

ENCALADO EN SUELOS AGRICOLAS ACIDIFICADOS DE LA REGION PAMPEANA: EFECTO SOBRE ACTIVIDAD DE HONGOS MICORRIZICOS

BERNARDO MAÑANA¹; FERNANDA COVACEVICH^{2,3*};
HERNAN RENE SAINZ ROZAS^{1,3}; PABLO ANDRÉS
BARBIERI³; JACQUELINE GISELLE COMMATTEO³

Recibido: 19/9/2020

Recibido con revisiones: 22/12/2020

Aceptado: 22/12/2020

RESUMEN

Nuestro objetivo fue evaluar los cambios en la abundancia y actividad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en respuesta al agregado de calcita como corrector de pH. Se testearon tres dosis de calcita (0, 2000 y 6000 kg ha⁻¹) aplicadas en Molisoles con pH subácidos ubicados en French y Gardey (Provincia de Buenos Aires) con rotaciones de trigo o cebada/soja-maíz-soja. Se colectaron muestras de suelo previo al inicio del ensayo y dos años después del encalado (2017) cuando las parcelas se encontraban en barbecho (M1, abril) y con cultivo (M2, noviembre, con trigo en estado vegetativo-prefloración en Gardey y soja en estado vegetativo en French). La aplicación de calcita incrementó el pH del suelo en ambos sitios, en French el pH fue de 6,04; 6,34 y 6,70; mientras que para Gardey fue de 5,51; 5,74; y 5,97, para las dosis de 0, 2000 y 6000 Kg ha⁻¹, respectivamente. La aplicación de calcita favoreció la actividad de HMA asociada a la esporulación, aunque no afectó el contenido de la glomalina fácilmente extraíble y total. La mayor extracción de glomalina total se logró utilizando pirofosfato de sodio como extractante, en relación al citrato de sodio (ambos en concentración 50 mM). La aplicación de dosis 2000 kg calcita ha⁻¹ favoreció la colonización micorrízica espontánea (de 21 a 24%) en las raíces de los cultivos. Los resultados obtenidos sugieren que el encalado con 2000 kg calcita ha⁻¹ podría ser recomendado como corrector de pH en suelos sub ácidos de la región, contribuyendo además a favorecer la abundancia y actividad de HMA, micro-organismos reconocidos como promotores de crecimiento vegetal y que favorecen la estructura y calidad del suelo.

Palabras clave: micorriza, calcita, pH.

LIMING IN ACIDIFIED AGRICULTURAL SOILS OF THE PAMPEAN REGION: EFFECT ON ACTIVITY OF MYCORRHIZAL FUNGI

ABSTRACT

Our objective was to evaluate changes in the abundance and activity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in response to the addition of calcite as a pH corrector. Three doses of calcite (0, 2000 and 6000 Kg ha⁻¹) were applied in Mollisols of subacid pH from in French and Gardey (Buenos Aires Province) with rotations of wheat or barley / soybean-corn-soybean. Soil samples were collected prior to the start of the experiment and two years

¹ Facultad de Ciencias Agrarias-UNMDP. Balcarce.

² Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Fundación para las Investigaciones Biológicas Aplicadas (INBIOTEC-CONICET y FIBA, Mar del Plata).

³ Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS, CONICET-INTA, Balcarce).

*Autor de contacto: covacevich.fernanda@inta.gob.ar



after liming (2017) when the plots were fallow (M1, April), and in plots with crops (M2, November, vegetative pre-flowering wheat in Gardey and vegetative soybeans in French). Calcite application raised soil pH (for the doses of 0, 2000 and 6000 Kg ha⁻¹ on French pH was 6.04; 6.34 and 6.70; while for Gardey it was 5.51; 5.74; and 5.97, respectively). Calcite application favored AMF activity associated with sporulation, although it did not affect the content of easily removable and total soil glomalin. Higher total glomalin extraction was attained with the sodium pyrophosphate extractant in relation to sodium citrate one (both in 50 mM concentration). The application of a 2000 kg dose of calcite ha⁻¹ favored spontaneous mycorrhizal colonization (from 21 to 24%) of crops roots. Obtained results suggest that liming with 2000 kg calcite ha⁻¹ could be recommended as a pH corrector in sub-acid soils of the region, also contributing to favor the abundance and activity of AMF, microorganisms recognized as plant growth promoters and that favor the structure and quality of the soil.

Keywords: *mycorrhizae, calcite, pH*

INTRODUCCIÓN

En la Argentina, la adopción de sistemas de labranza cero, aumento de la cantidad de fertilizantes comerciales, variedades de cultivos con alto potencial de rendimiento y resistentes a herbicidas, entre otros (Andrade *et al.*, 2016), favoreció un rápido incremento de los cultivos de soja, trigo y maíz, en los últimos 20 años (MAGyP, 2019). Esto ha ocurrido, en parte por la expansión de las áreas cultivadas hacia áreas destinadas originalmente para la producción ganadera en la región pampeana (RP), y en ecosistemas forestales naturales en la región norte (Piastrellini, 2016).

Juntamente con el incremento de la explotación agrícola y agregados de insumos, en la última década se ha evidenciado acidificación de los suelos de la RP. En agroecosistemas, la acidificación edáfica puede ocurrir por la exportación de bases en los granos y por el uso de fertilizantes que generan acidez (urea (CH₄N₂O), fosfato diamónico ((NH₄)₂HPO₄), fosfato monoamónico (NH₄H₂PO₄) y nitrato de amonio (NO₃NH₄)) (Vázquez & Pagani, 2015). Se considera que a pH menores que 6 la actividad biológica de

bacterias y fauna edáfica se ralentiza, afectándose procesos de mineralización (Curtin *et al.*, 1998), nitrificación (Anthonisen *et al.*, 1976), entre otros. Sainz Rozas *et al.* (2019) reportaron disminuciones de pH en suelos agrícolas la zona norte de Buenos Aires y sur de Santa Fe (llegando a valores de 5,5-5,8). De continuar la tendencia de acidificación, podría verse limitado el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Vázquez & Pagani, 2015), por lo que la aplicación de correctores de acidez en áreas críticas comienza a ser una estrategia a considerar.

La aplicación de productos tales como carbonatos, óxidos, hidróxidos, y silicatos de calcio y/o magnesio se denomina encalado y permite aumentar el pH de los suelos, mejorando la disponibilidad de nutrientes y la actividad microbiana (USDA, 1999). Uno de los materiales más utilizados es la calcita (CaCO₃), cuando ésta se aplica al suelo, reacciona con el H⁺ y el agua produciendo CO₂ y agua, a su vez, el Ca desplaza al H⁺ del complejo de intercambio disminuyendo la acidez intercambiable (Vázquez & Pagani, 2015). Machetti *et al.* (2019) determinaron que el encalado con dolomita en



sistemas agrícolas acidificados de la provincia de Buenos Aires y Santa Fe incrementó, en general, el pH, mejorando propiedades físicas y rendimiento.

Una estrategia biológica para favorecer la absorción de nutrientes poco móviles tales como el P, Zn^{+2} , cobre (Cu^{+2}) y Mo^{+2} es a través de la formación de micorrizas, simbiosis que se establece espontáneamente entre los hongos micorrízico arbusculares (HMA, Phylum Glomeromycota) y las raíces de las plantas. El micelio extra-radical de los HMA (que puede extenderse entre 80 y 3000 cm más allá de las raíces) contribuye a la absorción y posterior translocación de los nutrientes hacia el plasmalema de las células corticales de la raíz (con consecuencias favorables sobre el crecimiento de las plantas), en los arbusculos, estructura donde se establece el intercambio íntimo de fotosintatos y nutrientes entre ambos simbiontes (Pepe *et al.*, 2018). Además, los HMA producen y liberan al suelo una glicoproteína cementante de los agregados estables al agua denominada glomalina la cual pasa a formar parte de la materia orgánica (MO) edáfica (Rillig *et al.*, 2002), por lo que ha sido asociada al mantenimiento de la estructura del suelo así como al secuestro de carbono (C). La glomalina muestra un comportamiento recalcitrante y características hidrofóbicas, que evitan la pérdida de agua y nutrientes de las hifas; por tanto, es una biomolécula muy estable, con una vida media en el suelo de entre 6 y 42 años (Wu *et al.*, 2013).

