secuencias de TLSpP1 y NSpP1, aunque ubicadas en posiciones diferentes en el árbol filogenético. Por otra parte, LSA1 y RSP1, TLSpP2 y TLSpP3, que se ubicaban en distintas posiciones del gel, se ubicaron en el dendrograma alejadas del resto de las secuencias.

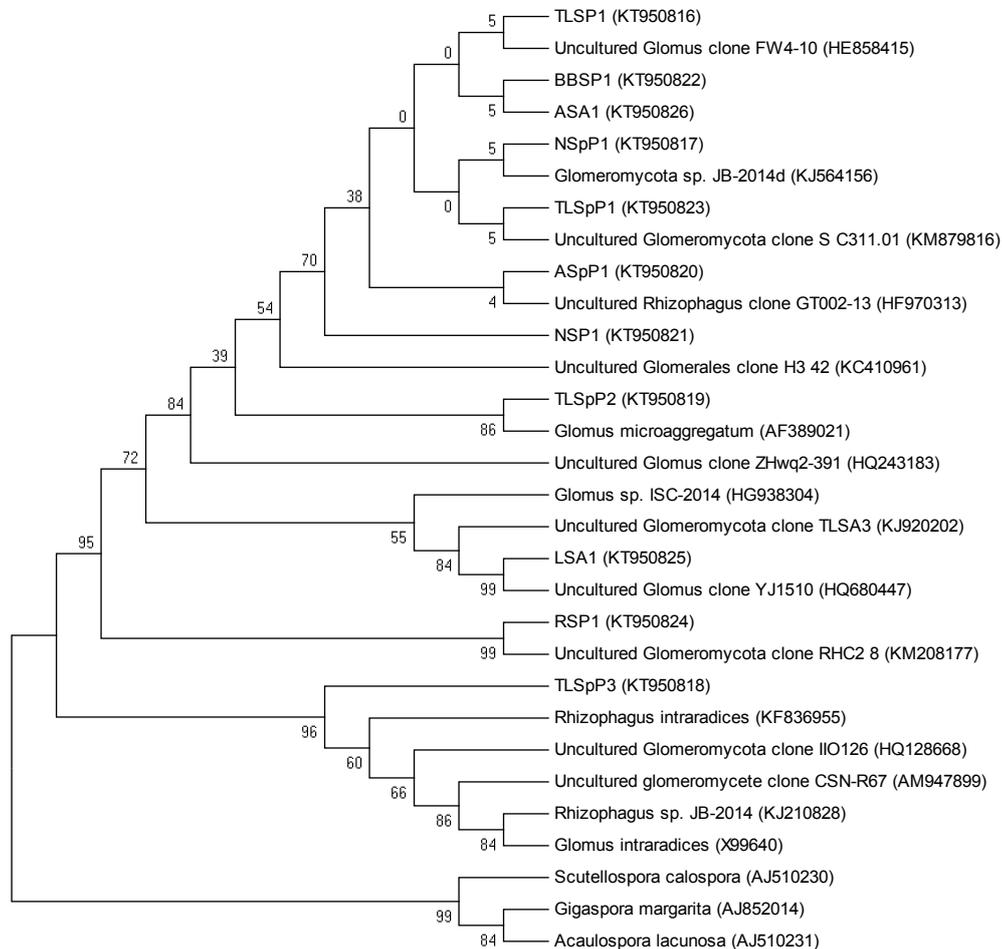


Figura 19. Árbol filogenético construido utilizando el método de Neighbor-Joining y 200 repeticiones, incorporando las secuencias provenientes del gel SSCP y aquellas de especies estrechamente relacionadas obtenidas de las bases de datos.

4.10. Relación entre los parámetros químicos de los suelos y de actividad y diversidad de hongos MA

El análisis de componentes principales (ACP) para las 10 localidades donde se incluyeron los parámetros químicos de los suelos, la colonización micorrícica, abundancia de esporas y contenido de GRSP provenientes de las plantas trampa y el Índice de diversidad de Shannon-Weaver de hongos MA a partir de suelo (Figura 20), explicó el 72,8% de la variabilidad total, siendo el 49,2% explicada por el componente principal 1 (CP1). El CP1 evidenció una asociación negativa entre los parámetros de suelo (Zn, MO, CIC, B y Fe) y la colonización micorrícica (MA% y Ar%) de hongos MA, así como también una asociación negativa entre la abundancia de esporas de hongos

MA y los parámetros químicos, principalmente el Zn (flechas opuestas en el eje horizontal). El contenido de GRSP se asoció de manera positiva con la MO, evidenciándose también cierta asociación con el resto de los parámetros de suelo. Aunque este análisis no permitió separar los sitios según su condición, dos sitios (Pu y BB) fueron agrupados por localidad, presentando sus dos condiciones próximas en un mismo cuadrante.

Se pudo observar que el índice de diversidad H, solo se asoció con el Fe en el CP1. Sin embargo, al analizar el CP2, se observó una asociación positiva del H con la abundancia de esporas y el Fe del suelo, y una asociación negativa con el Zn, la CIC y MO del suelo.

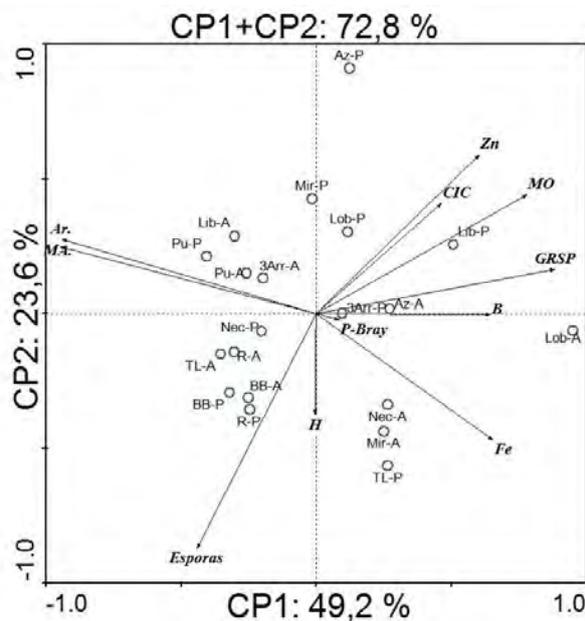


Figura 20. Análisis de componentes principales (ACP) incluyendo a los parámetros químicos de los suelos nativos, los parámetros de actividad de hongos MA (capacidad infectiva -MA%-), contenido de arúsculos -Ar%-), abundancia de esporas y contenido de proteínas relacionadas con la glomalina -GRSP- de las plantas trampa) y diversidad de hongos MA (Índice de diversidad de Shannon-Weaver calculado a partir de los patrones SSCP provenientes de suelo -H-).

5.- DISCUSION

5.1. Actividad de los hongos MA y relaciones con las características edáficas

Luego de la multiplicación de los hongos MA en cámara de crecimiento por 24 semanas, se observó la presencia de hifas, arbuscúlos y vesículas de hongos MA, tal como lo ha descripto Nardini *et al.* (2011). Los valores de capacidad infectiva (MA%) reportados en este estudio, fueron mayores a los obtenidos por Thougnon Islas *et al.* (2014), quienes analizaron muestras de suelo de catorce sitios agrícolas de la provincia de Buenos Aires. En el presente trabajo se duplicó el tiempo de multiplicación de hongos MA en la cámara de crecimiento, pasando de 12 a 24 semanas de multiplicación, permitiendo un mayor tiempo de colonización de las raíces. La multiplicación mediante plantas trampa permitió también estandarizar las condiciones de las plantas hospedantes, ya que la colonización se evaluó solo en raíces de raigrás/trébol blanco, y no en un conjunto de raíces de distintas especies, como ocurre en las muestras de campo. Si bien existen diferentes opiniones con respecto a la utilización de las plantas trampa, algunos reportes aceptan la idea de que los hongos MA son generalistas en su habilidad para formar asociaciones con las plantas trampa (Schwartz *et al.*, 2006).

Para los suelos agrícolas, se observó un efecto depresor del contenido de Fe del suelo sobre la MA%, coincidiendo con lo reportado por Covacevich *et al.* (2012a) y Thougnon Islas *et al.* (2014) para suelos de la Provincia de Buenos Aires. Estos autores reportaron también un efecto positivo de la MO sobre la MA%, que en este trabajo no se observó ya que se obtuvo la relación inversa para los suelos agrícolas, es decir que para esos suelos, un mayor contenido de MO disminuyó la micorrización. A su vez, se observó que para niveles de Fe entre 40 y 180 mg kg⁻¹, aumentos en el contenido de MO no incrementaron la micorrización. Esto podría sugerir que la MO no estaría modulando los efectos negativos del Fe sobre la micorrización, contradiciendo con lo planteado en nuestra primer hipótesis.

Al igual que en Thougnon Islas *et al.* (2014), no se obtuvieron esporas a partir de las muestras de suelo directamente colectadas del campo (datos no mostrados). Troeh y Loynachan (2009) reportaron también recuentos bajos de esporas (<1 espora/g suelo) en muestras colectadas de diferentes sitios agrícolas de Iowa (Estados Unidos). Transcurridas las 24 semanas de multiplicación en las plantas trampa realizado en este trabajo, el rango de esporas colectadas fue 666-5639 esporas 100 g suelo⁻¹, coincidiendo con los valores reportados por Zangaro *et al.* (2012), quienes analizaron

ambientes de bosques del sur de Brasil y obtuvieron valores entre 4000 y 8000 esporas/100 g suelo. El rango de esporas colectadas en este trabajo fue superior a lo reportado por Thounon Islas *et al.* (2014) (80-1175 esporas 100 g suelo⁻¹) para suelos de la Provincia de Buenos Aires, y por Lugo y Cabello (2002), (50-2000 esporas 100 g suelo⁻¹), para suelos de pastizales de altura del sur de la provincia de Córdoba. Si bien en algunos estudios, la disparidad de biomas es muy marcada, el trabajo de Thounon Islas *et al.* (2014) se realizó en biomas similares al presente trabajo, por lo que no podríamos atribuirle las diferencias a esto. Debido a que en este trabajo se duplicó el tiempo de multiplicación mediante plantas trampa, y se colectaron un mayor número de esporas, es probable que se haya favorecido la esporulación de especies de hongos MA que requerían más de doce semanas para completar su ciclo.

