



Revista Argentina de Microbiología

ISSN: 0325-7541

ram@aam.org.ar

Asociación Argentina de Microbiología  
Argentina

Thougnon Islas, Andrea J.; Eyherabide, Mercedes; Echeverría, Hernán E.; Sainz Rozas, Hernán R.;  
Covacevich, Fernanda

Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrícicos nativos de suelos de la  
provincia de Buenos Aires con manejo contrastante

Revista Argentina de Microbiología, vol. 46, núm. 2, junio-, 2014, pp. 133-143

Asociación Argentina de Microbiología  
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213031635012>

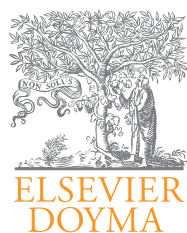
- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



# REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



## ARTÍCULO ORIGINAL

# Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrícicos nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires con manejo contrastante

Andrea J. Thougnon Islas<sup>a,b</sup>, Mercedes Eyherabide<sup>a</sup>, Hernán E. Echeverría<sup>a</sup>,  
Hernán R. Sainz Rozas<sup>a,b</sup> y Fernanda Covacevich<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad Integrada Facultad de Ciencias Agrarias-Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce, Balcarce, Argentina

<sup>b</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC), Mar del Plata, Argentina

Recibido el 21 de mayo de 2013; aceptado el 16 de enero de 2014

### PALABRAS CLAVE

Capacidad micotrófica;  
Respuesta micorrícica;  
*Glomeromycota*;  
Manejo agrícola;  
Maíz;  
Tomate

### Resumen

Se evaluó la capacidad micotrófica y de esporulación de consorcios microbianos con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) nativos de suelos de la provincia de Buenos Aires (Argentina), y se determinó si las características edáficas y los parámetros micorrícicos podrían permitir seleccionar inóculos potencialmente benéficos. Se seleccionaron muestras de suelo provenientes de 7 localidades, cada una bajo manejo agrícola (A) y prístino (P). Se instalaron plantas trampa y a las 10 semanas de crecimiento se evidenció colonización micorrícica en la raíces. El número de esporas del suelo de campo fue bajo, mientras que en el sustrato donde crecieron las plantas trampa varió entre 80-1175 esporas/100 g. El análisis de componentes principales indicó que los contenidos de P y Fe en el suelo fueron los principales moduladores de la capacidad micotrófica y de esporulación. Se determinó el potencial micorrícico (PM) de muestras provenientes de tres localidades: Lobería, Junín y Trenque Lauquen. Se verificó un PM elevado en las muestras provenientes de Lobería con suelo prístino y en las de Trenque Lauquen bajo manejo agrícola, mientras que fue bajo en las de Junín. Finalmente, se evaluó la eficiencia en condiciones controladas de suelos-inóculo de Lobería bajo manejo agrícola o prístino en plantas de maíz y de tomate. Si bien los incrementos en la materia seca asociados a la inoculación fueron no significativos ( $p > 0,05$ ), la respuesta micorrícica fue superior al 40 % en tomate y al 25 % en maíz, particularmente con el inóculo proveniente del sitio agrícola. Los bajos incrementos de crecimiento estarían asociados con la incipiente micorrización en ambas especies. Se plantea la necesidad de profundizar los estudios a efectos de determinar los factores involucrados que permitirían seleccionar inóculos eficientes.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: covacevich.fernanda@inta.gob.ar (F. Covacevich).

**KEYWORDS**

Infective capacity;  
Mycorrhizal response;  
*Glomeromycota*;  
Agricultural  
management;  
Corn;  
Tomato

## Mycotrophic capacity and efficiency of microbial consortia of arbuscular mycorrhizal fungi native of soils from Buenos Aires province under contrasting management

**Abstract**

We characterized the infective and sporulation capacities of microbial consortia of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) native of Buenos Aires province (Argentina) and determined if some soil characteristics and mycorrhizal parameters could allow to select potentially beneficial inocula. Soil samples were selected from seven locations in Buenos Aires province all under agricultural (A) and pristine (P) conditions. The AMF were multiplied and mycorrhizal root colonization of trap plants was observed at 10 weeks of growth. Spore number in field was low; however, after multiplication spore density accounted for 80-1175 spores per 100 g of soil. The principal component analysis showed that the P and Fe soil contents are the main modulators of infectivity and sporulation capacity. The mycorrhizal potential was determined in three locations, being high in Pristine Lobería and Agricultural Trenque Lauquen and low in Junín. Agricultural Lobería (AL) and Pristine Lobería (PL) inocula were selected and their efficiency was evaluated under controlled conditions. Even though shoot dry matter increases after inoculation was not significant ( $p > 0.05$ ) mycorrhizal response was greater than 40% for tomato and 25% for corn, particularly after inoculation with inocula from the agricultural management. These results could be associated to the incipient development of mycorrhizae in both species. Additional research should be conducted to further develop our findings in order to determine the factors involved in the selection of efficient inocula.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

La explotación intensiva del suelo de la provincia de Buenos Aires producida por la agricultura convencional de las últimas décadas, con permanente extracción de nutrientes, aceleró su degradación y afectó su fertilidad natural, lo que puso en peligro su productividad<sup>30</sup>. Sin embargo, las políticas agrícolas a nivel mundial están tendiendo hacia sistemas agrícolas sostenibles, destinados a la producción de cultivos con un mantenimiento del óptimo equilibrio físico, químico y biológico en el suelo. En este sentido, la utilización de microorganismos del suelo con potencialidad para mejorar la nutrición mineral (*Rhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, hongos formadores de micorrizas, entre otros) se está generalizando y permite disminuir el empleo de fertilizantes. De este modo, se reducen los costos de instalación de los cultivos<sup>23</sup> y se mantiene la sostenibilidad de los agroecosistemas.

Las tendencias actuales hacia una agricultura sustentable involucran cambios en las prácticas de manejo, así como la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) constituyen un grupo de microorganismos cosmopolitas<sup>19</sup>. Son habitantes del suelo pertenecientes al Phylum *Glomeromycota*<sup>35</sup>, que forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas. Presentan destacada importancia, particularmente por su papel como agentes de transporte de nutrientes de baja movilidad, como P y Zn, hacia la planta<sup>36</sup>, por lo que son utilizados como biofertilizantes luego de una correcta selección de los HMA más eficientes<sup>22</sup>.

La mayoría de los cultivos de importancia agrícola forman micorrizas arbusculares y, en muchos casos, evidencian

incrementos de la nutrición mineral y el crecimiento<sup>36</sup>. Aunque algunos estudios han comunicado efectos beneficiosos de la formación de micorrizas sobre el crecimiento de cultivos agrícolas, es difícil evaluar la contribución de los HMA en condiciones de campo<sup>18</sup>.

En la Argentina, varios autores han comunicado la presencia de HMA nativos. Diehl y Fontenla<sup>15</sup> comunicaron la asociación simbiótica de HMA con *Araucaria araucana* (Molina), una conífera ampliamente distribuida en los bosques andino-patagónicos del sur de Argentina y Chile. En ensayos de larga duración en la zona de La Plata<sup>33,34</sup>, se determinó elevada biodiversidad natural de HMA asociados a cultivos de trigo. En el sudeste bonaerense, se describió la colonización micorrícica espontánea en trigo<sup>12</sup>, en pasturas de gramíneas y leguminosas<sup>11</sup> y en gramíneas forrajeras tales como agropiro y festuca<sup>14</sup>.

