



XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo

Ordenamiento Territorial:
un desafío para la Ciencia del Suelo

Carmen G. Cholaky y José M. Cisneros

Compiladores

Trabajos de investigación

27 de Junio al 1 de Julio de 2016

Universidad Nacional de Río Cuarto

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

e-book

ISBN 978-987-688-173-9

UniRío
editora



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

CARACTERIZACIÓN DE GLOMEROMYCOTA PUNEÑOS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS MOLECULARES

MARÍA SOLEDAD RIVERO MEGA¹; FERNANDA COVACEVICH^{2,3}; KEREN HERNANDEZ GUIJARRO³; MARÍA LUZ TORRES¹ & MÓNICA LUGO^{1,4}

¹ Micología, Diversidad e Interacciones Fúngicas. Área de Ecología, Dpto. de Bioquímica y Ciencias Biológicas, FQByF, UNSL; ² CONICET-INBIOTEC/FIBA; ³ EEA INTA, Balcarce; ⁴ IMIBIO-CONICET-UNSL. Box 4, 2do piso Bloque I. Área de Ecología. Ejército de los Andes 950. (5700) San Luis.

solemega@live.com

Palabras claves: hongos micorrícicos arbusculares, diversidad molecular de hongos suelo, Puna

Resumen

Los Glomeromycota o HMA (hongos micorrícicos arbusculares) establecen simbiosis micorrícicas arbusculares en las raíces de la mayoría de las plantas y están distribuidos en todo tipo de ambientes. Estos hongos contribuyen a la nutrición mineral de sus hospedantes y a la conservación del suelo, entre algunas de sus funciones de gran importancia ecosistémica. Sin embargo, es poco lo que se conoce de su diversidad a nivel global y en particular en América Latina. En este trabajo se estudió la diversidad de los HMA de la Puna argentina, mediante la aplicación de métodos moleculares de muestras de suelos rizosféricos provenientes de cinco sitios, ubicados a diferentes altitudes y cultivados con plantas de *Sorghum bicolor* (L.) Moench; también se analizaron muestras de suelo nativo de la Puna. Para su caracterización, se extrajo el ADN de las muestras y se utilizaron *primers* que permiten la aproximación a nivel de género de Glomeromycota, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa. Se probaron diferentes *primers* y combinaciones, así como diferentes enzimas *Taq* polimerasas, también se trabajó con distintas diluciones y temperaturas de hibridación. Finalmente, se logró detectar la presencia de *Acaulospora* y de un grupo de *Funneliformis*. Además, *Funneliformis* fue analizado estudiando el polimorfismo conformacional de la cadena simple (SSCP), obteniéndose 45 genotipos diferentes en todos los sitios analizados. Los resultados a partir de plantas trampas y suelo nativo no fueron idénticos sino complementarios entre sí. La técnica aplicada arrojó resultados variables, éstos podrían ser propios de estas metodologías o atribuirse a que la puesta a punto de las mismas debería reforzarse. A su vez estos resultados se complementaron con los obtenidos en trabajos previos utilizando métodos morfológicos.



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

Introducción

La mayoría de las plantas forman asociaciones simbióticas, generalmente mutualistas, con hongos en sus órganos de absorción denominadas micorrizas; siendo las micorrizas arbusculares (MA) las de mayor distribución tanto por la diversidad de sus hospedantes como por los ambientes que colonizan (Wang & Qiu 2006; Smith & Read 2008). Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) otorgan a sus hospedantes múltiples beneficios en la mayoría de las asociaciones, especialmente favoreciendo a su nutrición mineral mediante la movilización de nutrientes poco móviles o de escasa disponibilidad en el suelo como el fósforo y el zinc, entre otros nutrientes, limitantes para su crecimiento. Además les proporcionan otras ventajas tales como resistencia a patógenos, al estrés hídrico, aumento de la tasa fotosintética, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, entre otras (Smith & Read 2008). Asimismo, los HMA contribuyen a la conservación del suelo por la formación de agregados (Rillig & Mummey 2006). La ubicación taxonómica y sistemática tradicional de los HMA se basa principalmente en caracteres morfológicos de sus esporas y de la colonización radical. Las características morfo-anatómicas de las esporas y esporocarpos de estos hongos junto con la ontogenia, permiten delimitar a las morfo-especies (Brundrett et al. 1996; Smith & Read 2008). Sin embargo, la producción y maduración de esporas está condicionada por distintos factores ambientales como la temperatura, humedad, pH, estación del año y características del hospedante, que pueden modificar el número de paredes, su espesor y su coloración (Smith & Read 2008). Además, algunos HMA son dimórficos, ya que pueden producir dos tipos diferentes de esporas asexuales: unas similares a las representantes del género *Acaulospora* (acaulosporoides), a *Gigaspora* (gigasporoides) y otras a *Glomus* (glomoides) (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo>; Goto & Maia 2006 en Stümer 2012; Krüger et al. 2011b). Por otra parte, las esporas recolectadas directamente de los ambientes naturales pueden estar degradadas o parasitadas por otros microorganismos alterando así su morfo-anatomía. Este inconveniente puede superarse por el empleo de las llamadas "plantas trampas" (PT), cultivo conjunto en maceta de plantas hospedantes con HMA provenientes de suelos (<http://invam.caf.www.edu>). Este método es sumamente útil para el seguimiento de la ontogenia de esporas de numerosos HMA. Sin embargo la utilización de PT presenta ciertas desventajas como el crecimiento exclusivo y excesivo de algunas especies y la total ausencia de otras, que no crecen ni esporulan en cultivo (De Souza, 2008). Es decir, los resultados de diversidad de comunidades de HMA, pueden interpretarse sólo parcialmente aplicando esta metodología (De Souza, 2008; Stümer, 2012). Es extensa la lista de plantas hospedadoras utilizadas para el cultivo de PT, asimismo, *Sorghum bicolor* puede considerarse un buen hospedante de HMA ya que su patrón fotosintético es del tipo C₄ y por lo tanto, se presume como una especie micótrufa obligada con alta dependencia micorrícica (Smith & Read, 2008).