No se registraron relaciones significativas entre el número de esporas y la colonización micorrícica de las plantas trampa, coincidiendo con los resultados reportados por Becerra *et al.* (2009). Esto, puede deberse a que las hifas pueden desarrollarse más rápido que las esporas, acelerando la infección en mayor grado que si esta proviniera de su germinación. Tommerup (1983) demostró que la germinación desaparece de las esporas, podría deberse a la dormición que presentan desde su formación, y que varía entre especies de hongos MA, por ejemplo, para *Glomus caledonium* y *G. monosporum*, el período de dormancia fue de 6 semanas en suelos húmedos y de 5 semanas en suelos secos; para *Gigaspora calospora*, fue de 12 y 6 semanas en suelos húmedos y secos, respectivamente; mientras que para *Acaulospora laevis*, en todas las condiciones de suelo se obtuvieron períodos de dormancia que alcanzaron los 6 meses. Luego del período de dormancia, bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, las esporas podrían ser capaces de germinar rápidamente y de forma sincronizada. Es probable entonces que la instalación de los cultivos trampa permitiera la formación de esporas a partir de propagulos de hongos MA colectados en el campo, proporcionándole probablemente las condiciones y tiempo necesarios para que los hongos MA puedan completar su ciclo de vida y esporular. Esto coincide con lo reportado por Troeh y Loynachan (2009), quienes utilizando cultivos trampa reportaron no solo aumentos en la abundancia de esporas sino también aumentos en la colonización por hongos MA. Debido a que en el suelo del campo se registró colonización micorrícica en las plantas nativas pero no se pudieron recolectar esporas viables, es probable que los propagulos micorrícicos nativos de esos suelos, consistieran en segmentos de hifas y

raíces colonizadas más que en esporas. Asimismo, es probable también que las esporas generadas en los cultivos trampa hayan provenido de las hifas activas de los hongos MA que colonizaron las plantas trampa. La formación de esporas es una de las fases del ciclo de los hongos micorrícicos que darían cuenta de la llegada de los mismos a la madurez (Bonfante y Genre, 2010). En general, la esporulación puede ocurrir entre la cuarta y octava semana de iniciada la micorrización bajo la mayoría de las condiciones (Schalamuk y Cabello, 2010) excepto bajo elevados contenidos de P, donde se puede inhibir la formación de micorrizas (Covacevich *et al.*, 2006). Como la abundancia de esporas y la capacidad infectiva se determinaron en la semana 24 de crecimiento, se considera que, si bien los tiempos fueron inferiores a los reportados por Schalamuk y Cabello (2010), el tiempo que permanecieron las raíces de las plantas trampa en contacto con los propágulos nativos fue suficiente para permitir el establecimiento de la colonización micorrícica y la esporulación de los hongos MA.

En este estudio, no se encontraron relaciones significativas entre esporas, MO, P-Bray o Fe para suelos agrícolas. Sin embargo, se observó en los suelos prístinos, una asociación negativa entre la abundancia de esporas provenientes de las plantas trampa y el contenido de Zn, MO y CIC (Tabla 6). El efecto negativo del Zn en la producción de esporas, ha sido previamente reportado por Del Val *et al.* (1999) para suelos contaminados con metales pesados. Del mismo modo, Pawlowska y Charvat (2004), establecieron que el aumento del Zn en el suelo (de 0 a 10 mM de Zn) puede resultar en una disminución significativa en la germinación y la densidad de esporas e hifas de hongos MA en cultivos *in vitro*. Astiz Imaz *et al.* (2014) determinaron efectos negativos de la fertilización con Zn sobre la capacidad infectiva de hongos MA nativos de la provincia de Buenos Aires en plantas de maíz crecidas en condiciones controladas. Sin embargo, no se ha reportado hasta el momento el efecto depresor del Zn del suelo sobre la capacidad de esporulación de los hongos MA nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires, consistiendo los resultados de este estudio en el primer reporte.

Según Driver *et al.* (2005), la GRSP no es exudada por los hongos MA, sino que es producida como un componente de las hifas y de las paredes de las esporas. Cuando las hifas mueren y se descomponen, dejan un residuo de glomalina en el suelo (Treseder y Allen, 2000), por lo que el contenido de GRSP puede ser considerado como un indicador de la actividad de hongos MA. Los valores de GRSP obtenidos en este trabajo, coinciden con los reportados por Thougnon Islas *et al.* (2014) en la

provincia de Buenos Aires y con Carrizo *et al.* (2015) en la provincia de Santa Fe. Sin embargo, son mayores a los reportados por Perez-Brandan *et al.* (2014) para la provincia de Salta. Esta diferencia en el contenido de GRSP, puede estar asociada a distintos tipos de suelo, contenido de MO y características microbiológicas (ej: diferentes taxa de hongos MA, pueden producir distinta cantidad de glomalina (Treseder y Turner, 2007)).

Los mayores valores de GRSP fueron obtenidos en los suelos prístinos, donde el contenido de MO fue mayor. Esta relación positiva entre GRSP y MO o carbono orgánico, ya ha sido descrita por otros autores (Treseder y Turner, 2007; Emran *et al.*, 2012; Carrizo *et al.*, 2015), sugiriendo que el carbono y el contenido de glomalina total del suelo, estarían sujetos a la misma dinámica de deposición y descomposición (Nichols y Wright, 2005). Los suelos prístinos, presentaron una relación negativa entre la GRSP y el P-Bray, poniendo de manifiesto el efecto depresor del P-Bray sobre la GRSP, coincidiendo con Lovelock *et al.* (2004). A su vez, se observó que para niveles de P-Bray menores a 50 mg kg^{-1} , aumentos en el contenido de MO tendían a aumentar el contenido de GRSP. Esto podría indicar que, para contenidos de P inferiores a 50 mg kg^{-1} , la MO estaría modulando los efectos negativos de P-Bray sobre el contenido de GRSP, coincidiendo con lo planteado en nuestra primer hipótesis.

En este trabajo, en los suelos agrícolas se evidenció una relación negativa entre la GRSP con la MA%. Esto, coincide con lo reportado por Thougnon Islas *et al.* (2016) para algunos suelos de la provincia de Buenos Aires. Sin embargo, en los suelos prístinos, esta relación no se manifestó, coincidiendo con Treseder y Allen (2000), Bedini *et al.* (2007) y Burrows (2014) quienes establecieron que la tasa de producción de glomalina, no siempre está relacionada con la abundancia de hongos MA. En este estudio no se encontró una relación entre la GRSP y la abundancia de esporas en ningún tipo de suelo, lo que fue coincidente con lo reportado por Burrows (2014), quien observó que aunque el contenido de glomalina es indicador de la actividad de las hifas, la glomalina falla al momento de predecir la producción futura de esporas. Rillig (2004) propuso cuatro formas para la cuantificación de la glomalina: proteína de suelo reactiva por el método de Bradford (BRSP), proteína fácilmente extraíble por el método de Bradford (EE-BRSP), proteína de suelo inmunorreactiva (IRSP), y proteína de suelo inmunorreactiva fácilmente extraíble (EE-IRSP). En este trabajo se realizó la extracción de proteína fácilmente extraíble por el método de Bradford (EE-BRSP). Diferentes autores (Whiffen *et al.*, 2007) han mostrado que todos los procedimientos muestran interferencias con otras proteínas estables al calor y compuestos no

proteicos tales como ácidos húmicos, taninos y polifenoles, subestimando hasta seis veces la cuantificación (Jorge Araújo *et al.*, 2015). A pesar de estas limitaciones, la determinación de la GRSP fácilmente extraíble (EE-BRSP, o EE-GRSP –la utilizada en este estudio-) es considerada una prueba útil (herramienta rápida y de bajo costo) para estimar la actividad de los hongos MA (Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

El análisis de componentes principales (ACP), mostró las relaciones entre los parámetros de actividad de los hongos MA (capacidad infectiva, de esporulación y de producción de GRSP), con las propiedades del suelo. Se evidenció una asociación positiva entre la GRSP y la MO, CIC y Zn, confirmando lo reportado por Thougnon Islas *et al.* (2016), para 7 sitios de la provincia de Buenos Aires. La asociación negativa entre la colonización micorrícica (MA% y Ar%) y el contenido de Fe o P-Bray, confirman lo reportado por Thougnon Islas *et al.* (2014) y Covacevich *et al.* (2012a), para 7 y 29 sitios de la provincia de Buenos Aires, respectivamente, aunque en este caso se incorporaron también las variables de GRSP y abundancia de esporas, que no habían sido consideradas en estudios previos.

Cuando se evaluaron relaciones simples entre los parámetros de suelo, y de los hongos MA, los resultados fueron distintos a cuando se analizaron en conjunto. Por ejemplo, la relación negativa que se observa en el ACP entre esporas y Fe, no es significativa al ser evaluada como una relación lineal entre estos dos parámetros. Esto estaría indicando que el ACP marca una tendencia en los resultados, que no siempre es comparable con el análisis individual de las variables. Estudios posteriores deberían tener a dilucidar la implicancia de estas relaciones.