Existen controversias en cuál es la metodología que revela con mayor exactitud la abundancia de glomalina edáfica. Una

metodología de detección-cuantificación utiliza un anticuerpo monoclonal específico para glomalina mediante ELISA (por sus siglas en inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”); sin embargo, esta metodología tiene un costo elevado y por lo tanto no es implementada para uso de rutina en laboratorio. La glomalina presenta diferente labilidad frente a extractantes químicos y procesos de alta temperatura (Reyna & Wall, 2014). Por ello, dependiendo de la concentración de extractante y ciclos de autoclavado, puede cuantificarse por espectrofotometría una fracción de las proteínas relacionadas con la glomalina (GRSP) fácilmente extraíble (denominada EE-GRSP por sus siglas en inglés “easily extractable glomalin-related soil protein”) y otra fracción denominada glomalina total conocida como T-GRSP (por sus siglas en inglés “Total glomalin-related soil protein”). La eficiencia de la extracción depende de la solubilidad de la proteína en el extractante y, probablemente de las características edáficas (Janos *et al.*, 2008; Reyna & Wall, 2014).

Los primeros reportes de efectos de encalado fueron aportados por Davis *et al.* (1982) quienes determinaron que a niveles de pH bajos (5,0), se reducía la colonización por los HMA en árboles de liquidámbar y que la adición de calcita revertía, al menos en parte, esta situación. Siqueira *et al.* (1984), determinaron que la acidez de un Ultisol inhibió la germinación de esporas de *Glomus moseae* mientras que el encalado aumentó la micorrización tanto por *G. moseae* como por *Gigaspora margarita*. Vázquez *et al.*, (2020) reportaron que el encalado corrigió la acidez de un suelo de España bajo siembra directa y favoreció la colonización micorrízica en



avena y vicia.

Actualmente, en nuestro país no se dispone de reportes destinados a evaluar el efecto de la aplicación de calcita como corrector de pH sobre la actividad de HMA nativos de sistemas agrícolas de la RP. Es por ello que nuestro objetivo fue estudiar el efecto del agregado de calcita como corrector de pH del suelo sobre la colonización micorrícica en raíces, como así también sobre la abundancia de esporas de HMA y el contenido de GRSP en el suelo, comparando además la eficiencia de la extracción de GRSP en función de la concentración y tipo de extractante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de los sitios y ensayos

El presente estudio se realizó a campo en dos sitios emplazados en las localidades de Gardey (partido de Tandil) y en la Localidad de French (partido de 9 de Julio) ambas ubicadas en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. En los dos sitios se emplazaron ensayos idénticos con un diseño experimental en tres bloques completos aleatorizados y unidades experimentales (parcelas) de 40 m² (4 m de ancho por 10 m de largo). Los dos sitios poseen una prolongada historia agrícola con secuencias de cultivos que incluyen trigo o cebada/soja-maíz-soja en los cuales se ha detectado un descenso del pH en el suelo. Los cultivos utilizados en el estudio fueron trigo (*Triticum aestivum* L.) para la localidad de Gardey y soja (*Glycine max* L.) para la localidad de French siendo realizados en siembra directa según las mejores prácticas (fecha de siembra, densidad,

control de malezas, etc.) de la zona (Forján & Manso, 2016), y sin limitaciones de nutrientes como N (Nitrógeno), P, S (Azufre) y Zn.

Se analizaron tres tratamientos denominados T0, T1 y T2 que corresponden a dosis crecientes de 0, 2000 y 6000 kg ha⁻¹ de calcita (CaCO₃, pureza 99%), respectivamente aplicadas en forma manual y en superficie a cada parcela por única vez en el año 2015. Se analizaron las muestras de suelo colectadas a campo en tres momentos de muestreo según se describe:

- Situación considerada inicial (SI): Las muestras fueron colectadas antes del agregado de la enmienda (2015).
- Dos años después del agregado de enmienda (2017). Se realizaron dos muestreos, el primero (M1) con suelo en rastrojo (sin cultivo) en los meses de julio y agosto (en Gardey y French, respectivamente), y el segundo (M2) con cultivo de trigo en estado vegetativo-prefloración (Gardey) y cultivo de soja en estado vegetativo (French), ambos en noviembre.

Las muestras fueron colectadas a 0-20 cm de profundidad con un muestreador de suelo tipo barreno de manera compuesta (30 submuestras para SI y 10 para M1 y M2).

Las muestras de suelo se secaron en estufa (30°C) y se pasaron por tamiz de 2 mm. En la **Tabla 1** se muestran las variables edáficas determinadas al inicio del presente trabajo (SI). El pH fue determinado tanto en la SI como en los M1 y M2 por electrodo de vidrio en relación 1:2,5 (relación suelo/agua). Además en la SI se determinó el P-Bray (Bray & Kurtz, 1945) y la MO (Walkley & Black, 1934).



Tabla 1. Características químicas de muestras de suelo colectadas en la situación inicial (SI) para French y Gardey. Se indican promedios y desvíos estándar entre paréntesis.

Table 1. Chemical characteristics of soil samples collected at initial situation (SI) for French and Gardey sites. Values between parentheses indicate standard deviations of the mean.

	pH	P-Bray	MO%
French	5,86 (±0,01)	15,97 (±0,74)	2,21 (±0,18)
Gardey (Tandil)	5,77 (±0,06)	12,46 (±0,87)	5,94 (±0,09)

Cuantificación de la abundancia de esporas de HMA

Para los dos sitios, muestreos y todos los tratamientos analizados, 50 g de suelo (proveniente del homogeneizado de las 10 submuestras colectadas en cada parcela), fueron procesados para la extracción de esporas de HMA mediante la técnica de tamizado en húmedo, decantado y centrifugación en gradiente de sacarosa al 60%, empleando tamices de tamaño de malla de 450, 124 y 53 μm . Se contabilizó el número de esporas de HMA de aspecto viable (con núcleos internos) por observación en lupa estereoscópica y se calculó la abundancia de esporas de HMA, referidas a 100 g de suelo (TWAMF, 2017).

Determinación del contenido de glomalina en el suelo

- Extracción de glomalina fácilmente extraíble (EE-GRSP): El procedimiento se realizó de acuerdo a Wright & Upadhyaya (1996), brevemente 0,01 g del suelo fueron secados al aire y tamizados por malla de 2mm, colocados en tubos citrato de sodio tribásico dihidratado 20

mM ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH=7,0), homogeneizando la suspensión que fue autoclavada (30 min a 121°C) e inmediatamente centrifugada (3500 rpm; 15 min). El contenido de proteínas en el sobrenadante fue determinado por el método de Bradford (1976) (reacción colorimétrica) y luego cuantificado por espectrometría (absorbancia a 595 nm), usando suero de albúmina bovina (BSA) como proteína estándar (Rosier *et al.*, 2006).

- Extracción de glomalina total con citrato de sodio (Na) (T-GRSP-C50): La metodología fue en gran parte similar a la descrita para EE-GRPS (Wright & Upadhyaya, 1996; Janos *et al.*, 2008) a diferencia que la suspensión de citrato de Na tuvo una concentración de 50 mM y el autoclavado de los tubos se realizó 3 veces consecutivas durante 60 min a 121°C cada una, obteniéndose un extracto prácticamente translúcido.

- Extracción de glomalina total con pirofosfato de Na (T-GRSP-P50): El procedimiento se realizó de manera similar al mencionado para la extracción de la T-GRSP-C50 (Wright *et al.*, 2006) a diferencia que, en este estudio, si bien el extractante caso fue pirofosfato de Na tal como



sugieren Wright *et al.* (2006) se utilizó una concentración 50 mM y ajustada a pH 8,0, a diferencia de la concentración 100 mM sugerida por los autores.

