

Efecto de la fertilización de largo plazo con fósforo y nitrógeno en las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociadas al cultivo de maíz

*Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias del Suelo*

Braian Gaset

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires – 2014

Lugar de trabajo: INTA – EEA Pergamino



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Valeria Soledad Faggioli

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Villa María)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Naturales (Universidad Nacional de La Plata)

Co-director de Tesis

Gerardo Rubio

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Manuel Carlos Ferrari

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Master of Agricultural Science (University of Reading, UK)

JURADO DE TESIS

JURADO

Fernando Salvagiotti

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nac. de Córdoba)

Magister en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Doctor of Philosophy (University of Nebraska-Lincoln)

JURADO

Fernanda Covacevich

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad Nac. de Mar del Plata)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad Nac. de Mar del Plata)

Doctor en Ciencias Agrarias (Universidad Nac. de Mar del Plata)

JURADO

Silvina Beatriz Restovich

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nac. de Río Cuarto)

Magister en Ciencias Agropecuarias (Universidad Nac. de Río Cuarto)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 08 de JULIO de 2024

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia por su permanente e incondicional apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la ayuda de numerosas personas e instituciones y por ello quiero expresar mi más sentido agradecimiento a:

Valeria Faggioli por su inmensurable contribución en la dirección de esta tesis.

Gerardo Rubio por sus innumerables aportes y su especial colaboración en la redacción de este manuscrito.

Manuel Ferrari por brindar el ensayo en el que se hizo el experimento y establecer el contacto con la directora de tesis.

Andrés Llovet por su acompañamiento en el proceso de formación y gran contribución como director de beca.

Luciano Rivoltella por su colaboración en las tareas concernientes a cuestiones operativas asociadas al ensayo, a la realización de los muestreos y al procesamiento de muestras.

Leticia Garcia y Jimena Dalpiaz por su ayuda en el procesamiento de muestras y en la realización de determinaciones analíticas.

Pablo Copia por facilitarme el equipamiento necesario para la cuantificación de estructuras micorrícicas.

María José Beribe por su colaboración en el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria quien hizo posible el abordaje de mi proceso formativo.

A la Escuela Para Graduados de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires por la inmensidad de conocimientos aportados a través de su cuerpo docente con excelente formación.

Al Laboratorio Regional, al Grupo Forrajeras y al Grupo Ecofisiología de la EEA Pergamino por facilitarme el equipamiento y las instalaciones necesarias para el acondicionamiento y procesamiento de muestras.

DECLARACIÓN

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Braian Gaset

Índice

Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Capítulo 1: Introducción general	13
1.1 El cultivo de maíz y la fertilización	2
1.1.1. El cultivo de maíz.....	2
1.1.2. Nutrición y uso de fertilizantes en el cultivo de maíz	2
1.2 Descripción de Glomeromycota	3
1.2.1. Glomeromycota como habitantes del suelo	3
1.2.2. Glomeromycota en la simbiosis	3
1.2.3. Beneficios de la simbiosis y diferencias entre familias de Glomeromycota ..	4
1.2.4. Importancia de los hongos formadores de micorrizas en el agroecosistema ..	5
1.3 Factores que afectan la simbiosis	6
1.3.1. Factores bióticos, abióticos y antrópicos	6
1.3.2. Continuo mutualismo-parasitismo	7
1.3.3. Impacto de oferta de P y N en mutualismo-parasitismo	7
1.4 Aplicación – Impacto del trabajo	8
1.5 Objetivo general.....	8
Capítulo 2: Efecto de la fertilización fosfatada y nitrogenada sobre la formación de micorrizas y la absorción de P y N en maíz.....	9
2.1 Introducción	10
2.1.1. <i>Objetivo</i>	11
2.1.2. <i>Hipótesis de trabajo</i>	11
2.2 Materiales y métodos.....	11
2.2.1 <i>Sitio y diseño experimental</i>	11
2.2.2 <i>Caracterización edáfica</i>	12
2.2.3 <i>Implantación del cultivo y aplicación de los tratamientos</i>	13
2.2.4 <i>Muestras de planta y raíz</i>	13
2.2.5 <i>Biomasa aérea y absorción de P y N</i>	13
2.2.6 <i>Porcentaje de micorrización</i>	14
2.2.7. <i>Condiciones climáticas durante el experimento</i>	14
2.2.8. <i>Análisis estadísticos</i>	15
2.3 Resultados.....	15
2.3.1 <i>Caracterización de los tratamientos – información edáfica</i>	15

2.3.2 Acumulación de biomasa, rendimiento y absorción de nitrógeno y fósforo .	16
2.3.3 Micorrización	21
2.4 Discusión	23
2.4.1 Caracterización de los tratamientos – información edáfica.....	23
2.4.2 Acumulación de biomasa, rendimiento y absorción de nitrógeno y fósforo .	24
2.4.3 Micorrización	25
2.5 Conclusiones	27
Capítulo 3: Composición de la comunidad de HFMA asociada al cultivo de maíz en respuesta a la fertilización fosfatada y nitrogenada.	28
3.1 Introducción	29
3.1.1 Objetivo.....	30
3.1.2 Hipótesis	30
3.2 Materiales y métodos	31
3.2.1. Muestreo de suelo rizosférico	31
3.2.2. Recolección de suelo de rizosfera y extracción de ADN	31
3.2.3. Secuenciación.....	31
3.2.4. Análisis Bioinformático	32
3.2.5. Diversidad alfa	32
3.2.6. Análisis estadístico	33
3.3 Resultados	34
3.3.1. Secuenciación.....	34
3.3.2. Diversidad alfa	35
3.3.3. Composición de la comunidad	36
3.3.4. Biomarcadores	41
3.4 Discusión	43
3.5 Conclusiones	45
Capítulo 4: Conclusiones Generales	47
4.1 La fertilización sobre el suelo y el cultivo de maíz.....	48
4.2 Fósforo en la simbiosis	48
4.3 Nitrógeno en la simbiosis	48
4.4 Conclusión general.....	49
4.5 Posibles líneas de trabajo.....	49
Bibliografía	50

Índice de cuadros

Cuadro 2.3.1.1. Caracterización edáfica de los tratamientos.	16
Cuadro 2.3.2.1. Valores-p para acumulación de biomasa, absorción de nutrientes y rendimiento del cultivo.	17
Cuadro 2.3.3.1. Valores-p correspondientes a las estructuras micorrícicas.	21
Cuadro 3.3.2.1. Índices de diversidad alfa de HFMA en el estadio vegetativo y reproductivo del cultivo de maíz.	36
Cuadro 3.3.3.1. Análisis de comparación de la composición de comunidades de HFMA (perMANOVA). En negrita valores p significativos, α : 0,05. Análisis basado en la matriz de abundancia relativa.	37
Cuadro 3.3.3.2. Efecto de la fertilización a largo plazo con P (comparaciones P0 vs P1) en el número de OTUs (media \pm error estándar) pertenecientes a familias de HFMA en la rizosfera de plantas de maíz en etapas vegetativas y reproductivas.	38
Cuadro 3.3.3.3. Efecto de la fertilización a largo plazo con N (es decir, N0 y N1) en el número de OTUs (media \pm error estándar) pertenecientes a familias de HFMA en la rizosfera de plantas de maíz en etapas vegetativas y reproductivas.	39
Cuadro 3.3.3.4. Abundancia relativa de cada familia dentro de cada tratamiento. Se informan los estimadores asintóticos promedios (EE) de cada familia de micorrizas (OTUs observados) evaluados. También se incluyen las estadísticas del test de Wald (Valor P) para las comparaciones. Para los GLMMs, se utilizó una distribución de error Gamma (enlace=logaritmo). Tratamientos: P0N0 testigo; P1N0 fertilizado con P; P0N1 fertilizado con N; P1N1 fertilizado con P y N.	40
Cuadro 3.3.3.5. Número de especies por familia. Se informan los estimadores asintóticos promedios (EE) de cada familia de micorrizas (OTUs observados) evaluados. También se incluyen las estadísticas del test de Wald (Valor P) para las comparaciones. Para los GLMMs, se utilizó una distribución de error de Poisson (enlace=logaritmo). Tratamientos: P0N0 testigo; P1N0 fertilizado con P; P0N1 fertilizado con N; P1N1 fertilizado con P y N.	41

Índice de figuras

Figura 1.1.1.1. Evolución de la superficie sembrada con maíz en Argentina en el período 201 - 2020 (Fuente: MAGyP, 2022).....	2
Figura 1.2.2.1. Esquema que representa las diferentes estructuras intra y extra-radicales que forman los hongos micorrícicos en la raíz de la planta hospedera (Adaptado de Brundrett, 2008; versión 2 on line http://mycorrhizas.info).....	4
Figura 2.2.1.1. Diseño experimental. Tamaño de las subparcelas: 7 m (ancho) x 35 m (largo). P0: testigo fósforo; P1: 24 kg P/ ha; N0: testigo nitrógeno; N1: 100 kg N/ ha; Tratamientos: P1N1; P1N0; P0N1 y P0N0. Subparcelas en gris, no utilizadas en el presente estudio, presentan los mismos tratamientos detallados, pero sin la aplicación de azufre.....	12
Figura 2.3.2.1. Acumulación de biomasa para los tratamientos evaluados a lo largo del ciclo del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico. Barras indican error estándar. $\alpha= 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.....	18
Figura 2.3.2.2. Absorción de P en biomasa aérea para los tratamientos evaluados a lo largo del ciclo del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico. Barras indican error estándar. $\alpha= 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.....	19
Figura 2.3.2.4. Rendimiento en base seca. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, $\alpha= 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher. Cuadrado negro indica la mediana en cada caja. Cada caja indica los cuartiles 1 y 3. Los bigotes indican los valores extremos.	20
Figura 2.3.3.1. Evolución de la formación de arbusculos en distintos estadios fenológicos del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico (según test en	22
Figura 2.3.3.2. Evolución de la formación de vesículas en distintos estadios fenológicos del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico (según test en Cuadro 2.3.3.1). $\alpha= 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.	23
Figura 3.3.3.1. Abundancia relativa de familias de HFMA asociadas al cultivo de maíz. A: estadio fenológico V6. B, estadio fenológico R1. P0N0 testigo; P0N1 fertilizado con N; P1N0 fertilizado con P; P1N1 fertilizado con P y N.....	36
Figura 3.3.3.2. Composición de la comunidad de HFMA (NMDS) presentes en la rizosfera del cultivo de maíz. (A) muestras tomadas en estadio fenológico V6 (stress=0,095), y (B) muestras tomadas en estadio fenológico R1 (stress=0,13). Los análisis están basados en disimilitud de Bray-Curtis. Las elipses (P0 y P1) indican una	

unidad de desviación estándar alrededor del centroide de cada grupo. P0N0 testigo; P0N1 fertilizado con N; P1N0 fertilizado con P; P1N1 fertilizado con P y N.	37
Figura 3.3.4.1. VTX que respondieron a los tratamientos de P en el estadio fenológico V6 (A) y en el estadio fenológico R1 (B) P0: sin agregado de P. P1: con agregado de P. VTX que respondieron a los tratamientos de N en el estadio fenológico V6 (C) y en el estadio fenológico R1 (D). N0: sin agregado de N. N1: con agregado de N. LDA: log-ratio differential abundance analysis.	42

Resumen

Efecto de la fertilización de largo plazo con fósforo y nitrógeno en las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociadas al cultivo de maíz

La micorrización es una relación simbiótica integrada por hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y las raíces de las plantas. Mediante esta simbiosis las plantas reciben recursos del suelo que son captados por el micelio extra radical de los hongos, y proveen a los mismos de carbono orgánico. Este intercambio es afectado por el ambiente circundante, siendo la disponibilidad de nutrientes un factor modulador clave. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la aplicación continua, y de largo plazo, de fósforo (P) y nitrógeno (N) en el suelo sobre las comunidades de HFMA residentes en la rizosfera. El experimento se condujo sobre un ensayo a campo de larga duración donde se evaluaron cuatro tratamientos de fertilización: P0N0 (testigo), P0N1 (100 kg N ha⁻¹), P1N0 (24 kg P ha⁻¹) y P1N1 (24 kg P ha⁻¹ y 100 kg N ha⁻¹). Se realizaron muestreos a lo largo del ciclo de crecimiento del cultivo de maíz, en los estadios V3, V6, V9, R1, R4 y R6. Se evaluó: (a) la acumulación biomasa aérea, la absorción de P y N y el rendimiento; (b) la presencia de hifas, arbusculos y vesículas en todos los muestreos realizados; y (c) la diversidad de HFMA en muestras de suelo rizosférico tomadas en los estadios V6 y R1 mediante secuenciación masiva de alto rendimiento de la región 18S rDNA. Se observó que el N fue el principal determinante de la acumulación de biomasa y del rendimiento en el cultivo. La absorción de P y N estuvo íntimamente vinculada a la fertilización. Las raíces de maíz mostraron porcentajes de micorrización superiores al 55% en todo el ciclo del cultivo. La fertilización fosfatada fue la principal moduladora de la micorrización. La adición de P tuvo un efecto supresor sobre la formación de arbusculos, pero no fue consistente en todo el ciclo del cultivo. La aplicación de N redujo la formación de vesículas sólo en el estadio R6 del cultivo. La aplicación de N incrementó la diversidad alfa de las comunidades de HFMA residentes en el suelo, aumentando el número de VTX por muestra lo que también se manifestó en el índice Shannon. La aplicación de N aumentó la diversidad en 8 de las 9 familias detectadas al aumentar el número de OTUs, en promedio, en un 90%. Glomeraceae fue la familia más abundante en todas las muestras. La oferta de P tuvo una influencia significativa en la composición de las comunidades de HFMA, haciendo que las comunidades se asemejen por tratamiento de P en ambos muestreos realizados. La fertilización fosfatada redujo en un 21% el número de OTUs en Glomeraceae tanto en el estadio V6 como R1 del cultivo. Se pudieron identificar taxones indicadores en cada tratamiento. Estos resultados ponen en valor la incidencia de las prácticas de fertilización más frecuentes en los sistemas agrícolas de la Región Pampeana Argentina sobre las comunidades de HFMA residentes en el suelo y pueden brindar un punto de partida en el desarrollo de estrategias de manejo asociadas a potenciar las bondades de los HFMA en la producción agrícola.

Palabras clave: biología de suelos, diversidad, sustentabilidad.

Abstract

Long-term phosphorus and nitrogen fertilization effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities associated with maize cultivation

Mycorrhization is a symbiotic relationship involving arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant roots. Through this symbiosis, plants receive soil resources captured by the extraradical mycelium of the fungi and provide the fungi with organic carbon. This exchange is affected by the surrounding environment, with nutrient availability being a key modulating factor. The objective of this thesis was to evaluate the effect of continuous, long-term application of phosphorus (P) and nitrogen (N) in the soil on AMF communities residing in the rhizosphere. The experiment was conducted on a long-term field trial where four fertilization treatments were evaluated: P0N0 (control), P0N1 (100 kg N ha⁻¹), P1N0 (24 kg P ha⁻¹), and P1N1 (24 kg P ha⁻¹ and 100 kg N ha⁻¹). Sampling was carried out throughout the maize growth cycle at stages V3, V6, V9, R1, R4, and R6. Evaluations included: (a) aerial biomass accumulation, P and N uptake, and yield; (b) the presence of hyphae, arbuscules, and vesicles in all samplings; and (c) AMF diversity in rhizospheric soil samples taken at stages V6 and R1 through high-throughput sequencing of the 18S rDNA region. It was observed that N was the main determinant of biomass accumulation and yield in the crop. P and N uptake was closely linked to fertilization. Maize roots showed mycorrhization rates above 55% throughout the crop cycle. Phosphorus fertilization was the main modulator of mycorrhization. The addition of P had a suppressive effect on arbuscule formation, though this was not consistent throughout the crop cycle. N application reduced vesicle formation only at the R6 stage of the crop. N application increased the alpha diversity of AMF communities in the soil, raising the number of VTX per sample, which was also reflected in the Shannon index. N application increased diversity in 8 of the 9 detected families by increasing the number of OTUs by an average of 90%. Glomeraceae was the most abundant family in all samples. P supply had a significant influence on the composition of AMF communities, making the communities similar by P treatment in both samplings. Phosphorus fertilization reduced the number of OTUs in Glomeraceae by 21% in both the V6 and R1 stages of the crop. Indicator taxa were identified for each treatment. These results highlight the impact of common fertilization practices in the agricultural systems of the Pampean Region of Argentina on resident AMF communities and can provide a starting point for developing management strategies to enhance the benefits of AMF in agricultural production.

Keywords: soil biology, diversity, sustainability.

Capítulo 1: Introducción general

1.1 El cultivo de maíz y la fertilización

1.1.1. El cultivo de maíz

El cultivo de maíz es uno de los más relevantes a nivel mundial y local. En 2021 se cosecharon 205,87 millones de ha de maíz a nivel global, de los cuales Argentina aportó el 4% (8,15 millones de ha) (FAO, 2023). En Argentina, con una superficie en crecimiento, el cultivo de maíz es uno de los principales cultivos extensivos (Figura 1.1.1.1). Con un rendimiento promedio de 7,4 Mg. ha⁻¹, este cereal superó los 60 millones de toneladas producidas en Argentina en la campaña 2020/21 (MAGyP, 2022).

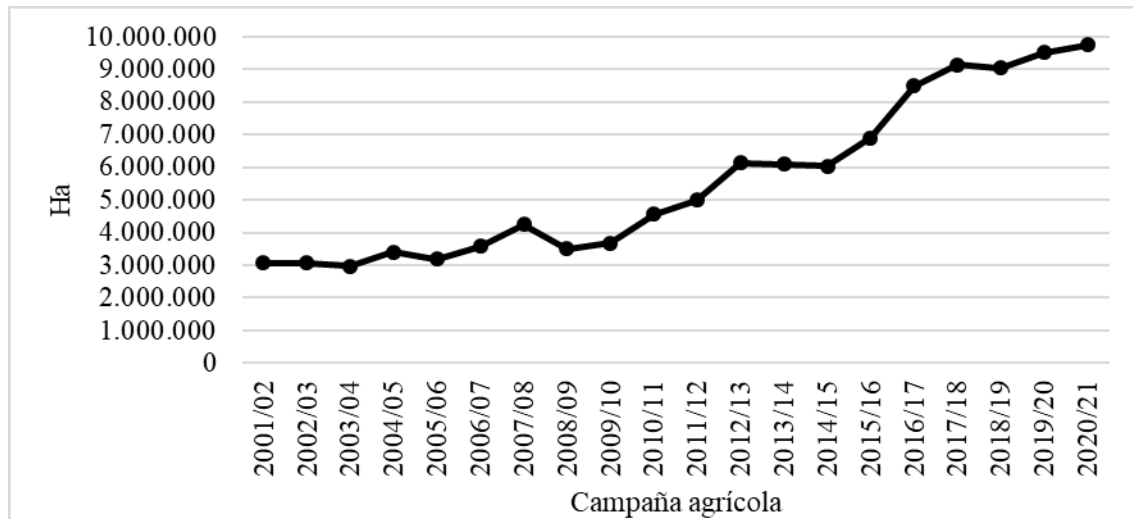


Figura 1.1.1.1. Evolución de la superficie sembrada con maíz en Argentina en el período 201 - 2020 (Fuente: MAGyP, 2022).

1.1.2. Nutrición y uso de fertilizantes en el cultivo de maíz

En el cultivo de maíz, como en el resto de los cultivos agrícolas, los rendimientos se encuentran limitados en gran parte de las regiones productivas del mundo por una baja fertilidad de los suelos (Mueller *et al.*, 2012). Los sistemas agrícolas actuales, en gran medida, basan su producción en aplicaciones continuas de fertilizantes químicos, principalmente nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio, que contribuyen a la disminución de la fertilidad biológica del suelo, afectando a la fijación biológica de nitrógeno y a la formación de micorrizas principalmente (Gruhn *et al.*, 2000; Lal, 2014; Plenchette, *et al.*, 2005). Deficiencias de N y P limitan la producción de maíz a nivel local y global (MacDonald *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2019). Ambos nutrientes son cruciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas y son requeridos en grandes cantidades por el cultivo de maíz (Bender *et al.*, 2013; Setiyono *et al.*, 2010). El N es componente central de las proteínas y enzimas vegetales y desempeña un papel central en la fotosíntesis ya que compone la molécula de clorofila por lo que interviene en la adquisición de carbono (C) de la planta (Evans, 1989). Por su parte, el P es esencial para la división celular, la reproducción y el metabolismo de las plantas. Su función está relacionada con la adquisición, almacenamiento y uso de energía, entre otros procesos (Epstein y Bloom, 2004).

La fertilización es la forma más directa de revertir las limitantes nutricionales al crecimiento y desarrollo de las plantas. En un sentido amplio, los fertilizantes son una herramienta para aportar nutrientes a los suelos y con ello mejorar la nutrición de los cultivos. En Argentina, durante la campaña 2020/21 se consumieron 5,3 millones de toneladas de fertilizantes, de las cuales el 54% fueron nitrogenados y el 36% fosfatados. El maíz fue el principal destino, recibiendo un tercio de los fertilizantes (Fertilizar, 2021). Globalmente, el uso de fertilizantes fosfatados ha aumentado de aproximadamente 5 Tg de P por año en 1961 a aproximadamente 20 Tg de P en 2013 (Chen y Graedel, 2016). Después de la Segunda Guerra Mundial, el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos ha llevado a aumentos significativos en la producción de alimentos, debido al proceso de producción de fertilizantes nitrogenados basado en el uso de combustibles fósiles a través del proceso de Haber-Bosch (Crews y Peoples, 2004; Smil, 2002). El uso global actual de fertilizante nitrogenado se estima en aproximadamente 113 Tg de N por año (FAO, 2023).

1.2 Descripción de Glomeromycota

1.2.1. *Glomeromycota como habitantes del suelo*

El suelo es un sistema vivo que sostiene una gran diversidad de organismos esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas. Entre los microorganismos residentes del suelo se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA). Los HFMA son organismos dominantes e importantes en el suelo, que comprenden del 10 al 50% de la biomasa microbiana total del suelo (Smith y Read, 2008). Los HFMA pertenecen al filo Glomeromycota (Tedersoo *et al.*, 2018; Schüßler y Walker, 2010). El cual está compuesto por un total de 342 especies distribuidas en cuatro órdenes (Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales, Paraglomerales) y 12 familias (Ambisporaceae, Archaeosporaceae, Geosiphonaceae, Polonasporaceae, Claroideoglomeraceae, Glomeraceae, Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, Pacisporaceae, Sacculosporaceae, Paraglomeraceae, Pervetustaceae) (Schüßler y Walker, 2010). Aunque están presentes en una gran variedad de ambientes (Davison *et al.*, 2015), la predominancia de una familia u otra es regulada por las características del ambiente (Chagnon *et al.*, 2013). Por ejemplo, Camenzind y colaboradores (2014) y Saks y colaboradores (2013) hallaron una gran abundancia de Gigasporaceae y Diversisporaceae en suelos de una reserva natural tropical y templada, respectivamente; lo contrario a ambientes agrícolas donde predomina casi exclusivamente Glomeraceae (Alguacil *et al.*, 2008; Bainard *et al.*, 2014; Daniell *et al.*, 2001; Faggioli *et al.*, 2019; Helgason *et al.*, 1998). En tanto que las especies de la familia Gigasporaceae se caracterizan por habitar suelos ricos en nutrientes y buena provisión hídrica (Anderson *et al.*, 1984).

1.2.2. *Glomeromycota en la simbiosis*

El término micorriza, de origen griego, define la simbiosis entre un grupo de hongos (mycos) y las raíces (rhizos) de una planta. La micorriza, es decir, la asociación entre los HFMA y las raíces de las plantas está conformada por tres estructuras principales: la raíz, el micelio intra-radical (MIR: dentro del apoplasto de la raíz) y el micelio extra-radical

(MER: en el suelo circundante). El MIR de los HFMA está involucrado en la transferencia de nutrientes entre los simbiontes y se diferencia en: arbuscúlos intracelulares, vesículas intra o intercelulares y circunvoluciones (Figura 1.2.2.1), cada una de estas estructuras posee una función particular (Bonfante-Fasolo, 1988; Morton *et al.*, 1997). La formación de arbuscúlos constituye la característica diagnóstica de las micorrizas arbusculares. Son estructuras formadas por hifas muy ramificadas que se encuentran dentro de las células corticales del hospedante e incrementan la superficie de contacto entre el hongo y la planta. En la zona de interfase o apoplasto se produce el intercambio, los nutrientes inorgánicos tales como el P y el zinc fluyen hacia la planta y los fotosintatos hacia el hongo (Smith y Read, 2008). Las vesículas son estructuras globosas llenas de lípidos que se forman en la raíz del hospedante en espacios inter o intra-celulares y su función principal es de reserva (Bonfante-Fasolo, 1988) o como propágulos (Biermann y Linderman, 1983).

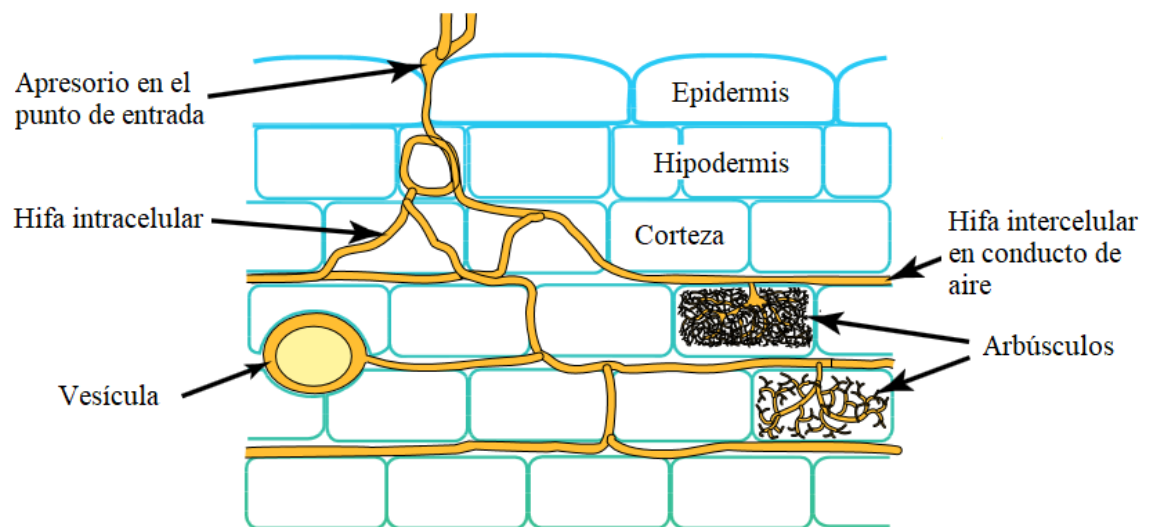


Figura 1.2.2.1. Esquema que representa las diferentes estructuras intra y extra-radicales que forman los hongos micorrícicos en la raíz de la planta hospedera (Adaptado de Brundrett, 2008; versión 2 on line <http://mycorrhizas.info>).