Las propiedades del suelo y su historia de uso podrían modular la infectividad de los HMA<sup>16</sup>. Algunas investigaciones indican que las prácticas agrícolas reducen la abundancia y diversidad de los HMA, otras han documentado que niveles elevados de P en el suelo afectan negativamente a los HMA<sup>36</sup>.

En la provincia de Buenos Aires (Argentina), Covacevich *et al.*<sup>13,14</sup> determinaron que, para una misma área agroecológica, diferentes manejos pueden afectar el potencial micorrícico y la capacidad micotrófica por HMA. Schalamuk y Cabello<sup>31,32</sup> comunicaron cambios en la densidad y diversidad de HMA asociados al manejo y al estado fenológico de los cultivos. Djuuna *et al.*<sup>16</sup> utilizaron datos provenientes de 291 muestras de suelo de Australia para evaluar el grado de asociación entre la infectividad de los HMA y las propiedades del suelo, empleando dos modelos estadísticos. Para nuestras condiciones, aún no se cuenta con información su-

ficiente para generar modelos de simulación. Nuestra hipótesis de trabajo es que las características edáficas podrían contribuir a seleccionar HMA nativos de Argentina infectivos y potencialmente benéficos.

Los objetivos del trabajo fueron los siguientes: a) caracterizar la capacidad micotrófica y de esporulación de consorcios microbianos con HMA nativos de sitios con aptitud agrícola de la provincia de Buenos Aires bajo manejos contrastantes (agrícolas y prístinos); b) determinar si las características edáficas o de manejo a las que estos estuvieron expuestos y sus capacidades micotróficas podrían permitir la selección de inóculos potencialmente benéficos.

## Materiales y métodos

### Recolección y selección de las muestras de suelo

Se seleccionaron muestras de suelos (Proyecto INTA AERN-295561) de sitios con aptitud agrícola de la provincia de Buenos Aires, cada uno bajo manejo contrastante (agrícola y sin actividad -prístino-). Las muestras de suelo fueron georreferenciadas y compuestas por 10 submuestras extraídas a no más de 50 m de radio del punto de georreferencia. Estas fueron obtenidas a una profundidad del perfil entre 0 y 20 cm, en similar posición de relieve y del área más representativa de cada lote, y fueron mantenidas en oscuridad a 4 °C hasta su procesamiento.

Parte del suelo fue secado a 30 °C, tamizado y utilizado en el Laboratorio de Suelos de la EEA INTA-Balcarce para la determinación del contenido de materia orgánica (MO)<sup>5</sup>, del pH (relación suelo:agua de 1:2,5), del P-Bray<sup>3</sup> y de los cationes intercambiables. El Ca y el Mg se determinaron mediante absorción atómica<sup>5</sup> (Shimadzu AA-6200, EE. UU.) y el Na y el K por fotometría de llama<sup>5</sup> (Corning Flame Photometer 410, EE. UU.), previa extracción con CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (1 N, pH 7). La determinación del contenido de Fe, Mn, Cu y Zn disponible se realizó mediante la extracción con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), con posterior cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica<sup>20</sup>. La determinación del B disponible se realizó en el Laboratorio Suelo-Fértil (Asociación de Cooperativas Argentinas Coop. Ltda., Pergamino) mediante la cuantificación por colorimetría<sup>4</sup>, previa extracción con agua caliente.

A partir de los resultados de los análisis químicos de los suelos de 120 sitios, se seleccionaron aquellas localidades que presentaron, al menos en uno de los dos manejos evaluados, valores de P-Bray mayores de 28 mg/kg de acuerdo al umbral establecido por Covacevich *et al.*<sup>12</sup> y ubicación espacial diferente dentro la provincia de Buenos Aires. En tal sentido fueron seleccionadas las localidades de Benito Juárez (BJ), Carlos Casares (CC), Coronel Dorrego (CD), Junín (J), Lobería (L), Madariaga (M) y Trenque Lauquen (TL), y de cada una se obtuvieron muestras de suelo bajo manejo agrícola (A) y prístino (P), lo que resultó en 14 sitios de colecta (7 localidades × 2 manejos).

### Capacidad micotrófica

El suelo de las localidades seleccionadas fue utilizado para montar cultivos trampa, mezclando el suelo nativo de cada

sitio con arena de río estéril (suelo/arena 2:1) en macetas de 100 ml con 4 repeticiones. Para obtener plantas hospedadoras de los HMA nativos, se sembraron semillas de rai-grás (*Lolium multiflorum* Lam.) previamente desinfectadas con un tratamiento que consistió en enjuague con H<sub>2</sub>O destilada, etanol 90 % durante 3 min, enjuague con H<sub>2</sub>O destilada, NaClO comercial al 3,5 % durante 3 min y enjuague con H<sub>2</sub>O destilada. Las plantas fueron criadas en cámara de crecimiento (Laboratorio de Microbiología de Suelos-UI FCA-EEA INTA, Balcarce, 12 h luz/12 h oscuridad; 23 °C), regadas diariamente con H<sub>2</sub>O destilada y con solución Hoagland con P al 50 % cada dos semanas. Luego de 10 semanas, las plantas fueron descalzadas, parte de las raíces fueron lavadas con agua y procesadas para la tinción con azul de tripán usando una modificación de la metodología propuesta por Phillips y Hayman<sup>28</sup>, en la que se omitió el uso de fenol en los reactivos. Para ello, las raíces fueron clarificadas con KOH 10 % durante 30 min a 60 °C, lavadas con H<sub>2</sub>O, acidificadas con HCl 0,1 N, lavadas con H<sub>2</sub>O y teñidas con azul de tripán (0,05 %) en lactoglicerol (ácido láctico, glicerol, agua destilada en proporción 1:1:1, 15 min, 50 °C). Se realizó la cuantificación microscópica<sup>8</sup> del grado de colonización micorrícica y de arbuscúlos en las raíces mediante observación al microscopio óptico (OLYMPUS BH-2, EE.UU.), registrando los segmentos de raíz colonizados con estructuras de HMA (hifas, arbuscúlos). A partir de la relación entre las observaciones donde se registraron estructuras de HMA y las observaciones totales, se calculó el porcentaje de arbuscúlos (Ar %) y el de infección total (MA %), que comprendió los segmentos con arbuscúlos, con hifas y/o con vesículas de HMA. El sustrato y las raíces no utilizados fueron secados en oscuridad a temperatura ambiente, y conservados para posteriores usos y determinaciones.

### Capacidad de esporulación

Tanto del suelo colectado a campo como del sustrato de crecimiento de las plantas trampa, se procedió a la extracción de esporas de HMA a partir de muestras de 40 g mediante la técnica de tamizado (malla: 450, 124, 53 y 30 µm) en húmedo y decantado y centrifugación (Giumelli Z-29, Argentina) en gradiente de sacarosa al 60 % ([http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fma\\_metodos\\_extracao\\_de\\_esporos.html](http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fma_metodos_extracao_de_esporos.html)).