5.2. Eficiencia de los consorcios con hongos MA como promotores de crecimiento de trigo y maíz

Tanto en las plantas de trigo como de maíz, la asociación simbiótica se estableció durante el período que duró el experimento. Esto pudo observarse por la presencia de estructuras características de los hongos MA en las raíces de las plantas. Si bien se obtuvo colonización micorrícica en todas las plantas, esta fue menor a lo esperado en ambas especies (se obtuvieron valores medios de capacidad infectiva en todos los tratamientos de 8,5% de MA para trigo y 6% de MA para maíz). Astiz Imaz *et al.* (2014) reportaron en un ensayo en condiciones controladas en maíz inoculado con suelo proveniente de 2 sitios de la provincia de Buenos Aires bajo condiciones contrastantes, valores medios del 60% de capacidad infectiva. En trigo y en condiciones controladas, Perez (2014), reportó valores de capacidad infectiva cercanos al 20%. Algunos

reportes, indican que el cultivo de trigo es poco probable que se beneficie de la colonización con hongos MA (Ryan y Graham, 2002) debido a su extenso sistema radical, con raíces finamente ramificadas y pelos radicales densos, que provoca que sea poco colonizada por hongos MA, con valores que oscilan entre 10 y 30% de la longitud de la raíz (Li *et al.*, 2005). Sin embargo, el ensayo de Perez (2014) se realizó en macetas más pequeñas que las utilizadas en nuestro experimento, y obtuvo niveles de colonización más altos, indicando que la morfología de las raíces no fue el limitante en la colonización.

Tanto en el ensayo de maíz como el de trigo, los inóculos utilizados fueron los mismos, y en ambos casos la colonización fue baja aun cuando provenían de plantas trampa que habían presentado más del 45% de colonización en sus raíces. Debido a que ambos ensayos se realizaron en condiciones de invernáculo, con las macetas ubicadas a un metro de altura, es probable que las temperaturas hayan sido más elevadas que en condiciones de campo o de macetas a nivel del suelo (Reynolds *et al.*, 2013), con una mayor amplitud térmica diaria (Mathers *et al.*, 2007). Esto podría haber provocado que, durante la época de temperaturas frías (período en el cual se llevó a cabo el ensayo de trigo), las macetas presentaran temperaturas más bajas que si se encontraban a nivel del suelo, y en épocas de temperaturas altas (período durante el cual se realizó el ensayo de maíz), las macetas se calentaran, aumentando la temperatura del sustrato, incidiendo quizá en ambos casos en una menor actividad de los hongos MA la que se reflejó en una baja colonización de las raíces.

En trigo, se determinaron efectos significativos por la inoculación en la producción de área foliar, de peso fresco aéreo y en la colonización micorrícica, aunque el test de comparaciones múltiples utilizado (Test de Tukey) solo permitió detectar diferencias entre medias de tratamientos en el peso fresco aéreo. Se utilizó este test, que es altamente estricto, debido a que si hubiéramos utilizado el Test de mínimas diferencias significativas, que es menos estricto, el elevado número de tratamientos involucrados en las comparaciones múltiples hubiera provocado una alta tasa de error. En aproximadamente el 75% de los inóculos, se detectaron RI positivas en el AF y el PFA. Nuestras respuestas positivas a la inoculación, coinciden con las reportadas por Saia *et al.* (2015), quienes si bien no obtuvieron efectos estadísticamente significativos, reportaron incrementos del 23% en la biomasa aérea de trigo duro, cuando este fue inoculado con hongos MA (solos o combinados con microorganismos promotores del crecimiento vegetal). Similares resultados fueron reportados por Mohammad *et al.*

(2004) y Al-Karaki *et al.* (2004). Además, y coincidiendo con los resultados de este estudio, Perez (2014), reportó incrementos del 30% en el crecimiento aéreo de plantas de trigo, inoculadas con consorcios con hongos MA nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires.

En maíz, se detectaron efectos significativos de la inoculación con hongos MA en el peso seco aéreo y en la colonización micorrícica (MA% y Ar%). El 45% de los inóculos presentó RI positivas. Estas respuestas a la inoculación positivas, serían coincidentes con las reportadas por Astiz Imaz *et al.* (2014), quienes obtuvieron respuestas positivas por la inoculación con hongos MA provenientes de dos localidades de la provincia de Buenos Aires, (Balcarce, y Coronel Dorrego) en plantas de maíz a los 45 DDS. De similar manera, Thougnon Islas *et al.* (2014), reportaron efectos significativos de la inoculación con consorcios de hongos MA provenientes de un sitio agrícola de Lobería (31 mg kg⁻¹ P-Bray, 178 mg kg⁻¹ Fe y 6,11 % MO), a los 15 DDS. Trabajos realizados en el extranjero también han evidenciado efectos positivos por la inoculación con hongos MA. Mohamed *et al.* (2014), reportaron respuestas positivas a la inoculación con hongos MA (con esporas de *Glomus* y *Gigaspora*), sola o combinada con bacterias, en maíz a los 90 DDS, presentando incrementos en el peso seco aéreo de las plantas. De la misma manera, Zhao *et al.* (2015) reportó aumentos significativos en el peso seco aéreo, como así también en el peso seco de raíces, por la inoculación con hongos MA en maíz bajo condiciones sin estrés hídrico, con respuestas a la inoculación del 21% y 7%, respectivamente, siendo estos valores, similares a los reportados en este trabajo. Ortas y Akpınar (2011), reportaron efectos positivos en el peso seco aéreo y de raíces, en plantas de maíz inoculadas con hongos MA nativos de Turquía, así como también en aquellos casos donde se inoculó con cepas seleccionadas de hongos MA. Sin embargo, Blanco y Gutierrez (1998), encontraron respuesta negativa en maíz a los 48 DDS, por la inoculación con hongos MA provenientes de un ecosistema nativo de Costa Rica, atribuyendo la falta de respuesta a la inoculación tanto a un desbalance entre K, N y P en el sustrato de crecimiento, lo que podría haber provocado una disminución del efecto de las micorrizas; como a la baja efectividad de los hongos MA nativos utilizados como inoculantes.

En los dos experimentos, si bien no todos los inóculos fueron eficientes en promover el crecimiento vegetal, algunos inóculos evidenciaron efectos promotores de crecimiento. Las mayores respuestas a la inoculación se obtuvieron en plantas

inoculadas con consorcios prístinos. En trigo, el 100% de los inóculos prístinos, y en maíz el 80% de los inóculos prístinos, fueron eficientes en promover el crecimiento vegetal. No se encontró ningún patrón de regionalidad ni característica química de suelo que pudiera determinar una mayor eficiencia en la promoción del crecimiento vegetal. Las mayores RI en suelos prístinos, coinciden con lo reportado por Perez (2014) para trigo inoculado con 2 consorcios con hongos MA nativos de sitios de la provincia de Buenos Aires, confirmando los resultados de este autor, al utilizar diez veces más inóculos.

Tanto en maíz como en trigo, las plantas con mayor respuesta a la inoculación (inoculadas con Lob-P, Az-P y Pu-P, para trigo; y con BB-P, para maíz), presentaron niveles medio-bajos de infección en sus raíces, demostrando de esta manera, una mayor eficiencia de estos consorcios para promover el crecimiento vegetal. Caso contrario fue AC-A que, en ambos experimentos, presentó valores negativos en su respuesta a la inoculación, con una alta capacidad de infección. Diversos autores, han reportado respuestas a la inoculación con hongos MA neutras o negativas sobre el crecimiento vegetal (Koide, 1985; Fitter, 1991). Johnson *et al.* (1997), definió a las asociaciones de hongos MA como benéficas a las plantas (mutualistas) cuando los costos netos son menores que los beneficios netos, y perjudiciales (parasíticas) cuando los costos superan los beneficios. Es probable entonces, que el consorcio proveniente de AC-A, tuviera un comportamiento parasítico por parte de los hongos MA, con una alta colonización de las raíces, un alto consumo de los fotosintatos y con un bajo aporte de nutrientes a la planta, traduciéndose en un bajo crecimiento vegetal (el costo fue mayor que el beneficio). Diversos autores han establecido que la colonización micorrícica y el rendimiento en materia seca de las plantas, son independientes uno de otro (Medeiros *et al.*, 1994; Khaliq y Sanders, 2000), en este sentido, Ahiabor y Hirata (1994), reportaron respuestas significativas en plantas inoculadas a pesar de las bajas tasas de infección de la raíz y la baja fertilidad del suelo.

Por otro lado, en el suelo los hongos MA interactúan con diferentes tipos de bacterias, principalmente en la rizósfera, con relaciones sinérgicas en la mayoría de los casos (Miransari, 2010), y pueden provocar distintos efectos en el suelo, modificando sus propiedades estructurales (Rillig y Mummey, 2006), o mejorando la disponibilidad de nutrientes (Marschner y Dell, 1994) y contribuyendo de esta manera a la promoción del crecimiento vegetal. Resultados obtenidos por el grupo de trabajo, han evidenciado

posibles interacciones sinérgicas entre los consorcios con hongos MA y organismos solubilizadores de P, cuyo agregado potenciaría los efectos de los hongos MA (Perez, 2014; Covacevich Com. Pers.). Es probable que en este estudio, hayan ocurrido interacciones sinérgicas entre los hongos MA y organismos solubilizadores de P nativos de cada suelo. Sin embargo, la evaluación de estas interacciones excede los objetivos de esta tesis por lo que futuros estudios deberían tender a clarificar sus efectos y poder generar nuevas perspectivas de utilización de los microorganismos del suelo con fines biotecnológicos. Esto podrá lograrse incrementando el entendimiento del sistema suelo-planta-microorganismos, en particular en la ecología de los hongos MA y la sinergia con distintos microorganismos, de manera de lograr técnicas/estrategias de inoculación más efectivas en la agricultura y ecológicamente sustentables.

5.3. Determinación de la diversidad de hongos MA mediante técnicas moleculares

La mayoría de los estudios de diversidad de hongos MA, se basan principalmente en el análisis de las esporas obtenidas del suelo, sin embargo, la producción de esporas puede variar. Es por esto, que analizamos las comunidades de hongos MA nativos de 11 sitios de la provincia de Buenos Aires, bajo condiciones contrastantes, basados en los perfiles de SSCP generados con fragmentos del gen 28 S del ADNr, provenientes tanto del sustrato (suelo) de las plantas trampa como de esporas de hongos MA. Se utilizó la estrategia de las plantas trampa, para multiplicar los hongos MA nativos, ya que se evidenciaron bajos o nulos contenidos de esporas en el campo. Además, las plantas trampa permitieron estabilizar las condiciones en relación a la planta hospedante (en el campo coexisten más de una especie), ya que uno de los objetivos de este estudio fue analizar cambios en la diversidad de los hongos MA en relación al uso del suelo o características químicas del mismo.