Determinación de la capacidad infectiva y colonización por HMA

En el M2, cuando los cultivos (soja en French y trigo en Gardey) se encontraban en el campo, se colectaron raíces (compuestas por 10 submuestras por parcela que fueron homogeneizadas en una muestra única), posteriormente procesadas para la determinación de la colonización micorrícica (CM). Brevemente, las raíces fueron lavadas y clarificadas con KOH al 10% (60°C por 30 minutos), y teñidas con azul de Tripán (0,05 %) en lactoglicerol (ácido láctico, glicerol y agua destilada en proporción 1:1:1 en vol., 90°C, 15 minutos) omitiendo el fenol del protocolo original (Phillips & Hayman, 1970). Se procedió a la cuantificación de estructuras de HMA en las raíces teñidas por observación microscópica expresando los resultados como % de raíz micorizadas (MA) y con arbusculos (Ar) (Brundrett, 2008).

Análisis de los resultados

Debido a que los datos biológicos (abundancia de esporas, abundancia de glomalina y CM) no cumplieron con el supuesto de normalidad, los mismos fueron transformados a Log₁₀. Los resultados normalizados fueron sometidos análisis de varianza (ANOVA), (SAS, Institute Inc, 2005). Debido a que para casi todos los casos (a excepción de CM) se detectaron in-

teracciones sitios*muestreo*tratamiento significativas, los resultados fueron analizados separadamente para cada sitio. Para cada muestreo, las diferencias entre tratamientos fueron separadas por el test de Diferencias Mínimas Significativas ($P < 0,05$). Se realizaron además correlaciones de Pearson entre el contenido de GRSP con el pH y la CM, así como entre las dos últimas variables mencionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cambios en el pH del suelo

El pH promedio de ambos sitios en la SI fue moderadamente ácido (5,8), lo que fundamenta la elección de los lotes para la aplicación de calcita (**Tabla 1**). Luego de dos años de aplicada la calcita, en French, el menor pH se registró en el M1 (suelo sin cultivo), mientras que en el M2 se registró un incremento significativo de dicho valor (pH M1= 5,89; pH M2= 6,36; $P < 0,05$, promedios entre tratamientos y repeticiones). Además, no se registraron diferencias significativas en el pH por la aplicación de calcita en el muestreo sin cultivo (M1) (**Fig. 1**). Sin embargo, en el muestreo con cultivo (M2) la aplicación de la mayor dosis de calcita ($T2 = 6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$) incrementó significativamente el pH en relación al testigo. La dosis intermedia ($T1 = 2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$) aunque incrementó el pH respecto del testigo, esta diferencia no alcanzó a ser significativa. En Gardey, la aplicación de la máxima dosis de calcita incrementó el pH en relación al testigo en ambos muestreos, mientras que al igual que en French, la aplicación de la dosis intermedia incrementó el pH; sin embargo, dicho aumento no fue significativo (**Fig.1**).



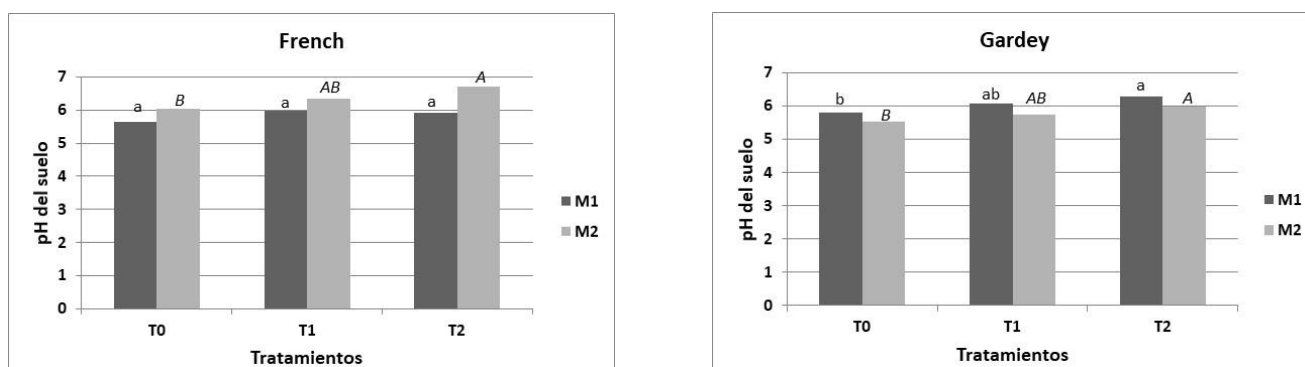


Figura 1. Valores de pH en suelo colectado en dos momentos (M1 y M2) para French (izquierda) y Gardey (derecha). Para cada momento de muestreo, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos ($n = 3$). T0 = $0 \text{ kg CaCO}_3 \text{ ha}^{-1}$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Figure 1. Soil pH in samples from French (left) and Gardey (right) collected at two sampling moment (M1 and M2). For each sampling moment, different letters of the same format indicate significant differences ($P < 0.05$) among calcite application treatments ($n = 3$). T0 = $0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Contrariamente a lo mencionado para French, en Gardey el mayor pH general se registró en el M1.

Los resultados indican que la aplicación de calcita en ambos sitios elevó el pH del suelo. Asimismo, en todas las situaciones, el cambio del pH por la aplicación de calcita fue superior en French que en Gardey, probablemente debido a la menor capacidad buffer del suelo. Esta puede ser considerada como la resistencia que tiene el suelo a cambiar el pH cuando se le adicionan sustancias ácidas o básicas y depende del contenido y tipo de acidez, presencia de sales, capacidad de intercambio catiónico (CIC) y por ende de la cantidad y tipo de arcillas y MO, y del pH inicial que tiene el suelo (Bennardi *et al.*, 2016 y referencias citadas). De esta forma, suelos arcillosos y ricos en MO, con gran CIC, tienen un fuerte poder buffer, por lo que nece-

sitan mayores cantidades de calcita para alcanzar un determinado pH. Por otro lado, suelos arenosos con baja CIC, tienen menor poder buffer, y cuando son ácidos, necesitan menores dosis de calcita para alcanzar determinados valores de pH (Espinosa & Molina, 1999). En los suelos del noroeste de la Provincia de Buenos Aires (9 de Julio-French), predominan CIC promedio de 15 cmol kg^{-1} , mientras que en los suelos del sudeste (Tandil-Gardey) de 25 cmol kg^{-1} (Eyherabide *et al.*, 2012). Además, mientras que en French el pH aumentó entre el M1 y el M2, en Gardey se evidenció una disminución para el mismo periodo. Se observa aquí una clara tendencia del suelo de Gardey a retornar al pH de la situación inicial, mientras que en French esto no ocurrió. Puede sugerirse entonces que debido a que el suelo de Gardey posee mayor CIC, contenido de arcilla y de MO, el pH de este

sitio siempre fue menor al de French aún en altas dosis de calcita aplicada (**Fig.1**).

Abundancia de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares

Para el suelo de French en el M1 (suelo sin cultivo) se registró mayor abundancia de esporas de HMA en los tratamientos que recibieron calcita (**Fig.2**) en relación al testigo. Sin embargo, para el M2 (suelo con cultivo) la mayor abundancia de esporas solo se detectó en el tratamiento con mayor dosis de calcita. En el sitio

Gardey y para el muestreo M1, se detectó un mayor número de esporas de HMA en el tratamiento con la mayor dosis de calcita; aun así, este tratamiento no difirió significativamente del número obtenido por la aplicación intermedia de calcita aunque ambos superaron al testigo. Si bien en el M2 no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de aplicación de calcita y el testigo, se evidenció el mismo patrón de aumento en el número de esporas como respuesta al agregado de calcita (**Fig.2**).