Por observación en lupa binocular (Zeiss Stemi SV8, Alemania) se cuantificó el número de esporas que evidenciaron núcleos en su interior como un estimador de viabilidad (<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/51>).

Se calculó la abundancia de esporas como un indicador de la capacidad de esporulación, expresando el n.º de esporas/100 g.

$$Ax = \frac{\text{nº de esporas de spx}}{100 \text{ g de suelo}}$$

### Potencial micorrícico

El suelo de tres localidades representativas del norte, sudeste y oeste de la provincia de Buenos Aires (Junín, Lobería y Trenque Lauquen, respectivamente), cada uno bajo manejo agrícola y prístino, fue utilizado para la determinación del potencial micorrícico. El suelo fue pasado por ta-

miz de 2 mm de malla, separando los restos vegetales. Parte del suelo fue procesado para erradicar los propágulos viables de HMA con el agregado de 10 µl de formaldehído/g suelo<sup>10</sup>. Se instalaron 6 series experimentales (3 localidades × 2 manejos) en macetas de 100 ml; cada una consistió en un sistema de diluciones decimales seriadas<sup>5</sup> compuestas por mezclas del suelo nativo y suelo desinfectado de HMA empleando 4 repeticiones por dilución.

Se sembraron plantas trampa con la metodología anteriormente indicada, las que fueron mantenidas en cámara de crecimiento. Luego de 10 semanas, las macetas fueron descalzadas y las raíces se procesaron para la observación de presencia-ausencia de colonización por HMA. El potencial micorrízico fue estimado como el número más probable (NMP) de propágulos micorrízicos/100 g suelo empleando las tablas de Alexander, para diluciones 10<sup>-1</sup> y sucesivas ( $p = 0,05$ )<sup>5</sup>.

### Eficiencia micorrízica

Para la selección de inóculos destinados a ser sometidos a un ensayo exploratorio de eficiencia, se consideraron las tres localidades donde se habían determinado todos los parámetros micotróficos (Junín, Lobería y Trenque Lauquen). La selección contempló que los suelos de los cuales provenían los inóculos pertenecieran a la misma localidad y exhibieran características edáficas contrastantes, especialmente en lo referido a P-Bray, MO, Fe y Zn. En este sentido, se seleccionaron los inóculos provenientes de Lobería bajo manejo agrícola (LA) y en condición prístina (LP). Para evaluar la eficiencia micorrízica, se montó un ensayo en cámara de crecimiento con macetas de 100 ml que fueron llenadas con un sustrato compuesto de suelo procesado con 10 µl formaldehído/g (para la erradicación de HMA) mezclado con perlita y vermiculita autoclavada, en proporción 2:1:1, respectivamente. Los tratamientos comprendieron 2 especies vegetales (maíz y tomate) y 3 tratamientos de inoculación, con 4 repeticiones por especie y tratamiento (total: 24 unidades experimentales): maíz inoculado con suelo-inóculo de Lobería agrícola o de Lobería prístino y maíz no inoculado; tomate inoculado con suelo-inóculo de Lobería agrícola o de Lobería prístino y tomate no inoculado. Las macetas fueron mantenidas en cámara de crecimiento y rotadas al azar semanalmente; las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada.

El inóculo utilizado consistió en un suelo-inóculo proveniente de los cultivos trampa realizados para determinar la capacidad micotrófica. Las raíces fueron cortadas en segmentos pequeños y mezclados con el suelo-inóculo, el que había sido previamente tamizado utilizando malla de 124 µm, a los efectos de eliminar las partículas de sustrato cuyo tamaño no se correspondería con propágulos de HMA. Esto fue confirmado bajo lupa binocular. Cada maceta de tratamiento con inoculación recibió 2 g del suelo-inóculo correspondiente.

Se sembraron dos semillas previamente desinfectadas por maceta (maíz: híbrido DK 670, tomate: Florensa N.º 143). Una vez germinadas, se realizó un raleo de plantas dejando solo una por maceta. Luego de la emergencia, los tratamientos no inoculados recibieron un filtrado bacteriano destinado a equilibrar la carga con los tratamientos ino-

culados. Para ello, 8 g de cada inóculo (LA y LP) fueron homogeneizados en 50 ml de agua destilada estéril mediante agitación durante 5 min en agitador magnético (Hanna Instruments HI 300N, EE. UU.). Luego se filtró (Whatman N.º 2) y se colectaron 40 ml de filtrado, que fueron distribuidos a razón de 5 ml en cada maceta no inoculada<sup>29</sup>.

Se colectó el material vegetal de las plantas de maíz y de tomate a 15 y 23 días después de la siembra (DDS), respectivamente. En ambos casos, la parte aérea fue separada de la radical y llevada a estufa a 60 °C durante 72 h. La cuantificación de la materia seca aérea (MSA) se realizó por gravimetría.

Para cada especie y tratamiento de inoculación se calculó la respuesta micorrízica (RM), parámetro considerado indicador de la eficiencia micorrízica, de acuerdo a la relación descrita por Cavagnaro *et al.*<sup>9</sup>

$$RM = \frac{MSAi - \text{media } MSAni}{\text{media } MSAni} \times 100$$

Donde MSAi corresponde al parámetro individual del peso seco de las plantas inoculadas con cada uno de los inóculos y la media MSAni corresponde al peso seco promedio de las plantas no inoculadas.

El material radical de cada tratamiento fue teñido con azul de tripán para la cuantificación microscópica del MA % y Ar % con la metodología anteriormente indicada.

### Análisis de los resultados

Los resultados fueron analizados por análisis de la varianza (ANOVA). Cuando las diferencias entre tratamientos fueron significativas, las medias fueron separadas utilizando la prueba estadística de diferencias mínimas significativas (DMS) ( $p < 0,05$ ). Se realizó el análisis de correlación lineal de Pearson y de componentes principales (PCA), este último utilizando el programa CANOCO<sup>39</sup>, relacionando los resultados de los análisis químicos de las muestras de suelo con los parámetros de capacidad micotrófica y abundancia de esporas de HMA.

## Resultados y discusión

### Muestras de suelo

Los resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de suelo evaluadas se presentan en la tabla 1, donde además, se señalan los valores promedio y desvíos estándar globales calculados para los manejos contrastantes, agrícola (A) y prístino (P). El rango de valores para algunas características fue amplio, como por ejemplo, el contenido de P-Bray, con diferencias de hasta 15 veces entre sitios, y en general, fue mayor para los sitios prístinos que para los agrícolas. Los contenidos de Zn y P-Bray presentaron una elevada variabilidad entre sitios, independientemente del manejo. El pH fue el parámetro que evidenció el menor cambio entre manejos de suelos. En general, los suelos bajo actividad agrícola exhibieron una disminución en la concentración de la mayoría de los nutrientes, a excepción del Mn y del Fe, pero





en algunos casos se observaron mayores niveles con el manejo agrícola. Este último efecto podría interpretarse por el menor pH observado bajo agricultura, con un incremento en la disponibilidad en condición de acidez<sup>24</sup>. De los micronutrientes analizados, el Zn fue el que disminuyó más marcadamente por la agricultura. Por otra parte, también la MO del suelo disminuyó por el uso agrícola, lo que evidenció un balance de carbono negativo.