La estrategia de PCR-SSCP permitió generar patrones con un número de bandas similar a los reportados por Thougnon Islas *et al.* (2016) para ADN proveniente de suelo y esporas. Los arboles de similitud generados a partir de los perfiles SSCP presentaron distintos patrones cuando se consideraron solo las muestras provenientes de suelo o en conjunto suelo-esporas. En ambos casos, se observó un agrupamiento por localidad (es decir cada sitio presentó sus dos condiciones juntas en el mismo Cluster), y no por la condición de uso del suelo. El hecho de que cada sitio presentara

sus dos condiciones juntas, podría deberse a que las comunidades de hongos MA estarían compartiéndose y serían moduladas por algún patrón geográfico o propiedad química del suelo, más que por el uso del suelo. Sin embargo, no encontramos ninguna propiedad química que justifique dicho agrupamiento. Esto no es consistente con lo reportado por Li *et al.* (2010), quienes encontraron que los clusters obtenidos por RFLP a partir de ADN de raíces, se agrupaban de acuerdo al uso del suelo, dejando de lado los suelos sin disturbar (similares a nuestros suelos prístinos), indicando que la composición de las comunidades de hongos MA cambian de acuerdo a la condición de uso del suelo, provocando cambios en las propiedades químicas y en las comunidades de plantas. Por otra parte, Thougnon Islas *et al.* (2016) reportaron que, a partir de la estrategia PCR-SSCP de muestras provenientes de suelo, no encontraron ningún agrupamiento ni por ubicación geográfica, ni por condición de uso del suelo. Además, cuando estos autores realizaron la estrategia de PCR-SSCP a partir de esporas, observaron un comportamiento diferencial entre sitios. En algunos casos, y al igual que Li *et al.* (2010), observaron un agrupamiento por condición de uso del suelo, mientras que en otros sitios, y coincidiendo con nuestros resultados, observaron un agrupamiento por localidad, aunque sin encontrar una propiedad química que justifique dicho agrupamiento.

El índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) es usado para caracterizar las comunidades, presentando valores que van desde 0, para comunidades que presentan un solo grupo taxonómico, a mayores valores, en aquellas comunidades que incluyen varios grupos taxonómicos. En este estudio, no se observó un patrón que evidencie que una de los dos condiciones de suelo evaluadas haya incidido favorable o desfavorablemente, sobre el Índice de diversidad, confirmando los resultados obtenidos por Thougnon Islas *et al.* (2016). Sin embargo, encontramos una tendencia, no soportada estadísticamente, donde para los suelos prístinos, la mayor diversidad se encontró en las muestras provenientes del oeste-sudoeste-sudeste de la provincia (Rivadavia, Trenque Lauquen, Puan, Bahía Blanca, Tres Arroyos y Miramar, siendo las últimas tres localidades cercanas al mar), mientras que para los suelos agrícolas, la mayor diversidad parecería encontrarse en el centro y sur de la provincia (Líbano y Azul, del centro, y Bahía Blanca, Tres Arroyos y Necochea, del sur de la provincia y cercanas al mar). Si bien nuestros resultados confirmarían la tendencia en el aumento de la diversidad de hongos MA en la cercanía al mar, reportado por Thougnon Islas *et al.* (2016), no estamos en condiciones de establecer una conclusión de nivel geográfico, ya que nuestros resultados no están soportados estadísticamente.

Además, nosotros observamos la tendencia mencionada solo para las muestras provenientes de suelo (y no de esporas, como Thounon Islas *et al.*, 2016) y no solo observamos una mayor diversidad en la cercanía al mar, sino también en el oeste y centro de la provincia (para suelos prístinos y agrícolas, respectivamente), por lo que sería necesario continuar con la investigación para poder establecer conclusiones geográficas, si las hubiere.

El ACP evidenció que el índice de diversidad de suelo solo se asoció con el Fe en el CP1. Sin embargo, al analizar el CP2, se observó una asociación negativa con el Zn, la CIC y la MO del suelo, y una asociación positiva entre la abundancia de esporas y el índice de diversidad de suelo. No se observó una asociación negativa entre el P-Bray y el índice de diversidad, resultado que no sería coincidente con lo reportado por Thounon Islas, *et al.*, (2016) para menos sitios que los evaluados en este estudio.

Por otra parte, no encontramos diferencias en el Índice de diversidad de las muestras provenientes de ADN de suelo y de esporas. Esto puede deberse a que si bien para extraer el ADN del suelo se utiliza una menor cantidad de material, se extrae el ADN de propágulos micorrícicos presentes en el suelo además del ADN de esporas. Al extraer el ADN de esporas en cambio, si bien el contenido de material inicial es casi 100 veces mayor, no todas las especies de hongos MA esporulan al mismo tiempo y hay algunas especies que tienen baja o nula capacidad de esporular (Clapp *et al.*, 1995). De esta manera, podría haberse generado cierta compensación en ambos casos, lo que resultó en patrones con similar número de bandas en el gel SSCP y por lo tanto, índices de diversidad similares. Estos resultados, confirmarían lo reportado por Thounon Islas *et al.* (2016), quienes no encontraron diferencias entre los índices de diversidad provenientes de suelos y de esporas, para siete sitios de la provincia de Buenos Aires (distintos a los de nuestro estudio), bajo condiciones contrastantes.

Los índices de diversidad cuantificados en este estudio se mantuvieron en un rango similar a los reportados por Thounon Islas *et al.* (2016) y evaluados por la misma técnica para hongos MA nativos de la provincia de Buenos Aires. Sin embargo, fueron menores a los reportados por Minggui *et al.* (2012) para suelos de China obtenidos mediante la técnica DGGE, y mayores a los reportados por Sánchez-Castro *et al.* (2012) quienes utilizaron la técnica SSCP a partir de ADN de raíces de un ecosistema semiárido mediterráneo de España. Estas diferencias, pueden deberse a que tanto Minggui *et al.* (2012), como Sánchez-Castro *et al.* (2012), obtuvieron índices de diversidad para un fragmento de 18S ADNr, amplificando no solo para la familia Glomeraceae, sino también Diversisporaceae.

En este estudio los índices de diversidad se calcularon en base a los patrones de bandas obtenidos por el gel SSCP para un fragmento de ADNr 28S amplificado. Sin embargo, no podemos asegurar que una banda haya correspondido únicamente a una especie de hongo MA. Esto es debido a que las esporas de los hongos MA son multinucleadas, y en ocasiones los núcleos presentan una composición genética diferente dentro de la misma espora, por lo que una misma especie podría resultar en más de una banda en el gel. Esto ha sido descrito por de Souza *et al.* (2004) quienes, mediante uso de la estrategia de DGGE reportaron patrones genéticos de más de una banda para hongos MA pertenecientes al género *Gigaspora*. Aun así y pese a las limitaciones de la técnica, la utilización de los patrones generados mediante la estrategia de PCR-SSCP a partir de ADN de suelo y esporas para la determinación de la diversidad, ha permitido avanzar en el conocimiento de la diversidad ambiental de los hongos MA. Además, debido que todas las muestras fueron sometidas al mismo procedimiento, esa posible sobreestimación quedaría estandarizada, dándole robustez a los resultados.

Las bandas que fueron cortadas y reenviadas a secuenciamiento, se agruparon en un dendrograma de similitud con individuos del género *Glomus* y se separaron de las secuencias de *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* como era de esperar, ya que se usaron primers específicos para la reacción por PCR, que amplifican parte de la región 28S del ADNr del género *Glomus* (Kjøller y Rosendahl, 2000; Rosendahl y Stukenbrock, 2004). En algunos casos, bandas que a simple vista se ubicaron en similar posición en el gel SSCP, se agruparon juntas en el árbol filogenético, obteniéndose secuencias aunque no idénticas, muy similares. Sin embargo, secuencias que se ubicaron en posiciones cercanas, no compartieron ninguna rama en el dendrograma debido a que eran muy diferentes. Esto podría indicar cierta sensibilidad del método de SSCP para separar secuencias cuyas bandas vistas a través del ojo humano parecieran ubicarse en posición similar en el gel. Aun así, el método utilizado permitió analizar gran número de muestras correspondientes a una amplia región de la provincia de Buenos Aires de manera conjunta. Asimismo, esto permitió detectar elevada diversidad genética de los hongos MA nativos pertenecientes al género *Glomus* (recientemente cambiado por *Funneliformis*), permitiendo un progreso en la identificación genética de los hongos MA nativos de una importante región agroecológica, como es la provincia de Buenos Aires.

6.- CONCLUSIONES

En este estudio, la estrategia de multiplicación de los hongos MA mediante plantas trampa, permitió no solo estandarizar las condiciones de multiplicación, sino también que le permitió a los hongos MA cumplir su ciclo y esporular, aumentando la abundancia de esporas en comparación con las muestras provenientes del campo. Tanto para MA% como para la abundancia de esporas, no se registró un patrón que evidencie que una de las dos condiciones evaluadas haya incidido favorable o desfavorablemente, ni un patrón de ubicación geográfica de los sitios. En cuanto al contenido de GRSP, se observó que las muestras provenientes de condiciones prístinas, que presentaban mayor MO en el suelo, presentaban mayor GRSP.

En los suelos agrícolas, se determinó efecto depresor del contenido de Fe del suelo sobre la MA% y se observó que con niveles de Fe entre 40 y 180 mg kg⁻¹, aumentos en el contenido de MO no aumentaron la micorrización. Para los suelos prístinos se determinó un efecto depresor del P-Bray sobre la GRSP, y se observó para los suelos con contenido de P-Bray menor a 50 mg kg⁻¹, que la MO moduló el efecto depresor del P. La abundancia de esporas no se asoció negativamente con el Fe o P-Bray, pero sí con el Zn, confirmando en este caso el efecto depresor que ejerce el Zn en la esporulación.