1.2.3. Beneficios de la simbiosis y diferencias entre familias de *Glomeromycota*

La relación micorrícica está basada en el suministro de fotoasimilados por parte de la planta a cambio de una serie de beneficios provistos por el hongo que varían según las especies fúngicas predominantes (Smith y Read, 2008). Los hongos requieren hasta un 20% del C del huésped para el establecimiento y mantenimiento del MIR y MER (Smith y Smith, 2011). Covacevich y colaboradores (2018) observaron que la colonización micorrícica arbuscular se relacionó positivamente con los carbohidratos solubles totales en el tallo de maíz y consecuentemente que la misma sería afectada por el estado fenológico del cultivo. Los beneficios provistos por el hongo compensan esta provisión de C, principalmente a través de mejoras en la nutrición mineral de P (Bagyaraj *et al.*, 2015; Battini *et al.*, 2017; Bucher, 2007). También se han reportado beneficios relacionados con la resistencia a patógenos (Qian *et al.*, 2015) y la tolerancia a sequía (Grümberg *et al.*, 2015). Entre los beneficios ligados a la nutrición mineral, el más conocido es la facilitación en el acceso a nutrientes poco móviles como P y, en menor

medida aquellos móviles como el N (George *et al.*, 1995; Govindarajulu *et al.*, 2005; Fitter, 2006; Guether *et al.*, 2009; Kiers *et al.*, 2011).

Experimentos en macetas con diferentes especies de HFMA han demostrado que el nivel de P vegetal aportado por los HFMA es variable. Esto indicaría que la captación de P puede diferir entre las especies de HFMA (Smith y Smith, 2011; Walder y van der Heijden, 2015). Tales diferencias radican en características propias de las familias de Glomeromycota. La familia Gigasporaceae comprende especies que colonizan las raíces a través de la germinación de sus esporas y su micelio, per se, no es infectivo ya que necesita estar vinculado a estructuras de resistencia como las esporas (Biermann y Linderman, 1983; Powell *et al.*, 2009). Esta familia posee gran importancia desde el punto de vista funcional ya que la producción de hifas extraradicales es usualmente más alta que la producida por otras familias como Glomeraceae (Hart y Reader, 2002) y en consecuencia es mayor su contribución a la adquisición de nutrientes (Maherali y Klironomos, 2007). En cambio, Glomeraceae, es una familia cuyos miembros presentan una gran habilidad de colonización intra-radical, con más velocidad que otras especies de Glomeromycota (Chagnon *et al.*, 2013). Esta característica se ha asociado con ventajas en la protección contra patógenos que ocupan los mismos sitios de la raíz (Maherali y Klironomos, 2007). De acuerdo con estudios comparativos, se ha detectado una mayor aptitud de adaptación a ambientes antrópicos de Glomeraceae con respecto a Gigasporaceae, puesto que esta familia tiene la capacidad de sobrevivir dentro de las raíces y algunas especies forman vesículas que le permiten mantenerse vitales y latentes en el suelo hasta un nuevo inicio de ciclo de cultivos (Chagnon *et al.*, 2013).

1.2.4. Importancia de los hongos formadores de micorrizas en el agroecosistema

Además de los beneficios mencionados anteriormente, la simbiosis micorrícica provee una serie de servicios ecosistémicos que están comenzando a ser más estudiados en los últimos años. Los más destacados son la supresión de patógenos (Lendzemo, *et al.*, 2005), la supresión de malezas en sistemas agrícolas (Rinaudo *et al.*, 2010), la alteración en la tolerancia a la herbivoría (Bennett y Bever, 2007), la tolerancia a condiciones sub-óptimas de potenciales hídricos tales como sequía, anegamiento, salinidad (Augé, 2001, Fournier *et al.*, 2007), y a altas temperaturas edáficas (Bunn *et al.*, 2009). También se ha demostrado que protegen de la erosión del suelo puesto que estabilizan la macroagregación del suelo mediante la exudación de compuestos orgánicos (Fall *et al.*, 2022). Otros estudios han demostrado que los HFMA contribuyen en la reducción de pérdidas de nutrientes por lixiviación o desnitrificación (van der Heijden, 2010; van der Heijden *et al.*, 2015). En efecto, se ha registrado que los HFMA disminuyeron significativamente las pérdidas de N por lixiviación de nitratos (Asghari y Cavagnaro, 2012). Adicionalmente, Bender y colaboradores (2015) reportaron una reducción de las pérdidas de P por lixiviación y de N por emisión de óxido nitroso y por lixiviación de nitrato. Incluso en ausencia de respuesta de la planta los HFMA demostraron reducir la lixiviación de nutrientes (van der Heijden, 2010). Este beneficio es indirecto ya que los HFMA influyen sobre las comunidades de bacterias que habitan la rizósfera y micorrizosfera (Johansson *et al.*, 2004; Sheublin *et al.*, 2010), y pueden inducir cambios en las comunidades desnitrificantes (Veresoglou *et al.*, 2012). Puede afirmarse, entonces, que los servicios ecosistémicos provistos por los HFMA son capaces de trascender el

beneficio inmediato para los cultivos y tienen el potencial de contribuir fuertemente en la sustentabilidad de los agroecosistemas.

1.3 Factores que afectan la simbiosis

1.3.1. Factores bióticos, abióticos y antrópicos

El grado y tipo de interacción entre individuos de diferentes especies depende de múltiples factores. La interacción entre una planta y el hongo dependerá tanto de la especie vegetal y de la especie del hongo como de los factores bióticos y abióticos imperantes (Müller y Krauss, 2005). Estos últimos factores son clave pues la formación de estructuras de las micorrizas es ambiente dependiente. Se ha observado que algunas especies de HFMA incrementan la formación de vesículas cuando la simbiosis ocurre en situaciones de alta oferta nutricional (Nijjer *et al.*, 2010). En cambio, en situaciones de estrés y cuando disminuye el suministro de metabolitos desde la planta hospedante, el hongo utiliza las reservas lipídicas de las vesículas, que posteriormente degeneran (Sieverding, 1991). El MER es altamente afectado por la heterogeneidad del suelo y está involucrado en la búsqueda de nuevas plantas y en la exploración del suelo para la adquisición de nutrientes minerales que utilizarán tanto el hongo como la planta. Las hifas del MER pueden tener un crecimiento extenso (hasta 8 cm desde la raíz) (Sieverding, 1991), son capaces de conectar diferentes plantas hospedantes y establecer simbiosis micorrízica con las diversas especies de plantas con las cuales se contactan (Giovannetti *et al.*, 2004).

Debido a que el hombre modifica las condiciones del suelo, también es un factor incidente sobre las especies de HFMA, por ejemplo, a través de la fertilización, el laboreo del suelo, el uso de pesticidas y la implantación de cultivos (Smith y Read, 2008). Las rotaciones de cultivos representan uno de los factores antrópicos más significativos para estos hongos (Johnson *et al.*, 1991) ya que son muy afectados por la comunidad vegetal con la que interactúan. Las plantas hospedadoras ejercen un rol clave sobre ellos. Algunos de los mecanismos implicados son el favorecimiento selectivo de la esporulación de ciertas especies de HFMA (Bever *et al.*, 1996) y la preferencia de la planta (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2003). A ello debe sumarse la competencia entre HFMA por la colonización radical (Lekberg *et al.*, 2006). El historial de fertilización de un lote es un factor esencial en la selección de las poblaciones de HFMA. La aplicación de fertilizantes fosfatados puede tener un rol negativo sobre la micorrización, al disminuir el beneficio neto que le aporta el hongo al huésped que ve satisfecho su demanda de P por esa vía (Bundrett *et al.*, 1996; Covacevich *et al.*, 2007; Covacevich y Echevarría, 2009; Fernández *et al.*, 2011; Jansa *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2001; Thougnon *et al.*, 2016). No obstante, Xiao y colaboradores (2019) encontraron que la adición de N incrementó la abundancia de los HFMA mientras que la adición de P aumentó la diversidad de los HFMA. Por su parte Williams y colaboradores (2017), estudiaron HFMA en cebada después de 55 años de tratamientos con distintas dosis de P y N. Estos investigadores encontraron que la fertilización con N redujo la diversidad de los HFMA mientras que el P no tuvo efecto significativo. De esta manera, la comunidad autóctona de HFMA estará compuesta por todas aquellas especies que logren adaptarse exitosamente a los filtros abióticos y bióticos del medio.

1.3.2. Continuo mutualismo-parasitismo

Diversos autores han propuesto que las asociaciones entre los HFMA y las plantas representan un continuo entre mutualismo y parasitismo (Johnson *et al.*, 1997; Klironomos, 2003). Dado que la relación micorrícica es modulada tanto por factores bióticos como abióticos, existen escenarios en los cuales el beneficio para la planta puede no ser mensurable. Debido a las capacidades contrastantes de los HFMA de aportar P o N a su planta hospedera (George *et al.*, 1995; Govindarajulu *et al.*, 2005; Fitter, 2006; Guether *et al.*, 2009; Kiers *et al.*, 2011), es esperable encontrar que las comunidades de hongos presentes en el suelo respondan de manera distinta al aporte diferencial de fertilizantes fosfatados o nitrogenados. Por su baja movilidad, el P es un elemento que puede ser mayormente captado por una planta micorrizada. De manera contrastante, la respuesta a la absorción de N por una planta micorrizada no debería ser muy marcada ya que es un nutriente muy móvil por lo que la extensión del volumen explorado del suelo tendrá un rol menos relevante. Cabe aclarar que, aunque las asociaciones micorrícicas pueden proveer beneficios variados, en esta tesis se abordará el continuo entre mutualismo y parasitismo exclusivamente en términos de nutrición de la planta.

1.3.3. Impacto de oferta de P y N en mutualismo-parasitismo

La oferta de P y N del suelo modula la simbiosis micorrícica a través de la cantidad individual de cada uno de los nutrientes, y también probablemente a la relación estequiometría N:P. El impacto del N sobre la micorrización se relacionaría con la oferta de fotoasimilados disponibles para los hongos (Bennett y Groten, 2022). El N influye en los balances de carbono en las plantas por su efecto sobre la fotosíntesis, modificando de esta manera la cantidad de compuestos carbonados disponibles para intercambiar con las micorrizas (Graham *et al.*, 1982; Lekberg *et al.*, 2021; Pearson *et al.*, 1991). Jiang y colaboradores (2018) encontraron que el enriquecimiento de N en el suelo redujo progresivamente la abundancia de los HFMA, alteró la composición de la comunidad y cambió el funcionamiento de las micorrizas hacia el parasitismo. La disponibilidad de P en el suelo también modula la simbiosis alterando su intercambio entre los hongos y las plantas (Shi *et al.*, 2021). La producción de hifas y de arbusculos es más alta en suelos con niveles más bajos de P (Antoninka *et al.*, 2015; Propster y Johnson, 2015). Los fenotipos micorrícicos (la formación de sus diferentes estructuras) surgen de interacciones entre las plantas, los hongos y el medio ambiente. Las diferencias en la relación N:P del suelo y la capacidad de absorción de los hongos y las plantas hacen que los HFMA sean intrínsecamente más limitados en N y menos en P que sus plantas hospedantes (Johnson *et al.*, 2015; Lekberg *et al.*, 2021). Los fenotipos mutualistas (i.e. predominio de arbusculos e hifas) se encuentran más probablemente en los sistemas limitados por P, pero con buena oferta de N, y los fenotipos comensales o parasitarios (i.e. predominio de vesículas) se encuentran en los sistemas limitados por N, independientemente de la oferta de P (Johnson *et al.*, 2015; Lekberg *et al.*, 2021). Se considera que la limitación de carbono, producto de la deficiencia de N, genera que los fenotipos pasen del mutualismo al comensalismo e incluso al parasitismo en términos de nutrición vegetal (Bennett y Groten, 2022; Johnson *et al.*, 2015). Sin embargo, es una concepción que no ha sido corroborada extensivamente y que podría potenciar los beneficios asociados a las micorrizas en términos de nutrición fosfatada.

1.4 Aplicación – Impacto del trabajo

La incorporación de nutrientes al suelo vía fertilizantes minerales es una práctica necesaria y debería ser mejor estudiada para optimizar el uso de insumos, mejorar la producción de alimentos y reducir su impacto en el medio ambiente. Un conocimiento más amplio sobre la interacción HFMA-planta en los sistemas de producción actuales podría ayudar a disminuir las brechas de rendimiento, haciendo un uso más racional de fertilizantes o aumentando la eficiencia de los mismos, colaborando con el medio ambiente. Entender cómo la disponibilidad de P y N modula la interacción entre los HFMA y especies vegetales destinadas a la producción de alimentos, y en las condiciones que éstas se cultivan, sería de gran utilidad para buscar estrategias que mejoren la producción. Sabemos que para lograr altos rendimientos de granos es necesario el uso de fertilizantes, sin embargo, desconocemos si las prácticas que conducen a este objetivo en el corto plazo están alineadas con las prácticas necesarias para aumentar los beneficios de la interacción planta-HFMA. Aún no ha sido estudiado en qué medida los niveles de fertilización que se usan en la Región Pampeana Argentina son capaces de modular la interacción planta-HFMA. Además, la contribución de los HFMA en la nutrición de los cultivos agrícolas es aún poco conocida.

1.5 Objetivo general

En esta tesis se plantea como objetivo general evaluar el efecto de la aplicación continua, y de largo plazo, de fertilizantes fosfatados y nitrogenados en el suelo sobre las comunidades de hongos formadores de micorrizas.

Capítulo 2: Efecto de la fertilización fosfatada y nitrogenada sobre la formación de micorrizas y la absorción de P y N en maíz.

2.1 Introducción

El N es uno de los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas y su deficiencia es uno de los factores más importantes que limitan la producción de maíz a nivel mundial (Fathi y Zeidali, 2021). En este sentido, los fertilizantes nitrogenados proporcionan alimentos directa o indirectamente a la mitad de la población mundial (Yadav *et al.*, 2017). A su vez, el maíz en Argentina se cultiva principalmente en suelos Molisoles altamente fértiles, aunque deficientes en P (Rubio *et al.*, 2008; Sainz Rozas *et al.*, 2012). Una gran proporción de estos suelos presentan disponibilidades de P menores al umbral crítico de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, en 0 – 20 cm de profundidad del suelo, establecido para la región Pampeana (Sucunza *et al.*, 2018) por lo cual, la fertilización fosfatada es una práctica común para reducir brechas de rendimiento.

Para satisfacer su demanda nutricional, el maíz, al igual que la mayoría de especies vegetales, es capaz de establecer relaciones simbióticas con HFMA (Smith y Read, 2008). Los HFMA son microorganismos existentes en el suelo y tienen la capacidad de desarrollar una asociación simbiótica con casi el 90 % de las especies vegetales (Ahangar *et al.*, 2014; Begum *et al.*, 2019b; Brundrett, 2002). Estos microorganismos mejoran la absorción de nutrientes y consecuentemente mejoran la nutrición mineral de los cultivos (Adesemoye y Kloeppe, 2009; Balliu *et al.*, 2015; Hazzoumi *et al.*, 2015; Schnepf *et al.*, 2011). A cambio, los HFMA reciben carbono de su planta huésped (Bryla y Eissenstat, 2005). El hospedero puede destinar aproximadamente del 11 al 26% de su carbono para intercambiar con los HFMA y lo hace en forma de azúcares hexosas simples (Parniske, 2008) y ácidos grasos sintetizados de novo (Jiang *et al.*, 2017; Luginbuehl *et al.*, 2017), que los HFMA utilizan para su crecimiento.

En los agroecosistemas templados, los HFMA son habitantes naturales de los suelos y son afectados negativamente por las prácticas agrícolas convencionales y las técnicas de manejo de cultivos tales como la labranza y la fertilización (Brito *et al.*, 2012; Brígido *et al.*, 2017; Helgason *et al.*, 1998; Oehl *et al.*, 2003; Jumpponen *et al.*, 2005). Está documentado que los HFMA mejoran la absorción de P y N, aumentando el área foliar y el crecimiento de las plantas (Balliu *et al.*, 2015). Por ejemplo, Garcés-Ruiz y colaboradores (2017) y Begum y colaboradores (2019a), observaron que la tasa de absorción de P aumentó considerablemente en las plantas de maíz inoculadas con HFMA. La producción de hifas, y consecuentemente de arbusculos, es más alta en suelos con niveles más bajos de P (Antonika *et al.*, 2015; Propster *et al.*, 2015). Sin embargo, estos resultados han sido evaluados en condiciones experimentales controladas y aún se cuenta con poca información de situaciones de campo con las comunidades de HFMA que residen en el suelo del agroecosistema. En la localidad de Balcarce, Astiz Imaz y colaboradores (2014), en un ensayo a campo bajo siembra directa no encontraron diferencias entre tratamientos de fertilización en el cultivo de maíz en el estadio V6. No obstante, encontraron un aumento de la colonización de HFMA en los tratamientos fertilizados en comparación al testigo cuando el cultivo de maíz se encontraba en anthesis.

Los fenotipos micorrícicos, es decir, la formación de sus diferentes estructuras, surgen de interacciones entre las plantas, los hongos y el medio ambiente. El porcentaje de raíces colonizadas por hifas, arbusculos y/o vesículas de HFMA puede reflejar los fenotipos

(McGonigle *et al.*, 1990). Los arbusculos representan los sitios de intercambio activo entre el hongo y la raíz, mientras que las vesículas son estructuras de reserva en las que el hongo almacena lípidos de un alto costo energético para la planta (Bennett y Groten 2022; Lekberg *et al.*, 2021). En este sentido, es esperable que los fenotipos mutualistas con alta formación de arbusculos sean más frecuentes en sistemas con limitación de P, pero con una oferta adecuada de N, mientras que los fenotipos comensales o parasitarios con alta formación de vesículas se encontrarían más frecuentemente en sistemas limitados por N, sin importar la disponibilidad de P (Johnson *et al.*, 2015; Lekberg *et al.*, 2021). Teniendo en consideración que los HFMA son uno de los principales socios del cultivo para obtener nutrientes del suelo y que la nutrición de las plantas es un pilar fundamental para la producción de alimentos, es imprescindible estudiar la influencia de la fertilización sobre estos simbioses en nuestros sistemas productivos. Esto podría generar más herramientas de decisión al pensar en estrategias que optimicen el uso de los fertilizantes y la nutrición de los cultivos.

2.1.1. Objetivo

Cuantificar el efecto de la fertilización fosfatada y nitrogenada de largo plazo sobre la formación de micorrizas y la absorción de P y N en maíz.

2.1.2. Hipótesis de trabajo

- A) La mayor disponibilidad de P disminuye la cantidad de arbusculos.
- B) La mayor disponibilidad de N atenúa la formación de vesículas.
- C) La absorción de P y N es explicada por la adición de cada nutriente.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Sitio y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en la campaña agrícola 2019/2020. Se utilizó como sitio de estudio un ensayo de fertilización de larga duración ubicado en la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (33°57'28.0"S 60°34'35.5"O). El ensayo tuvo su inicio en la campaña agrícola 2001/02 con el cultivo de maíz. Al momento de instalar el experimento el lote tenía una historia agrícola de más de 30 años y los últimos 5 años bajo siembra directa. En el mismo se evalúan los efectos directos y residuales de la aplicación de distintas estrategias de fertilización con P, N y azufre (S) en una rotación agrícola sobre la fertilidad del suelo y los rendimientos de grano. El experimento fue conducido bajo siembra directa continua sobre un suelo Argiudol típico, serie Pergamino, fase ligeramente erosionada (capacidad de uso: I-2) (INTA, 1972) que es representativo de la región (Rubio *et al.*, 2019). La rotación agrícola utilizada fue maíz – soja – trigo/soja 2^{da}. El diseño experimental fue en parcelas divididas con 4 repeticiones (bloques) (Figura 2.2.1.1). Las parcelas mayores estuvieron conformadas por dos tratamientos de P: P0 (0 kg P ha⁻¹), y P1 (18 - 28 kg P ha⁻¹, dependiendo del cultivo y del año). En las subparcelas (cuyas dimensiones fueron: 7 x 35 m) se dispusieron los tratamientos de N: N0 (0 kg N ha⁻¹) y

N1 (100 kg N ha⁻¹; cuando se realiza soja de primera, este tratamiento no recibe N). Las dosis de P y N se ajustaron de acuerdo al criterio de reposición de nutrientes por la extracción del cultivo. Los nutrientes se aplicaron anualmente, antes de la siembra en los casos del trigo (se fertilizó para la sucesión trigo/soja de esa campaña) y la soja de primera, o durante el ciclo del cultivo, como en el caso del N y S en maíz. La fuente nitrogenada fue urea granulada (46-0-0), la fosfatada superfosfato triple de calcio (0-46-0) y la azufrada sulfato de calcio dihidratado (yeso agrícola, 0-0-0-17S).

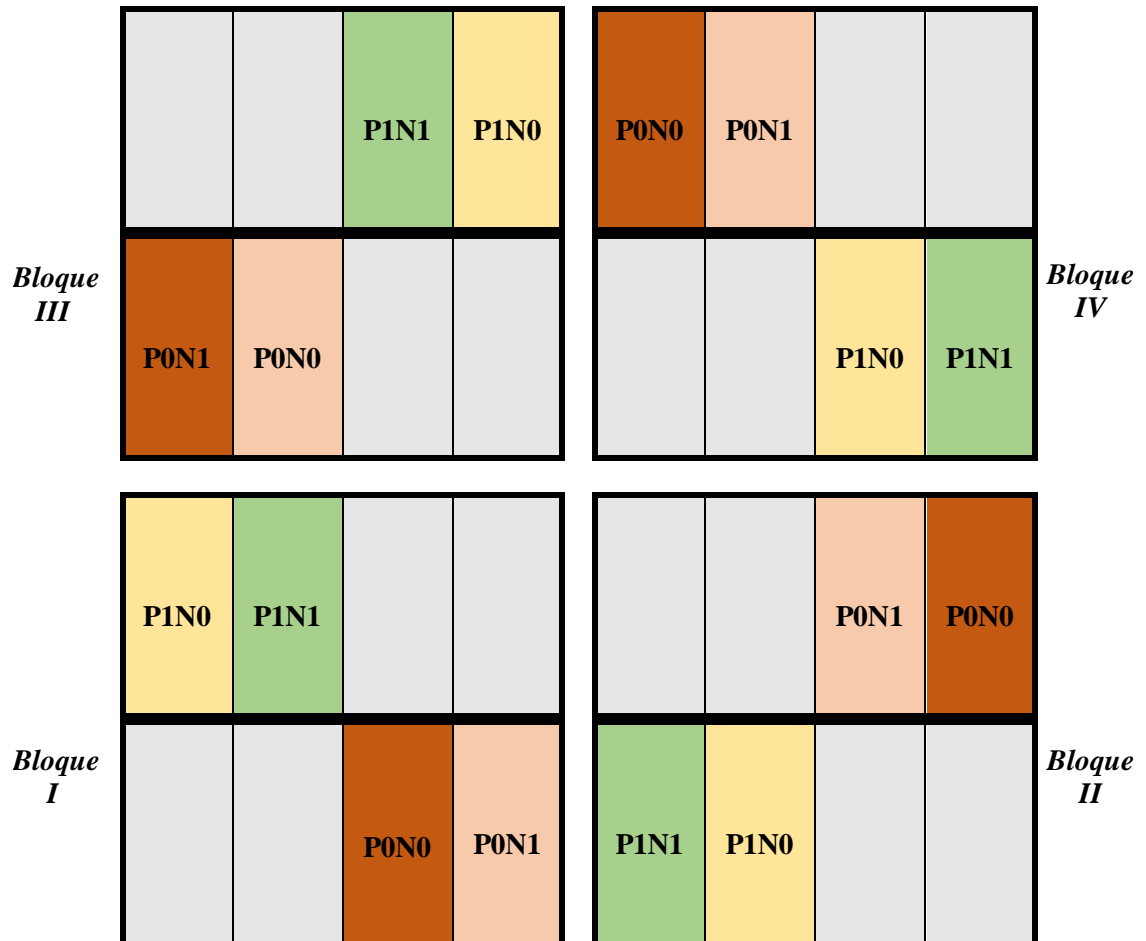


Figura 2.2.1.1. Diseño experimental. Tamaño de las subparcelas: 7 m (ancho) x 35 m (largo). P0: testigo fósforo; P1: 24 kg P/ ha; N0: testigo nitrógeno; N1: 100 kg N/ ha; Tratamientos: P1N1; P1N0; P0N1 y P0N0. Subparcelas en gris, no utilizadas en el presente estudio, presentan los mismos tratamientos detallados, pero sin la aplicación de azufre.

2.2.2 Caracterización edáfica

Previo a la siembra de maíz, el 30 de octubre de 2019 se realizó un muestreo de suelo para caracterizar la fertilidad química de cada subparcela. En cada una de las 16 subparcelas se tomaron muestras compuestas de 10 piques para cada profundidad (0-20, 20-40 y 40-60 cm). Los piques fueron tomados en dos líneas (5 piques en cada una) a lo largo de las subparcelas. Se dejaron bordes de 2 m al inicio y al final de la parcela y de 1,5 m en los laterales. Los piques fueron realizados en los entresurcos y a su vez se tuvo

la precaución de evitar las huellas de la maquinaria. Las muestras se secaron a temperatura ambiente, se molieron manualmente y se tamizaron a 2 mm. En cada una de ellas se determinó: pH en agua con una relación 1:2,5 (p/v), conductividad eléctrica a 25°C, carbono orgánico total (Walkley y Black, 1934), P extractable (Bray 1; Bray y Kurtz, 1945), P total (Sommers y Nelson, 1972), N de nitratos (Bremner, 1965), N total (Kjeldahl).

2.2.3 Implantación del cultivo y aplicación de los tratamientos

El 31 de octubre de 2019 se aplicaron los tratamientos de P: P0 (0 kg P ha⁻¹), y P1 (24 kg P ha⁻¹) al voleo manualmente, utilizando superfosfato triple de calcio como fuente. El 1^{ro} de noviembre del año 2019 se implantó el cultivo utilizando el híbrido DK72-20 VT3P, con un distanciamiento de 70 cm entre hileras y con una densidad de aproximadamente 79.500 semillas ha⁻¹. Previo a la siembra, la semilla fue tratada con insecticida (Imidacloprid 60%, a razón de 500 cm³/ 100 kg semilla) para el control de gusano blanco y recibió 300 cm³ 100 kg⁻¹ de semilla del fertilizante líquido para la aplicación de Zn de la empresa Rizobacter (Status Zn, 40% Zn p/p). Emergido el cultivo de maíz y contando ya con 7-8 hojas desplegadas, se aplicaron los tratamientos de N: N0 (0 kg N ha⁻¹) y N1 (100 kg N ha⁻¹) utilizando urea granulada como fuente. Simultáneamente se aplicó S (15 kg S ha⁻¹) en todas las subparcelas, con el fin de evitar que cualquier posible deficiencia de dicho nutriente afecte a la respuesta de los tratamientos. La aplicación de N y S fue realizada con maquinaria en bandas superficiales.