### Capacidad micotrófica

En todas las localidades y bajo las distintas condiciones de manejo se comprobó la colonización micorrícica en la raíces de las planta trampa por observación de estructuras características de HMA en las células corticales de la raíz (figs. 1A, B y C). Al igual que en el trabajo de Nardini *et al.*<sup>26</sup>, también en este estudio se registró la presencia de hifas, arbuscúlos y vesículas de HMA. El porcentaje de infección varió de 4,8 % a 56,7 % entre localidades. El porcentaje de arbuscúlos llegó a un máximo de 35 % en Carlos Casares, mientras que en la localidad de Madariaga bajo manejo prístino no se observó presencia de arbuscúlos en las plantas trampa (tabla 2).

El análisis estadístico evidenció interacciones localidad × manejo para los parámetros de capacidad micotrófica (datos no mostrados). Por esta razón se analizaron las diferencias entre manejos para cada localidad, así como entre localidades para cada uno de los manejos. El MA % varió significativamente entre manejos solo en 2 de las 7 localidades evaluadas: en un caso (Benito Juárez) fue mayor en el prístino y en otro (Junín) fue mayor en el agrícola (tabla 2). Se detectaron

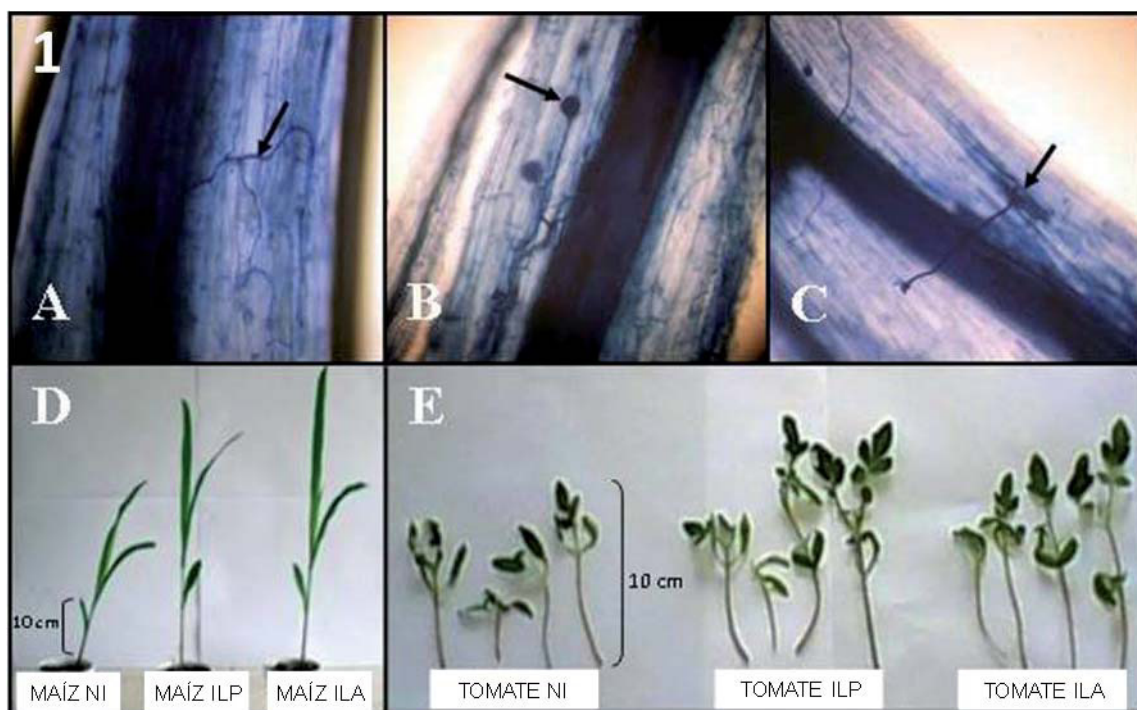
diferencias significativas en el porcentaje de arbuscúlos (Ar %) solo en la localidad de Carlos Casares, cuyas plantas trampa cultivadas en suelo colectado bajo manejo agrícola presentaron un mayor contenido de arbuscúlos en sus raíces. En algunos casos (Carlos Casares y Lobería bajo manejo agrícola), la mayor capacidad micotrófica se correspondió con el menor contenido de P-Bray del sitio agrícola evaluado, comparando los dos manejos. Sin embargo, esto no ocurrió en todas las situaciones. Es probable entonces que las diferencias de colonización se deban, además, a otras características del sustrato no consideradas en este estudio.

Al separar por manejo de suelo, tampoco se obtuvo un patrón uniforme en todas las localidades. Lobería presentó mayor capacidad micotrófica tanto para la situación agrícola como para la prístina, mientras que Benito Juárez y Carlos Casares lo hicieron para la situación agrícola y prístina, respectivamente. Parte de nuestros resultados confirman lo comunicado por Covacevich *et al.*<sup>13</sup> para muestras de otros sitios colectados en las localidades de Benito Juárez (A), Coronel Dorrego (A), Junín (A) y Trenque Lauquen (P).

Nuestros resultados constituyen la primera comunicación de la capacidad micotrófica por HMA nativos en la localidad de Madariaga.

### Capacidad de esporulación

No se obtuvieron esporas nucleadas a partir de las muestras de suelo colectadas directamente del campo (datos no mostrados). Troeh y Loynachan<sup>41</sup> informaron resultados similares, con recuentos bajos (< 1 espóra/g suelo) en muestras colectadas en diferentes sitios agrícolas de Iowa, EE. UU.



**Figura 1** Panel superior: Las flechas detallan el reconocimiento de hifa (A), de vesícula (B) y de arbuscúlo (C) de HMA en raíz de raigrás (40X) por tinción de Phillips y Hayman modificada, según se describe en Materiales y métodos. Panel inferior: Crecimiento diferencial asociado a la inoculación en plantas de maíz (D) y de tomate (E). NI: no inoculado; ILA: inóculo proveniente de Lobería agrícola; ILP: inóculo proveniente de Lobería prístino.

**Tabla 2** Indicadores de capacidad micotrófica y de esporulación y del potencial micorrícico de los suelos a partir de los resultados obtenidos empleando raigrás como planta hospedadora

Localidad	Manejo	MA % <sup>a</sup>	Ar % <sup>a</sup>	Abundancia de esporas (n.º esporas/100 g sustrato)	Potencial micorrícico (NMP propágulos HMA/100 g suelo)
Benito Juárez	A	26,7 Bb`	13,3 Ab`	180	Nd
	P	53,9 Aa	22,2 Aa	518	Nd
Carlos Casares	A	56,7 Aa`	35,0 Aa`	370	Nd
	P	23,9 Ab	11,7 Bb	1175	Nd
Coronel Dorrego	A	20,6 Ab`	14,4 Ab`	325	Nd
	P	22,8 Ab	10,6 Abc	358	Nd
Junín	A	20,6 Ab`	5,2 Abc`	130	19
	P	6,7 Bc	0,6 Acd	163	3,4
Lobería	A	42,5 Aa`	27,5 Aa`	320	28
	P	47,9 Aa	25,4 Aa	900	36
Madariaga	A	16,7 Abc`	7,8 Abc`	163	Nd
	P	7,5 Ac	0,0 Ad	530	Nd
Trenque Lauquen	A	4,8 Ac`	1,4 Ac`	120	34
	P	14,3 Abc	3,1 Abcd	80	28

A: agrícola, P: prístino.