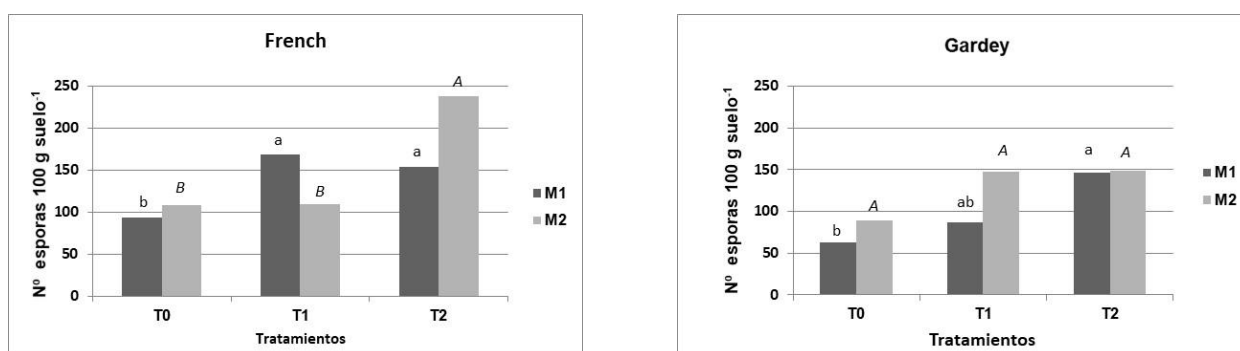


Figura 2. Abundancia de esporas de HMA en suelo colectado en French (izquierda) y en Gardey (derecha). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos para un mismo muestreo y sitio ($n = 3$). T0 = $0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Figure 2. Arbuscular mycorrhizal spore abundance in soils from French (left) and Gardey (right). For each site and sampling moment, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among calcite application treatments ($n = 3$). T0 = $0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Nuestros resultados indican un aumento de la esporulación de los HMA con el agregado de calcita. De manera similar, Wang *et al.* (1993) originalmente no detectaron presencia de esporas en suelos con pH 4,5, mientras que su abundancia aumentó luego de tratamientos de aplicación de cal. Considerando que los pH de la SI del presente trabajo fueron 5,85 y 5,76 para French y Gardey, respectivamente, es probable que los efectos del encalado sobre la

esporulación hubieran sido más marcados con valores de pH más cercanos a los reportados por Wang *et al.* (1993). La aplicación de calcita tuvo efectos significativos sobre la abundancia de esporas particularmente en French en ambos muestreos, mientras que en Gardey el efecto solo se evidenció en el M1 (**Fig. 2**). Es evidente que no se obtuvo un patrón de abundancia de esporas en relación a la aplicación de calcita uniforme entre sitios, lo que posiblemente podría

estar vinculado, en parte, a las diferentes especies hospedadoras de HMA en cada sitio. En este sentido, se destaca que para la dosis intermedia de calcita (T1) se evidenció descenso significativo de la esporulación en French entre muestreos, en contraposición un aumento de la misma en Gardey entre los M1 y M2 (**Fig.2**). Coughlan *et al.* (2000), reportaron que el encalado favoreció la abundancia de algunos géneros de esporas de HMA que prácticamente no estaban presentes en la situación de acidez. La abundancia de esporas de HMA depende de varios factores, por ejemplo la rotación, labranza, estado fenológico de la planta hospedadora, momento de la toma de muestras y condiciones edafo-climáticas, entre otros (Panwar *et al.*, 2011). En los ensayos del presente estudio, la

rotación utilizada incluyó trigo o cebada/soja-maíz-soja. En el M1 ambos sitios se encontraban sin cultivo (barbecho), siendo maíz el cultivo antecesor en French y soja en Gardey. Ha sido reportado (Carrenho *et al.* 2002; INVAM, 2019) que la habilidad de esporulación es dependiente de la planta hospedadora. Por lo tanto, podría sugerirse que aplicaciones intermedias de calcita, favorecieron la esporulación cuando el antecesor o cultivo implantado fue una gramínea en el momento en que se realizó el muestreo, evidenciando un posible efecto de la rotación. Esta hipótesis debería evaluarse en ensayos de rotaciones con diferentes antecesores en la misma zona edafoclimática.

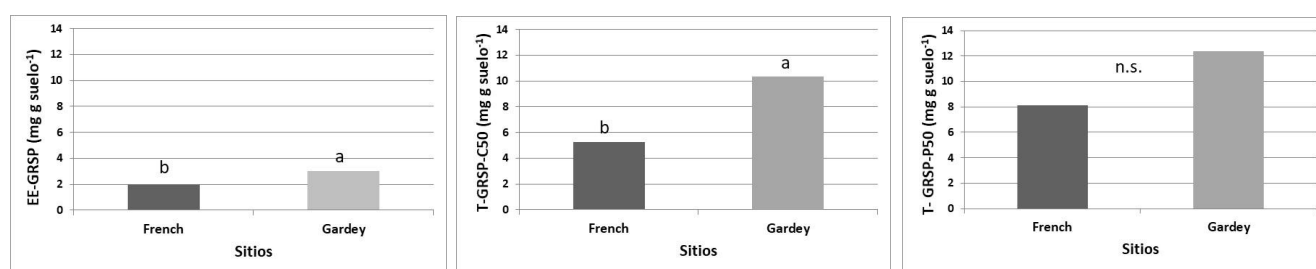


Figura 3. Contenido de glomalina en muestras de suelo colectadas en dos sitios en la Situación Inicial (antes de la aplicación de calcita). Izquierda, glomalina fácilmente extraíble (EE-GRSP); centro, glomalina total extraída con citrato de sodio (T-GRSP-C50); derecha, glomalina total extraída con pirofosfato de sodio (T-GRSP-P50). Para cada tipo de extractante, barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre sitios. n.s. no significativo.

Figure 3. Soil glomalin content in two sites before calcite application. Left, easily extractable glomalin (EE-GRSP); centre, total glomalin extracted with sodium citrate (T-GRSP-C50); right, total glomalin extracted with sodium pyrophosphate (T-GRSP-P50). For each extractant, bars with different letters show significant ($P < 0,05$) differences between sites. n.s. not significant.

Glomalina fácilmente extraíble (EE-GRSP)

Para el suelo colectado a campo en la SI en ambos sitios, se registró mayor ($P < 0,05$) contenido de glomalina fácilmente extraíble (EE-

GRSP) en el suelo de Gardey en relación al de French (**Fig. 3**). El contenido detectado en Gardey fue del 35,5% mayor respecto al de French, y esta tendencia fue detectada por cada

una de las técnicas de extracción (EE-GRSP, T-GRSP-C50 y T-GRSP-P50).

Para el suelo de French, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de EE-GRSP entre tratamientos durante el M1, mientras que, para el M2, los testigos y la dosis media de calcita mostraron mayor contenido de glomalina en relación al tratamiento con mayor aplicación de calcita. Además, se evidenció un mayor contenido de EE-GRSP en el M2 que en el M1 para todos los tratamientos de aplicación de calcita (**Fig. 4**). Para Gardey, el contenido de

EE-GRSP no presentó diferencias significativas entre tratamientos, ni entre muestreos para un mismo tratamiento (**Fig. 4**). Se ha sugerido, que la producción de glomalina puede ser dependiente del suministro de C aportado por las plantas hospedadoras, por lo tanto, es probable que las diferencias en el contenido de GRSP detectadas entre sitios y también entre muestreos hayan sido dependientes, al menos en parte, de la presencia y/o naturaleza de los cultivos presentes en los sitios en estudio.