Debido a que no todos los parámetros indicadores de actividad de hongos MA se relacionaron negativamente con el Fe y el P-Bray, y a que en aquellos casos donde la relación era negativa, la MO no siempre presentó un efecto modulador, se rechaza la Hipótesis 1.

Tanto en el ensayo de trigo como de maíz, se obtuvieron respuestas positivas por la inoculación con hongos MA, aunque los niveles de colonización de las plantas fueron menores a los esperados. Si bien se detectaron inóculos promisorios en la promoción del crecimiento vegetal (Lob-P, Az-P y Pu-P, para trigo; y BB-P, para maíz), un inóculo, proveniente de AC-A, evidenció una asociación de los hongos MA con mayor costo que beneficio para la planta. En ambos experimentos, los inóculos que fueron más eficientes en promover el crecimiento vegetal, provenían de suelos prístinos. En trigo, el 100% de los inóculos prístinos fueron eficientes, mientras que en maíz el 80% de los inóculos fueron eficientes en promover el crecimiento vegetal. Por lo tanto, en este estudio se encontraron evidencias suficientes para rechazar la Hipótesis 2.

La diversidad genética de los hongos MA evaluada mediante la estrategia de SSCP, para regiones del 28S del ADNr, se relacionó negativamente con los parámetros químicos del suelo (Zn, MO, y CIC) y no se encontró relación con el P-Bray del suelo. No se observó un patrón que evidencie que una de las dos condiciones evaluadas haya incidido favorable o desfavorablemente sobre el Índice de diversidad, evidenciando que la diversidad genética de hongos MA nativos de la provincia de Buenos Aires sería independiente de la condición de uso de suelo. Es por esto que no se encontraron evidencias para rechazar la Hipótesis 3.

Además, encontramos una tendencia, no soportada estadísticamente, donde para los suelos prístinos, la mayor diversidad se encontró en las muestras provenientes del oeste-sudoeste-sudeste de la provincia (Rivadavia, Trenque Lauquen, Puan, Bahía Blanca, Tres Arroyos y Miramar, siendo las últimas tres localidades cercanas al mar), mientras que para los suelos agrícolas, la mayor diversidad pareció encontrarse en el centro y sur de la provincia. Estudios posteriores, deberían tratar de dilucidar estos aspectos para poder realizar una conclusión geográfica.

7.- CONSIDERACIONES FINALES

En este estudio se avanzó en el conocimiento sobre la identidad genética de representantes del género *Glomus* nativos de la provincia de Buenos Aires, a través de la técnica de PCR-SSCP. Debido a que se realizó solo para individuos del género *Glomus*, futuros estudios deberían poner a punto esta técnica para los otros géneros de hongos MA.

En este estudio, los experimentos de inoculación con consorcios microbianos con hongos MA se realizaron en sustrato (suelo+perlita+arena) estéril. Podría suponerse entonces que los inóculos no establecieron interacciones con poblaciones microbianas nativas del sustrato de las macetas, las que podrían interferir en los resultados obtenidos. Para lograr mayor acercamiento a lo que podría ser un planteo de inoculación a nivel campo, futuros ensayos deberían ser conducidos para evaluar la eficiencia de los inóculos testeados en suelos con poblaciones microbianas nativas. Además, por antecedentes del grupo de trabajo se han evidenciado interacciones con hongos MA y microorganismos solubilizadores de P, que podrían estar interfiriendo en estos experimentos, por lo que estudios posteriores deberían tender a ampliar el conocimiento en este tema.

Por último, futuros estudios deberían evaluar si otras características del suelo, además de las evaluadas, resultantes del uso del mismo; podrían ejercer cierta presión de selección sobre los hongos MA, y evaluar si a través de dichas características se podrían seleccionar inóculos nativos de la provincia de Buenos Aires, que sean potenciales promotores del crecimiento de las plantas.

8.- BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, L.; ROBSON, A. 1991. Field management of VA mycorrhizal fungi. In: Kelster, D.; Cregan, P. (eds.) *The rhizosphere and plant growth*, Springer, Kluwer, Norwell. pp. 355-362.
- AHIABOR, B.D.; HIRATA, H. 1994. Characteristic responses of three tropical legumes to the inoculation of two species of VAM fungi in Andosol soils with different fertilities. *Mycorrhiza*. 5(1): 63-70.
- AL-KARAKI, G.; MCMICHAEL, B.; ZAK, J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*. 14(4): 263-269.
- ALVAREZ, R.; STEINBACH, H.S. 2006. Factores climáticos y edáficos reguladores del nivel de materia orgánica. En: Álvarez, R. (ed.) *Materia Orgánica "Valor Agronómico y Dinámica en Suelos Pampeanos"*, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. pp. 31-40.
- APPOLONI, S.; LEKBERG, Y.; TERCEK, M.T.; ZABINSKI, C.A.; REDECKER, D. 2008. Molecular Community Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Roots of Geothermal Soils in Yellowstone National Park (USA). *Microbial Ecology*. 56(4): 649-659.
- ASTIZ IMAZ, P.; BARBIERI, P.A.; ECHEVERRÍA, H.E.; SAINZ ROZAS, H.R.; COVACEVICH, F. 2014. Indigenous mycorrhizal fungi from Argentina increase Zn nutrition of maize modulated by Zn fertilization. *Soil Environm.* 33(1): 23-32.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. 1995. Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. 391-407.
- BAGAYOKO, M.; BUERKERT, A.; LUNG, G.; BATIONO, A.; RÖMHELD, V. 2000. Cereal/legume rotation effects on cereal growth in Sudano-Sahelian West Africa: soil mineral nitrogen, mycorrhizae and nematodes. *Plant and Soil*. 218(1-2): 103-116.
- BALESTRINI, R.; ROMERA, C.; PUIGDOMENECH, P.; BONFANTE, P. 1994. Location of a cell-wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and β -1, 3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta*. 195(2): 201-209.
- BECERRA, A.G.; CABELLO, M.; ZAK, M.R.; BARTOLONI, N. 2009. Arbuscular mycorrhizae of dominant plant species in Yungas forests, Argentina. *Mycologia*. 101(5): 612-621.
- BEDINI, S.; AVIO, L.; ARGESE, E.; GIOVANNETTI, M. 2007. Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 120(2-4): 463-466.
- BENBOUZA, H.; JACQUEMIN, J.-M.; BAUDOIN, J.-P.; MERGEAI, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to

- detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 10(2): 77-81.
- BENNETT, A.E.; BEVER, J.D.; DEANE BOWERS, M. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungal species suppress inducible plant responses and alter defensive strategies following herbivory. *Oecologia*. 160(4): 771-779.
- BIDARTONDO, M.I. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist*. 167(2): 335-352.
- BINGHAM, F. 1982. Boron. In: Page, A.; Miller, R.; Keeney, D. (eds.) *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*, ASA - SSSA, Madison, WI, Agronomy Monograph N°9. pp. 431-447.
- BLANCO, F.; GUTIERREZ, R. 1998. Efecto de la *Mucuna* sp. en la composición de la comunidad de hongos MA del suelo y en la respuesta del maíz a la inoculación con hongos MA. *Agronomía Costarricense*. 22(2): 153-161.
- BOHRER, K.E.; FRIESE, C.F.; AMON, J.P. 2004. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza*. 14(5): 329-337.
- BONFANTE, P.; GENRE, A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*. 1(4): 1-11.
- BONFANTE, P.; SELOSSE, M.A. 2010. A glimpse into the past of land plants and of their mycorrhizal affairs: from fossils to evo-devo. *New Phytologist*. 186(2): 267-270.
- BRADY, N.; WEIL, R. 2008. Soil Acidity. In: Brady, N.; Weil, R. (eds.) *The Nature and Properties of soil*, Prentice-Hall, inc., New Jersey, USA. pp. 358-399.
- BRAY, R.H.; KURTZ, L. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science*. 59(1): 39-46.
- BRUNDRETT, M.C. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in ecological research*. 21: 171–213.
- BRYLA, D.R.; DUNIWAY, J.M. 1997. Effects of mycorrhizal infection on drought tolerance and recovery in safflower and wheat. *Plant and soil*. 197(1): 95-103.
- BUCHER, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*. 173(1): 11-26.
- BURROWS, R. 2014. Glomalin Production and Infectivity of Arbuscular-Mycorrhizal Fungi in Response to Grassland Plant Diversity. *American Journal of Plant Sciences*. 5(1): 103-111.
- CARRIZO, M.E.; ALESSO, C.A.; COSENTINO, D.; IMHOFF, S. 2015. Aggregation agents and structural stability in soils with different texture and organic carbon contents. *Scientia Agricola*. 72(1): 75-82.