MA %: porcentaje de colonización micorrícica (infección total), calculado según se indica en Materiales y métodos.

Ar %: porcentaje de arbuscúlos, calculado según se indica en Materiales y métodos.

Nd: no determinado.

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre manejos contrastantes para la localidad ( $p < 0,05$ ); letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre localidades para cada manejo ( $p < 0,05$ ); letra con apóstrofe: agrícola; letra sin apóstrofe: prístino.

En nuestro trabajo, si bien el número de esporas a campo fue bajo, la capacidad micotrófica de las plantas trampa fue elevada. Es probable, entonces, que los propágulos micorrícicos en las muestras de suelo fueran principalmente segmentos de hifas y raíces colonizadas, más que esporas.

La abundancia de esporas de HMA en el sustrato donde crecieron las plantas trampa se mantuvo en el rango de 80-1175 esporas/100 g (tabla 2). Lugo y Cabello<sup>21</sup> observaron valores similares (50 a 2000 esporas/100 g) en muestras de suelo del sur de Córdoba, Argentina. Sin embargo, estos resultados son menores que los obtenidos por Zangaro *et al.*<sup>42</sup>, quienes obtuvieron valores entre 4000 y 8000 esporas/100 g suelo. Las diferencias mencionadas podrían atribuirse, en parte, a la disparidad de los biomas en estudio. Mientras que en este trabajo se analizaron suelos con aptitud agrícola, Lugo y Cabello examinaron suelos provenientes de praderas de gramíneas del centro de Argentina, y que Zangaro *et al.* estudiaron suelos de ambientes de bosque del sur de Brasil. Otra posibilidad es que se requieran más de 10 semanas de multiplicación para la producción de esporas de todos los propágulos viables<sup>31</sup>.

En 6 de las 7 localidades evaluadas, se registró mayor abundancia de esporas en suelos prístinos que en los agrícolas (tabla 2). Particularmente en Benito Juárez, Carlos Casares, Lobería y Madariaga, la abundancia de esporas en los sitios prístinos triplicó a la registrada en los agrícolas. En Coronel Dorrego, la abundancia de esporas fue similar entre

ambas condiciones y en Trenque Lauquen fue levemente superior en el sitio agrícola. En todos los casos, la abundancia de esporas fue el parámetro más elevado de propágulos capaces de formar micorrizas; y se encontraron muestras (Carlos Casares y Madariaga con manejo prístino) en las que, aun habiéndose observado abundancia de esporas, se obtuvieron valores bajos de colonización micorrícica. La correlación entre la abundancia de esporas y la colonización micorrícica fue baja ( $r = 0,37$ ) y sin significancia estadística ( $p = 0,197$ ). Esto coincide con lo comunicado en Argentina por Becerra *et al.*<sup>3</sup>, quienes tampoco encontraron correlación entre el número de esporas y la colonización micorrícica. Esto puede deberse a que las hifas se desarrollan más rápido que las esporas, acelerando la infección en mayor grado que si esta proviniera de su germinación. Tommerup<sup>40</sup> demostró que la germinación desaparece de las esporas podría estar relacionada con la dormición que presentan desde su formación, la que varía entre especies de HMA. Por ejemplo, para *Glomus caledonium* y *Glomus monosporum*, el período de dormancia fue de 6 semanas en suelos húmedos y de 5 semanas en suelos secos. Para *Gigaspora calospora*, fue de 12 y 6 semanas en suelos húmedos y secos, respectivamente; mientras que para *Acaulospora laevis*, en todas las condiciones de suelo se obtuvieron períodos de dormancia que alcanzaron los 6 meses.

Luego del período de dormición, bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, las esporas podrían ser

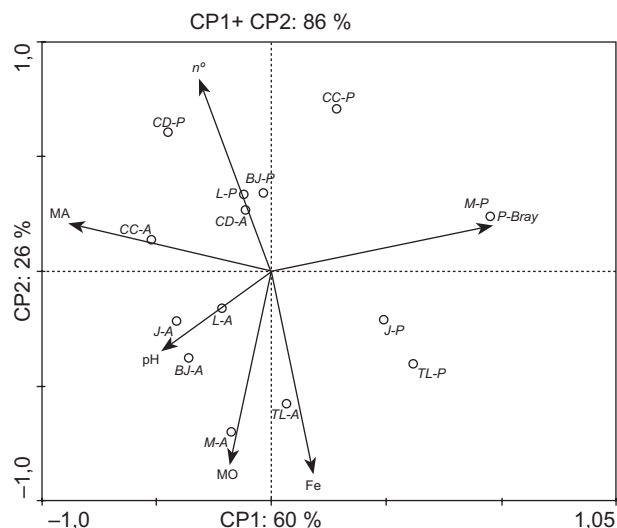


capaces de germinar rápidamente y de forma sincronizada. En nuestro caso, es posible entonces que al momento de realizar el recuento, gran parte de las esporas se encontraran en período de dormancia, por lo que no habrían contribuido a la colonización micorrícica a las 10 semanas de instaladas las plantas trampa. La instalación de los cultivos trampa permitió aumentar el número de esporas recolectadas en comparación con el suelo proveniente del campo, donde no se pudieron recolectar esporas nucleadas. Esto coincide con lo comunicado por Troeh y Loynachan<sup>41</sup>, quienes utilizando cultivos trampa observaron no solo aumentos en la abundancia de esporas, sino también aumentos en la colonización por HMA. Es probable entonces que los propágulos micorrícicos de los suelos utilizados en este estudio consistieran en segmentos de hifas y raíces colonizadas, más que en esporas. Asimismo, es probable también que las esporas generadas en los cultivos trampa hayan provenido de las hifas activas de los HMA que colonizaron las plantas trampa.

La formación de esporas es una de las fases del ciclo de los hongos micorrícicos que daría cuenta de su llegada a la madurez<sup>7</sup>. En general, la esporulación puede ocurrir entre la 4.<sup>a</sup> y la 8.<sup>a</sup> semana de iniciada la micorrización bajo la mayoría de las condiciones<sup>31</sup>, excepto bajo elevados contenidos de P, lo que puede inhibir la formación de micorrizas<sup>12,17</sup>. En este ensayo las determinaciones se realizaron a la 10.<sup>a</sup> semana de crecimiento. Por dicha razón, se considera que el tiempo que permanecieron las raíces de las plantas trampa en contacto con los propágulos nativos fue suficiente para permitir el establecimiento y la estabilización de la colonización micorrícica.

Si bien se realizaron análisis de correlación lineal de Pearson, no se obtuvieron asociaciones significativas entre los parámetros fisicoquímicos y los micorrícicos en los suelos estudiados (datos no mostrados).