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

Desde el año 2001, se han analizado filogenéticamente las secuencias de genes del ADNr (Stümer, 2012). Así, los HMA pasaron de constituir un orden (Glomerales) perteneciente a Zygomycota (Morton & Benny 1990; Bentivenga & Morton 1994 entre otros) a establecer un filum exclusivo de los HMA, Glomeromycota (Schüßler et al. 2001); inicialmente, con cuatro órdenes (Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archeosporales). Esta clasificación está modificándose paulatinamente, ya que se agregan nuevos taxones a nivel de clases, órdenes y familias (Schüßler & Walter 2010; Öehl et al. 2011; Redecker et al. 2013). Actualmente, los HMA están representados por aproximadamente 230 especies incluidas en Glomeromycota, la mayoría de ellas están caracterizadas sólo anatómica y morfológicamente y nunca fueron cultivadas en PT (Krüger et al. 2011a; www.amf-phylogeny.com). Además, los resultados de estudios ecológicos moleculares indicarían que las especies descritas hasta el momento, representan un escasa fracción de la diversidad existente de los HMA (Öpik et al. 2008). Globalmente, Kivlin et al. (2011) proponen que la riqueza de especies real de los HMA, analizando 14.961 secuencias publicadas de ADN, es seis veces mayor que la estimada. Así, los aportes desde la biología molecular podrían complementar a los estudios morfológicos y permitir elaborar una descripción más profunda y precisa de la diversidad de los HMA (Redecker et al. 2003; Stümer 2012). En el último decenio, a partir de técnicas derivadas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha precisado y ampliado el conocimiento de la diversidad rizosférica, incluyendo a los HMA. En particular, se mejoraron las técnicas moleculares que permiten la extracción de ADN de HMA directamente de muestras de suelo de campo, trampas o esporas (Hempel et al. 2007; Yang et al. 2010) y la caracterización de las especies probando nuevos *primers* o cebadores específicos para PCR (Krüger et al. 2011a). Además, la utilización de técnicas de *fingerprinting* moleculares tales como el polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) permiten realizar estudios tendientes a determinar el impacto de presiones ecológicas sobre la diversidad microbiana (Qing et al. 2007, Lugauskas et al. 2005). Esta técnica permite la caracterización de poblaciones, por la huella génica que generan en geles de poliacrilamida debido a variaciones en las secuencias contenidas en productos de PCR. Cabe destacar que hasta el momento, la información incluida en estos estudios proviene predominantemente del Hemisferio Norte, mayoritariamente Norte América y Europa, y existen escasos reportes provenientes del Hemisferio Sur, y menos aún de Sudamérica (De Souza, 2008; Kivlin et al. 2011). En nuestro país, estudios preliminares han evidenciado variabilidad genética de HMA nativos de la Provincia de Buenos Aires por la técnica de PCR-SSCP (Covacevich et al. 2012; Thougnon Islas et al. 2014).