2.2.4 Muestreos de planta y raíz

Durante el ciclo del cultivo, en los estadios fenológicos V3, V6, V9, R1, R4 y R6 (Ritchie y Hanway, 1982), se tomaron muestras de 1 m lineal de surco en un área representativa de cada subparcela. En cada muestreo, se cosecharon las plantas para la determinación de biomasa aérea (peso seco) y cuantificar la absorción de P y N. Simultáneamente se tomaron muestras de raíz de los primeros 15 cm de profundidad para las determinaciones de micorrización. Se prestó especial atención a que el número de plantas presentes en cada sitio de muestreo sea homogéneo. Toda muestra recolectada tuvo 6 plantas por metro lineal de surco. En los muestreos realizados en V3 y V6, debido al pequeño tamaño de la muestra, se tomaron 2 sets de muestras por subparcela, uno destinado a la medición de biomasa aérea y absorción de nutrientes y el segundo a las determinaciones asociadas a los hongos formadores de micorrizas. En los siguientes muestreos se realizaron todas las determinaciones con un solo set de muestra por subparcela.

2.2.5 Biomasa aérea y absorción de P y N

Los órganos aéreos de las plantas de maíz se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante. Una vez secas las muestras fueron pesadas y a continuación molidas a 1 mm para realizar las mediciones de P total y N total. En el muestreo correspondiente al estadio fenológico R6, el grano se procesó por separado del resto del material vegetal. Para ello, las espigas fueron trilladas a mano y los marlos pasaron a formar parte de la biomasa

aérea. Los granos fueron molidos en molino termo refrigerado, mientras que el resto de las plantas fueron molidas en molino para material vegetal. Los valores de producción de biomasa se expresaron en g m^{-2} . Para la determinación de P se pesó 0,07 g del material vegetal molido y se calcinó en mufla a 500°C durante 16 h (Fernandez *et al.*, 2009). Las cenizas se resuspendieron en 8 ml de 0,1 N HCl y el contenido de P se determinó por colorimetría según la metodología de Murphy y Riley (1962). Los resultados de concentración de P (mg g^{-1}) obtenidos fueron afectados por la biomasa correspondiente y se expresan como mg m^{-2} . Para la determinación de N se pesaron 0,3 g de material vegetal molido que fueron procesados según la metodología de Kjeldahl (1883) expresando los resultados como g m^{-2} .

2.2.6 Porcentaje de micorrización

Las muestras de raíces fueron tomadas con pala de los primeros 15 cm de profundidad. Los seis sistemas radicales de las plantas ubicados en la unidad experimental se almacenaron en bolsas plásticas para evitar la deshidratación. Inmediatamente después de cada muestreo, los sistemas radicales fueron acondicionados y de ellos se seleccionó 1 g de raíces finas tomadas al azar que a continuación fueron clarificadas y teñidas según Phillips y Hayman (1970). En el proceso de tinción las raíces fueron sometidas al siguiente protocolo: i) inmersión durante 10 minutos en una solución de KOH al 10 % m/m a 90°C . Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron y enjuagaron con agua. ii) inmersión durante 5 minutos en HCl al 10% v/v a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron y enjuagaron con agua. iii) inmersión durante 15 minutos en solución de azul de tripán 0,63 % m/v a 90°C . Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron y enjuagaron con agua.

Posteriormente a ser teñidas las raíces se almacenaron en una solución de ácido láctico y glicerol hasta la cuantificación de micorrización. La cuantificación en microscopio (magnificación 20X) de estructuras correspondientes a HFMA, más precisamente, el porcentaje de hifas, vesículas y arbuscúlos, siguió la metodología propuesta por McGonigle y colaboradores (1990). Para tal proceso se montaron sobre cada portaobjeto más de 30 fragmentos de raíces de aproximadamente 2 cm de longitud. En cada preparado se realizaron 3 observaciones por fragmento de raíz en 30 raíces, obteniendo de esta manera 90 observaciones por preparado o lo que equivale a 270 observaciones por subparcela, 1080 observaciones por tratamiento y 4320 para todo el experimento en el muestreo V3. Debido a la baja dispersión de los resultados dentro de los tratamientos y por cuestiones operativas, para el resto de los muestreos se montaron 2 preparados por muestra, es decir, 180 observaciones por subparcela, 720 por tratamiento, y 2880 por cada muestreo (V6, V9, R1, R4 y R6). Los resultados se expresan como porcentaje de sitios con presencia de cada estructura (% hifas, % arbuscúlos, % vesículas) sobre el total de sitios observados.

2.2.7. Condiciones climáticas durante el experimento

Se registraron precipitaciones y temperaturas mínimas y máximas durante el ciclo del cultivo de maíz (Figura 2.2.7.1).

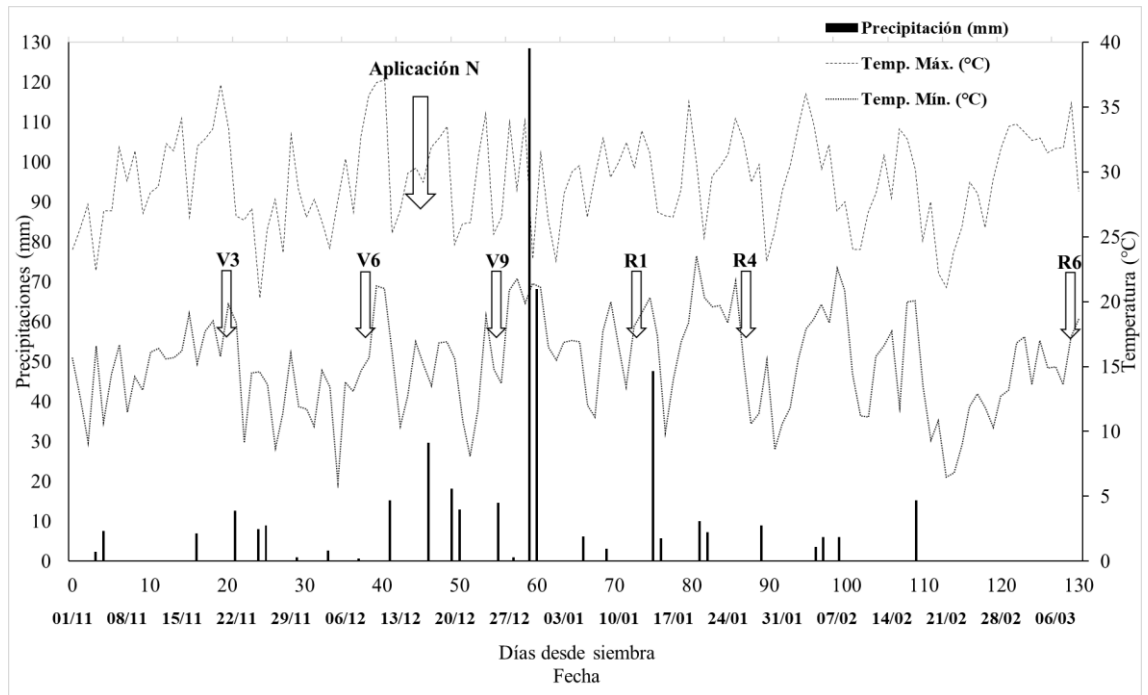


Figura 2.2.7.1. Condiciones climáticas durante el ciclo del cultivo. Las flechas pequeñas indican el momento de cada muestreo (indicando la fenología del cultivo). La flecha de mayor tamaño muestra el momento de la aplicación de nitrógeno. Fuente: Climatología EEA Pergamino.

2.2.8. Análisis estadísticos

Las variables de estudio se analizaron mediante modelos lineales generalizados (MLG), debido a que son medidas repetidas a lo largo del ciclo del cultivo y no cumplen con el supuesto de independencia de las observaciones requerido para un análisis de varianza tradicional. Las propiedades de suelo también fueron analizadas con MLG. Se modeló la matriz de varianza covarianza de los errores cuando los supuestos de normalidad y varianza constante no se cumplieron. Se trabajó con una probabilidad de 5% ($\alpha: 0,05$). Se utilizó el LSD de Fischer como test de comparación de medias. Se usó el test LSD Fischer como test de comparación de medias. Se utilizó el software estadístico InfoStat en interacción con R (Di Rienzo *et al.*, 2018).

2.3 Resultados

2.3.1 Caracterización de los tratamientos – información edáfica

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las variables edáficas evaluadas previamente a la implantación del cultivo (Cuadro 2.3.1.1). En la profundidad 0 – 20 cm se encontraron diferencias significativas para P extractable mostrando los tratamientos P1N0 y P1N1 los valores más altos con más de 20 ppm de P Bray 1. La otra variable que mostró diferencias significativas es el N de nitratos. Para este parámetro, el tratamiento P0N1 mostró el mayor valor mientras que la menor disponibilidad de N se observó en el tratamiento P1N1. En la profundidad 20 – 40 cm no se encontraron efectos

significativos de los tratamientos sobre ninguna de las variables analizadas. En la profundidad 40 – 60 cm se encontraron diferencias significativas para la variable carbono orgánico, aunque las diferencias entre los tratamientos son escasas (Cuadro 2.3.1.1).

Cuadro 2.3.1.1. Caracterización edáfica de los tratamientos.

Prof. (cm)	Trat.	pH	Ce (dS.m ⁻¹)	C (g.kg ⁻¹)	P Bray (mg.kg ⁻¹)	P Total (g.kg ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg.kg ⁻¹)	N Total (g.kg ⁻¹)
0-20	P0N0	5,5±0,1ns	0,1±0,0a	15,2±0,2ns	7,8±1,0b	344,8±5,5ns	13,1±0,2b	1,4±0,0ns
	P0N1	5,6±0,0ns	0,1±0,0b	14,8±0,9ns	8,4±1,6 b	345,3±9,3ns	14,6±0,4a	1,5±0,0ns
	P1N0	5,6±0,0ns	0,1±0,0a	14,6±0,2ns	27,9±0,7a	387,5±21,7ns	11,6±0,1c	1,5±0,1ns
	P1N1	5,6±0,0ns	0,1±0,0b	15,6±0,3ns	24,0±2,4a	397,0±18,2ns	10,8±0,2d	1,6±0,0ns
20-40	P0N0	6,0±0,1ns	0,1±0,0ns	8,1±0,9ns	3,9±1,4ns	290,5±14,2ns	6,0±0,3ns	0,9±0,1ns
	P0N1	6,1±0,0ns	0,1±0,0ns	7,7±0,5ns	5,4±1,7ns	319,0±13,1ns	6,1±0,2ns	0,9±0,1ns
	P1N0	6,1±0,0ns	0,1±0,0ns	7,6±0,3ns	4,2±0,4ns	292,5±37,3ns	4,8±0,5ns	0,9±0,0ns
	P1N1	6,1±0,1ns	0,1±0,0ns	8,3±0,6ns	5,9±2,0ns	331,8±8,7ns	5,0±0,6ns	1,0±0,0ns
40-60	P0N0	6,3±0,0ns	0,1±0,0ns	5,0±0,2ab	3,3±0,9ns	321,5±26,1a	4,1±0,2ns	0,7±0,0ns
	P0N1	6,4±0,0ns	0,1±0,0ns	4,8±0,1b	4,7±1,5ns	359,1±10,6a	4,4±0,3ns	0,6±0,0ns
	P1N0	6,3±0,0ns	0,1±0,0ns	4,9±0,1b	3,3±0,5ns	366,5±25,4a	4,0±0,2ns	0,6±0,0ns
	P1N1	6,3±0,0ns	0,1±0,0ns	5,3±0,2a	5,1±2,1ns	303,0±16,3a	4,1±0,3ns	0,6±0,0ns
Factor <i>p</i> -valor								
0-20	P	0,249	0,159	0,870	0,002	0,097	0,002	0,199
	N	0,477	0,020	0,529	0,318	0,565	0,241	0,199
	P * N	0,477	0,947	0,171	0,174	0,603	0,003	0,536
20-40	P	0,545	0,162	0,999	0,814	0,951	0,093	0,767
	N	0,081	0,898	0,505	0,275	0,227	0,537	0,428
	P * N	0,323	0,308	0,079	0,945	0,851	0,835	0,054
40-60	P	0,392	0,548	0,357	0,917	0,807	0,379	0,440
	N	0,707	0,797	0,364	0,263	0,550	0,454	>0,999
	P * N	0,460	0,421	0,024	0,878	0,048	0,743	0,327

Nota: CE: conductividad eléctrica; C: carbono orgánico; P Bray: fósforo extractable; P Total: fósforo total; N-NO₃⁻: nitrógeno de nitratos; N Total: nitrógeno total. Letras diferentes por columna y dentro de cada profundidad indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (α : 0,05). ns: no significativo.

2.3.2 Acumulación de biomasa, rendimiento y absorción de nitrógeno y fósforo

La oferta ambiental durante el ciclo del cultivo permitió lograr rendimientos de hasta 12 Mg ha⁻¹. Las precipitaciones registradas entre la siembra del cultivo y madurez fisiológica (1 de noviembre – 9 de marzo) fueron 458 mm. Este valor es semejante al de la serie histórica (1980-2020) de 476 mm para el mismo período. Lo que podemos destacar es que, de los 458 mm durante el ciclo del cultivo, 276 mm ocurrieron durante el período crítico (Grant *et al.*, 1989; Hall, *et al.*, 1981) y de los mismos, 206 mm en la primera parte del período crítico. Respecto a las temperaturas, la temperatura media mínima durante el período crítico fue de 16,2°C y la temperatura media máxima fue de 29,3°C. Ambos valores se encontraron levemente por debajo de los valores medios observados en la serie histórica (1980-2020).

Cuadro 2.3.2.1. Valores-p para acumulación de biomasa, absorción de nutrientes y rendimiento del cultivo.

Muestreo	Factor	Biomasa	P Absorbido	N Absorbido	Rendimiento
V3	P	0,040	0,020	0,088	-
	N	0,751	0,116	0,848	-
	P*N	0,281	0,811	0,211	-
V6	P	0,017	0,015	0,019	-
	N	0,620	0,886	0,919	-
	P*N	0,699	0,898	0,550	-
V9	P	0,004	0,073	0,011	-
	N	0,310	0,113	0,006	-
	P*N	0,501	0,432	0,056	-
R1	P	0,067	0,057	0,474	-
	N	0,063	0,068	0,001	-
	P*N	0,092	0,960	0,290	-
R4	P	0,138	0,076	0,391	-
	N	0,032	0,001	<0,0001	-
	P*N	0,011	0,004	0,005	-
R6	P	0,715	0,124	0,876	0,841
	N	0,001	0,054	<0,0001	<0,0001
	P*N	0,044	0,139	0,190	0,078

Biomasa: acumulación de biomasa aérea; P Absorbido: acumulación de fósforo en biomasa aérea; N absorbido: acumulación de nitrógeno en biomasa aérea; Rendimiento: rendimiento en grano en base seca. Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada muestreo (α : 0,05). ns: no significativo.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las variables de cultivo evaluadas (Cuadro 2.3.2.1). Las variables biomasa aérea, P absorbido y N absorbido fueron afectados por los tratamientos de fertilización de manera diferencial a lo largo del ciclo del cultivo. La acumulación de biomasa aérea mostró respuesta al factor P en los estadios vegetativos. Se registró mayor acumulación de biomasa en los tratamientos fertilizados con P (P1N0 y P1N1) vs los no fertilizados con P (P0N0 y P0N1) en los muestreos realizados en los estadios fenológicos V3, V6 y V9. En el estadio V3 los tratamientos sin P tuvieron una media de 4,6 g. m⁻² mientras que los tratamientos con P acumularon 5,7 g. m⁻² de materia seca, lo que implica un incremento de 25,7%. En el estadio V6 el incremento en la acumulación de biomasa por el agregado de P ascendió al 72,98% pasando de los 69,2 g. m⁻² para los tratamientos sin P a 119,7 g. m⁻² en los tratamientos fertilizados con P. En el estadio V9 el promedio de biomasa acumulada, para los tratamientos sin P, se ubicó en los 278,3 g. m⁻² ascendiendo un 42,94%, llegando a los 397,8 g. m⁻² en los tratamientos fertilizados con P. En el muestreo realizado en el estadio fenológico R1 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En los estadios R4 y R6 se visualizó una interacción P*N. Se observó la mayor acumulación de biomasa en el tratamiento P1N1 en el estadio R4 con 1.401 g. m⁻², un 24,90% más de biomasa acumulada que el resto de los tratamientos. En el estadio R6 los tratamientos P0N1 y P1N1 registraron un promedio de 2.192,1 g. m⁻², un 25,29% más de biomasa acumulada que los tratamientos sin N que promediaron 1.749,7 g. m⁻² (Figura 2.3.2.1).

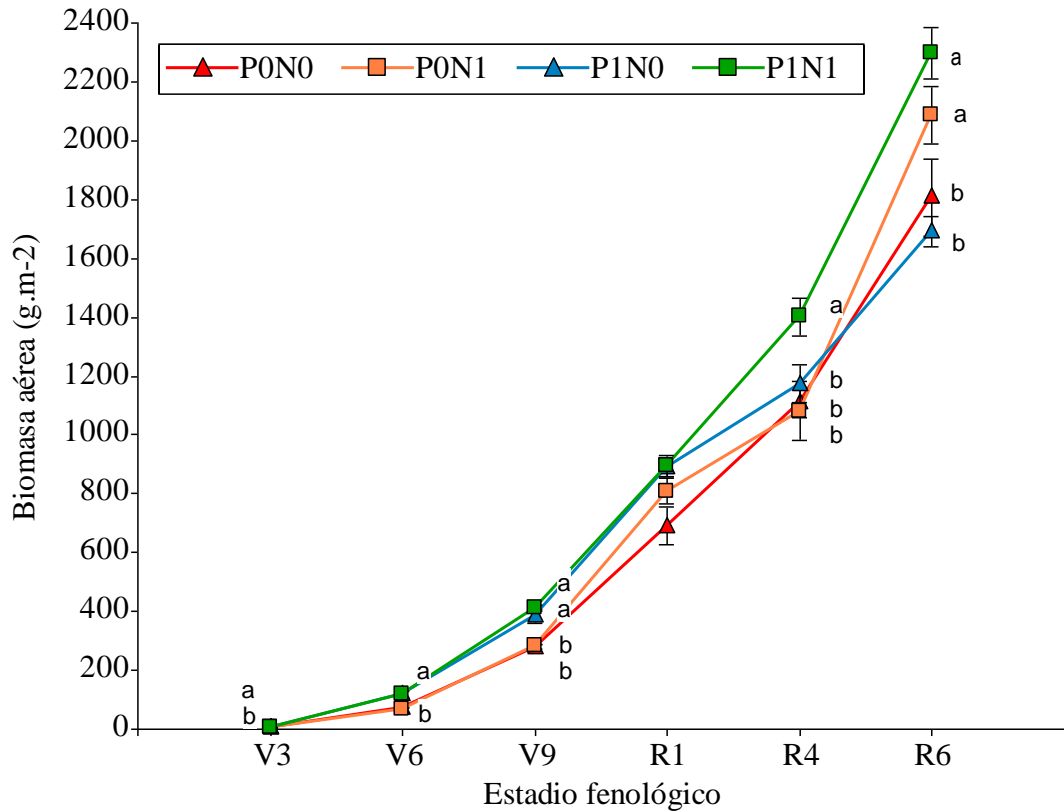


Figura 2.3.2.1. Acumulación de biomasa para los tratamientos evaluados a lo largo del ciclo del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico. Barras indican error estándar. $\alpha=0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.

El P absorbido mostró respuesta al factor P en los estadios V3 y V6 (Cuadro 2.3.2.1) absorbiendo más P en los tratamientos P1N0 y P1N1 (Figura 2.3.2.2). En el estadio V3, los tratamientos sin P absorbieron, en promedio, $13,6 \text{ mg. m}^{-2}$, mientras que los tratamientos con P absorbieron, en promedio, $23,7 \text{ mg. m}^{-2}$, lo que representa un aumento de $74,26\%$ en la absorción de P. De igual modo, en el estadio V6, los tratamientos sin P absorbieron, en promedio, $156,8 \text{ mg. m}^{-2}$, mientras que los tratamientos con P absorbieron, en promedio, $369,4 \text{ mg. m}^{-2}$, lo que representa un aumento de $135,55\%$ en la absorción de P. En estadios reproductivos, si bien el tratamiento P1N1 absorbió más P en todos los estadios, solamente en el estadio R4 la absorción de P fue significativamente superior. En el estadio R4, el tratamiento P1N1 registró $3.176,9 \text{ mg. m}^{-2}$ de P absorbido, mientras que los demás tratamientos registraron $1.816,3 \text{ mg. m}^{-2}$ de P absorbido. Esto representa un aumento de $74,91\%$ en la absorción de P a favor del tratamiento P1N1.

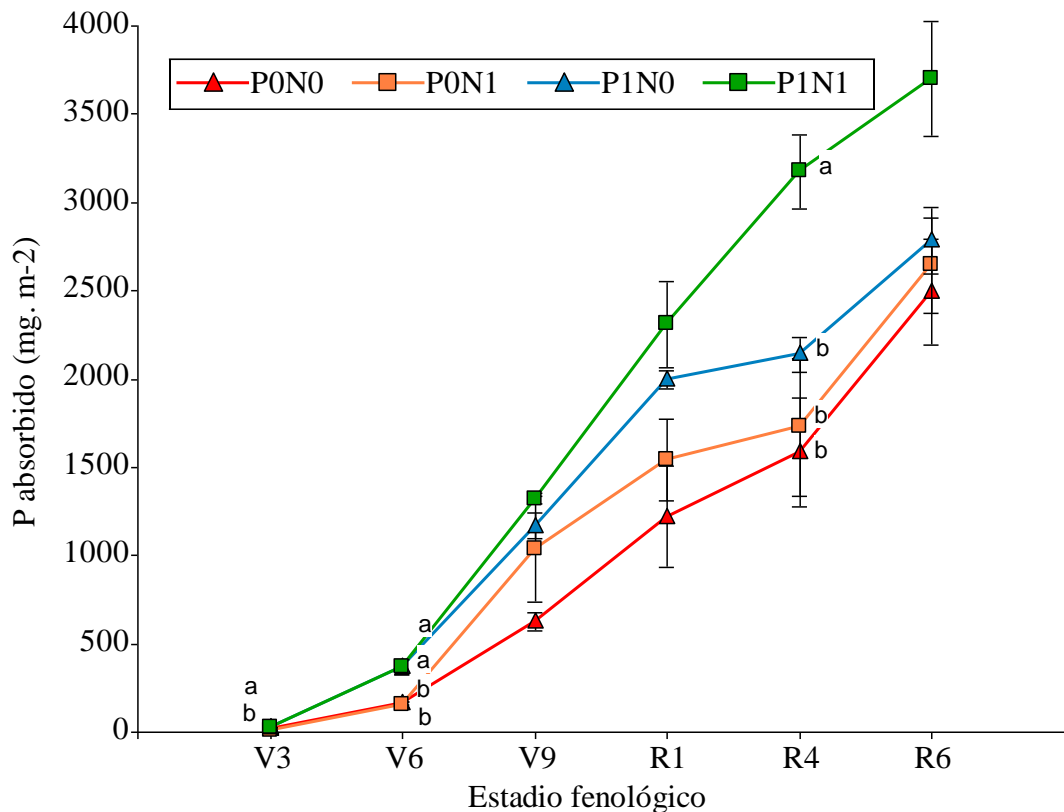


Figura 2.3.2.2. Absorción de P en biomasa aérea para los tratamientos evaluados a lo largo del ciclo del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico. Barras indican error estándar. $\alpha=0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.

El N absorbido manifestó respuesta al factor P en el estadio V6 absorbiendo 2,9 g. m⁻² en los tratamientos P1N0 y P1N1, un 56,76% más que en los tratamientos sin P. En el estadio fenológico V9, la absorción de N, mostró interacción P*N absorbiendo más N en el tratamiento P1N1 con 9,6 g. m⁻², un 38,46% más que el promedio de los tratamientos restantes. En el muestreo realizado en R1 hubo respuesta al factor N, absorbiendo 15,9 g. m⁻² en los tratamientos fertilizados con N (P0N1 y P1N1), los cuales absorbieron 74,73% más N que los tratamientos no fertilizados con N (promedio de 9,1 g. m⁻²). En el estadio R4 se observó una interacción P*N, absorbiendo la mayor cantidad de N en el tratamiento P1N1 (18,15 g. m⁻²), seguido por el tratamiento P0N1 (14,8 g. m⁻²) mientras que los tratamientos no fertilizados con N promediaron 10 g. m⁻² de N absorbido. Finalizado el ciclo del cultivo, en el estadio R6 se observó respuesta al agregado de N, manifestando 21,35 g. m⁻² de N absorbido en los tratamientos P0N1 y P1N1, un 75,72% más que los tratamientos P0N0 y P1N0 que promediaron 12,15 g. m⁻² de N absorbido (Figura 2.3.2.3).

El rendimiento fue afectado por el factor N (Cuadro 2.3.2.1), mostrando 1.241,7 g m⁻² de media para el tratamiento P1N1 y 1134,2 g m⁻² de media para el tratamiento P0N1 promediando 1.187,95 g. m⁻² de rendimiento (Figura 2.3.2.4). Este valor es un 42,97% mayor que el rendimiento promedio de los tratamientos no fertilizados con N (P0N0 y P1N0) el cual se ubicó en los 830,9 g. m⁻² de media. Se observó que la fertilización con

P redujo la variabilidad de los rendimientos. Y si bien la respuesta a P no fue estadísticamente significativa con un $\alpha= 0.05$, el tratamiento P1N1 rindió un 9,48% más que el tratamiento P0N1 (Figura 2.3.2.4).

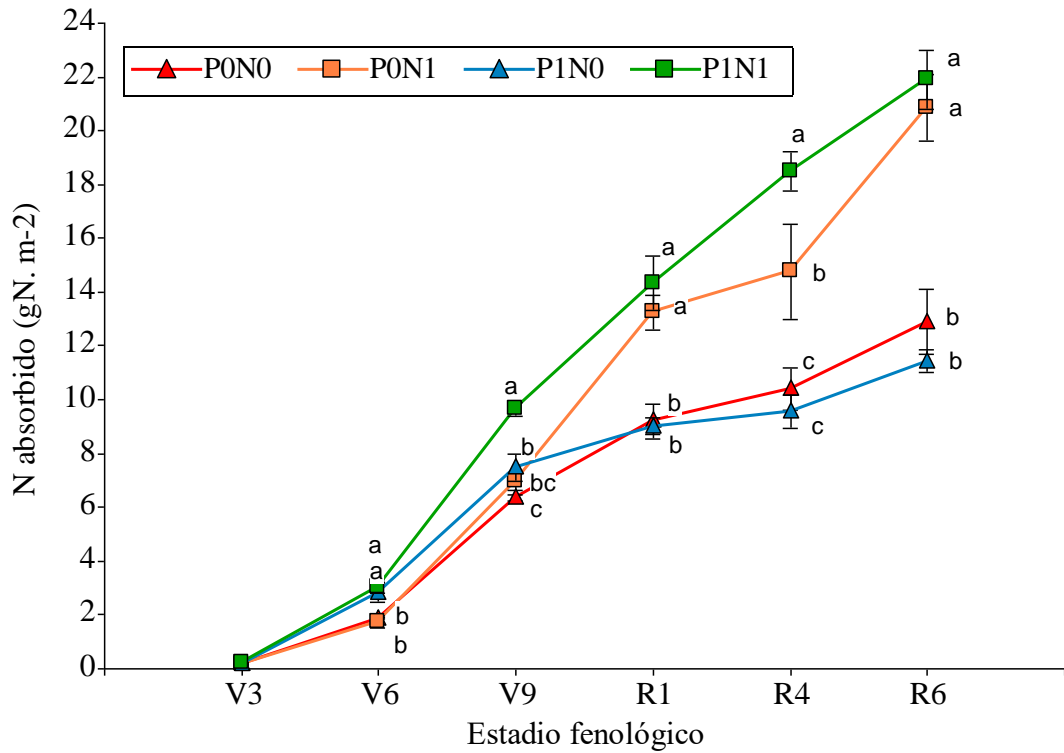


Figura 2.3.2.3. Absorción de N para los tratamientos evaluados a lo largo del ciclo del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico. $\alpha= 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.