El análisis de componentes principales (PCA) basado en las características químicas de los suelos, la capacidad micorrífica y la abundancia de esporas de las plantas trampa que crecieron en dichos sustratos permitió separar los sitios de estudio según su manejo (fig. 2). El análisis explicó el 86 % de la variabilidad total en los dos primeros componentes, con un 60 % de la varianza explicada por el componente principal 1 (CP1, eje horizontal). Asimismo, el CP1 muestra una asociación positiva (a la derecha) con el contenido de Fe y P-Bray, explicada principalmente por los suelos de los sitios prístinos. En oposición (a la izquierda), se proyectan negativamente el parámetro de micorrización (MA %) junto con el n.º de esporas (n.º). De esta manera, el CP1 sintetizó el manejo del suelo separando casi en su totalidad los sitios bajo agricultura de los prístinos. El CP2 (vertical) explicó aproximadamente el 26 % de la variabilidad y mostró proximidad entre el MA % y el n.º de esporas con el pH del suelo y el contenido de materia orgánica (MO). En general, las relaciones entre la capacidad micorrífica y las propiedades del suelo mostraron que solo algunas propiedades tuvieron influencia sobre la infectividad de los HMA. En este sentido, se evidenció asociación negativa (flechas opuestas) entre MA % y P-Bray, y entre el número de esporas con el contenido de Fe. Estos resultados confirman los obtenidos por Covacevich *et al.*<sup>13</sup> en suelos de sistemas productivos de la provincia de Buenos Aires, donde la capacidad de formar



**Figura 2** Análisis de componentes principales (PCA) basado en las características químicas de los suelos colectados bajo manejo agrícola (A) o prístino (P) en relación con la capacidad micorrífica (MA = colonización micorrícica) y la abundancia de esporas (n.º) determinada en los cultivos trampa. BJ: Benito Juárez; CC: Carlos Casares; CD: Coronel Dorrego; J: Junín; L: Lobería; M: Madariaga; TL: Trenque Lauquen.

micorrizas de los HMA nativos se asoció principalmente con la disponibilidad de P y Fe, y no con el manejo agrícola de los suelos. De igual manera, estos resultados coinciden con lo publicado por Covacevich *et al.*<sup>12,14</sup> y Siddiqui *et al.*<sup>36</sup>, al evidenciar que el P disponible en el suelo se asocia negativamente con la formación de micorrizas. Sin embargo, estos resultados no coinciden con lo comunicado por Djuuna *et al.*<sup>16</sup> para suelos de Australia, quienes no encontraron relación entre la capacidad micorrífica y el contenido de P en el suelo. Según estos autores, solo la elevación de los sitios y el C orgánico (parámetro que en ocasiones presentó resultados contradictorios) parecieron modular el grado de micorrización. En nuestro estudio, todas las muestras fueron colectadas de sitios con similar pendiente, y si bien la MO se asoció con la capacidad infectiva, no se evidenciaron efectos moduladores tan fuertes como los del contenido de P o Fe. En nuestro conocimiento, no hay reportes disponibles sobre la relación entre el contenido de Fe en el suelo y la capacidad de esporulación. En este sentido, cabe destacar que la asociación negativa entre el contenido de Fe en el suelo y la abundancia de esporas de HMA podría considerarse una evidencia de efectos del nutriente sobre los HMA, y constituiría esta la primera comunicación puntualmente referida a suelos de la provincia de Buenos Aires.

### Potencial micorrícico

Las muestras seleccionadas provinieron del norte, oeste y sudeste de la provincia de Buenos Aires. Los valores más altos de NMP de propágulos capaces de formar micorrizas en los suelos se registraron en Lobería suelo prístino y en Trenque Lauquen manejo agrícola (tabla 2). En contraste,

los suelos de Junín, tanto bajo manejo agrícola como prístino, presentaron el menor potencial micorrícico. Estos valores fueron menores que los informados por Covacevich *et al.*<sup>14</sup>, en donde estos se mantuvieron en el rango de 700 a 1400 propágulos/100 g en suelos de pasturas del sudeste de la provincia de Buenos Aires. Si bien los ambientes no serían comparables, nuestros resultados serían similares a los obtenidos por Silva *et al.*<sup>37</sup> en suelos de Brasil (entre 1,1 y 36 propágulos/100 g suelo).

Las correlaciones entre la abundancia de esporas y el potencial micorrícico así como entre este último y la capacidad micotrófica fueron bajas ( $r = 0,44$   $p = 0,378$  y  $r = 0,46$   $p = 0,356$ , respectivamente) y no estadísticamente significativas. Estos resultados no fueron los esperados y contradicen lo que refieren algunas publicaciones. Azcón-Aguilar *et al.*<sup>2</sup> mencionaron que el número de esporas correlacionó positiva y significativamente con el potencial micorrícico de suelos del sudeste de España. En nuestro estudio, las muestras colectadas en Trenque Lauquen, particularmente en situación prístina, aun cuando evidenciaron elevado potencial micorrícico, presentaron una baja capacidad micotrófica y abundancia de esporas en los cultivos trampa (tabla 2). Si bien el elevado contenido del P-Bray en dicho sitio, con más de 200 mg/kg en situación prístina, podría haber afectado negativamente la capacidad micotrófica y la esporulación, también se hubiera esperado un efecto similar para el potencial micorrícico. Se desconocen las causas de esta discordancia; deberían dirigirse futuros estudios a dilucidar este aspecto.

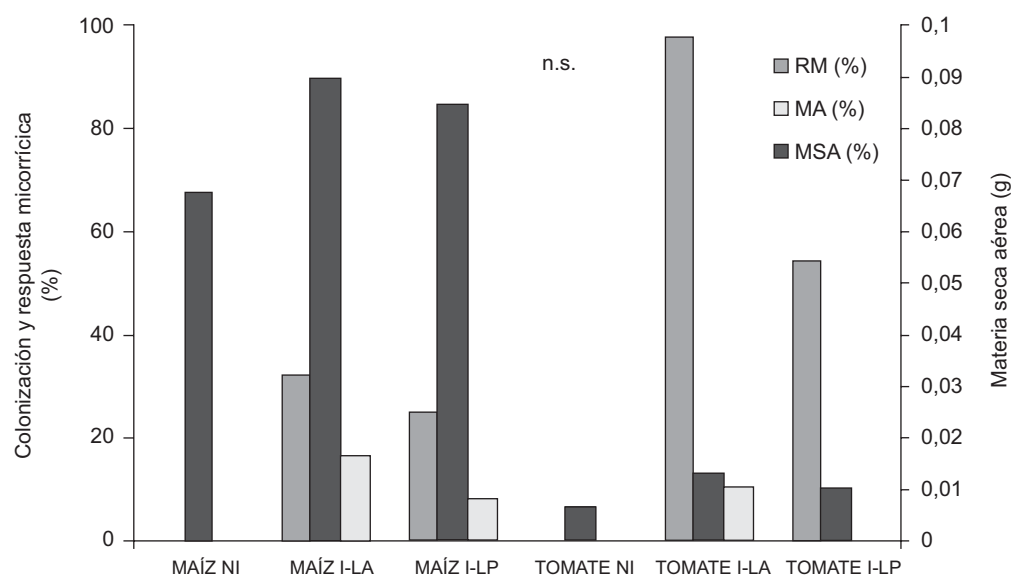
La abundancia de esporas cuantificada en los suelos de las plantas trampa fue siempre mayor que el potencial micorrícico. Lo mismo fue comunicado por Silva *et al.*<sup>37</sup>, en su estudio de suelos provenientes de Brasil. Esto puede deberse, por un lado, a que las esporas son estructuras más resistentes que otros tipos de propágulos y podrían permanecer por más tiempo en el suelo si se compara con las hifas o los

restos vegetales micorrizados. Por otra parte, podría haberse incurrido en una sobreestimación de este parámetro, dado que en ocasiones, esporas con núcleos visibles pueden no germinar (<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/51>). Asimismo, tal vez las esporas se encontraban en estado de dormancia, por lo que quizá no pudieron formar micorrizas dentro de las 10 semanas de establecidas las plantas trampa.