- CARVALHO, L.M.; CAÇADOR, I.; MARTINS-LOUÇÃO, M. 2001. Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza*. 11(6): 303-309.
- CAVAGNARO, T.; SMITH, F.; AYLING, S.; SMITH, S. 2003. Growth and phosphorus nutrition of a Paris type arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 157(1): 127-134.
- CHAPMAN, H. 1965. Cation-exchange capacity. In: Black, C.; Klute, A.; Miller, R.; Page, A. (eds.) *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*, ASA - SSSA, Madison, WI, Agronomy Monograph N°9. pp. 891-901.
- CLAPP, J.; YOUNG, J.; MERRYWEATHER, J.; FITTER, A. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist*. 130(2): 259-265.
- CLAPP, J.P.; HELGASON, T.; DANIELL, T.J.; PETER, J.; YOUNG, W. 2003. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Mycorrhizal ecology*, Springer, Berlin, Germany. pp. 201-224.
- CLARK, R.B.; ZETO, S.K. 1996. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 28(10-11): 1505-1511.
- CORNELISSEN, J.; AERTS, R.; CERABOLINI, B.; WERGER, M.; VAN DER HEIJDEN, M. 2001. Carbon cycling traits of plant species are linked with mycorrhizal strategy. *Oecologia*. 129(4): 611-619.
- COVACEVICH, F. 2010. Molecular tools for biodiversity and phylogenetic studies in mycorrhizas: The use of primers to detect arbuscular mycorrhizal fungi. In: Thangadurai, E.; Hijri, M.; Busso, C. (eds.) *Perspectives in Mycorrhizal Research*, Bioscience Publications, India. pp. 186-202.
- COVACEVICH, F.; ECHEVERRÍA, H.E. 2000. Caracterización química y biológica de un hapludol bajo diferentes manejo. *Ciencia del Suelo*. 18(2): 144-148.
- COVACEVICH, F.; ECHEVERRÍA, H.E. 2003. Utilización de formaldehído para la erradicación de hongos micorríticos arbusculares de muestras de suelo. *Ciencia del suelo*. 21: 9-17.
- COVACEVICH, F.; ECHEVERRÍA, H.E. 2008. Receptivity of an Argentinean pampas soil to arbuscular mycorrhizal *Glomus* and *Acaulospora* strains. *World Journal of Agricultural Sciences*. 4: 688-698.
- COVACEVICH, F.; ECHEVERRÍA, H.E. 2009. Mycorrhizal occurrence and responsiveness of tall fescue and wheatgrass are affected by the source of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *Journal of Plant Interactions*. 4(2): 101-112.
- COVACEVICH, F.; ECHEVERRÍA, H.E.; AGUIRREZABAL, L.A. 2007. Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization of field and glasshouse-grown spring wheat from Argentina. *Applied Soil Ecology*. 35(1): 1-9.

- COVACEVICH, F.; EYHERABIDE, M.; SAINZ ROZAS, H.; ECHEVERRÍA, H. 2012a. Capacidad micotrófica arbuscular y características químicas de suelos agrícolas y prístinos de Buenos Aires (Argentina). *Ciencia del Suelo*. 30(2): 119-128.
- COVACEVICH, F.; HERNÁNDEZ GUIJARRO, K.; SAINZ ROZAS, H.; ECHEVERRÍA, H. 2012b. Variabilidad de hongos micorrícicos (*Glomus* spp.) Mediante PCR-SSCP en suelos de Buenos Aires con diferentes manejos. *Actas 19° Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. Mar del Plata. En CD.
- COVACEVICH, F.; MARINO, M.A.; ECHEVERRÍA, H.E. 2006. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass. *European Journal of Soil Biology*. 42(3): 127-138.
- CRUZATE, G.A.; CASAS, R. 2012. Extracción y balance de nutrientes en los suelos agrícolas de la Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*. 6: 7-14.
- DALPÉ, Y.; DIOP, T.; PLENCHETTE, C.; GUEYE, M. 2000. Glomales species associated with surface and deep rhizosphere of *Faidherbia albida* in Senegal. *Mycorrhiza*. 10(3): 125-129.
- DANIELL, T.; HUSBAND, R.; FITTER, A.; YOUNG, J. 2001. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology*. 36(2-3): 203-209.
- DAUBER, J.; NIECHOJ, R.; BALTRUSCHAT, H.; WOLTERS, V. 2008. Soil engineering ants increase grass root arbuscular mycorrhizal colonization. *Biology and Fertility of Soils*. 44(5): 791-796.
- DAVIES, F.; SVENSON, S.; COLE, J.; PHAVAPHUTANON, L.; DURAY, S.; OLALDE-PORTUGAL, V.; MEIER, C.; BO, S. 1996. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology*. 16(11-12): 985-993.
- DE SOUZA, F.A.; KOWALCHUK, G.A.; LEEFLANG, P.; VAN VEEN, J.A.; SMIT, E. 2004. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter-and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3): 1413-1424.
- DEL VAL, C.; BAREA, J.; AZCON-AGUILAR, C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2): 718-723.
- DICKSON, S. 2004. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*. 163(1): 187-200.
- DJUUNA, I.A.F.; ABBOTT, L.K.; VAN NIEL, K. 2010. Predicting infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi from soil variables using generalized additive models and generalized linear models. *Biodiversitas*. 11: 145-150.

- DODD, J.C.; ROSENDAHL, S.; GIOVANNETTI, M.; BROOME, A.; LANFRANCO, L.; WALKER, C. 1996. Inter and intraspecific variation within the morphologically similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. *New Phytologist*. 133(1): 113-132.
- DODD, J.C.; THOMSON, B. 1994. The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and soil*. 159(1): 149-158.
- DOTZLER, N.; WALKER, C.; KRINGS, M.; HASS, H.; KERP, H.; TAYLOR, T.N.; AGERER, R. 2009. Acaulosporoid glomeromycotan spores with a germination shield from the 400-million-year-old Rhynie chert. *Mycological Progress*. 8(1): 9-18.
- DOUDS, D.; GALVEZ, L.; JANKE, R.; WAGONER, P. 1995. Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 52(2): 111-118.
- DOUDS JR, D.D.; MILLNER, P.D. 1999. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74(1-3): 77-93.
- DRIVER, J.D.; HOLBEN, W.E.; RILLIG, M.C. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 37(1): 101-106.
- EMRAN, M.; GISPERT, M.; PARDINI, G. 2012. Patterns of soil organic carbon, glomalin and structural stability in abandoned Mediterranean terraced lands. *European Journal of Soil Science*. 63(5): 637-649.
- EYHERABIDE, M. 2015. Cambios en la disponibilidad de micronutrientes por la agricultura en suelos de la región Pampeana. Tesis de *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. 57 p.
- EYHERABIDE, M.; SAINZ ROZAS, H.; ECHEVERRÍA, H.; VELASCO, J.; BARRACO, M.; FERRARIS, G.; ANGELINI, H. 2012. Niveles de cinc disponibles en suelos de la región pampeana Argentina. *Actas 19° Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. Mar del Plata. En CD.
- FINLAY, R.D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of experimental botany*. 59(5): 1115-1126.
- FITTER, A. 1991. Costs and benefits of mycorrhizas: implications for functioning under natural conditions. *Experientia*. 47(4): 350-355.
- FITTER, A. 1988. Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. *Journal of experimental botany*. 39(5): 595-603.
- FITTER, A.H. 1985. Functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas under field conditions. *New Phytologist*. 99: 257-265.

- FRANK, B. 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of AB Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza*. 15(4): 267-275.
- FRIESE, C.F.; ALLEN, M.F. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*. 83(4): 409-418.
- GADKAR, V.; RILLIG, M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiology Letters*. 263(1): 93-101.
- GANDOLFI, A.; SANDERS, I.R.; ROSSI, V.; MENOZZI, P. 2003. Evidence of recombination in putative ancient asexuals. *Molecular Biology and Evolution*. 20(5): 754-761.
- GARCÍA, F. 2001. Balance de fósforo en los suelos de la región pampeana. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*. 9(1): 3.
- GAUR, A.; ADHOLEYA, A. 2002. Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biology and Fertility of Soils*. 35(3): 214-218.
- GERDEMANN, J.; NICOLSON, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46(2): 235-244.
- GIOVANNETTI, M.; AVIO, L.; FORTUNA, P.; PELLEGRINO, E.; SBRANA, C.; STRANI, P. 2006. At the root of the wood wide web: Self recognition and non-self incompatibility in mycorrhizal networks. *Plant Signaling and Behavior*. 1(1): 1-5.
- GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*. 223(6): 1115-1122.
- GOVINDARAJULU, M.; PFEFFER, P.E.; JIN, H.; ABUBAKER, J.; DOUDS, D.D.; ALLEN, J.W.; BÜCKING, H.; LAMMERS, P.J.; SHACHAR-HILL, Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435(7043): 819-823.
- HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. London. 483 p.
- HELGASON, T.; DANIELL, T.; HUSBAND, R.; FITTER, A.; YOUNG, J. 1998. Ploughing up the wood-wide web?. *Nature*. 394(6692): 431-431.
- HELGASON, T.; MERRYWEATHER, J.; DENISON, J.; WILSON, P.; YOUNG, J.P.W.; FITTER, A. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*. 90(2): 371-384.

- HENDERSON, J.C.; DAVIES, F.T. 1990. Drought acclimation and the morphology of mycorrhizal *Rosa hybrida* L. cv. 'Ferdy' is independent of leaf elemental content. *New Phytologist*. 115(3): 503-510.
- HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509-547.
- HIJRI, I.; SÝKOROVÁ, Z.; OEHL, F.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; WIEMKEN, A.; REDECKER, D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology*. 15(8): 2277-2289.
- HIJRI, M.; SANDERS, I.R. 2005. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature*. 433(7022): 160-163.
- JAKOBSEN, I. 1994. Research approaches to study the functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the field. *Plant and Soil*. 159(1): 141-147.
- JAKOBSEN, I.; SMITH, S.; SMITH, F. 2002. Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition. In: Sanders, I.; Van del Heijden, M. (eds.) *Mycorrhizal ecology*, Springer, Berlin, Germany. pp. 75-92.
- JANOS, D.P. 1987. VA mycorrhizas in humid tropical ecosystems. In: Safir, G.R. (ed.) *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*, CRC, Boca Ratón, FL. pp. 107-134.
- JANSA, J.; MOZAFAR, A.; BANKE, S.; MCDONALD, B.A.; FROSSARD, E. 2002. Intra- and intersporal diversity of ITS rDNA sequences in *Glomus intraradices* assessed by cloning and sequencing, and by SSCP analysis. *Mycological Research*. 106(6): 670-681.
- JOHNSON, N.; GRAHAM, J.H.; SMITH, F. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum*. *New Phytologist*. 135(4): 575-585.
- JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.; CROOKSTON, R.; SIMMONS, S.R.; COPELAND, P.J. 1991. Vesicular–arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytologist*. 117(4): 657-663.
- JONER, E. 2000. The effect of long-term fertilization with organic or inorganic fertilizers on mycorrhiza-mediated phosphorus uptake in subterranean clover. *Biology and Fertility of Soils*. 32(5): 435-440.
- JONES, D.L.; NGUYEN, C.; FINLAY, R.D. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*. 321(1-2): 5-33.
- JORGE-ARAÚJO, P.; QUIQUAMPOIX, H.; MATUMOTO-PINTRO, P.; STAUNTON, S. 2015. Glomalin related soil protein in French temperate forest soils: interference in the Bradford assay caused by co-extracted humic substances. *European Journal of Soil Science*. 66(2): 311-319.