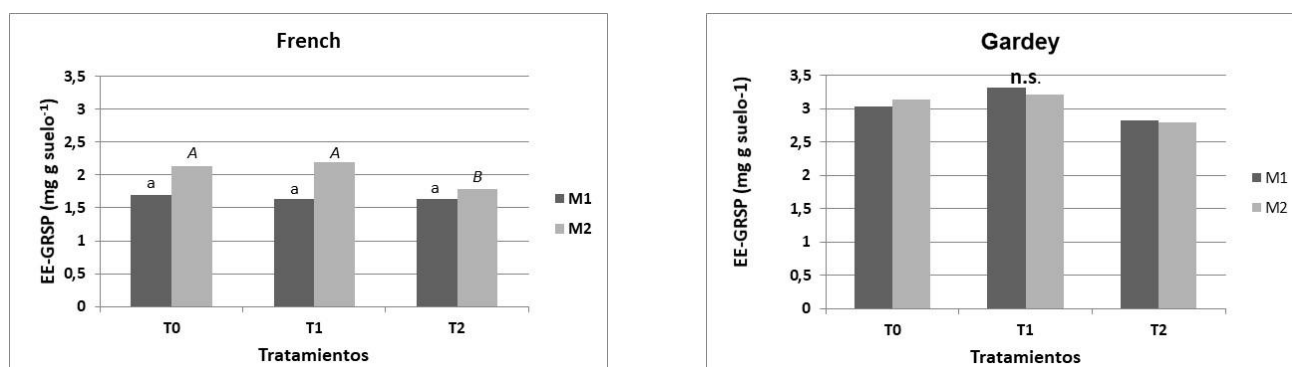


Figura 4. Contenido de glomalina fácilmente extraíble (EE-GRSP), en muestras de suelo colectadas en dos momentos (M1 y M2) para French (izquierda) y para Gardey (derecha). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos para un mismo muestreo y sitio. T0 = $0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$. n.s. no significativo.

Figure 4. Easily extractable glomalin (EE-GRSP) content in soil samples collected from French (left) and Gardey (right) in two moments (M1 and M2). For each site and sampling moment, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among calcite application treatments. T0 = $0 \text{ kg CaCO}_3 \text{ ha}^{-1}$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$. n.s. not significant.

Glomalina total extraída con citrato de Na 50 mM (T-GRSP-C50)

La cantidad de glomalina total en muestras colectadas a campo antes de la aplicación de calcita (SI) y extraída con citrato de Na 50 mM (T-GRSP-C50) prácticamente triplicó a la cantidad de glomalina fácilmente extraíble extraída con citrato de Na 20 mM (EE-GRSP) (**Fig. 3**). Además, de manera similar a lo men-

cionado para EE-GRSP, el contenido de T-GRSP-C50 extraída en suelos de Gardey superó en un 49% al extraído en French.

Para French, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de T-GRSP-C50 entre tratamientos para el M1. Sin embargo, en el M2, se detectó mayor contenido de T-GRSP-C50 en suelos con aplicación de calcita. Además, es de destacar que, para todos los

tratamientos, el contenido de T-GRSP-C50 fue siempre mayor en el M1, el que en general duplicó al cuantificado en el M2 (**Fig. 5**). Para Gardey, se detectó para el M1 mayor contenido de T-GRSP-C50 en los testigos, seguido por la mayor dosis de calcita aplicada (T2) mientras que el menor contenido de glomalina se detectó en el tratamiento que recibió la dosis intermedia (T1). Para el M2, no se detectaron diferencias

significativas entre tratamientos. En este caso el M2 mostró mayor contenido de T-GRSP-C50, principalmente en aquellos tratamientos en los que se aplicó calcita y más aún con la dosis intermedia T1 (**Fig. 5**).

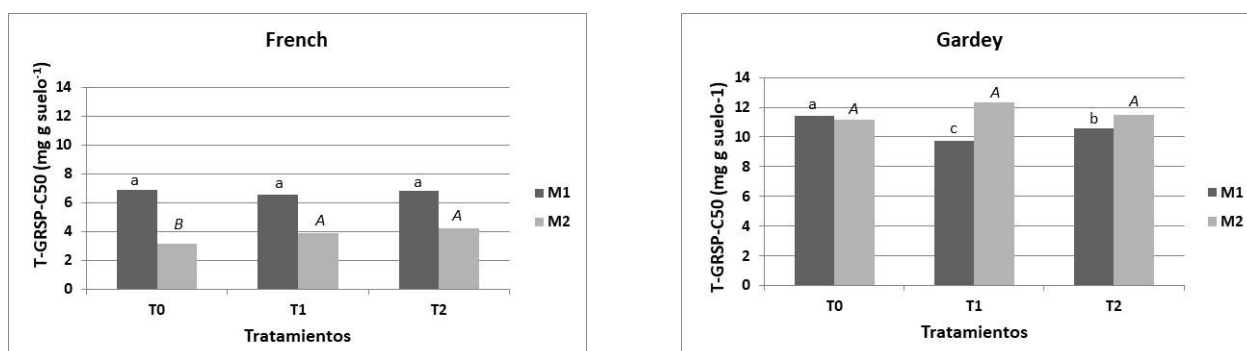


Figura 5. Contenido de glomalina total extraída con citrato de sodio 50 mM (T-GRSP-C50) en muestras de suelo colectadas en dos momentos (M1 y M2) en French (izquierda) y Gardey (derecha). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos para un mismo muestreo. T0 = $0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Figure 5. Total glomalin content extracted with sodium citrate 50 mM (T-GRSP-C50) in soil samples collected from French (left) and Gardey (right) in two moments (M1 and M2). For each site and sampling moment, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among calcite application treatments. T0 = $0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T1 = $2000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$; T2 = $6000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Glomalina total extraída con pirofosfato de Na 50 mM (T-GRSP-P50)

La cantidad de glomalina total en muestras colectadas a campo antes de la aplicación de calcita (SI) y extraída con pirofosfato de Na 50 mM (T-GRSP-P50) no varió significativamente ($P > 0,05$) entre los sitios de muestreo. Aun así, Gardey presentó un contenido de T-GRSP-P50 un 34% mayor respecto a French, continuando con la tendencia antes mencionada para EE-GRSP y T-GRSP-C50 (**Fig. 3**). No se detectaron

diferencias significativas en el contenido de T-GRSP-P50 para los diferentes tratamientos en ambos muestreos en los dos sitios estudiados (**Fig. 6**). Es probable que la elevada variabilidad entre los datos (Desvío estándar promedio 1,24 y 1,04 para French y Gardey, respectivamente) sea la causa de la no detección de diferencias significativas entre tratamientos. Si bien en ambos sitios, en el primer ciclo (de un total de 3), se extrajo un promedio del 58% de la glomalina total extraída, tampoco se detectaron diferencias

significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos para la primera extracción de T-GRSP-P50.

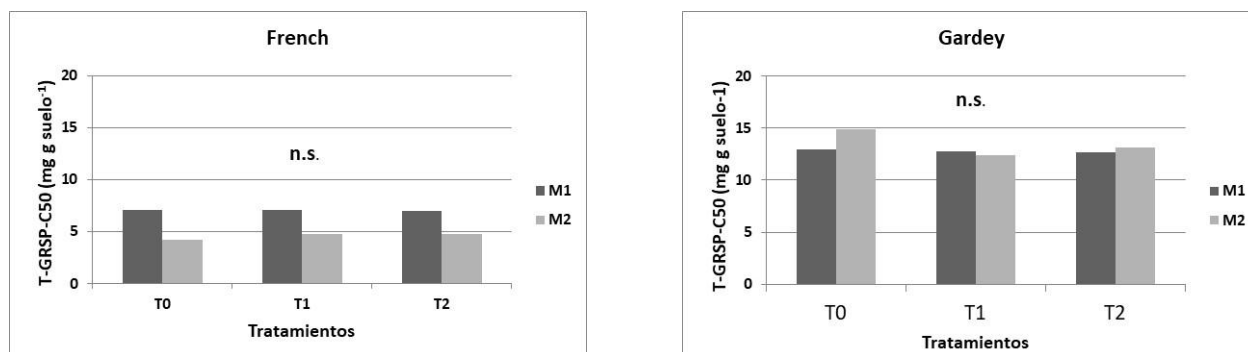


Figura 6. Contenido de glomalina total extraída con pirofosfato de sodio 50 mM (T-GRSP-P50) en muestras de suelo colectadas en dos momentos (M1 y M2) en French (izquierda) y Gardey (derecha). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos para un mismo muestreo. T0 = 0 kg ha⁻¹ CaCO₃; T1 = 2000 kg ha⁻¹ CaCO₃; T2 = 6000 kg ha⁻¹ CaCO₃.