### Eficiencia micorrícica

Las muestras provenientes de Lobería registraron alto potencial micorrícico y capacidad micotrófica en las plantas trampa, y abundancia intermedia-alta de esporas en comparación con Junín y Trenque Lauquen, donde se observaron menores valores para todos los parámetros mencionados (tabla 2). El suelo-inóculo seleccionado de Lobería permitió un mayor crecimiento de las plantas de maíz, a juzgar visualmente (fig. 1D), y si bien se registraron incrementos de MSA por la inoculación, estos no fueron estadísticamente significativos. La mayor RM se registró en las plantas inoculadas con suelo de LA: 32 %, en comparación con las inoculadas con suelo de LP: 25 % (fig. 3). Como era de esperar, las plantas no inoculadas no evidenciaron colonización micorrícica, mientras que la mayor capacidad micotrófica en plantas de maíz se registró por la inoculación con suelo de LA (tabla 3).

De manera similar a lo mencionado para maíz, también se observaron diferencias visuales por la inoculación en tomate (fig. 1E). Aun así, las diferencias en producción de MSA fueron estadísticamente no significativas, a pesar de que se registraron algunos incrementos en la producción de MSA, que representaron una RM superior al 90 % y 50 % para las plantas inoculadas con suelo de LA y LP, respectivamente (fig. 3). De manera similar a lo mencionado en el caso del maíz, no se registró evidencia de colonización micorrícica



**Figura 3** Producción de materia seca aérea (MSA), colonización micorrícica (MA) y respuesta micorrícica (RM) de plantas de maíz y tomate a los 15 y 23 DDS, respectivamente, en función de la inoculación. NI: no inoculado, I-LA: inoculado con inóculo proveniente de Lobería agrícola; I-LP: inoculado con inóculo proveniente de Lobería prístino. n.s.: no significativo ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 3** Capacidad micotrófica en plantas de maíz y de tomate en función de la inoculación

Inoculación	MA % maíz <sup>a</sup>	MA % tomate <sup>a</sup>
NI	0 b	0 b
I-LA	16,4 a	10,5 a
I-LP	8,2 b	3,4 b

NI: control no inoculado, I-LA: inoculado Lobería agrícola, I-LP: inoculado Lobería prístino.  
MA %: porcentaje de colonización micorrícica (infección total).

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de inoculación para esa especie vegetal ( $p < 0,05$ ).

en las plantas no inoculadas, Aun cuando la capacidad micotrófica fue baja para ambos tratamientos inoculados, independientemente del manejo previo, fue mayor en las plantas inoculadas con LA (tabla 3).

Las RM positivas por la inoculación con HMA en maíz serían coincidentes con lo que informa Astiz Imaz<sup>1</sup>, quien tampoco obtuvo incrementos de crecimiento estadísticamente significativos. En su estudio, Astiz Imaz<sup>1</sup> también observó respuestas micorrícicas positivas en plantas de maíz a los 45 DDS por la inoculación con HMA provenientes de dos localidades de la provincia de Buenos Aires: Lobería, con otros inóculos diferentes de los utilizados en este estudio, y Coronel Dorrego.

En algunos trabajos realizados en el extranjero también se hallaron efectos positivos por la inoculación con HMA<sup>27,38</sup>. Sin embargo, algunas publicaciones son contradictorias. Blanco y Gutiérrez<sup>6</sup> encontraron respuesta negativa en maíz a los 48 DDS por la inoculación con HMA provenientes de un ecosistema nativo de Costa Rica (34 mg P/kg, 223 mg Fe/kg, 6,10 % MO y textura arcillosa). Los citados autores han atribuido la falta de respuesta a la inoculación tanto a un desbalance entre K, N y P en el sustrato de crecimiento (lo que podría haber provocado una disminución del efecto de las micorrizas) como a la baja efectividad de los HMA nativos utilizados como inoculantes.

Las RM positivas en la producción de biomasa de tomate por la inoculación con HMA obtenidas en este estudio serían similares a las obtenidas por Mujica Pérez y Fuentes Martino<sup>25</sup>, quienes obtuvieron en esta especie efectos positivos, aunque no significativos, por la inoculación con HMA. Además, Subramanian *et al.*<sup>38</sup> informaron que plantas de tomate inoculadas presentaban mayor altura que las no inoculadas, independientemente de la condición de humedad del suelo; sin embargo, la RM fue mayor en los tratamientos sometidos a sequía grave.

En este trabajo, si bien los incrementos de crecimiento debido a la inoculación fueron no significativos, las dos especies mostraron un valor de RM positivo, alcanzando valores del 95 % de MSA en tomate. Tanto con maíz como con tomate, la mayor RM se obtuvo por la inoculación con los inóculos provenientes de LA. Estos inóculos, provenientes de suelos con elevados contenidos de MO y Fe y con moderados niveles

de P-Bray, fueron los que presentaron mayor capacidad micotrófica, intermedio-alto potencial micorrícico y abundancia de esporas. Asimismo, la mayor micorrización en maíz y tomate se registró por la inoculación con el suelo-inóculo proveniente de LA. Si bien la micorrización fue baja (probablemente a consecuencia del corto tiempo de exposición de las plantas a los inóculos -menos de 30 días-), se obtuvieron incrementos de crecimiento no significativos, en correspondencia con la aún incipiente micorrización.

## Conclusiones

El manejo de uso del suelo (agrícola y prístino) no afectó a los parámetros de micorrización evaluados (capacidad micotrófica, potencial micorrícico y abundancia de esporas). Asimismo, los elevados contenidos de P y Fe en el suelo se manifestaron como depresores de la capacidad micotrófica y de esporulación en asociación con plantas-trampa de raigrás.

La inoculación con consorcios microbianos (con HMA) nativos de Lobería provenientes de lotes bajo manejo agrícola llevó a una RM positiva en maíz y tomate. Los experimentos fueron exploratorios, pero los resultados sugieren que los bajos incrementos de crecimiento serían consecuencia de una simbiosis micorrícica incipiente. La mayor eficiencia del inóculo proveniente del sitio agrícola es un hallazgo novedoso, en tal sentido deberían encararse futuros estudios orientados a establecer los mecanismos involucrados.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con fondos de los proyectos PIP 1142010010025201, AERN 295582; AGR 400/12 y PICT2011-1413. Thougnon Islas agradece a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por la beca BENTR12 otorgada durante el desarrollo del presente trabajo y al Dr. Mondino por su asistencia en el análisis estadístico de componentes principales.