- KABIR, Z.; O'HALLORAN, I.; FYLES, J.; HAMEL, C. 1997. Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant and Soil*. 192(2): 285-293.
- KHALIQ, A.; SANDERS, F. 2000. Effects of vesicular–arbuscular mycorrhizal inoculation on the yield and phosphorus uptake of field-grown barley. *Soil Biology and Biochemistry*. 32(11): 1691-1696.
- KHAN, A.G. 1993. Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New South Wales, Australia. *Mycorrhiza*. 3(1): 31-38.
- KITTIWORAWAT, S.; YOUPENSUK, S.; RERKASEM, B. 2010. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in *Mimosa invisa* and Effect of the Soil pH on the Symbiosis. *Chiang Mai Journal Science*. 37(3): 517-527.
- KIVLIN, S.N.; HAWKES, C.V.; TRESEDER, K.K. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 43(11): 2294-2303.
- KJØLLER, R.; ROSENDAHL, S. 2000. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation polymorphism). *Plant and Soil*. 226(2): 189-196.
- KLIRONOMOS, J.N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*. 84(9): 2292-2301.
- KOIDE, R. 1985. The nature of growth depressions in sunflower caused by vesicular–arbuscular mycorrhizal infection. *New Phytologist*. 99(3): 449-462.
- KOWALCHUK, G.A.; DE SOUZA, F.A.; VAN VEEN, J.A. 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology*. 11(3): 571-581.
- LANDWEHR, M.; HILDEBRANDT, U.; WILDE, P.; NAWRATH, K.; TÓTH, T.; BIRÓ, B.; BOTHE, H. 2002. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza*. 12(4): 199-211.
- LAVADO, R. 2006. La Región Pampeana: Historia, características y uso de sus suelos. En: Álvarez, R. (ed.) *Materia Orgánica “Valor Agronómico y Dinámica en Suelos Pampeanos”*, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. pp.1-12.
- LEAKE, J.R. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*. 7(4): 422-428.
- LI, H.; ZHU, Y.; MARSCHNER, P.; SMITH, F.; SMITH, S. 2005. Wheat responses to arbuscular mycorrhizal fungi in a highly calcareous soil differ from those of clover, and change with plant development and P supply. *Plant and Soil*. 277(1-2): 221-232.

- LI, L.F.; LI, T.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z.W. 2010. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Letters*. 71(3): 418-427.
- LINDSAY, W.L.; NORVELL, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*. 42(3): 421-428.
- LIU, A.; HAMEL, C.; HAMILTON, R.; SMITH, D. 2000. Mycorrhizae formation and nutrient uptake of new corn (*Zea mays* L.) hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. *Plant and Soil*. 221(2): 157-166.
- LOVELOCK, C.E.; WRIGHT, S.F.; CLARK, D.A.; RUESS, R.W. 2004. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*. 92(2): 278-287.
- LUGO, M.A.; CABELLO, M.N. 2002. Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia*. 94(4): 579-586.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*. 159(1): 89-102.
- MARSHALL, C.B.; MCLAREN, J.R.; TURKINGTON, R. 2011. Soil microbial communities resistant to changes in plant functional group composition. *Soil Biology and Biochemistry*. 43(1): 78-85.
- MATHERS, H.; LOWE, S.; SCAGEL, C.; STRUVE, D.; CASE, L. 2007. Abiotic factors influencing root growth of woody nursery plants in containers. *HortTechnology*. 17(2): 151-162.
- MCGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H. 2000. The inconsistent effect of soil disturbance on colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi: a test of the inoculum density hypothesis. *Applied Soil Ecology*. 14(2): 147-155.
- MEDEIROS, C.; CLARK, R.; ELLIS, J. 1994. Growth and nutrient uptake of sorghum cultivated with vesicular-arbuscular mycorrhiza isolates at varying pH. *Mycorrhiza*. 4(5): 185-191.
- MERRYWEATHER, J.; FITTER, A. 1998. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*. II. Seasonal and spatial patterns of fungal populations. *New Phytologist*. 131-142.
- MINGGUI, G.; MING, T.; QIAOMING, Z.; XINXIN, F. 2012. Effects of climatic and edaphic factors on arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Hippophae rhamnoides* in the Loess Plateau, China. *Acta Ecologica Sinica*. 32: 62-67.
- MIRANSARI, M. 2010. Arbuscular Mycorrhiza and soil microbes. In: Thangadurai, D.; Busso, C.A.; Hijri, M. (eds.) *Mycorrhizal biotechnology*, Science, CRC and Taylor and Francis Publishers, USA. 226 p.

- MOHAMED, A.A.; EWEDA, W.E.; HEGGO, A.; HASSAN, E.A. 2014. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulphur-oxidising bacteria on onion (*Allium cepa* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in sandy soil under green house conditions. *Annals of Agricultural Sciences*. 59(1): 109-118.
- MOHAMMAD, A.; MITRA, B.; KHAN, A. 2004. Effects of sheared-root inoculum of *Glomus intraradices* on wheat grown at different phosphorus levels in the field. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 103(1): 245-249.
- MOSSE, B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopathology*. 11(1): 171-196.
- MUMMEY, D.L.; RILLIG, M.C. 2006. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil*. 288(1-2): 81-90.
- MUTHUKUMAR, T.; UDAIYAN, K. 2000. Influence of organic manures on arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. in relation to tissue nutrients and soluble carbohydrate in roots under field conditions. *Biology and Fertility of Soils*. 31(2): 114-120.
- NARDINI, C.B.; DI SALVO, L.P.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E. 2011. Micorrizas arbusculares: asociaciones simbióticas e indicadores de calidad ambiental en sistemas de cultivos extensivos. *Revista Argentina de Microbiología*. 43(4): 311-311.
- NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of Ecology*. 83(6): 991-1000.
- NICHOLS, K.; WRIGHT, S. 2005. Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils. *Soil Science*. 170(12): 985-997.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MADER, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. 2003. Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(5): 2816-2824.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E.; MADER, P.; DUBOIS, D.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*. 138(4): 574-583.
- OEHL, F.; SILVA, G.A.D.; GOTO, B.T.; SIEVERDING, E. 2011. Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon*. 116(1): 75-120.
- ORTAS, I.; AKPINAR, Ç. 2011. Response of maize genotypes to several mycorrhizal inoculums in terms of plant growth, nutrient uptake and spore production. *Journal of Plant Nutrition*. 34(7): 970-987.
- PARNISKE, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. 6(10): 763-775.

- PAWLOWSKA, T.E. 2005. Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 251(2): 185-192.
- PAWLOWSKA, T.E.; CHARVAT, I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(11): 6643-6649.
- PEREZ, G.R. 2014. Caracterización de hongos micorrizicos arbusculares y bacterias solubilizadoras de P nativos del cultivo de trigo asociado a la labranza y la fertilización. Tesis de Ingeniería Agronómica. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. 86 p.
- PEREZ-BRANDAN, C.; ARZENO, J.L.; HUIDOBRO, J.; CONFORTO, C.; GRUMBERG, B.; HILTON, S.; BENDING, G.D.; MERILES, J.M.; VARGAS-GIL, S. 2014. The effect of crop sequences on soil microbial, chemical and physical indicators and its relationship with soybean sudden death syndrome (complex of *Fusarium* species). *Spanish Journal of Agricultural Research*. 12(1): 252.
- PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P. 2006. DARwin software.
- PHILLIPS, J.; HAYMAN, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55(1): 158-IN118.
- PONGRAC, P.; VOGEL-MIKUŠ, K.; KUMP, P.; NEČEMER, M.; TOLRÀ, R.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J.; REGVAR, M. 2007. Changes in elemental uptake and arbuscular mycorrhizal colonisation during the life cycle of *Thlaspi praecox* Wulfen. *Chemosphere*. 69(10): 1602-1609.
- POSADA, R.H.; FRANCO, L.A.; RAMOS, C.; PLAZAS, L.S.; SUÁREZ, J.C.; ÁLVAREZ, F. 2008. Effect of physical, chemical and environmental characteristics on arbuscular mycorrhizal fungi in *Brachiaria decumbens* (Stapf) pastures. *Journal of applied microbiology*. 104(1): 132-140.
- PURIN, S.; RILLIG, M.C. 2007. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiología*. 51: 123-130.
- R CORE TEAM. 2012. R: A Language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- REDECKER, D. 2000a. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*. 10(2): 73-80.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. 2000b. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. 289: 1920-1921.
- REYNOLDS, M.; PASK, A.; MULLAN, D.; CHAVEZ-DULANTO, P. 2013. Fitomejoramiento fisiológico I: enfoques interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. CIMMYT, México. 176 p.