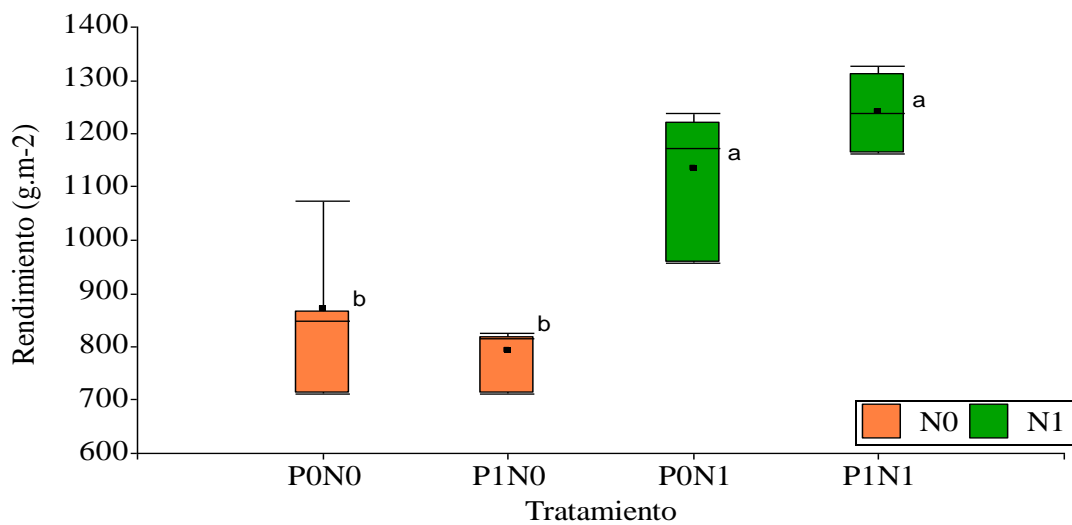


Figura 2.3.2.4. Rendimiento en base seca. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente

significativas, $\alpha= 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher. Cuadrado negro indica la mediana en cada caja. Cada caja indica los cuartiles 1 y 3. Los bigotes indican los valores extremos.

2.3.3 Micorrización

Cuadro 2.3.3.1. Valores-p correspondientes a las estructuras micorrícicas.

Muestreo	Factor	Hifas	Arbúsculos	Vesículas	Ves/Arb
V3	P	0,122	0,134	0,531	0,263
	N	0,009	0,012	0,752	0,938
	P*N	0,913	0,865	0,342	0,450
V6	P	0,050	0,050	0,900	0,579
	N	0,409	0,409	0,302	0,473
	P*N	0,303	0,303	0,932	0,754
V9	P	0,102	0,102	0,498	0,631
	N	0,180	0,180	0,821	0,980
	P*N	0,007	0,007	0,296	0,508
R1	P	0,023	0,023	0,893	0,519
	N	0,412	0,412	0,101	0,135
	P*N	0,352	0,352	0,640	0,721
R4	P	0,079	0,079	0,948	0,512
	N	0,062	0,062	0,677	0,747
	P*N	0,289	0,289	0,440	0,823
R6	P	0,470	0,470	0,183	0,087
	N	0,054	0,054	<0,0001	0,002
	P*N	0,092	0,092	0,372	0,880

Nota: Hifas: formación de hifas en raíz; Arbúsculos: formación de arbúsculos en raíz; Vesículas: formación de vesículas en raíz; Ves/Arb: relación vesículas/ arbúsculos en raíz. Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada muestreo ($\alpha: 0,05$). ns: no significativo.

Durante distintos estadios del cultivo de maíz, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros micorrícicos evaluados (Cuadro 2.3.3.1). En relación a las hifas y arbúsculos, se observó que el efecto de la fertilización con P y N fue dinámico a lo largo del ciclo del cultivo. En este sentido, en el estadio V3 el factor N tuvo un efecto supresor sobre la formación de estructuras micorrícicas (Figura 2.3.3.1) disminuyendo el porcentaje de colonización de 78,17% a 70,56%, es decir, una reducción del 10,80%. En el muestreo realizado en V6, el agregado de P suprimió un 12,50% la formación de hifas y arbúsculos, disminuyendo la colonización del 82,50% a 73,34%. En el estadio V9, se observó una interacción P*N significativa, donde el tratamiento P0N0 mostró los valores más altos de micorrización con un 87,22% de colonización en comparación al resto de tratamientos que promediaron un 77,36% de colonización. Esto se traduce en que la aplicación de fertilizantes redujo la colonización en un 12,74%. Pasando al ciclo reproductivo del cultivo, solamente se detectó un efecto supresor, estadísticamente significativo, del factor P en el estadio fenológico R1. En dicho estadio, los tratamientos que recibieron P (P1N0 y P1N1) tuvieron una media de 65,28% de colonización

micorrícica, un 21,38% menor que los tratamientos que no recibieron P (P0N0 y P0N1) que promediaron un 79,24% de colonización. En la Figura 2.3.3.1 se observa una tendencia supresora del agregado de P sobre la formación de arbusculos, que se mantiene en todo el ciclo del cultivo. La formación de vesículas y la relación vesículas/ arbusculos manifestó un efecto significativo del factor N en el estadio fenológico R6 (Cuadro 2.3.3.1). El agregado de N disminuyó significativamente la formación de vesículas. con una media de 8,61%, versus una abundancia de 21,25% en los tratamientos que no recibieron N (P0N0 y P1N0). Dicho de otro modo, la escasez de N produjo un aumento de 146,81% en la formación de vesículas (Figura 2.3.3.2). Esta disminución de la formación de vesículas, por la aplicación de N, afectó significativamente a la relación vesículas/ arbusculos disminuyéndola de 0,31 en los tratamientos sin N (P0N0 y P1N0) a 0,15 en los tratamientos fertilizados con N (P0N1 y P1N1) lo que representa una merma del 46,77% en esta relación.

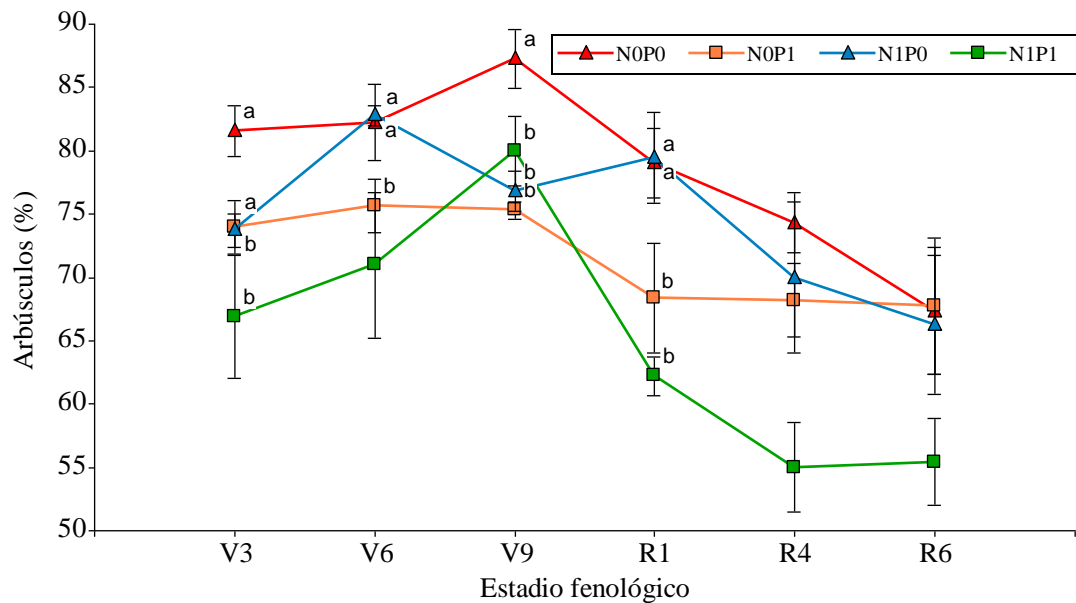


Figura 2.3.3.1. Evolución de la formación de arbusculos en distintos estadios fenológicos del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico (según test en Cuadro 2.3.3.1). $\alpha = 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.

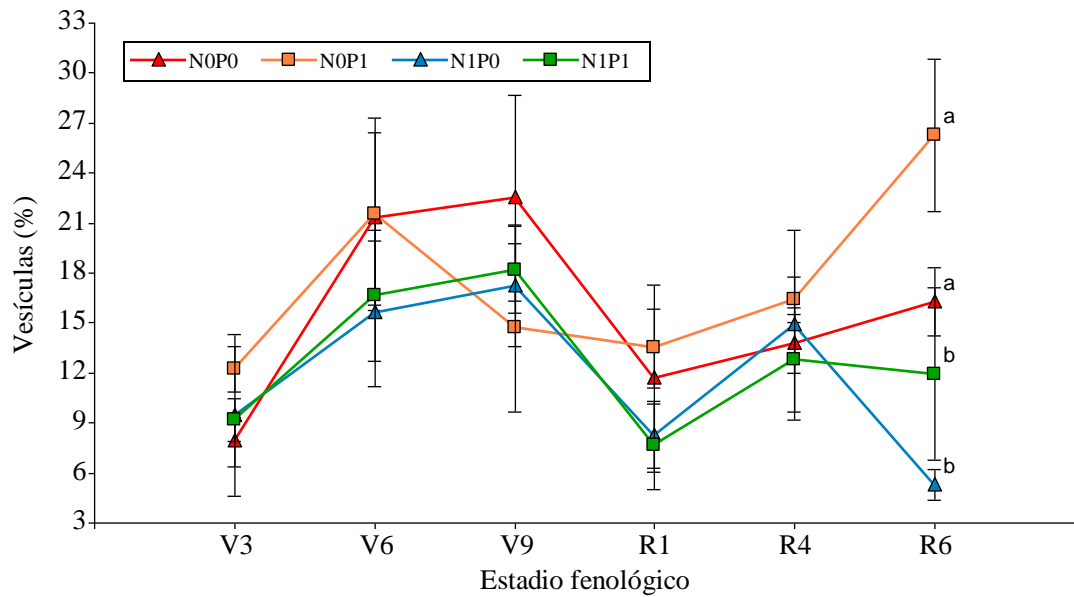


Figura 2.3.3.2. Evolución de la formación de vesículas en distintos estadios fenológicos del cultivo de maíz. P0 sin agregado de P; P1 fertilizado con P; N0 sin agregado de N; N1 fertilizado con N. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada estadio fenológico (según test en Cuadro 2.3.3.1). $\alpha = 0.05$. Estadístico de Prueba LSD de Fisher.

2.4 Discusión

2.4.1 Caracterización de los tratamientos – información edáfica

La aplicación continua de fertilizantes con P y N no incidió en todas las propiedades edáficas evaluadas. No se afectó el pH, la conductividad eléctrica ni en el carbono orgánico del suelo. Esto es consistente con lo encontrado en diversas investigaciones (Divito *et al.*, 2011; Fontana *et al.*, 2021). Las diferencias observadas entre profundidades son las esperables para el perfil edáfico estudiado (INTA, 1972). La aplicación continuada de fertilizantes alteró la disponibilidad de P en los primeros 20 cm de suelo. Los tratamientos sin P se encontraron por debajo del umbral crítico para el cultivo de maíz en la región de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de P en 0 – 20 cm (Sucunza *et al.*, 2018) mientras que los tratamientos que recibieron P se encontraron muy por encima de este valor. La fertilización no generó cambios en el contenido de P total. Estos resultados difieren de los encontrados en la región por Ciampitti y colaboradores (2011) quienes observaron que la fertilización fosfatada aumentó el P total en el suelo, aunque en dicha investigación la dosis de fertilizante fosfatado utilizada fue de 34 kg ha^{-1} mientras que en esta tesis fue de 24 kg P ha^{-1} .

Por otro lado, la fertilización nitrogenada correspondiente al cultivo de maíz fue realizada posteriormente al análisis de suelo. De esta manera, el N-NO_3^- medido en el suelo corresponde al N residual del cultivo antecesor. En este caso particular, el cultivo de maíz fue sembrado sobre un rastrojo de trigo/soja. Puesto que el principal suministro de N para la soja es la fijación biológica de N, ésta no recibió aplicación de fertilizantes nitrogenados. De esta manera, la última aplicación de N fue realizada en el cultivo de trigo antecesor. Los mayores valores de N-NO_3^- encontrados a la siembra del maíz se

observaron en los tratamientos que nunca recibieron P (P0N0 y P0N1). Esto podría explicarse por la menor absorción de N por parte de los cultivos limitados por P (Krouk y Kiba, 2020; Vitousek *et al.*, 2010).

2.4.2 Acumulación de biomasa, rendimiento y absorción de nitrógeno y fósforo

La respuesta de la biomasa aérea a la fertilización con P se evidenció únicamente en los estadios vegetativos. La aplicación de N se realizó cuando el cultivo tenía 7 hojas desplegadas. Los efectos del N se hicieron visibles en la acumulación de biomasa a partir del estadio fenológico R4 (ver Figura 2.3.2.1). Pasaron 45 días desde la aplicación de N hasta el muestreo en R4, con una precipitación acumulada, en ese período, de 350 mm (ver Figura 2.2.7.1). Estas condiciones favorecieron al tratamiento P1N1 en los estadios R4 y R6. La absorción de nutrientes, producto de la acumulación de biomasa y la concentración en los tejidos mostró respuestas diferenciadas. La absorción de P respondió a la aplicación de los tratamientos de P, como cabía esperar. Aunque la deficiencia de N reduce la absorción de P (Pedersen *et al.*, 2019), la aplicación de N sólo aumentó la absorción de P en el estadio R4 (ver Figura 2.3.2.2). Por parte de la absorción de N, los tratamientos de P aumentaron en la absorción de N en prácticamente todo el ciclo del cultivo. La aplicación de N en V7 incrementó la disponibilidad de N en el suelo, lo que a su vez aumentó su absorción y por ese motivo, en todos los muestreos realizados posteriormente a la aplicación de N se mostró respuesta al tratamiento de N (ver Figura 2.3.2.3).

A pesar de que los tratamientos sin P presentaron valores de P disponible inferiores al umbral crítico de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de P en 0 – 20 cm (Sucunza *et al.*, 2018), el cultivo no respondió en términos de rendimiento a la fertilización con P. Cabe mencionar que los umbrales críticos son probabilísticos, es decir, indican mayor o menor probabilidad de encontrar respuesta a la fertilización en función de la disponibilidad de P en 0 – 20 cm medido mediante el método Bray 1. Este resultado inesperado y sobre el cual no tenemos una justificación convincente ya ha sido visto con anterioridad en el experimento de larga duración. Observando la serie histórica del experimento, en la campaña 2016/17 se realizó un cultivo de maíz que tampoco respondió a los tratamientos de P. Una posible explicación a la no respuesta a la fertilización fosfatada es que las fracciones orgánicas lábiles, no contempladas en el análisis de P, estén suministrando el P requerido por el cultivo (Appelhans *et al.*, 2021). Otra posible explicación es que una proporción del P tomado por los cultivos no proviene de lo que representa el método Bray 1, ya que, el cultivo también puede tomar P de otras fracciones inorgánicas lábiles y moderadamente lábiles no representadas en la prueba Bray 1 (Biassoni *et al.*, 2023). Por el lado del N, la respuesta en rendimiento a la fertilización nitrogenada era esperable. Utilizando el método de disponibilidad inicial de N (N-NO_3^- del suelo a 0-60 cm + N del fertilizante) (Ruiz *et al.*, 1997) los tratamientos presentaron los siguientes valores de disponibilidad de N: P0N0 ($61,2 \text{ kg ha}^{-1}$), (P0N1 $66,5 + 100 \text{ kg ha}^{-1}$), P1N0 ($53,7 \text{ kg ha}^{-1}$) y P1N1 ($52,3 + 100 \text{ kg ha}^{-1}$). Considerando los rendimientos alcanzados por el cultivo de maíz en este estudio, donde el tratamiento P1N1 tuvo una media de $1241,7 \text{ g m}^{-2}$, podemos considerar un valor crítico inicial de N de 162 kg ha^{-1} (Salvagiotti *et al.*, 2004) que sólo fue alcanzado por los tratamientos N1.

2.4.3 Micorrización

Se observó una temprana colonización en las raíces del cultivo, mostrando altos niveles de colonización desde el estadio V3. En dicho muestreo, que fue realizado 20 días después de la siembra, se obtuvo una media general de 74,7% de raíces colonizadas con HFMA. Tal nivel de colonización supera los valores observados por otros autores que reportaron un 40% de colonización en maíz, 21 días después de la siembra en un suelo franco limoso en Canadá (McGonigle y Miller, 1996). Adicionalmente, supera ampliamente los resultados encontrados en la localidad de Balcarce donde se registraron valores de 10 a 30% de colonización en el cultivo de maíz bajo siembra directa a los 45 días después de la siembra (Astiz Imaz *et al.*, 2014). No obstante, los resultados, están en línea con otros estudios en maíz que reportaron un 72% de colonización a los 40 días (Cozzolino *et al.*, 2013). Nuestros resultados permiten inferir que el suelo tenía una elevada infectividad micorrícica, que es la habilidad natural de un suelo de inducir la formación de micorrizas en las plantas (Plenchette *et al.*, 1989). El nivel de infectividad micorrícica representa un parámetro de la fertilidad edáfica debido a la multiplicidad de servicios ecosistémicos provistos por las micorrizas arbusculares (Verbruggen *et al.*, 2011). Los sistemas de labranza, fertilización y la rotación de cultivos influyen fuertemente sobre la infectividad (Schalamuk y Cabello, 2009; Wang *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha reportado una fuerte relación negativa entre la infectividad y la disponibilidad de P del suelo (Duvert *et al.*, 1990; Jansa *et al.*, 2009; McGee, 1989). En la localidad de Balcarce, en el cultivo de festuca se registró que la micorrización llega a valores mínimos con 18.3 mg kg⁻¹ de P en 0 – 10 cm de profundidad de suelo, valor a partir del cual la colonización se mantiene en valores mínimos de 6.9% (Covacevich *et al.*, 2006). En la misma localidad, en el cultivo de trigo, la micorrización llega a valores mínimos con 27 mg kg⁻¹ de P en 0 – 20 cm de profundidad de suelo, valor a partir del cual la colonización se mantiene en valores mínimos de 10% (Covacevich *et al.*, 2007). Estos valores se diferencian de los encontrados en el cultivo de maíz estudiado que presentó valores de micorrización superiores al 55% a lo largo del ciclo del cultivo aun cuando el suelo presentaba valores de 24 mg kg⁻¹ de P en 0 – 20 cm. La alta infectividad micorrícica que presenta el suelo estudiado podría explicarse por la rotación de cultivos y el empleo de siembra directa (Schalamuk y Cabello, 2009). Las redes de micelio, los fragmentos de raíces infectadas y las esporas constituyen la reserva de inóculo micorrícico del suelo (Smith y Read, 2008). Por tal motivo la no remoción del suelo preservaría un mayor inóculo micorrícico lo que podría explicar los resultados encontrados (Schalamuk y Cabello, 2009; Wang *et al.*, 2008).

Los menores valores de colonización observados en los tratamientos fertilizados con P coinciden con los datos de la literatura que indican que en suelos bien provistos de P, la planta capta más P de manera directa, que sería una vía más económica que tener que derivar carbono a los HFMA (Duvert *et al.*, 1990; Jansa *et al.*, 2009; McGee, 1989; Zhang *et al.*, 2021). Esto explicaría la menor formación de micorrizas ya que la dependencia del cultivo por parte de la red hifal es menor cuando el P se encuentra fácilmente disponible. A pesar de observarse efectos depresores del P sobre la micorrización, se observó el mantenimiento de una elevada colonización en los tratamientos fertilizados con P (68,39%). Esto podría indicar que el vínculo entre las plantas y los HFMA debería deberse a otro servicio ecosistémico no evaluado en este estudio como podría ser la resistencia a patógenos (Qian *et al.*, 2015) o la tolerancia a sequía (Grümberg *et al.*, 2015) entre otros.

Posiblemente, dada la alta infectividad micorrícica del suelo estudiado, los efectos de la simbiosis se pudieron ver alterados por posibles cambios en las comunidades micorrícicas. A pesar de la reducción en la colonización micorrícica, estos resultados abren el interrogante de cómo puede ser modificada la comunidad de HFMA en suelos agrícolas fertilizados y cómo diferentes comunidades benefician a cultivos de grano (Jansa *et al.*, 2007).

El agregado de N, contrariamente a lo hipotetizado, no aumentó la simbiosis micorrícica arbuscular. Este resultado coincide con lo reportado recientemente por Sun y colaboradores (2023) quienes encontraron una disminución en la colonización micorrícica en el cultivo de maíz, pero con dosis de N muy superior a la empleada en el presente trabajo (360 kg ha^{-1}). Adicionalmente, la fertilización con N disminuyó las estructuras de reserva de los HFMA al final del ciclo del cultivo. Podemos decir que una mayor oferta de C por el agregado de N benefició los HFMA (Covacevich *et al.*, 2018). Lo que no podemos asegurar es que los HFMA hayan pasado del mutualismo al comensalismo e incluso al parasitismo como sugieren Johnson y colaboradores (2015). El aumento de la colonización por déficit de P o de N, refuerza la teoría de que las asociaciones simbióticas entre las raíces de las plantas y los HFMA representan una de las estrategias más importantes para mejorar la nutrición de las plantas (Brady y Weil, 2010; Neumann y Martinoia, 2002). Que el agregado de N tenga menor impacto sobre la colonización micorrícica puede explicarse por la menor contribución de los HFMA en la nutrición nitrogenada de la planta que en la nutrición fosfatada. Se ha encontrado que inocular una planta con HFMA aumenta la colonización, pero no la captura de N proveniente de zonas enriquecidas (Hodge *et al.*, 2000) lo cual indicaría una pobre contribución de los HFMA en la nutrición nitrogenada de las plantas. Esto podría ir en línea con Jumpponen y colaboradores (2005) quienes encontraron que el enriquecimiento con N causa cambios mínimos en la colonización micorrícica, pero cambia la composición de la comunidad de HFMA.

Las raíces del maíz experimentan un aumento en su peso total y crecen en longitud y profundidad a medida que avanza la estación de crecimiento, desde la germinación hasta el estadio R2-R3, donde alcanzan sus valores máximos para estas variables (Mengel y Barber, 1974; Peng *et al.*, 2010). Estos valores se mantienen durante un par de semanas antes de disminuir durante el periodo de rápido crecimiento reproductivo (Mengel y Barber, 1974; Peng *et al.*, 2010). Por consiguiente, la profundidad y el tamaño del sistema radical incrementa hasta el inicio del llenado efectivo de los granos durante el avance de la estación de crecimiento. A partir de este punto, la mayor parte de los asimilados se dirige hacia la espiga, lo que resulta en una baja cantidad destinada a las raíces (Andriani, 2000; Peng *et al.*, 2010). Coincidentemente, observaciones realizadas en Balcarce indican que las raíces del cultivo de maíz alcanzan su máxima profundidad de exploración del suelo (alrededor de 2 m) durante la etapa de floración (Otegui *et al.*, 1995). En esta línea, la simbiosis debería verse afectada en el período reproductivo induciendo al hongo a formar estructuras de resistencia (vesículas), especialmente en los tratamientos no fertilizados con N. La gran disminución en la formación de vesículas en R1 puede deberse a la gran oferta hídrica que tuvo el cultivo en ese estadio (ver Figura 2.2.7.1).

En síntesis, la fertilización a largo plazo demostró crear un ambiente favorable para especies eficientes en la colonización y persistencia, pero menos mutualistas desde el

punto de vista nutricional. En este estudio, con los niveles de fertilización empleados se manifestaron dos escenarios opuestos. Al inicio del ciclo del cultivo no hubo variación en la formación de vesículas, pero la adición de P tuvo un efecto supresor en la formación de arbusculos lo que coincide con lo señalado por Johnson y colaboradores (1997). Al final del ciclo, no hubo diferencias entre los tratamientos en la formación de arbusculos, pero sí en la formación de vesículas. Podemos notar que la adición de N disminuyó la formación de vesículas lo que indicaría que los HFMA partitionaron mayor proporción de C destinado a la formación de arbusculos.

2.5 Conclusiones

Se logró cuantificar la incidencia de la fertilización fosfatada y nitrogenada de largo plazo sobre la formación de micorrizas, destacando a la fertilización fosfatada como la moduladora de la micorrización en el cultivo de maíz. La fertilización fosfatada generó cambios en la disponibilidad de P en 0 - 20 cm de profundidad. La adición de P elevó la disponibilidad del nutriente en el suelo, aumentando el crecimiento vegetal principalmente en los estadios vegetativos del cultivo de maíz. La disponibilidad de P afectó negativamente a la formación de arbusculos. Pero no fue consistente en el ciclo del cultivo. Se acepta parcialmente la hipótesis A. El N fue el mayor determinante del rendimiento. Adicionalmente, la aplicación de N redujo la formación de vesículas sólo al final del ciclo del cultivo. Se acepta parcialmente la hipótesis B. La absorción de P y N estuvo íntimamente vinculada a la fertilización. Se acepta la hipótesis C.

Capítulo 3: Composición de la comunidad de HFMA asociada al cultivo de maíz en respuesta a la fertilización fosfatada y nitrogenada.

3.1 Introducción

La disponibilidad de nutrientes y la relación hongo-planta afectan la composición de la comunidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA): se espera una mayor abundancia y biomasa de HFMA cuando el P es más escaso que el N (Johnson *et al.*, 2013; Lilleskov *et al.*, 2019). En tales circunstancias, las plantas obtienen un beneficio mayor al asignar C a los HFMA para la absorción de P en lugar de destinarlo a la absorción de N, como se haría a través de sistemas radicales más extensos. La forma en que las plantas asignan C puede afectar tanto a la abundancia como a la diversidad de HFMA, lo que sugiere que esta posible dependencia entre la limitación de P y N podría extenderse a la diversidad de estas comunidades. Por ejemplo, si las plantas reducen la asignación de C a los HFMA, la competencia podría llevar a la eliminación de especies raras, con el consiguiente descenso en la diversidad de HFMA (Liu *et al.*, 2015; Knecht *et al.*, 2016). En este escenario, se podría esperar una mayor diversidad de HFMA en estados enriquecidos con N, si dicho enriquecimiento lleva a que el P se convierta en el nutriente más limitante (Albornoz *et al.*, 2023). Por otro lado, si el N es el nutriente más escaso, las plantas podrían optar por asignar el C a la absorción de N en lugar de a los HFMA, lo que posiblemente reduciría su diversidad (Liu *et al.*, 2015). No obstante, aún existen incógnitas en cuanto a los efectos del enriquecimiento y la depleción de N en los ecosistemas limitados por P.