Figure 6. Total glomalin content extracted with sodium pyrophosphate 50 mM (T-GRSP-P50) in soil samples collected from French (left) and Gardey (right) in two moments (M1 and M2). For each site and sampling moment, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among calcite application treatments. T0 = 0 kg ha⁻¹ CaCO₃; T1 = 2000 kg ha⁻¹ CaCO₃; T2 = 6000 kg ha⁻¹ CaCO₃.

Comparación entre técnicas de extracción de glomalina

Para poder comparar el contenido de EE-GRSP que es la metodología más utilizada en las cuantificaciones de GRSP e involucra un solo paso de extracción, con los contenidos de T-GRSP, se comparó el contenido de EE-GRSP con los de T-GRSP-C50 y T-GRSP-P50 obtenidos en el primer ciclo de extracción. Se destaca además que la modificación del método T-GRSP-P50 en el que la concentración de pirofosfato de Na se utilizó, a diferencia de lo que proponen Wright *et al.* (2006), a concentración de 50 mM, permitió comparar los resultados con los obtenidos por el método T-GRSP-C50.

La mayor extracción se logró utilizando pirofosfato de Na 50 mM, seguido por citrato de Na 50 mM, ambos con tres extracciones. El mismo

patrón se mantuvo cuando se compararon las tres metodologías, pero con las de glomalina total con un solo ciclo de extracción (**Tabla 2**). Cuando se realizó la comparación separando los datos en función a los sitios de estudio, también se evidenció el mismo patrón que el mencionado para la comparación de todo el pool de datos. Es de destacar con todos los métodos de extracción, siempre se obtuvo más ($P < 0,05$) glomalina en Gardey que en French.

Tanto los niveles de EE-GRSP como los de T-GRSP, se encontraron entre los rangos obtenidos por Wright & Upadhyaya (1998), en suelos de USA y Escocia: de 1 a 8 mg de EE-GRSP.g suelo⁻¹ y 2 a 14 mg de T-GRSP-C50.g suelo⁻¹, respectivamente. Por su parte, Curaqueo *et al.* (2010) en Molisoles de Chile bajo siembra directa cuantificaron niveles de 2 mg de EE-GRSP g⁻¹ suelo y 8 mg de T-GRSP-C50 g suelo⁻¹.

¹, respectivamente. Baéz Pérez *et al.* (2012), rior al extraído por el citrato de Na (ambos a concentración 100 mM) en Tepetates (horizonte fosfato de Na aproximadamente tres veces supe-

Tabla 2. Comparación de metodologías para la extracción de glomalina en muestras de suelo en dos localidades (promedios entre sitios y tratamientos de aplicación de calcita). EE-GRSP = glomalina fácilmente extraíble utilizando citrato de sodio 20 mM y una extracción; T-GRSP-C50= glomalina total utilizando citrato de sodio 50 mM, tres ciclos de extracción; T-GRSP-P50= glomalina total utilizando pirofosfato de sodio 50 mM, tres ciclos de extracción; T-GRSP-C50 1º y T-GRSP-P50 1º= glomalina total utilizando citrato o pirofosfato de sodio 50 mM, respectivamente; valor de la primera extracción. $\bar{x}$: promedio

Table 2. Comparison of glomalin extraction methodologies in soil samples from two sites (averages between sites and calcite application treatments). EE-GRSP = easily removable glomalin (by using 20 mM sodium citrate and an extraction cycle); T-GRSP-C50 = total glomalin (by using 50 mM sodium citrate, three extraction cycles); T-GRSP-P50 = total glomalin (by using 50 mM sodium pyrophosphate, three extraction cycles); 1st T-GRSP-C50 and 1st T-GRSP-P50 = total glomalin using 50 mM sodium citrate or pyrophosphate, respectively; value of the first extraction. $\bar{x}$: mean

	Método				
	EE-GRSP	T-GRSP-C50	T-GRSP-C50 1º	T-GRSP-P50	T-GRSP-P50 1º
	mg suelo ⁻¹				
$\bar{x}$ Sitios	2,45 e	8,10 b	3,81 d	9,48 a	5,52 c
Sitio					
French	1,85 d	5,25 b	3,08 c	5,82 a	3,26 c
Gardey	3,05 e	11,12 b	4,60 d	13,13 a	7,78 c

Para cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas entre los métodos de extracción ($P < 0,05$)

For each row, different letters indicate significant differences between extraction methods ($P < 0.05$)

del suelo endurecido) cultivados de México, evidenciando que no sería apropiado utilizar indistintamente cualquiera de los dos extractantes. Lo antes mencionado coincide en parte con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la extracción de T-GRSP-P50 fue siempre superior a la obtenida por citrato de Na independientemente del sitio, aunque el valor no fue triplicado como lo reportado por otros autores (Baéz Pérez *et al.*, 2012). En nuestro

estudio, la diferencia entre extractantes a favor del pirofosfato de Na fue de un 10% y 15% superior que la del citrato de Na, para los sitios French y Gardey, respectivamente. Estos resultados están en línea con los informados por otros autores (Wright *et al.*, 2006; Halvorson *et al.*, 2006), quienes, trabajando en suelos con pH ácidos a moderadamente ácidos, determinaron que el pirofosfato de Na extrajo



significativamente entre un 10 a un 53% más de T-GRSP que el citrato y el borato de Na.

La glomalina es una fracción distinguible de la MO y puede alcanzar hasta el 30% de carbono del suelo (Rillig *et al.*, 2001). Haddad & Sarkar (2003), encontraron correlaciones positivas entre la MO y GRSP, a su vez, observaron una mayor correlación por parte de la T-GRSP con esta fracción. Esto también fue observado por Seguel *et al.* (2008), para suelos Andisoles (alto contenido de MO) de Chile. Esto explica las diferencias observadas en la T-GRSP-P50 entre French y Gardey, dado que el contenido de MO en este último sitio casi triplicó al valor de MO determinado en French (**Tabla 1**).

Al comparar extractantes, los extractantes que fueron utilizados en concentración 50mM, superaron solo en el primer ciclo de extracción en más del 50% al que se utilizó en la EE-GRSP. Como se mencionó, la extracción por la metodología EE-GRSP que utiliza citrato de Na 20mM es la más utilizada según los reportes en la bibliografía. Si bien habría que confirmar por otras metodologías que todos los extractos corresponden solamente a proteínas GRSP, los resultados de este estudio permitirían sugerir mayor eficiencia de extracción con concentración de extractantes mayor al 20 mM, aun realizando un solo ciclo de extracción.

Correlaciones entre el pH y la glomalina edáfica.

Se detectaron correlaciones positivas y significativas entre el pH y el contenido de T-GRSP-C50 de French. El resto de las correlaciones fueron bajas y sin significancia estadística (**Tabla 3**). Las correlaciones

obtenidas no coincidirían con las informadas por Haddad & Sarkar (2003) y por Wang *et al.* (2015), quienes encontraron correlaciones negativas entre el pH del suelo y la EE-GRSP y T-GRSP, detectando menores niveles de GRSP a medida que el pH del suelo aumentaba. Estos mismos autores explican que en los suelos que estudiaron, el menor pH se asociaba a mayor contenido de MO (situación que no ocurrió en nuestro estudio), mayor actividad de los HMA y menor competencia por parte de otros microorganismos, detectándose un mayor contenido de GRSP. Se desconocen las causas de falta de correlaciones o la obtención de correlaciones positivas, obtenidas en nuestro estudio.