- REMY, W.; TAYLOR, T.N.; HASS, H.; KERP, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(25): 11841-11843.
- RENKER, C.; HEINRICHS, J.; KALDORF, M.; BUSCOT, F. 2003. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza*. 13(4): 191-198.
- RILLIG, M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*. 84(4): 355-363.
- RILLIG, M.C.; MUMMEY, D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*. 171(1): 41-53.
- ROSENDAHL, S.; MATZEN, H.B. 2008. Genetic structure of arbuscular mycorrhizal populations in fallow and cultivated soils. *New Phytologist*. 179(4): 1154-1161.
- ROSENDAHL, S.; STUKENBROCK, E.H. 2004. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology*. 13(10): 3179-3186.
- ROSIER, C.L.; HOYE, A.T.; RILLIG, M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(8): 2205-2211.
- RYAN, M.H.; GRAHAM, J.H. 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Diversity and Integration in Mycorrhizas*, Springer, Netherlands. pp. 263-271.
- SAIA, S.; RUISI, P.; FILECCIA, V.; DI MICELI, G.; AMATO, G.; MARTINELLI, F. 2015. Metabolomics suggests that soil inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi decreased free amino acid content in roots of durum wheat grown under N-limited, P-rich field conditions. *PloS one*. 10(6).
- SAINZ ROZAS, H.; ECHEVERRÍA, H.E.; ANGELINI, H. 2012. Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región Pampeana y ExtraPampeana argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 38(1): 33-39.
- SAINZ ROZAS, H.; EYHERABIDE, M.; ECHEVERRÍA, H.E.; BARBIERI, P.A.; ANGELINI, H.P.; LARREA, G.; FERRARIS, G.N.; BARRACO, M.R. 2013. Cuál es el estado de la fertilidad de los suelos argentinos. *Simposio Fertilidad*, IPNI.
- SAINZ ROZAS, H.R.; ECHEVERRIA, H.E.; ANGELINI, H.P. 2011. Niveles de carbono orgánico y pH en suelos agrícolas de las regiones pampeana y extrapampeana argentina. *Ciencia del Suelo*. 29(1): 29-37.
- SALAZAR LEA PLAZA, J.C.; MOSCATELLI, G. 1989. Mapa de suelos de la Provincia de Buenos Aires. Escala. 1(500): 000.
- SÁNCHEZ-CASTRO, I.; FERROL, N.; BAREA, J.M. 2012. Analyzing the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the roots of

- representative shrubland species in a Mediterranean ecosystem. *Journal of Arid Environments*. 80: 1-9.
- SBRANA, C.; GIOVANNETTI, M. 2005. Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*. 15(7): 539-545.
- SCHALAMUK, S.; CABELLO, M. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia*. 102(2): 261-268.
- SCHALAMUK, S.; CHIDICHIMO, H.; CABELLO, M. 2007. Variaciones en la composición de especies de Glomeromycota (Fungi) en un cultivo de trigo bajo distintos sistemas de labranza. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 42(1-2): 45-53.
- SCHALAMUK, S.; VELAZQUEZ, S.; CHIDICHIMO, H.; CABELLO, M. 2006. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia*. 98(1): 16-22.
- SCHREINER, R.P.; TARARA, J.M.; SMITHYMAN, R.P. 2007. Deficit irrigation promotes arbuscular colonization of fine roots by mycorrhizal fungi in grapevines (*Vitis vinifera* L.) in an arid climate. *Mycorrhiza*. 17(7): 551-562.
- SCHÜßLER, A. 1999. Glomales SSUrRNA gene diversity. *New Phytologist*. 144(2): 205-207.
- SCHÜßLER, A.; GEHRIG, H.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. 2001. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research*. 105(01): 5-15.
- SCHÜßLER, A.; WALKER, C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. [on line] <http://www.arbuscular-mycorrhiza.net/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf> [consulta: 18 julio 2015]
- SCHWARZOTT, D.; WALKER, C.; SCHÜßLER, A. 2001. *Glomus*, the Largest Genus of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales), Is Nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21(2): 190-197.
- SCHWARTZ, M.W.; HOEKSEMA, J.D.; GEHRING, C.A.; JOHNSON, N.C.; KLIRONOMOS, J.N.; ABBOTT, L.K.; PRINGLE, A. 2006. The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecology letters*. 9(5): 501-515.
- SENGUPTA, A.; CHAUDHURI, S. 2002. Arbuscular mycorrhizal relations of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. *Mycorrhiza*. 12(4): 169-174.
- SHARMAH, D.; JHA, D.; PANDEY, R.; MEGHVANSI, M. 2010. Molecular approaches in arbuscular mycorrhizal research: a review. *Journal of Phytology*. 2(7): 75-90.

- SIDDIQUI, Z.A.; AKHTAR, M.S.; FUTAI, K. 2008. Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 362 p.
- SIIA. 2015. Superficie Sembrada, Superficie Cosechada, Producción y Rendimiento. [en línea] <<http://www.sii.gov.ar/series>> [consulta: noviembre-2015]
- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.C.; LALONDE, M. 1993a. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363: 67–69.
- SIMON, L.; LEVESQUE, R.; LALONDE, M. 1993b. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(12): 4211-4215.
- SIX, J.; CONANT, R.; PAUL, E.A.; PAUSTIAN, K. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil*. 241(2): 155-176.
- SMITH, S.; READ, D. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London, UK.
- STEINBERG, P.D.; RILLIG, M.C. 2003. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biology and Biochemistry*. 35(1): 191-194.
- STRACK, D.; FESTER, T.; HAUSE, B.; SCHLIEMANN, W.; WALTER, M.H. 2003. Review paper: Arbuscular mycorrhiza: Biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology*. 29(9): 1955-1979.
- STUBBLEFIELD, S.P.; TAYLOR, T.N.; TRAPPE, J.M. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *American Journal of Botany*. 74(12): 1904-1911.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
- TAYLOR, A.F.; ALEXANDER, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist*. 19(03): 102-112.
- TAYLOR, T.; REMY, W.; HASS, H.; KERP, H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia*. 87(4): 560-573.
- THOMPSON, J. 1991. Improving the mycorrhizal condition of the soil through cultural practices and effects on growth and phosphorus uptake by plants. In: Johansen, C.; Lee, K.K.; Sahrawat, K.L. (eds.) Phosphorus nutrition of grain legumes in the semi-arid tropics, ICRISAT Publishing, India. pp. 117-137.
- THOUGNON ISLAS, A.J.; HERNANDEZ GUIJARRO, K.; EYHERABIDE, M.; SAINZ ROZAS, H.R.; ECHEVERRÍA, H.E.; COVACEVICH, F. 2016. Can soil properties and agricultural land use affect arbuscular mycorrhizal fungal communities indigenous from the Argentinian Pampas soils?. *Applied Soil Ecology*. 101: 47–56.

- THOUGHTON ISLAS, A.J.; EYHERABIDE, M.; ECHEVERRÍA, H.E.; SAINZ ROZAS, H.R.; COVACEVICH, F. 2014. Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrícicos nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires con manejo contrastante. *Revista Argentina de Microbiología*. 46(2): 133-143.
- TITUS, J.H.; TITUS, P.J.; NOWAK, R.S.; SMITH, S.D. 2002. Arbuscular mycorrhizae of Mojave Desert plants. *Western North American Naturalist*. 327-334.
- TOLJANDER, J.F.; LINDAHL, B.D.; PAUL, L.R.; ELFSTRAND, M.; FINLAY, R.D. 2007. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology*. 61(2): 295-304.
- TOMMERUP, I. 1983. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British mycological Society*. 81(2): 381-387.
- TRESEDER, K.K.; ALLEN, M.F. 2000. Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO₂ and nitrogen deposition. *New Phytologist*. 147(1): 189-200.
- TRESEDER, K.K.; TURNER, K.M. 2007. Glomalin in Ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*. 71(4): 1257.
- TROEH, Z.I.; LOYNACHAN, T.E. 2003. Endomycorrhizal fungal survival in continuous corn, soybean, and fallow. *Agronomy Journal*. 95(1): 224-230.
- TROEH, Z.I.; LOYNACHAN, T.E. 2009. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Species in Soils of Cultivated Soybean Fields. *Agronomy Journal*. 101(6): 1453-1462.
- TROUVELOT, A. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. (eds.) *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, INRA Press, Paris. pp. 217-221.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALLEN, N.M. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*. 11(3): 296-310.
- VAN TUINEN, D.; ZHAO, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. 1998. PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: Varma, A. (ed.) *Mycorrhiza manual*, Springer, Berlin, Germany. pp. 387-400.
- VANDENKOORNHUYSE, P.; HUSBAND, R.; DANIELL, T.J.; WATSON, I.J.; DUCK, J.M.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*. 11(8): 1555-1564.
- VANDENKOORNHUYSE, P.; RIDGWAY, K.P.; WATSON, I.J.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*. 12(11): 3085-3095.

- WALKLEY, A.; BLACK, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37(1): 29-38.
- WANG, Q.; BAO, Y.; LIU, X.; DU, G. 2014. Spatio-temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi associated with glomalin-related soil protein and soil enzymes in different managed semiarid steppes. *Mycorrhiza*. 24(7): 525-538.
- WHIFFEN, L.K.; MIDGLEY, D.J.; MCGEE, P.A. 2007. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. *Soil Biology and Biochemistry*. 39(2): 691-694.
- WILLIS, A.; RODRIGUES, B.; HARRIS, P. 2013. The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 32(1): 1-20.
- WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*. 161(9): 575-586.
- WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 198(1): 97-107.
- WU, Q.-S.; LI, Y.; ZOU, Y.-N.; HE, X.-H. 2015. Arbuscular mycorrhiza mediates glomalin-related soil protein production and soil enzyme activities in the rhizosphere of trifoliate orange grown under different P levels. *Mycorrhiza*. 25(2): 121-130.
- ZANGARO, W.; ROSTIROLA, L.V.; DE SOUZA, P.B.; DE ALMEIDA ALVES, R.; LESCANO, L.E.A.M.; RONDINA, A.B.L.; NOGUEIRA, M.A.; CARRENHO, R. 2012. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza*. 23(3): 221-233.
- ZHAO, R.; GUO, W.; BI, N.; GUO, J.; WANG, L.; ZHAO, J.; ZHANG, J. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress. *Applied Soil Ecology*. 88: 41-49.
- ZHAO, Z.-W.; XIA, Y.-M.; QIN, X.-Z.; LI, X.-W.; CHENG, L.-Z.; SHA, T.; WANG, G.-H. 2001. Arbuscular mycorrhizal status of plants and the spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in the tropical rain forest of Xishuangbanna, southwest China. *Mycorrhiza*. 11(3): 159-162.