## Bibliografía

1. Astiz Imaz P, Barbieri PA, Echeverría HE, Sainz Rozas HR, Covacevich F. Indigenous mycorrhizal fungi from Argentina increase Zn nutrition of maize modulated by Zn fertilization. *Soil Environm.* 2014; En Prensa, disponible en <http://www.se.org.pk/Papers.aspx>
2. Azcón-Aguilar C, Palenzuela J, Roldán A, Bautista S, Vallejo R, Barea JM. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Appl Soil Ecol.* 2003;22:29-37.
3. Becerra A, Cabello M, Bartolini N, Zac MR. Arbuscular mycorrhizae of dominant plant species in Yungas forests, Argentina. *Mycologia.* 2009;101:612-21.

4. Bingham FT, Boron. En: Page AL, editor. Methods of soils analysis, part 2, chemical and microbiological properties, agronomy monograph. 2.<sup>a</sup> ed. Madison (WI), ASA-SSSA; 1982. p. 431-47.
5. Black, CA, Evans DD, Ensminger LE, White JL, Clark FE, editores. Methods of soil analysis, part 2. Agron Monogr 9, ASA-SSSA. Madison (WI), 1965. p. 801.
6. Blanco F, Gutiérrez R. Efecto de la *Mucuna* sp. en la composición de la comunidad de HMA del suelo y en la respuesta del maíz a la inoculación con HMA. Agron Costarricense. 1998;22: 153-61.
7. Bonfante P, Genre A. Mechanisms underlying beneficial plant - fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nat Commun. 2010;1:48.
8. Brundrett MC. Mycorrhizal associations: The Web Resource. 2008 [en línea; consultado Dic 2012]. Disponible en: <http://mycorrhizas.info/method.html>
9. Cavagnaro TR, Smith FA, Ayling SM, Smith SE. Growth and phosphorous nutrition of a Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytol. 2003;157:127-34.
10. Covacevich F, Echeverría HE. Utilización de formaldehído para la erradicación de hongos micorrícicos arbusculares de muestras de suelo. Cienc suelo. 2003;21:9-17.
11. Covacevich F, Echeverría HE. Caracterización química y biológica de un Hapludol bajo diferentes manejos. Cienc suelo. 2000;18:144-8.
12. Covacevich F, Echeverría HE, Aguirrezabal LAN. Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization into field and glasshouse-grown spring wheat in Argentina. Appl Soil Ecol. 2007;35:1-9.
13. Covacevich F, Eyherabide M, Sainz Rozas HR, Echeverría HE. Capacidad micorrícica arbuscular y características químicas de suelos agrícolas y prístinos de Buenos Aires (Argentina). Cienc suelo. 2012;30:119-28.
14. Covacevich F, Marino MA, Echeverría HE. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass in a moderately acidic Argentinean soil. Eur J Soil Biol. 2006;42:127-38.
15. Diehl P, Fontenla SB. Arbuscular mycorrhizal infection in two morphological root types of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. Rev Argent Microbiol. 2010;42:133-7.
16. Djuuna IAF, Abbott LK, Van Niel K. Predicting infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi from soil variables using generalized additive models and generalized linear models. Biodiversitas. 2010;11:145-50.
17. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM). 2011 [en línea; consultado May 2012] <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/concepts/lifecycle.htm>
18. Jakobsen I. Research approaches to study the functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the field. Plant Soil. 1994;159:141-7.
19. Kivlin SN, Hawkes CV, Treseder KK. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem. 2011;43:2294-303.
20. Lindsay WL, Norwell WA. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci Soc Am J. 1978;42:421-8.
21. Lugo M, Cabello M. Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. Mycología. 2002;94:579-86.
22. Miransari M. Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake. Arch Microbiol. 2011;193:77-81.
23. Morte A, Honrubia M. Growth response of *Phoenix canariensis* Hort. et Chabaud to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. Palms. 2002;46:76-80.
24. Mortvedt JJ, editor. Micronutrients in Agriculture, 2nd. edition. Soil Science Society of America book series N.º 4. Madison, Wisconsin, USA; 1991. p. 760.
25. Mujica Pérez Y, Fuentes Martínez AG. Efecto a la biofertilización con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en el cultivo del tomate en condiciones de estrés abiótico. Cultivos tropicales [en línea]. 2012;33:40-6.
26. Nardini CB, Di Salvo LP, García De Salamone IE. Micorrizas arbusculares: asociaciones simbióticas e indicadores de calidad ambiental en sistemas de cultivos extensivos. Rev Argent Microbiol. 2011;43:311.
27. Ortas I, Akpinar C. Response of maize genotypes to several mycorrhizal inoculums in terms of plant growth, nutrient uptake and spore production. J Plant Nutr. 2011;34:970-87.
28. Phillips JM, Hayman DS. Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. T Brit Mycol Soc. 1970;55:158-61.
29. Püschel D, Rydlová J, Vosátka M. The development of arbuscular mycorrhiza in two simulated stages of spoil-bank succession. Appl Soil Ecol. 2007;35:363-9.
30. Sainz Rozas H, Echeverría HE, Angelini HP. Niveles de materia orgánica y de pH en suelos agrícolas de la región pampeana y extrapampeana Argentina. Cienc suelo. 2011;29:29-37.
31. Schalamuk S, Cabello M. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on *Glomeromycota* diversity. Mycologia. 2010;102:261-8.
32. Schalamuk S, Cabello M. Effect of tillage systems on the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) propagule bank in soils. En: Arya A, Perelló AE, editores. Management of fungal plant pathogens. California, USA, MPG Books Group; 2010. p. 162-70.
33. Schalamuk S, Chidichimo H, Cabello M. Variaciones en la composición de especies de *Glomeromycota* (Fungi) en un cultivo de trigo bajo distintos sistemas de labranza. Bol Soc Argent Bot. 2007;42:45-53.
34. Schalamuk S, Velazquez S, Chidichimo H, Cabello M. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. Mycologia. 2006;98:16-22.
35. Schüßler A, Schwarzott WC. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. Mycol Res. 2001;105:1413-21.
36. Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K, editores. Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Dordrecht, The Netherlands, Springer; 2008. p. 362.
37. Silva GA, Maia LC, Silva FSB, Lima PCF. Potencial de infectividade de fungos micorrícicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. Rev Bras Bot. 2001;24:135-43 [en línea].
38. Subramanian KS, Tenshia V, Jayalakshmi K, Ramachandran V. Antioxidant enzyme activities in arbuscular mycorrhizal (*Glomus intraradices*) fungus inoculated and non-inoculated maize plants under zinc deficiency. Indian J Microbiol. 2011;51:37-43.
39. Ter Braak CJF. CANOCO-a FORTRAN program for canonical community ordination. Microcomputer Power. Ithaca, NY, 1987-1992. Programa computacional.
40. Tommerup IC. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. T Brit Mycol Soc. 1983;81:381-7.
41. Troeh ZI, Loynachan TE. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungal species in soils of cultivated soybean fields. Agron J. 2009;101:1453-62.
42. Zangaro W, Vergal Rostirola L, Bochi De Souza P, De Almeida Alves R, Azevedo Marques Lescano LE, Berbel Lírio Rondina A, Nogueira MA, Carrenho R. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. Mycorrhiza. 2012;23:221-33.