Colonización micorrícica

Para la colonización micorrícica (CM) y el contenido de arbusculos (Ar), no se determinaron diferencias significativas entre sitios (CM= 21,46% y 24,38% para French y Gardey, respectivamente; Ar= 9,94% y 13,01%, para French y Gardey, respectivamente). En French se detectó aumento tanto en la CM como en el contenido de Ar por el agregado de la dosis intermedia de calcita, obteniéndose la menor CM y Ar en parcelas con la mayor dosis de aplicación de calcita. En Gardey, si bien no se detectaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros de colonización evaluados, es de destacar que tanto la CM como el contenido de Ar en el tratamiento con dosis intermedias de calcita prácticamente duplicaron al registrado en los T0 (**Fig. 7**).

Nuestros resultados indicarían que el agregado de calcita favoreció la CM. La dosis de



Tabla 3. Coeficientes de correlación entre pH y el contenido de glomalina determinados en dos sitios (French y Gardey) y en dos momentos de muestreo (M1 y M2). EE-GRSP = glomalina fácilmente extraíble; T-GRSP-C50= glomalina total (con citrato de sodio 50 mM como extractante y tres ciclos de extracción); T-GRSP-P50= glomalina total (con pirofosfato de sodio 50 mM como extractante y tres ciclos de extracción). * indica significancia estadística ($P < 0,05$)

Table 3. Correlation indices between pH and glomalin content determined at two sites (French and Gardey) and at two sampling times (M1 and M2). EE-GRSP= easily removable glomalin; T-GRSP-C50 = total glomalin (by using 50 mM sodium citrate and three extraction cycles); T-GRSP-P50 = total glomalin (by using 50 mM sodium pyrophosphate and three extraction cycles). * indicante statistical significance ($P < 0,05$)

Coeficientes de correlación r				
Muestreo	Sitio	pH/GRSP-20	pH/ GRSP-C50	pH/ GRSP-P50
M1	French	0,58	0,77*	0,22
	Gardey	0,05	-0,23	-0,11
	Ambos sitios	0,29	0,41*	0,26
M2	French	0,57	0,77*	0,22
	Gardey	0,05	-0,23	-0,11
	Ambos sitios	0,29	0,41	0,26

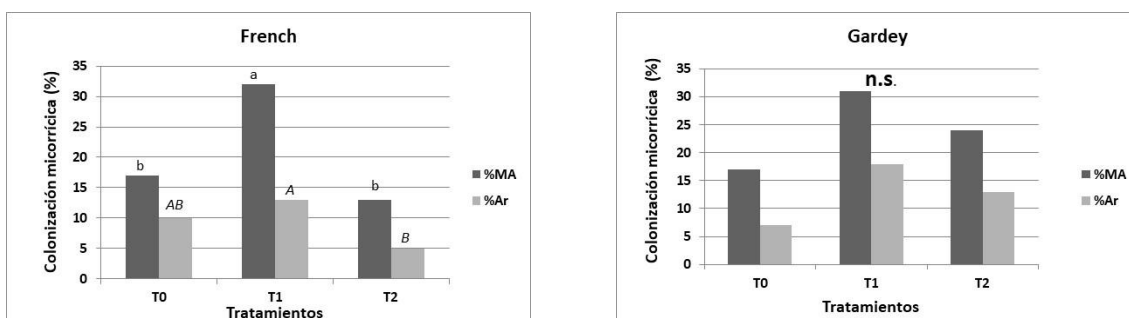


Figura 7. Colonización micorrízica espontánea en raíces de cultivos en French (izquierda) y Gardey (derecha). Para cada sitio y parámetro de colonización (MA o Ar), letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de aplicación de calcita ($P < 0,05$). n.s.= no significativo. T0= 0 kg ha⁻¹ CaCO₃; T1 = 2000 kg ha⁻¹ CaCO₃; T2 =6000 kg ha⁻¹ CaCO₃. n.s. no significativo.

Figure 7. Spontaneous mycorrhizal colonization in crop roots at French (left) and Gardey (right). For each site and colonization parameter (MA or Ar), different letters indicate significant differences between calcite application treatments ($P < 0.05$). n.s = not significant. T0 = 0 kg ha⁻¹ CaCO₃; T1 = 2000 kg ha⁻¹ CaCO₃; T2 = 6000 kg ha⁻¹ CaCO₃. n.s. not significant.

calcita intermedia demostró ser el mejor tratamiento superando al testigo y a la dosis mayor y las diferencias fueron mayores en el sitio French. Estos resultados se condicen con los obtenidos por Davis *et al.* (1982), quienes informaron mayor CM ante aumentos del pH generado por el agregado de CaCO₃. Esto también fue observado por Siqueira *et al.* (1984),

quienes informaron que el agregado de dolomita en un suelo Ultisol favoreció la CM de dos especies distintas de HMA. Por su parte, Coughlan *et al.* (2000) informaron incrementos en la CM en arces azucareros juntamente luego de incrementos en el pH (hasta llegar a valores próximos a 7) por encalado. Por el contrario, Wang *et al.* (1993), trabajando con raíces de avena y papa, no determinaron cambios significativos en la CM por efecto del encalado, aunque el pH varió de 4,7 a 7,5.

No se determinaron asociaciones significativas entre la CM en los dos parámetros cuantificados MA% y Ar% con el contenido de EE-GRSP, T-GRSP-C50 o T-GRSP-P50 así como tampoco con el pH del suelo. Los reportes en relación a las asociaciones mencionadas en este estudio son, en ocasiones contradictorios (Shao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 1993, 2015), desconociéndose las causas de la ausencia de correlación detectada en este estudio.

CONCLUSIONES

En este estudio se puso en evidencia que la aplicación de 2000 y/o 6000 kg ha⁻¹ calcita en Molisoles de dos sitios de la Provincia de Buenos Aires con diferencial nivel de MO y con pH subácidos, elevó el valor del pH del suelo. Además, no se determinaron efectos deletéreos de la aplicación de calcita sobre la esporulación y colonización de raíces por los HMA nativos de los suelos subácidos estudiados, pudiendo inferirse una estimulación de proliferación de HMA ante la aplicación de la dosis intermedia. Aunque el encalado no ejerció efecto significativo sobre el contenido de GRSP, se destaca que la utilización de concentración de extractantes (50mM)

mayor que la de la metodología más utilizada (citrato de Na 20mM), y particularmente la utilización de pirofosfato de Na resultó en mayor extracción de GRSP en comparación con el citrato de Na. Se sugiere que la aplicación de dosis de calcita de 2000 kg ha⁻¹, podría ser recomendada como corrector de pH de suelo en suelos moderadamente ácidos (próximos a 5,8) elevando su nivel en aproximadamente una unidad y que dicho tratamiento de suelo, no afectaría y hasta podría favorecer la abundancia y actividad de HMA. Futuros estudios deberían abordar la relación entre la abundancia de HMA y la producción de glomalina con la estabilidad de agregados de suelos sometidos a tratamientos de aplicación de calcita.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos de proyectos INTA ("Intensificación Sustentable de la Agricultura en la Región Pampeana", código: 2019-PE-E1-I011-001 "Desarrollo y aplicación de tecnologías para el control de la erosión y degradación de suelos, código: 2019-PE-E2-I052-001" y "Disponibilidad de estrategias de manejo que contribuyan a la conservación/restitución de la biodiversidad edáfica y su funcionalidad en sistemas agrícolas, código 2019-PD-E2-I037-002") del Foncyt: PICT 2017-0757 y PICT 2015-0392, con recursos del laboratorio de suelos y planta del grupo "Relación Suelo-Cultivo" de la EEA Balcarce y de CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade, FH (Ed). 2016. Los desafíos de la Agricultura. International Plant Nutrition Institute. 136 P. Disponible