Varios estudios han demostrado que la fertilización tiene un impacto significativo en la composición de las comunidades de HFMA (Bainard *et al.*, 2014; Hijri *et al.*, 2006; Gosling *et al.*, 2013). Además, se registraron efectos negativos de la fertilización en las funciones micorrícicas (Johnson, 1993; Kahiluoto *et al.*, 2009). En ambientes ricos en nutrientes, las plantas tienden a reducir drásticamente la asignación de recursos a las estructuras micorrícicas, lo que afecta la colonización y propagación de las especies de HFMA (Mäder *et al.*, 2000). Esta disminución en la asignación de fotoasimilados aumenta la competencia por los recursos escasos dentro de la raíz. Como resultado, se observa un cambio en el balance competitivo de las especies, favoreciendo a aquellas más agresivas en detrimento de las más mutualistas (Kiers *et al.*, 2002; 2008). Por ejemplo, Bainard y colaboradores (2014) observaron que, frente a un aumento en la disponibilidad de P en el suelo, las especies de *Funneliformis* y *Septoglomus* (dos géneros de la familia Glomeraceae) incrementaban su abundancia dentro de la raíz, mientras que ocurría lo contrario con el resto de las especies de HFMA. Como resultado, la fertilización a largo plazo crea un ambiente más favorable para especies eficientes en la colonización y persistencia, pero menos mutualistas desde el punto de vista nutricional.

También se ha sugerido que los cambios en las comunidades de HFMA pueden reflejar las estrategias de historia de vida tanto del hongo como del hospedero, utilizando el marco de competidores, tolerantes al estrés o ruderales (Grime, 1979, Chagnon *et al.*, 2013). En este contexto, Chagnon y colaboradores (2013) propusieron clasificar a las familias Gigasporaceae, Acaulosporaceae y Glomeraceae como competidores, tolerantes al estrés y ruderales, respectivamente, en función de sus características funcionales. Los HFMA competidores se caracterizan por una producción elevada de hifas fuera de las raíces, una significativa transferencia de P al hospedero y la producción tardía de esporas. Por otro lado, los HFMA tolerantes al estrés presentan una tasa de crecimiento reducida, micelio

de larga vida y resistencia a factores de estrés abiótico. En cambio, los HFMA ruderales se destacan por su rápido crecimiento, la producción temprana de esporas y tasas elevadas de renovación de hifas (Chagnon *et al.*, 2013).

Las comunidades de HFMA con más diversidad presentan mayor resiliencia y capacidad de adaptación a cambios ambientales (Fitter, 2005). En el caso particular de los sistemas productivos pampeanos, donde las condiciones del suelo y prácticas agrícolas han experimentado cambios significativos en las últimas décadas, el impacto sobre las comunidades de HFMA es prácticamente desconocido. En la provincia de Córdoba Faggioli y colaboradores (2019) describieron a las comunidades de HFMA asociadas al cultivo de soja en campos con historias de uso contrastantes. Adicionalmente, al sur de la provincia de Buenos Aires, Fernandez-Gnecco y colaboradores (2021) estudiaron las comunidades microbianas asociadas al cultivo de soja y maíz con distinta intensificación productiva. La microbiota rizosférica es el entorno más dinámico de la interacción planta-suelo-microorganismos, donde los microorganismos, las raíces de las plantas y los constituyentes del suelo interactúan (Hill *et al.*, 2000; Bandyopadhyay *et al.*, 2017). Para abordar esta brecha de conocimiento, las tecnologías de secuenciación de última generación, como la secuenciación de alto rendimiento, ofrecen la posibilidad de caracterizar las comunidades microbianas con alta resolución y repetibilidad. Según Hart y colaboradores (2015), estas tecnologías son en un recurso fundamental para entender las comunidades de HFMA. En este sentido, existen bancos de taxonomía molecular de Glomeromycota que facilitan la comparación de resultados con otros estudios (Kohout *et al.*, 2014). Por ejemplo, la secuenciación de la porción 18S rDNA se ha llevado a cabo en numerosas muestras de suelo, raíces y esporas, y se ha almacenado en la base de datos MaarjaAM (Õpik *et al.*, 2010; 2013), una base de datos de acceso abierto reconocida mundialmente por especialistas en el tema. En esta base de datos, las secuencias con más del 97% de similitud se agrupan para formar un "taxón virtual" o "taxa" (VTX), identificados con un número que los asocia a una especie o familia de HFMA. Por ejemplo, el VTX00039 corresponde a un taxa que contiene secuencias de la familia Gigasporaceae. Teniendo en cuenta la importancia del mantenimiento de la diversidad HFMA para la resiliencia de la agricultura y la sensibilidad de estos hongos a las prácticas agronómicas, las técnicas de secuenciación masiva representan una herramienta clave para generar información de vital importancia al momento de diseñar prácticas de manejo tendientes a optimizar los potenciales beneficios brindados por los HFMA.

3.1.1 Objetivo

Estudiar el impacto de la fertilización fosfatada y nitrogenada de largo plazo sobre la composición de las comunidades autóctonas de hongos formadores de micorrizas arbusculares en suelo rizosférico.

3.1.2 Hipótesis

A) La fertilización altera la composición de las comunidades de HFMA en suelo rizosférico.

B) La comunidad de HFMA estará mayormente compuesta por miembros de la familia Glomeraceae.

C) La fertilización conjunta con P y N favorece el aumento de la abundancia de Gigasporaceae, con respecto al resto de las situaciones de fertilización evaluadas.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1. Muestreo de suelo rizosférico

Durante la extracción de muestras detallada en el Capítulo 2 se realizaron dos muestreos de suelo rizosférico. Los muestreos se realizaron en las etapas de desarrollo vegetativo (en el estadio fenológico V6: seis hojas completamente expandidas) y reproductivo (en el estadio fenológico R1: inicio de la floración) del cultivo de maíz (Ritchie y Hanway, 1982). Seis plantas pertenecientes a un metro lineal por unidad experimental fueron seleccionadas aleatoriamente en cada momento de muestreo. Se recogieron cuidadosamente plantas enteras usando una pala para recuperar raíces intactas de 0-15 cm de profundidad. Durante el muestreo, la biomasa aérea y las raíces se separaron y procesaron. Las muestras de biomasa aérea se utilizaron para determinar la acumulación de materia seca y absorción de P y N (ver Capítulo 2). Las raíces se utilizaron para dos destinos distintos: a) cuantificación de la micorrización (ver Capítulo 2) y b) la obtención de suelo rizosférico para posterior extracción de ADN. Para este último punto, las raíces se manipularon cuidadosamente evitando la contaminación entre tratamientos.

3.2.2. Recolección de suelo de rizosfera y extracción de ADN

Las raíces se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas se recolectó la porción de tierra adherida a las raíces usando pinceles estériles. El cepillado se usó para desalojar suavemente las partículas de suelo de la superficie de la raíz y el material recolectado se transfirió a un tubo Eppendorf estéril. Todas las muestras de suelo rizosférico se almacenaron en freezer a -30°C hasta la extracción de ADN. El ADN genómico se extrajo utilizando DNeasy® PowerSoil® Pro-Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la espectrofotometría se realizó con los kits NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific™) y Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific™) siguiendo los protocolos indicados por el fabricante. El ADN extraído se mantuvo a -20°C hasta su posterior análisis de secuenciación.

3.2.3. Secuenciación

La evaluación de Glomeromycota en el ADN de muestras de suelo de la rizosfera se realizó mediante PCR y secuenciación Miseq Illumina de la región SSU. Se realizó PCR semi-anidada para aumentar el rendimiento del amplicón HFMA objetivo. La primera reacción de PCR se llevó a cabo con los cebadores específicos de HFMA AML1 y AML2 que produjeron un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen 18S rRNA (Lee *et al.*,

2008). La reacción de PCR semi-anidada se llevó a cabo con los cebadores NS31 (Simon *et al.*, 1992) y AML2, lo que produjo un amplicón de 550 pb. La preparación y secuenciación de la biblioteca se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Unidad de Genómica, Castelar, Buenos Aires, Argentina. Las lecturas sin procesar están disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) con el número de proyecto [PRJEB53717](#).

3.2.4. Análisis Bioinformático

La exploración preliminar de datos sin procesar se realizó con FastQC 0.12.0 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Debido a que la calidad promedio de las lecturas del secuenciador de R2 (reverse read) fue ≤ 25 , en este estudio sólo se usaron lecturas de R1 (forward read). Las lecturas se truncaron a 180 bases y las secuencias con un error esperado > 1 se descartaron mediante USEARCH v.11 (Edgar, 2010). Las lecturas restantes se colapsaron en tipos de secuencia únicos por muestra, conservando los recuentos de lectura y excluyendo singletons. Estas secuencias sirvieron como entrada para el agrupamiento en OTU (Operational Taxonomic Unit) con una similitud de secuencia del 97% siguiendo a Öpik y colaboradores (2010), usando USEARCH, mientras eliminaba simultáneamente secuencias supuestamente quiméricas. Las secuencias representativas se sometieron a una búsqueda de similitud en la base de datos MaarjAM (estado de septiembre de 2021, Öpik *et al.*, 2010) y se asignaron a taxones virtuales (VTX) utilizando USEARCH v.11 (Edgar, 2010). Las OTUs que no tenían al menos un 90 % de similitud en un mínimo de 150 bases con ninguna secuencia de Glomeromycota en la base de datos de MaarjAM se excluyeron del análisis adicional.

3.2.5. Diversidad alfa

La diversidad alfa es un término utilizado en ecología para describir la diversidad de especies dentro de una comunidad o un hábitat específico. Representa la riqueza de especies y la abundancia relativa de esas especies en un área delimitada. Básicamente, la diversidad alfa se refiere a la variedad de especies en un ecosistema particular. Los componentes clave de la diversidad alfa son: a) riqueza de especies: el número total de diferentes especies presentes en la comunidad. b) equitatividad o uniformidad: la distribución relativa de individuos entre las diferentes especies. Una comunidad donde todas las especies tienen un número similar de individuos tiene alta equitatividad. La diversidad alfa se puede medir mediante índices de diversidad. Los índices de diversidad son métodos que combinan riqueza y equitatividad, como el índice de Shannon y el índice de Simpson, entre otros (Magurran y McGill, 2011).

El índice de Shannon, también conocido como índice de diversidad de Shannon-Weaver, es una medida comúnmente utilizada en ecología para cuantificar la diversidad de especies en una comunidad. Este índice tiene en cuenta tanto la riqueza de especies (el número de especies presentes) como la equitatividad (la distribución de los individuos entre las especies). El índice de Shannon (H') se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \cdot \ln p_i)$$

donde:

S es el número total de especies (riqueza de especies).

p_i es la proporción de individuos de la especie i en la comunidad total.

\ln es el logaritmo natural.

Valores bajos del índice indican menor diversidad, lo que puede significar una comunidad dominada por una o pocas especies. Contrariamente, valores más altos del índice indican mayor diversidad, sugiriendo una comunidad con una distribución más equitativa de individuos entre las especies.

El índice de Simpson es otra medida comúnmente utilizada en ecología para cuantificar la biodiversidad en una comunidad. A diferencia del índice de Shannon, que pone un énfasis más igual en la riqueza y la equitatividad de especies, el índice de Simpson da más peso a las especies dominantes en una comunidad. El índice de Simpson (D) puede expresarse:

$$D = \sum_{i=1}^S p_i^2$$

donde:

S es el número total de especies (riqueza de especies).

p_i es la proporción de individuos de la especie i en la comunidad total, calculada como $p_i = n_i/N$.

n_i es el número de individuos de la especie i .

N es el número total de individuos de todas las especies.

El valor de D varía entre 0 y 1. Un valor de 0 indica infinita diversidad (hipotético, ya que no ocurre en la realidad). Un valor de 1 indica que la comunidad está dominada por una sola especie.

Tanto el índice de Shannon como el índice de Simpson fueron utilizados para evaluar la diversidad alfa de las comunidades de HFMA en suelo rizosférico.

3.2.6. Análisis estadístico

Para la estimación de los índices de diversidad, se realizó la rarefacción por un número mínimo de lecturas con la función 'rarefy' del paquete *vegan* de R (Oksanen *et al.*, 2015). Los índices de diversidad, la abundancia relativa de lecturas y el número de VTX por familia se analizaron utilizando modelos lineales generalizados utilizando una distribución de Poisson. Cuando el valor-p de la prueba fue $<0,05$, las medias se compararon mediante la prueba HSD Tukey después de la corrección de Bonferroni. Los estimadores asintóticos (riqueza y abundancia relativa) de cada familia micorrícica censada entre los tratamientos diferenciales de fertilización en el cultivo de maíz, tanto para su etapa vegetativa como reproductiva, se compararon mediante Modelos Lineales

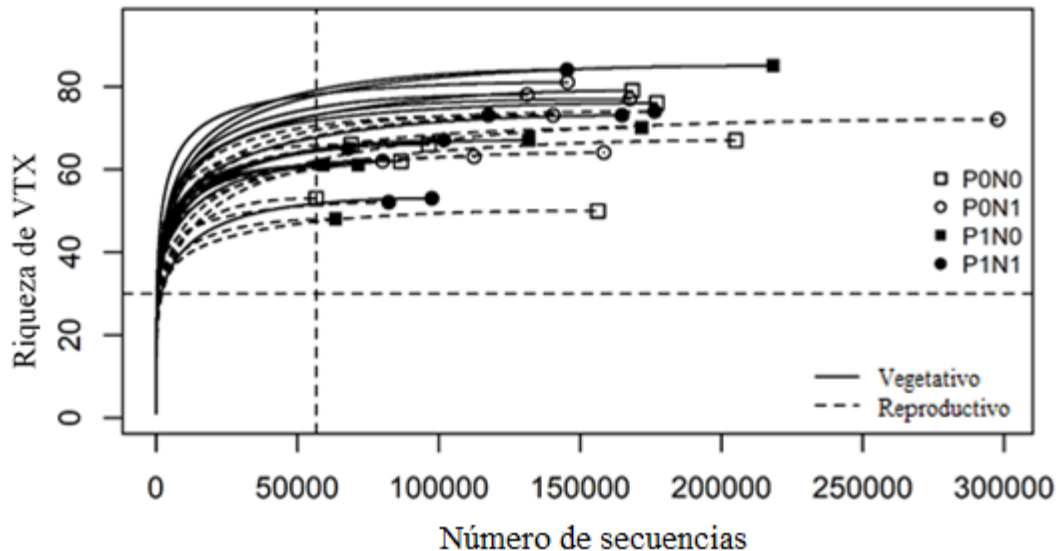
Generalizados Mixtos (GLMMs) (Zuur *et al.*, 2013). Como variables de respuesta se utilizaron los estimadores asintóticos de las diferentes familias de micorrizas reportadas, y los tratamientos fueron la variable categórica (factor fijo). Se utilizó la categoría "Bloque" como variable aleatoria. La distribución de errores que mejor se ajustó a nuestros datos fue la de Poisson (link=log). Para seleccionar la mejor estructura para los GLMM, utilizamos el criterio de información de Akaike (AIC) para seleccionar el modelo que mejor representaba nuestra variabilidad, eligiendo el modelo no nulo con el valor de AIC más bajo (Bates *et al.*, 2014; Bates, 2015). Usamos la función `anova` del paquete "stats" para comparar modelos. Verificamos los supuestos de los modelos informados utilizando el paquete de "performance" versión 0.10.2 (Lüdecke *et al.*, 2021). Todos los cálculos se realizaron con el software estadístico R versión 4.1.3 (RStudio Team, 2022). Usamos las funciones `glm`, `glmer` y `glmer.nb` del paquete "lme4" versión 1.1-27.1 para determinar la importancia de los modelos. Para la comparación de diferentes categorías correspondientes a un factor fijo, utilizamos la función `LSD.test` del paquete "agricolae" versión 1.3-5. Para los gráficos se utilizó la función `ggpredict` del paquete "ggeffects" versión 1.1.1 (Lüdecke, 2018) y las herramientas gráficas del paquete "ggplot2" versión 3.3.5. Para evaluar el impacto de las prácticas de fertilización en la composición de las comunidades de HFMA, se evaluó el análisis de varianza permutacional múltiple (perMANOVA) usando la función 'adonis', y luego se graficó con una escala dimensional no métrica bidimensional ($k = 2$) (NMDS) usando la función 'metaMDS' del paquete *vegan* de R (Oksanen *et al.*, 2015). La correlación lineal entre la ordenación y los rasgos de la planta se evaluó utilizando la función 'envfit' del paquete *vegan* después del análisis NMDS. Los vectores significativamente relacionados con la composición de la comunidad ($p < 0,05$) se trazaron en la figura NMDS. Los VTX significativos asociados a los tratamientos de fertilización se estimaron mediante el análisis LEfSe basado en la prueba de kruskal-wallis y LDA utilizando la función 'ldamarker' del paquete microbiano de R (<https://github.com/guokai8/microbial>). Luego, para generar las cifras con los marcadores VTX significativos, utilizamos la función 'plotLDA' del paquete microbiano (<https://github.com/guokai8/microbial>).

3.3 Resultados

3.3.1. Secuenciación

Se secuenció con éxito el ADN genómico de HFMA de 32 muestras de suelo rizosférico de plantas de maíz, sometidas a tratamientos contrastantes de fertilización a largo plazo con P y N. Después del procesamiento de las secuencias, un total de 3.940.868 lecturas llevaban un código de barras correcto (la secuencia del cebador correcto) y 3.859.452 coincidieron (similitud $\geq 97\%$) con un taxón virtual de la base de datos MaarjAM (Öpik *et al.*, 2010). El análisis de rarefacción reveló que este esfuerzo de secuenciación fue suficiente para detectar valores representativos de riqueza de HFMA en las muestras estudiadas, según lo mostrado por las curvas de rarefacción asintóticas (Figura 3.3.1.1). Que la curva llegue a la asíntota implica que las diferencias en el número de secuencias encontradas en los distintos tratamientos no alteran la riqueza de los VTX encontrados. Esto permite que los resultados obtenidos sean comparables. La línea punteada que corta al eje "x" indica el número mínimo de secuencias necesarias para alcanzar un determinado

número de especies observadas. Es decir, muestra el esfuerzo de muestreo requerido para encontrar una cantidad específica de especies. La línea punteada que corta al eje “y” representa el número estimado de VTX que se esperaría encontrar en una muestra cuando el tamaño de la muestra es mínimo. Básicamente, esta intersección proporciona una estimación inicial de la diversidad presente en la comunidad a partir de la muestra más



pequeña posible. Este punto en el eje Y es crucial porque indica la riqueza de especies estimada a partir de la menor cantidad de esfuerzo de muestreo. A medida que se incrementa el tamaño de la muestra (movimiento hacia la derecha en el eje X), se espera que el número de especies observadas también aumente, alcanzando eventualmente una asíntota que refleja el número total de especies presentes en la comunidad estudiada.

Figura 3.3.1.1. Análisis de rarefacción de secuencias. La línea de puntos perpendicular al eje “x” (Número de secuencias) indica el número mínimo de secuencias necesarias para alcanzar un determinado número de especies observadas. La línea de puntos perpendicular al eje “y” (Riqueza de VTX) representa el número estimado de VTX que se esperaría encontrar en una muestra cuando el tamaño de la muestra es mínimo. P0N0 testigo; P0N1 fertilizado con N; P1N0 fertilizado con P; P1N1 fertilizado con P y N. Vegetativo: estadio fenológico V6. Reproductivo: estadio fenológico R1.

3.3.2. Diversidad alfa

En la etapa vegetativa, los índices de diversidad no difirieron entre los tratamientos (Cuadro 3.3.2.1). Los valores de riqueza observada variaron entre 68,5 y 74,5 VTX por muestra, 2,2 y 2,4 para el índice de Shannon, y 0,8 y 0,9 para el índice de Simpson (Cuadro 3.3.1). En contraste, en la etapa reproductiva, los tratamientos N1 mostraron valores más altos de riqueza observada e índice de Shannon que N0, independientemente del nivel de P. La riqueza observada varió entre 66 y 68 VTX por muestra en los tratamientos N1, y entre 50 y 59 VTX por muestra en los tratamientos N0, mientras que el índice de Shannon alcanzó 2,7 en N1 y de 2,4 a 2,5 en los tratamientos N0 (Cuadro 3.3.2.1).

Cuadro 3.3.2.1. Índices de diversidad alfa de HFMA en el estadio vegetativo y reproductivo del cultivo de maíz.

Tratamiento	Vegetativo (V6)			Reproductivo (R1)		
	Observado	Shannon	Simpson	Observado	Shannon	Simpson
P0N0	70,7±4,03	2,4±0,07	0,9±0,02	59±4,38 b	2,4±0,22 b	0,9±0,04
P0N1	74,5±4,25	2,3±0,21	0,8±0,06	68±2,61 a	2,7±0,08 a	0,9±0,02
P1N0	68,5±5,68	2,3±0,10	0,8±0,02	50±7,60 b	2,5±0,11 b	0,9±0,01
P1N1	69,2±6,46	2,2±0,15	0,8±0,04	66±5,08 a	2,7±0,06 a	0,9±0,01
ANOVA valor-p						
P	0,4894	0,3234	0,5634	0,2540	0,7726	0,5376
N	0,6756	0,4022	0,1384	0,0205	0,0434	0,1383
P*N	0,7797	0,9210	0,9816	0,4638	0,9275	0,9724

Nota: media ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de las columnas mediante análisis post hoc de Tukey después de la prueba ANOVA. P0N0 testigo; P0N1 fertilizado con N; P1N0 fertilizado con P; P1N1 fertilizado con P y N. Vegetativo: estadio fenológico V6. Reproductivo: estadio fenológico R1.

3.3.3. Composición de la comunidad

En general, en este estudio detectamos 3 clases, 10 familias, 12 géneros y 146 VTX de Glomeromycota. Los Glomeromycetes, Paraglomeromycetes y Archaeosporomycetes representaron el 76,9%, 13,6% y 7,5% de la abundancia relativa, respectivamente, mientras que el 2% de las lecturas no coincidieron con la base de datos MaarjAM. Las familias detectadas fueron Glomeraceae (68,1% de abundancia relativa), Paraglomeraceae (13,6%), Claroideoglomeraceae (4,4%), Ambisporaceae (3,3%), Geosiphonaceae (2,9%), Diversisporaceae (1,8%), Gigasporaceae (1,8%), Achaesporaceae (1,3%), Acaulosporaceae (0,8%) y Pacisporaceae (0,01%) (Figura 3.3.3.1).

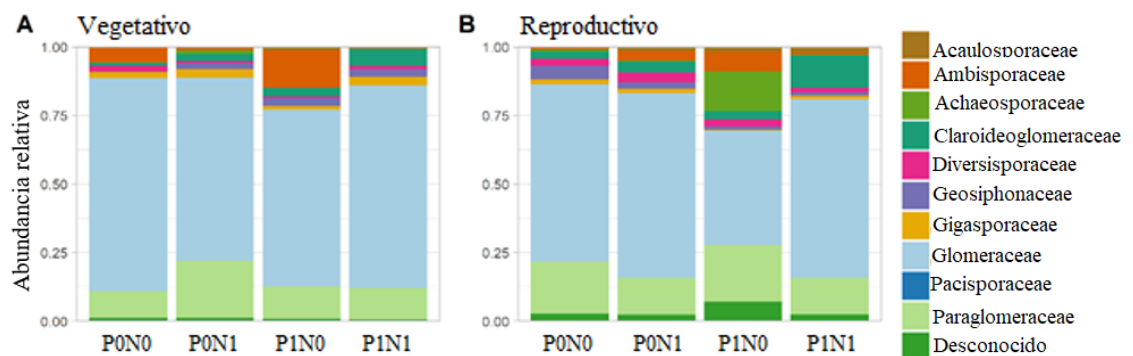


Figura 3.3.3.1. Abundancia relativa de familias de HFMA asociadas al cultivo de maíz. A: estadio fenológico V6. B, estadio fenológico R1. P0N0 testigo; P0N1 fertilizado con N; P1N0 fertilizado con P; P1N1 fertilizado con P y N.

Los análisis de perMANOVA (análisis multivariado permutado de la varianza) y NMSD (Non-Metric Multidimensional Scaling o Escalamiento Multidimensional No Métrico, en español) revelaron diferencias estadísticamente significativas entre la composición de comunidades en los tratamientos de P (P0 vs P1) con un valor p de 0,047 y 0,039 en los

estadios fenológicos V6 y R1, respectivamente (Cuadro 3.3.3.1). Las comunidades de HFMA de los tratamientos P0N0 y P0N1 se ubicaron juntos mientras que los tratamientos P1N0 y P1N1 se agruparon entre sí separándose de los tratamientos que no recibieron P. Este patrón pudo notarse tanto en el estadio vegetativo como en el estadio reproductivo del cultivo (Figura 3.3.3.2).

Cuadro 3.3.3.1. Análisis de comparación de la composición de comunidades de HFMA (perMANOVA). En negrita valores p significativos, α : 0,05. Análisis basado en la matriz de abundancia relativa.

Modelo	Vegetativo (V6)					Reproductivo (R1)				
	g.l.	SC	R ²	F	Valor P	g.l.	SC	R ²	F	Valor P
P	1	0,250	0,107	17,656	0,047	1	0,345	0,107	17,112	0,039
N	1	0,174	0,074	12,295	0,247	1	0,209	0,065	10,378	0,428
P*N	1	0,213	0,091	15,024	0,107	1	0,230	0,071	11,425	0,308
Residual	12	170	0,727			12	24	0,755		
Total	15	234	100			15	32	100		

Nota: Vegetativo: estadio fenológico V6. Reproductivo: estadio fenológico R1.

El efecto de la fertilización con P y N sobre el número de OTUs pertenecientes a cada familia se observa en los Cuadros 3.3.3.2 y 3.3.3.3, respectivamente. El agregado de P (P1) disminuyó el número de OTUs en la familia Glomeraceae de 154,9 a 122,7 (un 26,2% menos) en el estadio vegetativo y de 146,2 a 115,2 (un 26,9% menos) en el estadio reproductivo (Cuadro 3.3.3.2).