La Puna es un ambiente extremo, exclusivo de Sudamérica, cuyas características climáticas, edafológicas y biogeográficas la convierten en un área única (Cabrera & Willink, 1980) y de gran interés por su Biodiversidad (Morrone 2001). En suelos rizosféricos de la Puna, Lugo et al. (2008) describieron la diversidad de HMA y bacterias, analizando morfológicamente esporas de los HMA provenientes directamente

XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

de muestras de campo encontraron 10 morfo-especies a lo largo del gradiente altitudinal estudiado. En este sentido, surge la necesidad de completar los estudios taxonómicos tradicionales, con análisis moleculares de rutina y evaluar la potencialidad de la combinación de ambos tipos de determinaciones en la taxonomía de los HMA. Así, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad de los HMA nativos de la Puna argentina utilizando técnicas moleculares, aplicadas directamente a muestras de suelo en PT.

Materiales y Métodos

El área de estudio pertenece a la Puna argentina, Provincia Puneña, en la región fitogeográfica del Dominio Andino-Patagónico (Cabrera 1976) y está ubicada entre los 2000 a 4500 metros sobre el nivel del mar (msnm). Las muestras analizadas fueron recolectadas a lo largo del camino de Iturbe (Jujuy) a Iruya (Salta), en 5 sitios a diferentes altitudes en la Puna argentina, L1: 23° 00' 6,8''S – 65°22' 7,3''O (3370 msnm), L2: 22°53' 35,1''S – 65° 16' 0,08''O (3790 msnm), L3: 22°55'50,7''S – 65°19'9,7''O (3570 msnm), L4: 22°53'23,3''S – 65°14'56,7''O (3870 msnm) y L5: 22°59'28,4''S – 65°21'32,3''O (3404 msnm).

En cada sitio altitudinal se recolectaron 30 muestras de suelo a 15-20 cm de profundidad y se mantuvieron en la heladera a 4°C; se realizó un homogenizado por cada nivel altitudinal de las 30 muestras de suelo, cada homogenizado ("suelo inóculo") se utilizó para iniciar las plantas trampa (PT) y cultivar los HMA nativos. Para llevar a cabo los cultivos de PT se utilizó como planta trampa a *S. bicolor*, las cariopsis fueron esterilizadas con NaClO al 5% (Schulz et al. 1993) y lavadas con abundante agua estéril; posteriormente y para su germinación, se ubicaron en cajas de Petri en condiciones de esterilidad durante 5 días; una vez germinadas, se seleccionaron las plántulas más vigorosas para ser cultivadas en las PT siguiendo la metodología de Morton et al. (2004). Por cada sitio se cultivaron 3 macetas con 3 plántulas de *S. bicolor* cada una; en cada maceta se usó 250g de suelo puneño como inóculo y como suelo soporte 200g de suelo puneño previamente pasteurizado mezclado con perlita estéril en una proporción 2:1, respectivamente. Las condiciones de cultivo de la PT simulaban las condiciones naturales en las que comúnmente crece *S. bicolor* (al aire libre, expuestas a horas de luz y oscuridad natural, variaciones de temperatura y alta radiación solar durante los meses de verano), evitando las precipitaciones como posibles fuentes de contaminación y fueron regadas esporádicamente con agua destilada. Transcurridos dos meses de cultivo, las PT mostraron signos de insuficiencia nutricional, a partir de este período se implementó el riego con solución de Hoagland (Hoagland & Aron, 1950) libre de fósforo; una vez superado el déficit nutricional de las PT, se retomó el regado normal con agua destilada. Posteriormente, se trasplantaron las PT a macetas de 1,5L y se adicionó más suelo soporte hasta completar el volumen de la maceta; en estas condiciones, se cultivaron hasta los 4 meses. Para verificar la colonización radical



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

por HMA de las PT, las raíces se clarificaron y tiñeron (Grace & Stribley 1991); éstas se montaron en preparados semipermanentes con agua y glicerina, en los que se cuantificó, bajo microscopio óptico a 40X, la intensidad de colonización según 5 categorías: 1 (0-5%), 2 (6-25%), 3 (26-50%), 4 (51-75%), 5 (76-100%) (Kormanik & McGraw 1982 en Rajapakse & Miller 1992).

La extracción del ADN genómico total se realizó tanto del suelo-sustrato de las PT como de las muestras de suelo nativo de la Puna sumadas al análisis, utilizando el *kit* de extracción *kit Power Soil™* (MoBio, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para confirmar la integridad del ADN extraído, éste fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1%; las bandas se revelaron con 1,5µL de GelRed por cada 100mL de solución; se sembraron 5µL por cada muestra y 1µL de marcador 1Kb DNA Leader Axygen; se utilizó TBE 1X como solución buffer. La electroforesis se realizó a 120V, durante ca. 60 minutos. La presencia de bandas bajo luz UV en los geles de agarosa se consideró como resultados positivo, para cada muestra y par de *primers* utilizados. Por otro lado, se cuantificó el contenido de ADN en 5µL por muestra y absorbancia 260/280 con el equipo *Epoch* (Biotech).