- en
https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_los_desafios_de_la_agricultura_fandrade.pdf
- Anthonisen, AC; RC Loehr; TBS Prakasam & EG Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 48: 835-852.
- Báez Pérez, A; JD Etchevers; MdC González Chávez; CH Moreno; CM Monreal & C Prat. 2012. Extracción de glomalina y compuestos asociados con dos soluciones químicas en tepetates cultivados de México. *Comunicaciones en ciencia del suelo y análisis de plantas* 43: 28-35
- Bennardi, DO; A Díaz Gorostegui, L Juan, G Millan, AE Pellegrini & ME Vázquez. 2018. Evaluación de la capacidad buffer de suelos ácidos de la región pampeana *Ciencia del Suelo* 36 (1): 30-38
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bray, RH & L Kurtz 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59(1): 39-46.
- Brundrett, M. 2008. Mycorrhizal associations: The Web Resource. Disponible en <http://mycorrhizas.info/vam.html#S3>
- Carrenho, R; SFB Trufem & VLR Bononi. 2002. Effects of using different host plants on the detected biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi from an agroecosystem. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 93-101
- Coughlan, A; Y Dalpe; L Lapointe & Y Piche. 2000. Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forests. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1543-1554.
- Curaqueo, G; E Acevedo; P Cornejo; A Seguel; R Rubio & F Borie. 2010. Tillage effect on soil organic matter, mycorrhizal hyphae and aggregates in a Mediterranean agroecosystem. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal* 10(1): 12 - 21.
- Curtin, D; CA Campbell & A Jalil. 1998. Effects of acidity on mineralization: pH dependence of organic matter mineralization in weakly acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (1): 57-64.
- Davis, EA; JL Young & RG Linderman. 1982. Soil lime level (pH) and VA-Mycorrhiza effects on growth responses of sweetgum seedlings. *Soil Science Society of America Journal* 47 (2): 251-256.
- Espinosa, J & E Molina. 1999. Acidez y Encalado de los suelos Ediciones IPNI. Disponible en <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/AcidezYEncaladoDeLosSuelosEspinosaYMolina.pdf>
- Eyherabide, M; HE Echeverria; HR Sainz Rozas & J Velazco. 2012. Niveles de cobre disponibles en suelos de la región pampeana Argentina. XXIII congreso argentino de la ciencia del suelo. Mar del Plata, Argentina - 16 al 20 de abril de 2012.
- Forján, H & L Manso. 2016. Rotaciones y secuencias de cultivos en la región mixta cerealera del centro-sur bonaerense. Ediciones INTA 87 pp. Disponible en https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_-_rotaciones_y_secuencias_de_cultivos_en_la_region_mixta_cerealera_del_centro_sur_bonaerense.pdf
- Haddad, MJ & D Sarkar. 2003. Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: Part II-Relationship with soil properties. *Environmental Geosciences* 10 (3): 99-106.
- Halvorson, J & J Gonzalez. 2006. Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: Distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. *Plant and Soil* 286: 339-356.
- INVAM, 2019. Stimulation of Sporulation. En: International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Disponible en: <https://invam.wvu.edu/methods/culture-methods/stimulation-of-sporulation>
- Janos, DP; S Garamszegia & B Beltran. 2008. Glomalin extraction and measurement. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 728-739.
- Machetti, N; AE Pellegrini; NM Gutiérrez; Ra Giraudo; F Tropeano; F Fernández; ME Vázquez & DJ Cosentino. 2019. Efecto del encalado sobre propiedades químicas y físicas del suelo y sobre el rendimiento de soja (*Glycine max*). *Ciencia del Suelo* 37 (2): 372-382
- MAGyP. 2019. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Estimaciones Agrícolas. Disponible en <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/>
- Panwar, V; MK Meghvansi & S Siddiqui. 2011. Short-term temporal variation in sporulation dynamics of



- arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and physico-chemical edaphic properties of wheat rhizosphere. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 247-254 <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.12.012>
- Pepe, A; Giovannetti, & C Sbrana. 2018. Lifespan and functionality of mycorrhizal fungal mycelium are uncoupled from host plant lifespan. *Scientific Reports* 8: 10235. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28354-5>.
- Phillips, JM & DS Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161
- Piastrellini, R. 2016. Aportes a la determinación de la Huella ambiental de biocombustibles en Argentina. Influencia de los sistemas de manejo de cultivos sobre el impacto del consumo de agua, del uso del suelo y de las emisiones de gases de efecto invernadero para el biodiesel de soja. *Ecosistemas* 25(2): 106-109. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/540/54046745014.pdf>
- Reyna, D & L Wall. 2014. Revision of two colorimetric methods to quantify glomalin-related compounds in soil subjected to different managements. *Biology and Fertility of Soils* 50: 395-400.
- Rillig, MC; SF Wright; KA Nichols; WF Schmidt & MS Torn. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil* 233: 167-177
- Rillig, MC; SF Wright & V Eviner 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* 238: 325-333.
- Rosier, CT; A Hoyer & MC Rillig. 2006. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2205-2211.
- Sainz Rozas, HR; M Eyherabide; G Larrea; N Martínez Cuesta; H Angelini; N Reussi Calvo & N Wyngaard. 2019. Relevamiento y determinación de propiedades químicas en suelos de aptitud agrícola de la región pampeana. Simposio de fertilidad. FERTILIZAR. Rosario, 8 y 9 de mayo de 2019.
- SAS Institute. 2005. SAS User's guide. Statistics. SAS Institute, Inc., Cary.
- Seguel, A; R Rubio; R Carrillo; A Espinosa & F Borie. 2008. Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del sur de Chile. *Bosque* (Valdivia) 29 (1): 11-22.
- Shao, YD; AK Srivastava; QS Wu, DJ Zhang & HN Mu. 2018. Analysis of root mycorrhizal colonization and soil GRSP of *Osmanthus fragrans*. *Current Horticulture* 6(1): 15-18
- Siqueira, JO; DH Hubell & AW Mahmud. 1984. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 76: 115-124.
- TWAMF. 2017. The World of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Barreto de Novais, C. (Ed.). <http://www.twamf.com/>
- USDA. United States Department of Agriculture. 1999. Liming to Improve Soil Quality in Acid Soils. Soil quality-Agronomy technical note N°8. [En línea] < <https://www.nrcs.usda.gov/internet/FSE-DOCUMENTS/nrcs142p2-053252.pdf>>
- Vázquez, MS & A Pagani. 2015. Calcio y Magnesio. En: Echeverría, HE. & FO García (eds.). Fertilidad de suelos y fertilidad de cultivos. 317-355.
- Vázquez, E; M Benito; R Espejo & N Teutscheroova. 2020. No-tillage and liming increase the root mycorrhizal colonization, plant biomass and n content of a mixed oat and vetch crop. *Soil and Tillage Research* 200, 104623.
- Walkley, A & IA Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37(1): 29-38.
- Wang, GM; DP Stribley; PB Tinker & C Walker. 1993. Effects of pH on arbuscular mycorrhiza I. Field observations on the long-term liming experiments at Rothamsted and Woburn. *New Phytologist* 124: 465-472.
- Wang, Q; W Wang; X He; W Zhang; K Song & S Han. 2015. Role and Variation of the Amount and Composition of Glomalin in Soil Properties in Farmland and Adjacent Plantations with Reference to a Primary Forest in North-Eastern China. *PLoS One* 10(10): e0139623.
- Wright, SF & A Upadhyaya. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161(9): 575-586.



- Wright, SF & A Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular micorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198:97–107.
- Wright, SF; KA Nichol & WF Schmidt. 2006. Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. *Chemosphere* 64 (7): 1219-1224.
- Wu, QS; HH Xin; QC Ming; NZ Ying; W Shuang & L Yan. 2013. Relationships between Glomalin Related Soil Protein in Water-Stable Aggregate Fractions and Aggregate Stability in Citrus Rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15 (3): 603–6