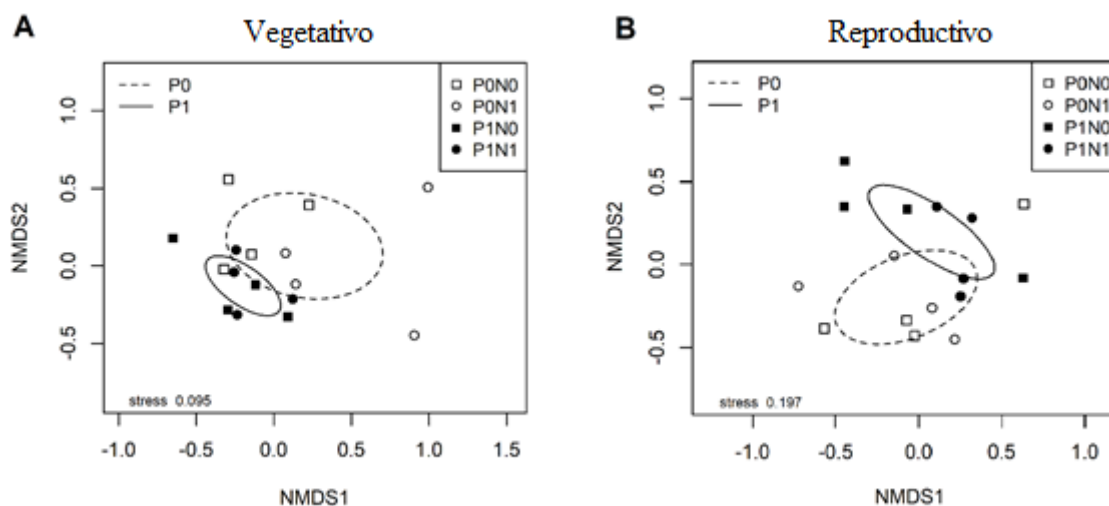


Figura 3.3.3.2. Composición de la comunidad de HFMA (NMDS) presentes en la rizosfera del cultivo de maíz. (A) muestras tomadas en estadio fenológico V6 (stress=0,095), y (B) muestras tomadas en estadio fenológico R1 (stress=0,13). Los análisis están basados en disimilitud de Bray-Curtis. Las elipses (P0 y P1) indican una unidad de desviación estándar alrededor del centroide de cada grupo. P0N0 testigo; P0N1 fertilizado con N; P1N0 fertilizado con P; P1N1 fertilizado con P y N.

Cuadro 3.3.3.2. Efecto de la fertilización a largo plazo con P (comparaciones P0 vs P1) en el número de OTUs (media \pm error estándar) pertenecientes a familias de HFMA en la rizosfera de plantas de maíz en etapas vegetativas y reproductivas.

Familia	Vegetativo (V6)			
	P0	P1	F ^(*)	P ^(*)
Acaulosporaceae	7,4 \pm 0,96	5,4 \pm 0,82		<i>ns</i>
Ambisporaceae	10,7 \pm 1,29	11,6 \pm 1,35		<i>ns</i>
Achaesporaceae	3,2 \pm 0,65	3,7 \pm 0,76		<i>ns</i>
Claroideoglomeraceae	9,5 \pm 1,09	9,1 \pm 1,07		<i>ns</i>
Diversisporaceae	11,9 \pm 1,22	9,9 \pm 1,11		<i>ns</i>
Geosiphonaceae	6,2 \pm 1,21	7,3 \pm 1,36		<i>ns</i>
Gigasporaceae	12,6 \pm 1,38	10,3 \pm 1,23		<i>ns</i>
Glomeraceae	154,9 \pm 8,44 a	122,7 \pm 6,92 b	29,95	0,0001
Paraglomeraceae	33,8 \pm 3,64	33,9 \pm 3,64		<i>ns</i>
Familia	Reproductivo (R1)			
	P0	P1	F ^(*)	P ^(*)
Acaulosporaceae	4,1 \pm 0,72	5,0 \pm 0,79		<i>ns</i>
Ambisporaceae	7,6 \pm 1,00	7,5 \pm 0,99		<i>ns</i>
Achaesporaceae	2,0 \pm 0,50	2,9 \pm 0,64		<i>ns</i>
Claroideoglomeraceae	8,0 \pm 1,00	8,9 \pm 1,05		<i>ns</i>
Diversisporaceae	6,3 \pm 0,88	6,8 \pm 0,92		<i>ns</i>
Geosiphonaceae	3,7 \pm 0,72	3,9 \pm 0,75		<i>ns</i>
Gigasporaceae	8,8 \pm 1,73	9,2 \pm 1,84		<i>ns</i>
Glomeraceae	146,2 \pm 14,27 a	115,2 \pm 11,37 b	29,95	0,0001
Paraglomeraceae	26,5 \pm 1,82	29,0 \pm 1,90		<i>ns</i>

(*) Valores F y P del test de Wald, letras diferentes indican diferencias significativas entre la fertilización P0 y P1 para las etapas de desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas por separado. Para los modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs), se utilizó una distribución de error Poisson (enlace=logaritmo).

El agregado de N (N1) tuvo un mayor efecto sobre el número de OTUs pertenecientes a cada familia estudiada si lo comparamos con el P, especialmente en el estadio reproductivo del cultivo (Cuadro 3.3.3.3). En el estadio vegetativo el agregado de N afectó positivamente al número de OTUs en la familia Archaeosporaceae llevando este valor de 2,4 en N0 a 4,7 en N1, es decir, un aumento del 95,8% (Cuadro 3.3.3.3). En el estadio fenológico R1 del cultivo de maíz se registró un aumento del número de OTUs en 8 de 9 familias, siendo la familia Diversisporaceae la única que no respondió al agregado de N. Con un aumento promedio de 90,4% en el número de OTUs en las 8 familias afectadas por el N, la familia Glomeraceae presentó el aumento más modesto de 26,4%, mientras la familia Ambisporaceae fue la más afectada por el N, con un aumento de 150% sobre el número de OTUs (Cuadro 3.3.3.3). La familia Pacisporaceae se observó solamente en las muestras de los tratamientos P0N0 y P0N1 tomadas en el estadio reproductivo, lo que imposibilitó analizar la familia Pacisporaceae estadísticamente.

Cuadro 3.3.3.3. Efecto de la fertilización a largo plazo con N (es decir, N0 y N1) en el número de OTUs (media \pm error estándar) pertenecientes a familias de HFMA en la rizosfera de plantas de maíz en etapas vegetativas y reproductivas.

Familia	Vegetativo (V6)			
	N0	N1	<i>F</i> (*)	<i>P</i> (*)
Acaulosporaceae	6,0 \pm 0,87	6,8 \pm 0,92		<i>ns</i>
Ambisporaceae	10,6 \pm 1,28	11,7 \pm 1,36		<i>ns</i>
Achaesporaceae	2,4 \pm 0,54 b	4,7 \pm 0,82 a	5,67	0,033
Claroideoglomeraceae	8,9 \pm 1,05	9,7 \pm 1,10		<i>ns</i>
Diversisporaceae	11,0 \pm 1,17	10,7 \pm 1,16		<i>ns</i>
Geosiphonaceae	6,0 \pm 1,19	7,37 \pm 1,38		<i>ns</i>
Gigasporaceae	10,6 \pm 1,24	12,3 \pm 1,33		<i>ns</i>
Glomeraceae	140,0 \pm 7,73	137,7 \pm 7,62		<i>ns</i>
Paraglomeraceae	34,5 \pm 3,69	33,4 \pm 3,59		<i>ns</i>

Familia	Reproductivo (R1)			
	N0	N1	<i>F</i> (*)	<i>P</i> (*)
Acaulosporaceae	2,6 \pm 0,57 b	6,5 \pm 0,90 a	12,3	0,003
Ambisporaceae	4,6 \pm 0,77 b	10,5 \pm 1,19 a	17,27	0,001
Achaesporaceae	1,4 \pm 0,45 b	3,3 \pm 0,64 a	4,88	0,045
Claroideoglomeraceae	6,1 \pm 0,88 b	10,7 \pm 1,16 a	9,88	0,007
Diversisporaceae	6,0 \pm 0,87	7,0 \pm 0,94		<i>ns</i>
Geosiphonaceae	2,7 \pm 0,61 b	4,9 \pm 0,85 a	5,08	0,04
Gigasporaceae	6,9 \pm 1,40 b	10,7 \pm 1,88 a	5,55	0,034
Glomeraceae	115,4 \pm 11,39 b	145,9 \pm 14,25 a	29,01	0,001
Paraglomeraceae	20,9 \pm 1,62 b	34,6 \pm 2,08 a	26,68	0,001

(*) Valores F y P del test de Wald, letras diferentes indican diferencias significativas entre la fertilización N0 y N1 para las etapas de desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas por separado. Para los modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs)GLMMs, se utilizó una distribución de error Poisson (enlace=logaritmo).

Se evaluó el efecto simple de cada tratamiento (P0N0, P1N0, P0N1 y P1N1) sobre la abundancia relativa de cada familia (Cuadro 3.3.3.4) y sobre el número de OTUs dentro de cada familia perteneciente a Glomeromycota (Cuadro 3.3.3.5) en diferentes estadios del cultivo. La abundancia relativa de Acaulosporaceae, Ambisporaceae, Claroideoglomeraceae, Diversisporaceae, Geosiphonaceae y Paraglomeraceae mostraron respuesta a los tratamientos en el período vegetativo del cultivo (Cuadro 3.3.3.4). Acaulosporaceae, Claroideoglomeraceae y Geosiphonaceae manifestaron la menor abundancia en el testigo (P0N0), lo que indica que el uso de fertilizantes aumentó la abundancia relativa de las familias. Ambisporaceae tuvo una reducción de su abundancia con el agregado de N (tratamientos P0N1 y P1N1). Diversisporaceae presentó su mayor abundancia relativa en el testigo, exponiendo que el agregado de fertilizantes tendió a disminuir su abundancia relativa. Paraglomeraceae tuvo un aumento de su abundancia relativa con el agregado de N, pero solamente cuando no se agregó P (tratamiento P0N1) (Cuadro 3.3.3.4). Pasando al estadio reproductivo del cultivo, Acaulosporaceae,

Ambisporaceae, Claroideoglomeraceae y Glomeraceae manifestaron respuesta a los tratamientos. Acaulosporaceae y Claroideoglomeraceae presentaron su mayor abundancia relativa en ambientes de alta fertilidad (tratamiento P1N1). Ambisporaceae aumentó su abundancia relativa con el agregado de P y N por separado (tratamientos P1N0 y P0N1). Glomeraceae se vio afectada negativamente con el agregado de P en escenarios de baja oferta de N (tratamiento P1N0) (Cuadro 3.3.3.4).

Cuadro 3.3.3.4. Abundancia relativa de cada familia dentro de cada tratamiento. Se informan los estimadores asintóticos promedios (EE) de cada familia de micorrizas (OTUs observados) evaluados. También se incluyen las estadísticas del test de Wald (Valor P) para las comparaciones. Para los GLMMs, se utilizó una distribución de error Gamma (enlace=logaritmo). Tratamientos: P0N0 testigo; P1N0 fertilizado con P; P0N1 fertilizado con N; P1N1 fertilizado con P y N.

Familia	Tratamiento				ValorP
	P0N0	P1N0	P0N1	P1N1	
Vegetativo (V6)					
Acaulosporaceae	0,0042±0,0013 b	0,01± 0,004 a	0,01±0,0016 ab	0,01±0,0016 ab	0,0432
Ambisporaceae	0,05±0,04 a	0,14±0,09 a	0,01±0,0045 b	0,0021±0,0014 b	0,0033
Achaesporaceae					NC
Claroideoglomeraceae	0,01±0,0031 b	0,03±0,01 a	0,02±0,01 a	0,05±0,01 a	0,0037
Diversisporaceae	0,02±0,01 a	0,01± 0,0026 b	0,01±0,0029 ab	0,01±0,01 ab	0,0491
Geosiphonaceae	0,0013±0,0053 b	0,03±0,01 a	0,02±0,01 a	0,03±0,01 a	0,0005
Gigasporaceae	0,02±0,01	0,01±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	<i>ns</i>
Glomeraceae	0,77±0,05	0,65±0,04	0,66±0,04	0,74±0,05	<i>ns</i>
Paraglomeraceae	0,09±0,02 b	0,12±0,02 b	0,20±0,03 a	0,11±0,02 b	0,0487
Desconocido	0,01±0,0047	0,01±0,0036	0,01±0,0045	0,0045±0,0019	<i>ns</i>
Reproductivo (R1)					
Acaulosporaceae	0,0014±0,0012 b	0,01±0,01 ab	0,01±0,0047 ab	0,02±0,02 a	0,0416
Ambisporaceae	0,01±0,0043 b	0,07±0,04 a	0,03±0,02 ab	0,01±0,0044 b	0,0451
Achaesporaceae					NC
Claroideoglomeraceae	0,02±0,01 b	0,03±0,01 b	0,04±0,01 ab	0,11±0,04 a	0,0455
Diversisporaceae	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,02	0,02±0,01	<i>ns</i>
Geosiphonaceae	0,05±0,03	0,01±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	<i>ns</i>
Gigasporaceae					NC
Glomeraceae	0,64±0,06 a	0,41±0,04 b	0,67±0,07 a	0,66±0,06 a	0,0031
Paraglomeraceae	0,14±0,06	0,18±0,07	0,12±0,05	0,11±0,04	<i>ns</i>
Desconocido	0,02±0,01 b	0,04±0,03 a	0,01±0,01 b	0,02±0,01 b	0,0411

Referencias: NC = No Convergencia; *ns* = no significativo. Promedios con letras diferentes presentan diferencias significativas dentro de cada familia ($p < 0.05$).

Múltiples familias presentaron variaciones en su composición, es decir, el número de OTUs que conforman cada familia en respuesta a los tratamientos evaluados (Cuadro 3.3.3.5). En el estadio vegetativo del cultivo, dos familias variaron su composición en respuesta a los tratamientos. La familia Archaeosporaceae presentó sus mayores valores en los tratamientos con N (P0N1 y P1N1). Por su parte, la familia Glomeraceae presentó

sus valores más bajos con el agregado de P (P1N0 y P1N1) (Cuadro 3.3.3.5). En el período reproductivo se registró un mayor efecto de los tratamientos sobre las familias de HFMA. Acaulosporaceae, Ambisporaceae, Claroideoglomeraceae y Paraglomeraceae aumentaron el número de OTUs con la fertilización con N (P0N1 y P1N1). Por su parte, Glomeraceae mostró una reducción en su número de OTUs con el agregado de P (P1N0) y un aumento con el agregado de N (P0N1) (Cuadro 3.3.3.5).

Cuadro 3.3.3.5. Número de especies por familia. Se informan los estimadores asintóticos promedios (EE) de cada familia de micorrizas (OTUs observados) evaluados. También se incluyen las estadísticas del test de Wald (Valor P) para las comparaciones. Para los GLMMs, se utilizó una distribución de error de Poisson (enlace=logaritmo). Tratamientos: P0N0 testigo; P1N0 fertilizado con P; P0N1 fertilizado con N; P1N1 fertilizado con P y N.

Familia	Tratamiento				Valor P
	P0N0	P1N0	P0N1	P1N1	
Vegetativo (V6)					
Acaulosporaceae	6,00±1,22	6,00±1,22	8,75±1,48	4,75±1,09	ns
Ambisporaceae	8,70±1,54	12,43±1,88	12,68±1,90	10,69±1,73	ns
Achaesporaceae	1,75±0,66 b	3,00±0,87 ab	4,75±1,09 a	4,67±1,25 ab	0,0341
Claroideoglomeraceae	9,25±1,52	8,50±1,46	9,75±1,56	9,75±1,56	ns
Diversisporaceae	13,25±1,82	8,75±1,48	10,50±1,62	11,00±1,66	ns
Geosiphonaceae	5,56±1,38	6,52±1,54	677±1,58	7,97±1,76	ns
Gigasporaceae	11,21±1,75	9,96±1,64	13,95±1,97	10,71±1,70	ns
Glomeraceae	159,06±9,71 a	120,97±7,86 b	150,84±9,31 a	124,46±8,03 b	0,0012
Paraglomeraceae	32,00±4,00	36,92±4,46	35,69±4,34	31,01±3,90	ns
Reproductivo (R1)					
Acaulosporaceae	2,25±0,75 c	3,00±0,87 bc	6,00±1,22 ab	7,00±1,32 a	0,0285
Ambisporaceae	4,99±1,13 b	4,24±1,04 b	10,23±1,63 a	10,73±1,67 a	0,0109
Achaesporaceae	1,25±0,56	1,67±0,75	2,75±0,83	3,75±0,97	ns
Claroideoglomeraceae	6,50±1,27 b	5,75±1,20 b	9,50±1,54 ab	12,00±1,73 a	0,0400
Diversisporaceae	5,25±1,15	6,75±1,30	7,25±1,35	6,75±1,30	ns
Geosiphonaceae	2,73±0,84	2,73±0,84	4,71±1,13	5,21±1,19	ns
Gigasporaceae	7,23±1,65	6,63±1,83	10,60±2,16	10,84±2,20	ns
Glomeraceae	133,81±13,72 b	96,98±10,27 c	158,61±16,04 a	133,32±13,68 b	0,0001
Paraglomeraceae	21,50±2,32 b	20,25±2,25 b	31,50±2,81 a	37,75±3,07 a	0,0015

Referencias: NC = No Convergencia; ns = no significativo. Promedios con letras diferentes presentan diferencias significativas dentro de cada familia ($p < 0.05$).

3.3.4. Biomarcadores

El método LDA (Abundancia Diferencial Logarítmica) es utilizado para identificar diferencias en la abundancia de características (como genes o especies) entre diferentes condiciones o grupos. Sirve para encontrar los VTX marcadores de cada situación. Se utiliza para determinar la importancia de los taxones expresados de manera diferencial para la comunidad microbiana. Se realizó un análisis LDA en ausencia de P (P0) vs en presencia de P (P1), y en ausencia de N (N0) vs en presencia de N (N1) (Figura 3.3.4.1). En el período vegetativo, los taxas indicadores de P0 correspondieron a las familias

Glomeraceae (VTX00107 - *Glomus sp.* y VTX00217 - *Glomus kottke*), Paraglomeraceae (VTX00348 - *Paraglomus alguacil*), Archaeosporaceae (VTX00004 - *Archaeospora wirsel*), y Gigasporaceae (VTX00041 - *Scutellospora castanea*). En P1 los taxos indicadores pertenecieron a las familias Glomeraceae (VTX00114 - *Glomus sp.*, y VTX00111 - *Glomus sp.*), Geosiphonaceae (VTX00241 - *Geosiphon pyriformis*), y Claroideoglomeraceae (VTX00193 - *Claroideoglomus lamellosum*) (Figura 3.3.4.1 A).

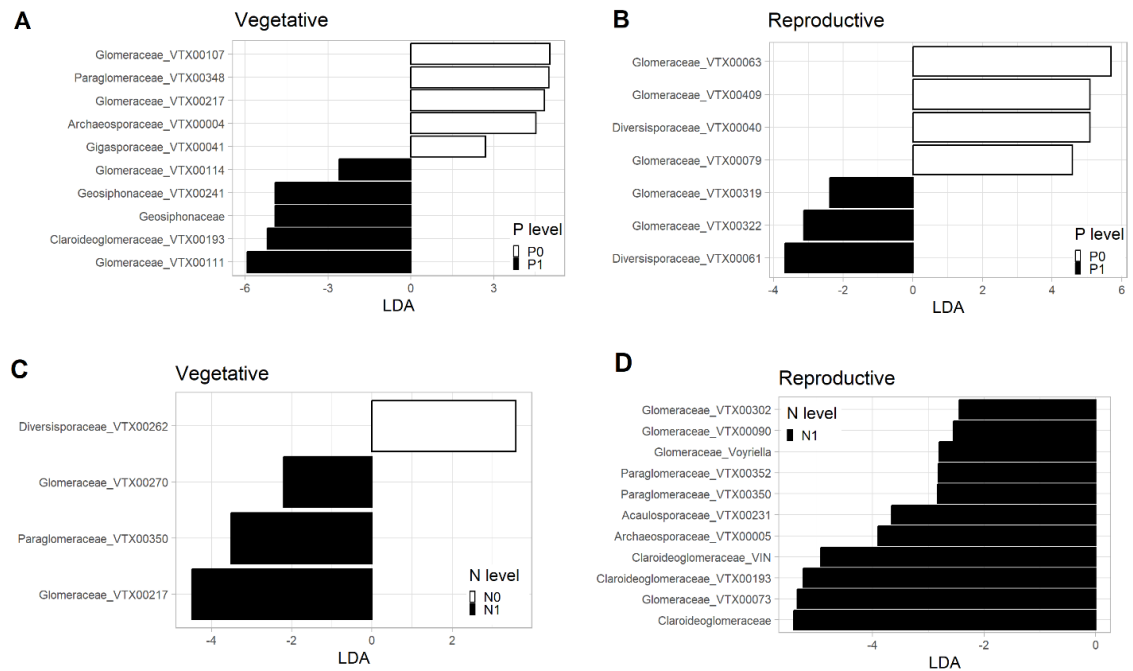


Figura 3.3.4.1. VTX que respondieron a los tratamientos de P en el estadio fenológico V6 (A) y en el estadio fenológico R1 (B) P0: sin agregado de P. P1: con agregado de P. VTX que respondieron a los tratamientos de N en el estadio fenológico V6 (C) y en el estadio fenológico R1 (D). N0: sin agregado de N. N1: con agregado de N. LDA: log-ratio differential abundance analysis.

En el período reproductivo del cultivo, los taxos indicadores de P0 correspondieron a las familias Glomeraceae (VTX00063 - *Glomus viscosum*, VTX00409 - *Glomus torrecillas*, y VTX00079 - *Glomus sp.*), y Diversisporaceae (VTX00040 - *Diversispora sp.*). En P1 los taxos indicadores pertenecieron a las familias Glomeraceae (VTX00319 - *Glomus sp.* y VTX00322 - *Glomus sp.*), y a la familia Diversisporaceae (VTX00061 - *Diversispora epigaea*) (Figura 3.3.4.1 B). Respecto al N, en el período vegetativo, el taxos indicador de N0 correspondió a la familia Diversisporaceae (VTX00262 - *Redeckera fulvum*) mientras que en N1 los taxos indicadores pertenecieron a las familias Glomeraceae (VTX00270 - *Glomus yamato*, y VTX00217 - *Glomus kottke*), y a la familia Paraglomeraceae (VTX00350 - *Paraglomus alguacil*) (Figura 3.3.4.1 C). En el período reproductivo del cultivo, en N1 los taxos indicadores pertenecieron a las familias Glomeraceae (VTX00302 - *Glomus sp.*, VTX00090 - *Glomus manihotis*, *Voyriella* - *Glomus voyriella*, y VTX00073 - *Glomus sp.*), Paraglomeraceae (VTX00352 - *Paraglomus alguacil*, y VTX00350 - *Paraglomus alguacil*), Acaulosporaceae (VTX00231 - *Acaulospora sp.*),

Achaesporaceae (VTX00005 - *Archaeospora sp.*), Claroideoglomeraceae (Claroideoglomerácea VIN - *Claroideoglomus sp.*, VTX00193 - *Claroideoglomus lamellosum*, y Claroideoglomerácea - *Claroideoglomus sp.*) (Figura 3.3.4.1 D). A su vez, los tres VTX más abundantes a nivel general, en el estudio realizado, fueron VTX00111 (*Glomus afrothismia*), VTX00063 (*Glomus viscosum*) y VTX00308 (*Paraglomus glom*) con un 18,28, 8,21 y 6,92% de abundancia relativa, respectivamente.

3.4 Discusión

La familia Glomeraceae fue la más abundante el suelo rizosférico, como era de esperarse en un agroecosistema. Este ambiente cultivado favorece a las especies ruderales frente a las tolerantes al estrés y a las especies competidoras (Grime, 1979, Chagnon *et al.*, 2013). Este ensayo fue realizado bajo siembra directa, donde predominó Glomeraceae y no se observó respuesta de la familia Gigasporaceae. Se sabe que la labranza altera la colonización de HFMA en maíz. Tawewaki y colaboradores (2023) encontraron que las comunidades de HFMA se vieron alteradas por la presencia o ausencia de labranza; específicamente, la labranza aumentó la dominancia de las Gigasporaceae, mientras que la no labranza aumentó la dominancia de las Acaulosporaceae

La aplicación de N incrementó la diversidad alfa de las comunidades de HFMA, aumentando el número de VTX lo que también se manifestó en el índice de Shannon. A mayor número de VTX distintos por muestra, la diversidad alfa de la comunidad de HFMA es mayor. Solamente se identificó un efecto positivo del N sobre la diversidad de HFMA en el estadio reproductivo del cultivo. Cabe destacar que la aplicación de N se realizó en el estadio fenológico V7, es decir, fue posterior al muestreo correspondiente al período vegetativo del cultivo, realizado en V6. Por este motivo, los efectos verificados del tratamiento de N en el muestreo realizado en el periodo vegetativo del cultivo se deberían expresamente al efecto residual del N por el uso de urea en la rotación y de ahí la importancia de haber realizado el presente estudio en un ensayo de larga duración (Johnston y Poulton, 2018). Cabe acotar que en este experimento de larga duración los tratamientos se repiten anualmente en las mismas parcelas. La falta de respuesta de los HFMA a los tratamientos con N en el periodo vegetativo del cultivo estaría asociada a que la fertilización del año tiene más efecto que la historia de fertilización, lo que podría interpretarse como la ausencia de efectos residuales del N en los sistemas agrícolas sobre las comunidades de HFMA. Si bien hubo diferencias en el N-NO³⁻ entre los tratamientos al inicio del ciclo del cultivo (Cuadro 2.3.1.1 – Capítulo 2) estos no fueron suficientes para producir modificaciones en la comunidad de HFMA. Sun y colaboradores (2023) observaron que con dosis de 120 kg ha⁻¹ de N se encontró que el N incrementó la riqueza y la biomasa de los HFMA en el cultivo de maíz, pero a dosis elevadas de N, por encima de las dosis agrónomicamente utilizadas, (360 kg ha⁻¹) redujo la diversidad de los HFMA. Se ha reportado que la adición de N resultó en un cambio significativo en la diversidad y la estructura de la comunidad de HFMA en el cultivo de trigo (Zhu *et al.*, 2018). Otros autores, estudiando el cultivo de maíz en los estadios fenológicos V6, R1 y R4 concluyeron que la fertilización con N a dosis agrónomicas tiene un impacto mínimo en la diversidad general de los HFMA (Tian *et al.*, 2013). Contrariamente, también ha sido

reportado el efecto negativo del N sobre la riqueza de HFMA (Egerton-Walburton *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2013). Esta reducción en número de especies ocurre porque algunas son más afectadas que otras por el incremento de N del suelo (Liu *et al.*, 2015; Camenzind *et al.*, 2014). Es importante resaltar que los cambios en la comunidad de HFMA también dependen de la planta huésped. Por ejemplo, se ha observado que especies como *Lotus tenuis* ha mantenido alta diversidad de HFMA en la Cuenca del Río Salado a pesar de crecer en distintos suelos o presentar variaciones en el manejo como la aplicación o no de herbicidas (García *et al.*, 2023).

La ausencia de efecto del nivel de P del suelo sobre la alfa diversidad de los HFMA no era esperada pero sí ha sido reportada anteriormente. Algunos autores han arribado a la misma conclusión en experimentos a campo en Canadá, con dosis de 22 kg ha⁻¹ y en Estonia evaluando múltiples sitios con distintas disponibilidades de P (Beauregard *et al.*, 2013; Moora *et al.*, 2014), mientras que otros encontraron reducciones de la riqueza luego del agregado de P (Verbruggen *et al.*, 2012; Gosling *et al.*, 2013; Camenzind *et al.*, 2014; Klabi *et al.*, 2015), e incluso un aumento en el número de VTX (Liu *et al.*, 2015). Esta respuesta errática entre estudios también ocurre en la abundancia de especies. Finalmente, es interesante considerar la estequiometría del N y P (Johnson, 2010). Se ha reportado que el agregado de N en suelos ricos en P puede reducir tanto la riqueza de HFMA (Egerton-Walburton *et al.*, 2007) como la colonización micorrícica (Mendoza *et al.*, 2016), pero que ello no ocurre en suelos deficientes de P. Wang y colaboradores (2024) observaron que la aplicación única de N redujo significativamente la riqueza y diversidad de la comunidad de HFMA, mientras que la aplicación combinada de N y P las aumentó significativamente. En el presente estudio no se observó una respuesta a N o P condicionada por la respuesta o interacción entre ambos nutrientes, sino que los índices de alfa diversidad respondieron a la fertilización N, independientemente de la oferta de P. Ante estos resultados es posible inferir que la adición de N al cultivo generó un ambiente favorable para los HFMA, probablemente por una mayor oferta de C de la planta (Albornoz *et al.*, 2023).

La composición de la comunidad fue significativamente afectada por la fertilización con P. La adición de P alteró la composición de las comunidades de HFMA, agrupando a las comunidades por tratamiento de P en ambos muestreos realizados. Gracias a experimentos en condiciones controladas, se sabe que la disponibilidad de P determina si la absorción de P es directa o a través de las micorrizas (Smith y Read, 2008). Mayores niveles de P en el suelo aumentan la absorción directa del nutriente mientras que deficiencias de P generan que mayor cantidad de P sea absorbida a través de las micorrizas (Zhang *et al.*, 2021). Un estudio reciente demostró que la adición a largo plazo de N y/o P tuvo un efecto significativo en la estructura y composición de la comunidad de HFMA (Wang *et al.*, 2024). En coincidencia con el presente estudio, la composición de la comunidad de HFMA fue principalmente influenciada por la disponibilidad de P en el suelo (Wang *et al.*, 2024). Adicionalmente, en un cultivo intersembrado con soja y maíz se observó una diversidad significativamente mayor y especies que coexistían en el grupo sin fertilizar en comparación con los grupos fertilizados con N, y se encontraron diferencias significativas en la estructura de la comunidad en todos los tratamientos (Zeng *et al.*, 2021).

Una especie indicadora es una especie biológica que define un rasgo o característica del ambiente en el que se encuentra. Por ejemplo, Lang y colaboradores (2022) cotejaron la abundancia de los distintos taxones en 6 tratamientos de P en una rotación de trigo y maíz y encontraron respuestas diferenciales de los taxones frente a los tratamientos. La abundancia relativa del taxón dominante *Funneliformis caledonium* disminuyó mientras que la del segundo taxón dominante *Claroideoglossum lamellosum* aumentó a medida que aumentaba la dosis de fertilizante de P. En este estudio se identificaron las especies indicadoras de cada tratamiento y los de mayor abundancia. Los tres VTX más abundantes a nivel general, en el estudio realizado, fueron VTX00111 (*Glomus sp.*), VTX00063 (*Glomus viscosum*) y VTX00308 (*Paraglossum glom*) con un 18,28, 8,21 y 6,92% respectivamente. El VTX00111 ha sido documentado en los 5 continentes, en múltiples cultivos, pero no ha sido reportado en el cultivo de maíz. El VTX00063 ha sido documentado en el cultivo de maíz en Hungría en experimento de 50 años de monocultivo (Sasvari *et al.*, 2011), en Italia bajo distintas prácticas de manejo y fertilización con N (Boriello *et al.*, 2012) y en China (Tian *et al.*, 2013). Por lo tanto, podría deducirse que se trata de un VTX característico de ambientes cultivados con maíz.

El VTX 00308 tampoco ha sido reportado anteriormente en cultivos de maíz, sino que se ha hallado en situaciones de remediación de suelos con metales pesados (Beltrán-Nambo *et al.*, 2021). Distintas especies de HFMA pueden presentar distinto nivel de beneficio para las plantas. Por ejemplo, un estudio demostró que la inoculación con *Rhizophagus intraradices* en el cultivo de maíz mejoró significativamente el crecimiento de las plantas y los contenidos de P y aumentó la colonización micorrícica ante estrés por sequía (Zhao *et al.*, 2015). Por otro lado, la identidad de la planta y las condiciones ambientales han demostrado influir en la intensidad de las interacciones planta-hongo y en las retroalimentaciones posteriores (Klironomos, 2002; Helgason *et al.*, 2002; Harrison y Bardgett, 2010).

Para finalizar, es importante destacar que el mantenimiento de especies autóctonas de HFMA tiene consecuencias favorables en el ecosistema debido a que la diversidad estructural está relacionada con la diversidad funcional (Hart y Reader, 2002). Además, se ha demostrado que comunidades de HFMA con mayor riqueza estimularon más la productividad de la planta que una comunidad pobre en especies (Maherali y Klironomos, 2007). La identificación de prácticas de manejo y de recursos que afectan la simbiosis micorrícica y en consecuencia los beneficios en la adquisición de nutrientes, es un desafío para incrementar las funciones de las micorrizas en los agroecosistemas. Chapin III y colaboradores (2000) enfatizan la importancia del estudio de la abundancia de las especies debido a que responde más rápidamente a las actividades del hombre que los cambios en la riqueza de especies, y porque tiene importantes consecuencias en el ecosistema mucho antes que una especie desaparezca.

3.5 Conclusiones

La oferta de P tuvo una influencia significativa en la composición de las comunidades de HFMA. La fertilización fosfatada redujo el número de OTUs en Glomeraceae. La aplicación de N aumentó el número de OTUs en 8 de 9 de las familias detectadas. Se acepta la hipótesis A. La aplicación de N mostró un impacto claro al incrementar la

diversidad alfa de las comunidades de HFMA residentes en el suelo, reflejado en un aumento del número de VTX por muestra y en el índice de Shannon. Es notorio el efecto a corto plazo del N sobre la diversidad de las comunidades de HFMA, careciendo prácticamente de efectos residuales entre campañas agrícolas. El efecto residual de la fertilización nitrogenada incrementó el número de OTUs en la familia Archaeosporaceae en el estadio V6 del cultivo. No obstante, la aplicación de urea en el estadio V7 del cultivo incrementó el número de OTUs en todas las familias excepto Diversisporaceae en el estadio R1. Lo cual habla del efecto a corto plazo del uso de fertilizantes nitrogenados sobre las comunidades de HFMA. Por otra parte, Glomeraceae fue la familia más abundante en todas las muestras. Se acepta la hipótesis B. Asimismo, se registró una disminución en el número de OTUs en la familia Glomeraceae debido a la fertilización fosfatada, tanto en período vegetativo como reproductivo del cultivo. Gigasporaceae no se vio afectada por la aplicación de P. Se rechaza la hipótesis C. Estos hallazgos, incluyendo la identificación de taxones indicadores en cada tratamiento, respaldan la hipótesis inicial sobre la alteración de las comunidades de HFMA debido a la fertilización fosfatada y nitrogenada, resaltando la importancia de estos nutrientes en la composición y diversidad de las mismas.

Capítulo 4: Conclusiones Generales

4.1 La fertilización sobre el suelo y el cultivo de maíz

Los efectos de la fertilización de largo plazo sobre el suelo se visualizaron principalmente en el P disponible en 0 - 20 cm de profundidad. El N no tuvo efectos residuales a largo plazo, lo cual era esperable por la dinámica del N en el suelo. Adicionalmente, como fue hipotetizado, la absorción de P y N estuvo ligada al uso de fertilizantes fosfatados y nitrogenados, respectivamente. Sería un error intentar correlacionar la absorción de nutrientes con el nivel de colonización medidos en este trabajo. Hacer esto, en las condiciones evaluadas, nos llevaría a pensar que un aumento en la colonización de HFMA en las raíces del cultivo de maíz se asociaría a una menor absorción de nutrientes, principalmente P. Por último, en las condiciones experimentadas, el cultivo de maíz no respondió estadísticamente en rendimiento a la aplicación de P, pero mostró una tendencia positiva al agregado de este nutriente.

4.2 Fósforo en la simbiosis

Se observó que la adición de P disminuyó la simbiosis con HFMA, medida como porciones de la raíz colonizadas por estructuras de HFMA, en gran parte del ciclo del cultivo, como se predijo en las hipótesis. Dicha disminución de la simbiosis se vio reflejada en una reducción en el número de arbusculos observados a lo largo del ciclo del cultivo. Al analizar mediante 18S rDNA observamos que el P alteró la composición de las comunidades de HFMA, agrupando a las comunidades por tratamiento de P en el período vegetativo y en el período reproductivo del cultivo de maíz. Como era de esperar, en un ambiente antropizado, la familia Glomeraceae fue la más abundante en todas las muestras analizadas, tal como fue hipotetizado. En esta familia, el agregado de P disminuyó la riqueza observada, disminuyendo su número de OTUs, tanto en el período vegetativo como en el período reproductivo del cultivo.

4.3 Nitrógeno en la simbiosis

Desde el punto de vista de los HFMA, la adición de N moduló la formación de vesículas al final del ciclo del cultivo, disminuyendo la formación de vesículas en los tratamientos fertilizados con N, como fue hipotetizado. Esto podría interpretarse como que las plantas sin deficiencias de N mantienen la simbiosis hasta el final del ciclo del cultivo. En otras palabras, la simbiosis sigue siendo beneficiosa para la planta al punto que el carbono que pueda costarle mantener a los HFMA es compensado por el beneficio que estos aportan al huésped, dando a entender un aumento en el mutualismo planta - HFMA. La aplicación de urea en V7 mostró un claro impacto al incrementar la diversidad alfa de las comunidades autóctonas de HFMA, reflejado en un aumento del número de VTX por muestra y en el índice de Shannon medidos en R1. Incrementó la diversidad de las comunidades de HFMA al incrementar el número de OTUs de la mayoría de las familias. Adicionalmente, hizo que múltiples VTX de diversas familias fueran diferencialmente abundantes. El N mostró algunos efectos residuales en el sistema. Por ejemplo,

incrementó el número de VTX en la familia Archaeosporaceae y redujo la abundancia relativa de la familia Ambisporaceae en el estadio V6, previo a la aplicación de urea.

4.4 Conclusión general

La información obtenida en esta tesis, amplía el conocimiento de la interacción entre el cultivo de maíz y los HFMA en sistemas de producción típicos de la Región Pampeana. En este trabajo se observó un claro aumento de la simbiosis en los tratamientos no fertilizados con P. Sería de utilidad intentar aislar la contribución de los HFMA en la nutrición fosfatada del cultivo en ambientes de baja disponibilidad de P y alta disponibilidad de N. La identificación de cambios en la abundancia relativa de diversas familias de HFMA en respuesta a los tratamientos de fertilización en diferentes etapas fenológicas del cultivo, indican que la composición de las comunidades de HFMA en suelo rizosférico en el cultivo de maíz es sensible a la disponibilidad de P y N. Estos hallazgos, incluyendo el reconocimiento de taxones indicadores en cada tratamiento, no sólo respaldan la hipótesis inicial sobre la alteración de las comunidades de HFMA debido a la fertilización fosfatada y nitrogenada, sino que podrían ser el punto de partida en la profundización en el conocimiento de estas especies como mejoradoras de los sistemas productivos agrícolas de la región.

4.5 Posibles líneas de trabajo

En base a los resultados, proponemos las siguientes líneas de trabajo de interés:

- Evaluar la simbiosis en otros niveles de fertilización con P y N. Especialmente a menores y mayores disponibilidades de P en el suelo para analizar el comportamiento de los HFMA.
- Integrar otros nutrientes comúnmente utilizados en los sistemas agrícolas pampeanos como el azufre y zinc como fuente de variación.
- Estudiar la dinámica de las comunidades de HFMA en la rotación de cultivos.
- Aislar el impacto de las comunidades de HFMA mediante tratamientos esterilizados.
- Medir más parámetros beneficiosos de la simbiosis como puede ser la protección vegetal por parte de los HFMA.
- Evaluar estrategias de fertilización que potencien la simbiosis, como puede ser niveles bajos a intermedios de P en ambientes ricos en N.
- Estudiar la potencialidad de los taxones indicadores como potenciales herramientas para potenciar la producción del cultivo de maíz.

Bibliografía

- Adesemoye, A.O. y Kloeppe, J. W. 2009. Plant-microbe interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1-12.
- Ahanger, M.A.; Hashem, A.; Abd Allah, E.F. y Ahmad, P. 2014. In: Ahmad, P., Rasool, S. (Eds.). *Arbuscular Mycorrhiza in Crop Improvement Under Environmental Stress*. pp. 69-95.
- Albornoz, F.E.; Standish, R.J.; Bissett, A. y Prober, S.M. 2023. Richness of arbuscular mycorrhizal fungi increases with ecosystem degradation of temperate eucalypt woodlands. *Plant and Soil*, 1-17.
- Alguacil, M. del M.; Lumini, E.; Roldan, A.; Salinas-García, J.R.; Bonfante, P. y Bianciotto, V. 2008. The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecological Applications* 18(2): 527-536.
- Anderson, R.; Liberta, A. y Dickman, L. 1984. Interaction of vascular plants and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture-nutrient gradient. *Oecologia* 64(1): 111-117.
- Andriani, J.M. 2000. Consumo de agua de los cultivos en el Sur de Santa Fe. Para mejorar la producción. 13: 27-30.
- Antoninka, A. J.; Ritchie, M.E. y Johnson, N.C. 2015. The hidden Serengeti—Mycorrhizal fungi respond to environmental gradients. *Pedobiologia*. Vol 58(5-6): 165-176.
- Appelhans, S.C.; Barbagelata, P.A.; Melchiori, R.J.M.; Gutierrez Boem, F.H. y Caviglia, O.P. 2021. Is the Lack of Response of Maize to Fertilization in Soils with Low Bray1-P Related to Labile Organic Phosphorus? *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 21:612-621.
- Ashgari, H.R. y Cavagnaro, T.R. 2012. Arbuscular mycorrhizas reduce nitrogen loss via leaching. *PLoS One* 7(1): e29825.
- Astiz Imaz, P.; Barbieri, P.A.; Echeverría, H.E.; Sainz Rozas, H.R. y Covacevich, F. 2014. Indigenous mycorrhizal fungi from Argentina increase Zn nutrition of maize modulated by Zn fertilization. *Soil and Environment*. 31(1): 23-32.
- Augé, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11(1): 3-42.
- Bagyaraj, D.J.; Sharma, M.P. y Maiti, D. 2015. Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Science*. 108(7): 1288-1293.
- Bainard, L.D.; Bainard, J.D.; Hamel, C. y Gan, Y. 2014. Spatial and temporal structuring of arbuscular mycorrhizal communities is differentially influenced by abiotic factors and host crop in a semi-arid prairie agroecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 88(2): 333-344.

- Balliu, A.; Sallaku, G. y Rewald, B. 2015. AMF inoculation enhances growth and improves the nutrient uptake rates of transplanted, salt-stressed tomato seedlings. *Sustain.* 7: 15967-15981.
- Bandyopadhyay, P.; Bhuyan, S.K.; Yadava, P.K.; Varma, A. y Tuteja, N. 2017. Emergence of plant and rhizospheric microbiota as stable interactomes. *Protoplasma* 254:617-626.
- Bates, D. 2015. Package 'lme4'. *Convergence.* 12(2). {HYPERLINK: <https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/lme4.pdf>}. [Fecha de consulta: 22 de junio de 2021].
- Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B. y Walker, S. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.
- Battini, F.; Grønlund, M.; Agnolucci, M.; Giovannetti, M. y Jakobsen, I. 2017. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Scientific Reports*, 7(1), 4686.
- Beauregard, M.S.; Gauthier, M.P.; Hamel, C.; Zhang, T.; Welacky, T.; Tan, C.S. y St-Arnaud M. 2013. Various forms of organic and inorganic P fertilizers did not negatively affect soil- and root-inhabiting AM fungi in a maize-soybean rotation system. *Mycorrhiza* 23(2): 143-154.
- Begum, N.; Ahanger, M.A.; Su, Y.; Lei, Y.; Mustafa, N.S.A.; Ahmad, P. y Zhang, L. 2019a. Improved drought tolerance by AMF inoculation in maize (*Zea mays*) involves physiological and biochemical implications. *Plants.* 8: 1-20.
- Begum, N.; Qin, C.; Ahanger, M.A.; Raza, S.; Khan, M.I.; Ashraf, M.; Ahmed, N. y Zhang, L. 2019b. Role of arbuscular mycorrhizal Fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science.* 10: 1-15.
- Beltrán-Nambo, M. de los A.; Rojas-Jacuinde, N.; Martínez-Trujillo, M.; Jaramillo-López, P.F.; Gómez Romero, M. y Carreón-Abud, Yazmín. 2021. Differential strategies of two species of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of maize plants grown in chromium-contaminated soils. *Biometals.* 34: 1247-1261.
- Bender, R.; Haegele, J. W.; Ruffo, M. L. y Below, F. E. 2013. Nutrient Uptake, Partitioning, and Remobilization in Modern, Transgenic Insect-Protected Maize Hybrids. *Agronomy Journal.* 105:161-170.
- Bender, S.F.; Conen, F. y Van der Heijden, M.G. 2015. Mycorrhizal effects on nutrient cycling, nutrient leaching and N₂O production in experimental grassland. *Soil Biology and Biochemistry.* 80: 283-292.
- Bennett, A. E. y Groten, K. 2022. The costs and benefits of plant–arbuscular mycorrhizal fungal interactions. *Annual Review of Plant Biology.* 73: 649-672.
- Bennett, A.E. y Bever, J.D. 2007. Mycorrhizal species differentially alter plant growth and response to herbivory. *Ecology.* 88(1): 210-218.
- Bever, J.D.; Morton, J.B.; Antonovics, J. y Schultz, P.A. 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology.* 71-82.

- Biassoni, M.M.; Vivas, H.; Gutiérrez-Boem, F.H. y Salvaggiotti, F. 2023. Changes in soil phosphorus (P) fractions and P bioavailability after 10 years of continuous P fertilization. *Soil and Tillage Research*. Volume 232, 105777.
- Biermann, B. y Linderman, R.G. 1983. Use of vesicular -arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95: 97-105.
- Bonfante-Fasolo, P. 1988. The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations. *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis: Springer*, 219-235.
- Borriello, R.; Lumini, E.; Girlanda, M.; Bonfante, P. y Bianciotto, V. 2012. Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biology and Fertility of Soils* 48:911-922.
- Brady, N.C. y Weil, R.R. 2010. *Elements of the Nature and Properties of Soils*. Pearson Prentice Hall.
- Bray, R.H. y Kurtz, L.T. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soil. *Soil Sci.* 59, 39-45.
- Bremner, J. M. 1965. Nitrogen availability indexes. *Methods of soil analysis, part 2: 1324-1345*.
- Brígido, C.; van Tuinen, D.; Brito, I.; Alho, L.; Goss, M.J. y Carvalho, M. 2017. Management of the biological diversity of AM fungi by combination of host plant succession and integrity of extraradical mycelium. *Soil Biol. Biochem.* 112, 237-247.
- Brito, I.; Goss, M.J.; Carvalho, M.; Chatagnier, O. y van Tuinen, D. 2012. Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil Tillage Research*. 121: 63-67.
- Brundrett, M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. 154:275-304
- Bryla, D.R. y Eissenstat, D.M. 2005. Respiratory Costs of Mycorrhizal Associations. In: Lambers, H., Ribas-Carbo, M. (Eds.), *Plant Respiration*. Springer, Dordrecht. p 207-224.
- Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173(1): 11-26.
- Bundrett, M.; Ashwath, N. y Jasper, D. 1996. Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. *Plant and Soil* 184(1): 173-184.
- Bunn, R.; Lekberg, Y. y Zabinski, C. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi ameliorate temperature stress in thermophilic plants. *Ecology* 90(5): 1378-1388.
- Camenzind, T.; Hempel, S.; Homeier, J.; Horn, S.; Velescu, A.; Wilcke, W. y Rillig, M.C. 2014. Nitrogen and phosphorus additions impact arbuscular mycorrhizal abundance and molecular diversity in a tropical montane forest. *Global Change Biology* 20(12): 3646-3659.
- Chagnon, P.L.; Bradley, R.L.; Maherali, H. y Klironomos, J.N. 2013. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in plant science*, 18(9): 484-491.

Chapin III, F.S.; Zavaleta, E.S.; Eviner, V.T.; Naylor, R.L.; Vitousek, P.M.; Reynolds, H.L.; Hooper, D.U.; Lavorel, S.; Sala, O.E.; Hobbie, S.E.; Mack, M.C. y Díaz, S. 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature*. 405(6783) 234-242.

Chen, M. y Graedel, T.E. 2016. A half-century of global phosphorus flows, stocks, production, consumption, recycling, and environmental impacts. *Global Environmental Change*. 36: 139-152.

Ciampitti, I.A.; Picone, L.; Rubio, G.; y Garcia, F.O. 2011. Pathways of Phosphorous Fraction Dynamics in Field Crop Rotations of the Pampas of Argentina. *Soil Science Society of America Journal*. 75: 918-926.

Covacevich, F. y 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. y 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.; Echeverria, H.E. y Aguirrezabal, L.A.N. 2007. Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization into field and glasshouse-grown spring wheat in Argentina. *Applied Soil Ecology*. 35: 1-9

Covacevich, F.; Marino, M.A. y Echeverria, H.E. 2006. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass in a moderately acidic Argentinean soil. *European Journal of Soil Biology*. 42: 127-138

Covacevich, F.; Martínez Veneri, J.; Dosio, G. A. A. 2018. Does mycorrhizal colonisation vary between maize and sunflower under limitations to radiation source or carbohydrate sink? *Crop and Pasture Science*. 69(10): 974-984.

Covacevich, F.; Veneri, J.M. y Dosio, G.A.A. 2018. Does mycorrhizal colonisation vary between maize and sunflower under limitations to radiation source or carbohydrate sink? *Crop and Pasture Science*. 69(10): 974-984.

Cozzolino, V.; Di Meo, V. y Piccolo, A. 2013. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. *Journal of Geochemical Exploration*. 129: 40-44.

Crews, T.E. y Peoples, M.B. 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 102: 279-297.

Daniell, T.J.; Husband, R.; Fitter, A.H. y Young, J.P. 2001. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 203-209.

Davison, J.; Moora, M.; Öpik, M.; Adholeya, A.; Ainsaar, L.; Bâ, A.; Burla, S.; Diedhiou, G. A.; Hiiesalu, I.; Jairus, T.; Johnson, N. C.; Kane, A. Koorem, K.; Kochar, M.; Ndiaye, C.; Pärtel, M.; Reier, Ü.; Saks, Ü.; Singh, R.; Vasar, M. y Zobel, M. 2015. Global

assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*. 349(6251): 970-973.

Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Divito, G.A.; Sainz Rozas, H.R.; Echeverría, H.E.; Studdert, G.A. y Wyngaard, N. 2011. Long term nitrogen fertilization: Soil property changes in an Argentinean Pampas soil under no tillage. *Soil and Tillage Research*. 114(2): 117-126.

Duvert, P.; Perrin, R. y Plenchette, C. 1990. Soil receptiveness to VA mycorrhizal association: concept and method. *Plant and Soil*. 124(1): 1-6.

Edgar, R. 2010. Usearch. Lawrence Berkeley National Lab. (LBNL), Berkeley, CA (United States).

Egerton-Warburton, L.M.; Johnson, N.C. y Allen, E.B. 2007. Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecological monographs*. 77(4): 527-544.

Epstein, E. y Bloom, A.J. 2004. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives (Second Edition). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 402p.

Evans, J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia*. 78: 9-19.

Faggioli, V.S.; Cabello, M.N.; Grilli, G.; Vasar, M.; Covacevich, F. y Öpik, M. 2019. Root colonizing and soil borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi differ among soybean fields with contrasting historical land use. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 269: 174-182.

Faggioli, V.S.; Cabello, M.N.; Grilli, G.; Vasar, M.; Covacevich, F. y Öpik, M. 2019. Root colonizing and soil borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi differ among soybean fields with contrasting historical land use. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 269: 174-182.

Fall, A.F.; Nakabonge, G.; Ssekandi, J.; Founoune-Mbouop, H.; Apori, S.O.; Ndiaye, A. y Ngom, K. 2022. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on soil fertility: Contribution in the improvement of physical, chemical, and biological properties of the soil. *Frontiers in Fungal Biology*. Volume 3. Article: 723892.

FAO. 2023. FAOSAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. {HYPERLINK "<http://www.fao.org/faostat/en/#home>"}.
{HYPERLINK "<http://www.fao.org/faostat/en/#home>"}

Fathi, A. y Zeidali, E. 2021. Conservation tillage and nitrogen fertilizer: a review of corn growth, yield and weed management. *Central Asian Journal of Plant Science Innovation*. 1(3): 121-142.

Fernandez, M.; Belinque, H.; Boem, F.G. y Rubio, G. 2009. Compared phosphorus efficiency in soybean, sunflower and maize. *Journal of plant nutrition* 32(12): 2027-2043.

- Fernández, M.; Gutiérrez Boem, F. y Rubio, G. 2011. Effect of indigenous mycorrhizal colonization on phosphorus-acquisition efficiency in soybean and sunflower. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174(4): 673-677.
- Fernandez-Gnecco, G.A.; Smalla, K.; Maccario, L.; Sørensen, S.J.; Barbieri, P.A.; Consolo, V.F.; Covacevich, F. y Babin, D. 2021. Microbial community analysis of soils under different soybean cropping regimes in the Argentinean south-eastern Humid Pampas. *Fems Microbiology Ecology*. 97(3) fiab007.
- Fertilizar Asociación Civil. 2021. Evolución Mercado de Fertilizantes Argentino 2020. {HYPERLINK“<https://fertilizar.org.ar/wp-content/uploads/2021/03/Evolucio%CC%81n-Mercado2020.pdf>”}.
- Fitter, A.H. 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93(2): 231-243.
- Fitter, A.H. 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function *New Phytologist*. 172: 3-6.
- Fontana, M.B.; Novelli, L.E.; Sterren, M.A.; Uhrich, W.G.; Benintende, S.M. y Barbagelata, P.A. 2021. Long-term fertilizer application and cover crops improve soil quality and soybean yield in the Northeastern Pampas region of Argentina. *Geoderma* Vol. 385.
- Fougnes, L.; Renciot, S.; Muller, F.; Plenchette, C.; Prin, Y.; de Faria, S.; Bouvet, J.; Sylla, S.N.; Dreyfus, B. y Bâ, A. 2007. Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings. *Mycorrhiza* 17(3): 159-166.
- Garcés-Ruiz, M.; Calonne-Salmon, M.; Plouznikoff, K.; Misson, C.; Navarrete-Mier, M.; Cranenbrouck, S. y Declerck, S. 2017. Dynamics of short-term phosphorus uptake by intact mycorrhizal and non-mycorrhizal maize plants grown in a circulatory semihydroponic cultivation system. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1-8.
- García, I.V.; Covacevich, F.; Fernández-López, C. y Cabello, M. N. 2023. *Lotus tenuis* maintains high arbuscular mycorrhizal diversity in grasslands regardless of soil properties or management. *Rhizosphere*. Vol 27 - 100754.
- George, E.; Marschner, H. y Jakobsen, I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology*. 15: 257-270.
- Giovannetti, M.; Sbrana, C.; Avio, L. y Strani, P. 2004. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*. 164(1): 175-181.
- Gosling, P.; Mead, A.; Proctor, M.; Hammond, J.P. y Bending, G.D. 2013. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. *New Phytologist*. 198(2): 546-556.

Govindarajulu, M.; Pfeffer, P.E.; Jin, H.; Abubaker, J.; Douds, D.D.; Allen, J.W.; Bucking, H.; Lammers, P.J. y Shachar-Hill, Y. 2005 Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435: 819-823.

Graham, J.H.; Leonard, R.T. y Menge, J.A. 1982. Interaction of light intensity and soil temperature with phosphorus inhibition of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation. *New Phytologist*. 91: 683-690.

Grant, R.; Jackson, B.; Kiniry, J. y Arkin, G. 1989. Water deficit timing effects on yield components in maize. *Agronomy Journal*. 81: 61-65.

Grime, J.P. 1979. 2006. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. Wiley. Libro. (2006 segunda edición).

Gruhn, P.; Goletti, F. y Yudelman, M. 2000. Integrated nutrient management, soil fertility, and sustainable agriculture: current issues and future challenges. International Food Policy Research Institute.

Grümberg, B.C.; Urcelay, C.; Shroeder, M.A.; Vargas-Gil, S. y Luna, C.M. 2015. The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. *Biology and Fertility of Soils*. 51(1): 1-10.

Guether, M.; Neuhäuser, B.; Balestrini, R.; Dynowski, M.; Ludewig, U. y Bonfante, P. 2009. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*. 150: 73-83.

Hall, A.; Lemcoff, J. y Trápani, N. 1981. Water stress before and during flowering in maize and its effects on yield, its components, and their determinants. *Maydica*. 26: 19-38.

Harrison, K.A. y Bardgett, R.D. 2010. Influence of plant species and soil conditions on plant–soil feedback in mixed grassland communities. *Journal of Ecology*. 98(2): 384-395.

Hart, M.M. y Reader, R.J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 153(2): 335-344.

Hart, M.M.; Aleklett, K.; Chagnon, P.L.; Egan, C.; Ghignone, S.; Helgason, T.; Lekberg, Y.; Öpik, M.; Pickles, B.J. y Waller, L. 2015. Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 207(1): 235-247.

Hazzoumi, Z.; Moustakime, Y.; hassen Elharchli, E. y Joutei, K.A. 2015. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and water stress on growth, phenolic compounds, glandular hairs, and yield of essential oil in basil (*Ocimum gratissimum* L). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2: 10.

Helgason, T.; Daniell, T.J.; Husband, R.; Fitter, A.H. y Young, J.P.W. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*. 394: 431-431.

Helgason, T.; Merryweather, J.W.; Denison, J.; Wilson, P.; Young, J.P.W. y Fitter, A.H. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*. 90: 371-384.

- Hijri, I.; Sykorova, Z.; Oehl, F.; Ineichen, K.; Mader, P.; Wiemken, A. y Redecker, D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology*. 15(8): 2277-2289.
- Hill, G.T.; Mitkowski, N.A.; Aldrich-Wolfe, L.; Emele, L.R.; Jurkonie, D.D.; Ficke, A.; Maldonado-Ramirez, S.; Lynch, S.T. y Nelson, E.B. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*. 15: 25-36.
- Hodge, A.; Robinson, D.; y Fitter, A. 2000. An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient-rich patches in soil. *New Phytologist*. 145(3): 575-584.
- INTA, 1972. Carta de Suelos de la República Argentina, Hoja 3360-32 Pergamino. Buenos Aires, 106 p.
- Jansa, J.; Oberholzer, H-R. y Egli, S. 2009. Environmental determinants of the arbuscular mycorrhizal fungal infectivity of Swiss agricultural soils. *European Journal of Soil Biology* 45(5): 400-408.
- Jansa, J.; Smith, F.A. y Smith, S.E. 2007. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*. 177: 779-789.
- Jiang, S.; Liu, Y.; Luo, J.; Qin, M., Johnson, N.C.; Öpik, M.; Vasar, M.; Chai, Y.; Zhou, X.; Mao, L.; Du, G.; An, L. y Feng, H. 2018. Dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal community structure and functioning along a nitrogen enrichment gradient in an alpine meadow ecosystem. *New Phytologist*. 220(4): 1222-1235.
- Jiang, Y.; Wang, W.; Xie, Q.; Liu, N.; Liu, L.; Wang, D.; Zhang, X.; Yang, C.; Chen, X.; Tang, D. y Wang, E. 2017. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*. 1172-1175.
- Johansson, J.F.; Paul, L.R. y Finlay, R.D. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48(1): 1-13.
- Johnson, N.C. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Bulletin of the Ecological Society of America* 3(4): 749-757.
- Johnson, N.C. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist*. 185(3): 631-647.
- Johnson, N.C.; Angelard, C.; Sanders, I.R. y Kiers, E.T. 2013. Predicting community and ecosystem outcomes of mycorrhizal responses to global change. *Ecology Letters*. 16: 140-153.
- Johnson, N.C.; Graham, J.H. y Smith, F. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist*. 135(4): 575-585.
- Johnson, N.C.; Pflieger, F.; Crookston, R.; Simmons, S.R. y Copeland, P.J. 1991. Vesicular–arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytologist* 117(4): 657-663.

- Johnson, N.C.; Wilson, G.W.T.; Wilson, J.A.; Miller, R.M. y Bowker, M.A. 2015. Mycorrhizal phenotypes and the Law of the Minimum. *New Phytologist*, 205(4), 1473-1484.
- Johnston, A.E. y Poulton, P.R. 2018. The importance of long-term experiments in agriculture: their management to ensure continued crop production and soil fertility; the Rothamsted experience. *European Journal of Soil Science*. 69: 113-125.
- Jumpponen, A., Trowbridge, J., Mandyam, K., Johnson, L., 2005. Nitrogen enrichment causes minimal changes in arbuscular mycorrhizal colonisation but shifts community composition—evidence from rDNA data. *Biology and Fertility of Soils*. 41: 217-224.
- Kahiluoto, H.; Ketoja, E. y Vestberg, M. 2009. Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality in contrasting cropping systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 134: 36-45.
- Kelly, R.; Edwards, D.; Thompson, J. y Magarey, R. 2001. Responses of sugarcane, maize, and soybean to phosphorus and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop and Pasture Science*. 52(7): 731-743.
- Kiers, E.T.; Duhamel, M.; Beesetty, Y.; Mensah, J.A.; Franken, O.; Verbruggen, E.; Fellbaum, C.R.; Kowalchuk, G.A.; Hart, M.M.; Bago, A.; Palmer, T.M.; West, S.A.; Vandenkoornhuise, P.; Jansa, J. y Bücking, H. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science*. 333: 880-882.
- Kiers, E.T.; Duhamel, M.; Beesetty, Y.; Mensah, J.A.; Franken, O.; Verbruggen, E.; Fellbaum, C.R.; Kowalchuk, G.A.; Hart, M.M. y Bago, A. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*. 333(6044): 880-882.
- Kiers, E.T.; West, S.A. y Denison, R.F. 2002. Mediating mutualisms: Farm management practices and evolutionary changes in symbiont co-operation. *Journal of applied Ecology* 39(5): 745-754.
- Kiers, E.T.; West, S.A. y Denison, R.F. 2008. Maintaining cooperation in the legume-rhizobia symbiosis: identifying selection pressures and mechanisms. *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*: Springer. 59-76.
- Kjeldahl, J. 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. 22(1): 366-382.
- Klabi, R.; Bell, T.H.; Hamel, C.; Iwaasa, A.; Schellenberg, M.; Raies, A. y St-Arnaud, M. 2015. Plant assemblage composition and soil P concentration differentially affect communities of AM and total fungi in a semi-arid grassland. *FEMS Microbiology Ecology* 91(1): 1-13.
- Klironomos, J. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*. 84. 2292-2301.
- Klironomos, J.N. 2002 Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*. 417:67-70.

Knecht, B.; Jansa, J.; Franken, O.; Engelmoer, D.J.; Werner, G.D.; Bücking, H. y Kiers, E.T. 2016. Host plant quality mediates competition between arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*. 20: 233-240.

Kohout, P.; Sudová, R.; Janoušková, M.; Čtvrtlíková, M.; Hejda, M.; Pánková, H.; Slavíková, R.; Štajerová, K.; Vosátka, M. y Sýkorová, Z. 2014. Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry*. 68: 482-493.

Krouk, G. y Kiba, T. 2020. Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights. *Current Opinion in Plant Biology*. 57: 104-109.

Lal, R. 2014. Climate strategic soil management. *Challenges*. 5: 43-74.

Lang, M.; Zhang, C.; Su, W.; Chen, X.; Zou, C. y Chen, X. 2022. Long-term P fertilization significantly altered the diversity, composition and mycorrhizal traits of arbuscular mycorrhizal fungal communities in a wheat-maize rotation. *Applied Soil Ecology*. Vol. 170 - 104261.

Lee, J.; Lee, S. y Young, J.P. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 65(2): 339-349.

Lekberg, Y. y Koide, R. 2006. Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist*. 168(1): 189-204.

Lekberg, Y.; Arnillas, C.A.; Borer, E.T.; Bullington, L.S.; Fierer, N.; Kennedy, P.G. y Henning, J.A. 2021. Nitrogen and phosphorus fertilization consistently favor pathogenic over mutualistic fungi in grassland soils. *Nature Communications*. 12(1): 3484.

Lendzemo, V.W.; Kuyper, T.W.; Kropff, M.J. y van Ast, A. 2005. Field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Striga hermonthica* performance on cereal crops and has the potential to contribute to integrated *Striga* management. *Field Crops Research*. 91(1): 51-61.

Lilleskov, E.A. Kuyper, T.W.; Bidartondo, M.I. y Hobbie, E.A. 2019. Atmospheric nitrogen deposition impacts on the structure and function of forest mycorrhizal communities: a review. *Environmental Pollution*. 246: 148-162.

Liu, Y.; Mao, L.; Li, J.; Shi, G.; Jiang, S.; Ma, X.; An, L.; Du, G. y Feng, H. 2015. Resource availability differentially drives community assemblages of plants and their root-associated arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 386: 341-355.

Lüdtke, D. 2018. ggeffects: Tidy Data Frames of Marginal Effects from Regression Models. *The Journal of Open Source Software*. 3(26). 772. doi: 10.21105/joss.00772.

Lüdtke, D.; Ben-Shachar, M.; Patil, I.; Waggoner, P. y Makowski, D. 2021. "performance: An R Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models." *Journal of Open Source Software*. 6(60). 3139. doi:10.21105/joss.03139.

- Luginbuehl, L.H.; Menard, G.N.; Kurup, S.; Van Erp, H.; Radhakrishnan, G.V.; Breakspear, A.; Oldroyd, G.E.D. y Eastmond, P.J. 2017. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*. 356:1175-1178.
- MacDonald, G.K.; Bennett, E.M.; Potter, P.A. y Ramankutty, N. 2011. Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7): 3086-3091.
- Mäder, P.; Edenhofer, S.; Boller, T.; Wiemken, A. y Niggli, U. 2000. Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biology and Fertility of Soils* 31(2): 150-156.
- Magurran, A.E. y McGill, B.J. 2011. *Biological diversity. Frontiers in Measurement and Assessment*, Oxford University Press.
- MAGyP. 2022. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. {HYPERLINK <https://datosestimaciones.magyp.gob.ar/>}.
- Maherali, H. y Klironomos, J.N. 2007. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*. 316(5832): 1746-1748.
- McGee, P. 1989. Variation in propagule numbers of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a semi-arid soil. *Mycological Research*. 92(1): 28-33.
- McGonigle, T.; Miller M.; Evans, D.; Fairchild, G. y Swan, J. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 115(3): 495-501.
- McGonigle, T.P. y Miller, M.H. 1996. Mycorrhizae, Phosphorus Absorption, and Yield of Maize in Response to Tillage. *Soil Science Society of America Journal*. 60(6): 1856-1861.
- Mendoza, R.; García, I.; Depalma, D. y López, C.F. 2016. Competition and growth of a grass-legume mixture fertilized with nitrogen and phosphorus: effect on nutrient acquisition, root morphology and symbiosis with soil microorganisms. *Crop and Pasture Science*. 67: 629-640.
- Mengel, D.B. y Barber, S.A. 1974. Development and distribution of the corn root system under field conditions 1. *Agronomy Journal*. 66: 341-344.
- Moora, M.; Davison, J.; Öpik, M.; Metsis, M.; Saks, U.; Jairus, T.; Vasar, M. y Zobel, M. 2014. Anthropogenic land use shapes the composition and phylogenetic structure of soil arbuscular mycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 90(3): 609-621.
- Morton, J.B.; Bever, J.D. y Pflieger, F.L. 1997. Taxonomy of *Acaulospora gerdemannii* and *Glomus leptotichum*, synanamorphs of an arbuscular mycorrhizal fungus in Glomales. *Mycological Research*. 101(05): 625-631.
- Mueller, N.; Gerber, J.; Johnston, M.; Ray, D.; Ramankutty, N. y Foley, J. 2012. Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature*. 490: 254-257.

- Müller, C. y Krauss, J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*. 8. 450-6.
- Murphy, J. y Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* 27: 31-36.
- Neumann, G. y Martinoia, E. 2002. Cluster roots - an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science*. 7: 162-167.
- Nijjer, S.; Rogers, W.E. y Siemann, E. 2010. The impacts of fertilization on mycorrhizal production and investment in Western Gulf Coast Grasslands. *The American Midland Naturalist*. 163(1): 124-133.
- Oehl, F.; Sieverding, E.; Ineichen, K.; Mader, P.; Boller, T. y 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: 2816-2824.
- Oksanen, J. 2015. Multivariate Analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>.
- Õpik, M.; Vanatoa, A.; Vanatoa, E.; Moora, M.; Davison, J.; Kalwij, J.M.; Reier, U. y Zobel, M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188(1): 223-241.
- Õpik, M.; Zobel, M.; Cantero, J.J.; Davison, J.; Facelli, J.M.; Hiiesalu, I.; Jairus, T.; Kalwij, J.M.; Koorem, K.; Leal, M.E.; Liira, J.; Metsis, M.; Neshataeva, V.; Paal, J.; Phosri, C.; Põlme, S.; Reier, Ü.; Saks, Ü.; Schimann, H.; Thiéry, O.; Vasar, M. y Moora, M. 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 23(5): 411-430.
- Otegui, M.E.; Andrade, F.H. y Suero, E.E. 1995. Growth, water use, and kernel abortion of maize subjected to drought at silking. *Field Crops Research*. 40: 87-94.
- Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. 6:763-775.
- Pearson, J.N.; Smith, S.E. y Smith, F.A. 1991. Effect of photon irradiance on the development and activity of VA mycorrhizal infection in *Allium porrum*. *Mycological Research*. 95: 741-746.
- Pedersen, I.F.; Sørensen, P.; Rasmussen, J.; Withers, P.J.A. y Rubæk, G.H. 2019. Fertilizer ammonium: nitrate ratios determine phosphorus uptake by young maize plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 182: 541-551.
- Peng, Y.; Niu, J.; Peng, Z.; Zhang, F. y Li, C. 2010. Shoot growth potential drives N uptake in maize plants and correlates with root growth in the soil. *Field Crops Research*. 115: 85-93.
- Phillips, J.M. y Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society*. 55(1): 158-161.

Plenchette, C.; Clermont-Dauphin, C.; Meynard, J.M. y Fortin, J.A. 2005. Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science*. 85: 31-40.

Plenchette, C.; Perrin, R. y Duvert, P. 1989. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Canadian Journal of Botany*. 67(1): 112-115.

Powell, J.R.; Parrent, J.L.; Hart, M.M.; Klironomos, J.N.; Rillig, M.C. y Maherali, H. 2009. Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Royal Society B*. 276:4237-45.

Propster, J.R. y Johnson, N.C. 2015. Uncoupling the effects of phosphorus and precipitation on arbuscular mycorrhizas in the Serengeti. *Plant and Soil*. 388(1-2), 21-34.

Qian, L.; Yu, W.J.; Cui, J.Q.; Jie, W.G. y Cai, B.Y. 2015. *Funneliformis mosseae* affects the root pathogen *Fusarium oxysporum* in soybeans. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*. 65(4): 321-328.

Rinaudo, V.; Bàrberi, P.; Giovannetti, M. y van der Heijden, M.G. 2010. Mycorrhizal fungi suppress aggressive agricultural weeds. *Plant and Soil*. 333(1-2): 7-20.

Ritchie, S.W. y Hanway, J.J. 1982. How a corn plant develops. Iowa State Univ. Special Report 48.

RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA. Retrieved from <http://www.rstudio.com/>

Rubio, G.; Gutiérrez Boem, F.H.; y Cabello, M.J. 2008. Estimating available soil phosphorus increases after phosphorus additions in Mollisols. *Soil Science Society of America Journal*. 72(6): 1721-1727.

Rubio, G.; Pereyra, F.X. y Taboada, M.A. 2019. Soils of the Pampean Region. En: Rubio, G.; Lavado, R.S. y Pereyra, F.X. (eds). *The Soils of Argentina*. World Soils Book Series. Springer Int. Publ. p. 81-100.

Ruiz, R.A.; Satorre, E.H.; Maddoni, G.A.; Calderini, D.F.; Miralles, D.J.; Cárcova, J. y Di Nápoli, M.R. 1997. Bases funcionales de la respuesta a la fertilización nitrogenada de cultivos de maíz en el norte de la Provincia de Buenos Aires. En: *Actas VI Congreso Nacional de Maíz, Tomo II*, pp. 121-128. Pergamino, Buenos Aires, noviembre 1997. AIANBA, Pergamino.

Sainz Rozas, H.; Echeverría, H. y Angelini, H. 2012. Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región Pampeana y Extra Pampeana Argentina. *RIA*. 38, 33-39.

Saks, Ü.; Davison, J.; Öpik, M.; Vasar, M.; Moora, M. y Zobel, M. 2013. Root-colonizing and soil-borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate forest understorey 1. *Botany*. 92(4): 277-285.

Salvagiotti, F.; Pedrol, H.; Castellarín, J.; Cordone, G.; Capurro, J.; Felizia, J.C.; Gargicevich, A.; Gentili, O.; Martínez, F.; Méndez, J.; Prieto, G. y Trentino, N. 2004. Umbrales de nitrógeno a la siembra para el diagnóstico de la fertilización nitrogenada en

maíz según el potencial de rendimiento. En: Maíz Campaña 2003/2004, pp. 84-88. Para Mejorar la Producción 26, EEA Oliveros, INTA.

Sasvari, Z.; Hornok, L. y Posta, K. 2011. The community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of maize grown in a 50-year monoculture. *Biology and Fertility of Soils* 47:167-176.

Schalamuk, S. y Cabello, M. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia*. 102(2): 261-268.

Scheublin, T.R.; Sanders, I.R.; Keel, C. y van der Meer J.R. 2010. Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME Journal* 4(6): 752-763.

Schnepf, A.; Jones, D. y Roose, T. 2011. Modelling nutrient uptake by individual hyphae of arbuscular mycorrhizal Fungi: temporal and spatial scales for an experimental design. *Bulletin of Mathematical Biology*. 73: 2175-2200.

Schüßler, A. y Walker, C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Gloucester, UK: Published in libraries at Royal Botanic Garden Edinburgh, Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University URL <https://www.amf-phylogeny.com>. (última actualización 04 Noviembre 2021)

Setiyono, T.D.; Walters, D.T.; Cassman, K.G.; Witt, C. y Dobermann, A., 2010. Estimating maize nutrient uptake requirements. *Field Crops Research*. 118: 158-168.

Shi, J.; Zhao, B.; Zheng, S.; Zhang, X.; Wang, X.; Dong, W.; Xie, Q.; Wang, G.; Xiao, Y.; Chen, F.; Yu, N. y Wang, E. 2021. A phosphate starvation response-centered network regulates mycorrhizal symbiosis. *Cell*. 184(22): 5527-5540.

Sieverding, E.; Friedrichsen, J. y Suden, W. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Sonderpublikation der GTZ (Germany).

Simon, L.; Lalonde, M. y Bruns T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from VA endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 291-295.

Smil, V. 2002. Nitrogen and food production. Proteins for human diets. *Ambio*. 31: 126-131.

Smith, S.E. y Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, third ed. Academic Press, London, UK.

Smith, S.E. y Smith, F.A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*. 62: 227-250.

Sommers, L.E. y Nelson, D.D.W. 1972. Determination of total phosphorus in soil. *Soil Sci. Soc. Am Proc*. 36: 902-904.

- Sucunza, F. A.; Gutierrez Boem, F. H.; Garcia, F. O.; Boxler, M. y Rubio, G. 2018. Long-term phosphorus fertilization of wheat, soybean and maize on Mollisols: Soil test trends, critical levels and balances. *European Journal of Agronomy*. 96: 87-95.
- Sun, J.; Zhao, J.; Huo, J.; Wang, S.; Xu, L.; Chen, X.; Qiu, Y. y Liu, M. 2023. The balance between arbuscular mycorrhizal fungal diversity and plant growth benefits from optimizing nitrogen inputs in agroecosystems. *Applied Soil Ecology*. Vol. 187 - 104834.
- Tatewaki, Y.; Higo, M. e Isobe, K. 2023. Impacts of Tillage Practices on Growth, Phosphorus Uptake, and Yield of Maize in Controlled and Field-Based Studies in Relation to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied Microbiology*. 3(2): 358-374.
- Tedersoo, L.; Sánchez-Ramírez, S.; Kõljalg, U.; Bahram, M.; Döring, M.; Schigel, D.; May, T.; Ryberg, M. y Abarenkov, K. 2018. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*. 90(1): 135-159.
- Thougnon Islas, A. J.; Hernandez Guijarro, K.; Eyherabide, M.; Sainz Rozas, H. R.; Echeverría, H. E. y Covacevich, F. 2016. Can soil properties and agricultural land use affect arbuscular mycorrhizal fungal communities indigenous from the Argentinean Pampas soils? *Applied Soil Ecology*. 101: 47-56.
- Tian, H.; Drijber, R.A.; Zhang, J.L. y Li, X.L. 2013. Impact of long-term nitrogen fertilization and rotation with soybean on the diversity and phosphorus metabolism of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi within the roots of maize (*Zea mays* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 164: 53-61.
- van der Heijden, M. G. 2010. Mycorrhizal fungi reduce nutrient loss from model grassland ecosystems. *Ecology*. 91(4): 1163-1171.
- van der Heijden, M.G.; Martin, F.M.; Selosse, M.A. y Sanders, I.R. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*. 205(4), 1406-1423.
- Vandenkoornhuyse, P.; Ridgway, K.; Watson, I.; Fitter, A. y Young, J. 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12(11): 3085-3095.
- Verbruggen, E.; Kiers, E.T.; Bakelaar, P.N.C.; Rölting, W.F.M. y van der Heijden, M.G. 2011. Provision of contrasting ecosystem services by soil communities from different agricultural fields. *Plant and Soil*. 350(1): 43-55.
- Verbruggen, E.; van der Heijden, M.G.; Weedon, J.T.; Kowalchuk, G.A y Roeling. W.F. 2012. Community assembly, species richness and nestedness of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Molecular Ecology*. 21(10): 2341-2353.
- Veresoglou, S.D.; Shaw, L. J.; Hooker, J.E. y Sen, R. 2012. Arbuscular mycorrhizal modulation of diazotrophic and denitrifying microbial communities in the (mycor)rhizosphere of *Plantago lanceolata*. *Soil Biology and Biochemistry*. 53:78-81.
- Vitousek, P.M.; Porder, S.; Houlton, B.Z. y Chadwick, O.A. 2010. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen–phosphorus interactions. *Ecological Applications*. 20: 5-15.

Walder, F. y van der Heijden, M.G. 2015. Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature Plants*. 1: 15159.

Walkley, A. y Black, A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37: 29-38.

Wang, Y.; Zhang, W.; Li, C.; Chang, S.; Miao, Y.; Li, Q.; Kou, Z. y Dang, T. 2024. Nitrogen and phosphorus fertilization leads to soil arbuscular mycorrhizal fungal diversity changes and rainfed crop yield increase on the Loess Plateau of China: A 37-year study. *Pedosphere*. 34(2): 328-338.

Wang, Y.Y.; Vestberg, M.; Walker, C.; Hurme, T.; Zhang, X. y Lindström, K. 2008. Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. *Mycorrhiza*. 18(2): 59-68.

Williams, A.; Manoharan, L.; Rosenstock, N.P.; Olsson, P.A. y Hedlund, K. 2017. Long-term agricultural fertilization alters arbuscular mycorrhizal fungal community composition and barley (*Hordeum vulgare*) mycorrhizal carbon and phosphorus exchange. *New Phytologist*. 213: 874-885.

Xiao, D.; Che, R.; Liu, X.; Tan, Y.; Yang, R.; Zhang, W.; He, X.; Xu, Z. y Wang, K. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi abundance was sensitive to nitrogen addition but diversity was sensitive to phosphorus addition in karst ecosystems. *Biology and Fertility of Soils*. 55(5): 457-469.

Yadav, M.R.; Kumar, R.; Parihar, C.M.; Yadav, R.K.; Jat, S.L.; Ram, H.; Meena, R.K.; Singh, M.; Birbal Verma, A. P.; Kumar, U.; Ghosh, A.; y Jat, M.L. 2017. Strategies for improving nitrogen use efficiency: A review. *Agricultural Reviews*. 38(1): 29-40.

Zeng, H.; Yu, L.; Liu, P.; Wang, Z.; Chen, Y. y Wang, J. 2021. Nitrogen fertilization has a stronger influence than cropping pattern on AMF community in maize/soybean strip intercropping systems. *Applied Soil Ecology*. Vol. 167 - 104034.

Zhang, L.; Chu, Q.; Zhou, J.; Rengel, Z. y Feng, G. 2021. Soil phosphorus availability determines the preference for direct or mycorrhizal phosphorus uptake pathway in maize. *Geoderma*. Vol. 403 - 115261.

Zhao, R.; Guo, W.; Bi, N.; Guo, J.; Wang, L.; Zhao, J. y 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*. Vol. 88. Pages 41-49.

Zhu, C.; Tian, G.; Luo, G.; Kong, Y.; Guo, J. Wang, M.; Guo, S.; Ling, N. y Shen, Q. 2018. N-fertilizer-driven association between the arbuscular mycorrhizal fungal community and diazotrophic community impacts wheat yield. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. Vol. 254. Pages 191-201.

Zuur, A.F.; Hilbe, J.M. y Ieno, E.N. 2013. *A Beginner's Guide to GLM and GLMM with R: A Frequentist and Bayesian Perspective for Ecologists*. Highland Statistics Limited.