El ADN extraído a partir del suelo de las PT y de suelo nativo de la Puna se utilizó para amplificar, por la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), regiones del ADN ribosomal de los HMA. Para ello se realizaron reacciones de *PCR* directas (en las que el templado era el ADN extraído) y también del tipo *PCR* anidadas (*nested PCR*) en las que en la segunda reacción el templado era el amplificado de la primera reacción. Las condiciones de reacción fueron: 3µL/2µL (de ADN sin diluir y del templado de la *primer PCR* diluido 1:10; 1:50; 1:100, para la primera y segunda reacción de *PCR*, respectivamente), *buffer* 1,5mM con MgCl₂, *dNTPs* 0,25mM, *primers* 0,1-0,2mM, Taq polimerasa 1,25mM y se trabajó con volúmenes finales de 15 y 25µL para las primera y segunda *PCR*, respectivamente. Para la mayoría de las reacciones se utilizó la enzima *GoTaq® DNA Polymerase* de Promega, también la enzima *Taq DNA Polymerase* de Invitrogen y para algunas muestras aisladas la *Platinum® Taq DNA Polymerase* de Invitrogen. En todos los casos se emplearon las condiciones de reacción indicadas por el fabricante y las muestras se sembraron con sus respectivos negativos.

En las reacciones de amplificación directas (amplificación a partir del ADN extraído), se emplearon los *primers* ITS T2 /ITS4; también se realizaron reacciones de amplificación con el par de *primers* FM6/GIGA5.8R (De Souza et al. 2004). En las reacciones anidadas, se utilizó el par de *primers* NS5 /ITS4 (White et al. 1990); el producto de amplificación fue el templado de una segunda serie de *PCRs*, con los pares de *primers* GLOM 1310 /ITS4, ACAU1660/ITS4- NS5/GIGA 5.8 R (Redecker 2000) y PARA1313/ITS4 (Hijri 2006). Siguiendo la misma estrategia de *PCRs* anidadas, se utilizó para la primera serie de reacciones, el par de *primers* LSU 0061/LSU 0599 (Kjøller & Rosendahl 2000); en la segunda serie se incluyó el par de *primers* LSU RK4f

XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

/LSU RK7r (Kjøller & Rosendahl 2000; Stukenbrock & Rosendahl 2005 a y b). Para ambas reacciones se aplicaron las condiciones de amplificación previamente publicadas por Kjøller & Rosendahl (2000); además, a efectos de evitar doble bandeado, se incrementó en 1°C la temperatura de *annealing*. El producto de esta última reacción de *PCR* se analizó mediante la estrategia de *SSCP* (Kjøller & Rosendahl 2000; Simon et al. 1993; Stukenbrock & Rosendahl 2005 a y b). Para confirmar las amplificaciones de las reacciones de *PCR*, los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa como se indicó anteriormente para confirmar la integridad del ADN, pero aplicando un marcador 100pb.

Además, se analizó gráficamente la imagen obtenida mediante el revelado del gel *SSCP*, se cuantificó el número de bandas observadas en cada muestra (variable Riqueza de bandas); las bandas se compararon cualitativamente entre sí mediante el cálculo de la distancia recorrida por banda y su intensidad. Así, la medición de los recorridos se realizó con el programa *Corel DRAW Graphics suite X6*, para la cuantificación se consideraron como iguales las bandas que difirieron en distancias de +/- 2 mm.

Resultados

Las raíces de los hospedantes utilizados como "trampas" previamente procesadas, fueron observadas microscópicamente y se determinó la colonización radical por los HMA en las PT correspondientes a todos los sitios (L1, L2, L3, L4 y L5), observándose una colonización escasa entre un 0 y 5% (categoría 1).

De acuerdo a los resultados de cantidad y pureza del ADN cuantificado por el equipo *Epoch*, se observó que el ADN extraído se mantuvo dentro del rango de 7,6 a 12,9 ng/ μ L. La cuantificación de la pureza arrojó valores de absorbancia 260/280 que oscilaron entre 0,6 y 2,11.

De las *PCR* directas (*primers ITS T2/ITS4* y *FM6/GIGA5.8R*), no se registraron resultados positivos para ninguno de los sitios, tanto cuando el material genético provino de suelo nativo como de PT.

A partir del ADN obtenido de las PT, en las reacciones anidadas en las que se utilizó el par de *primers NS5/ITS4* en la primera serie de amplificación, se obtuvieron resultados positivos en al menos una repetición de cada uno de los sitios muestreados, utilizando *Taq DNA Polymerase*, mientras que no se obtuvieron resultados positivos cuando se utilizó la enzima *GoTaq® DNA Polymerase*.

De la segunda serie de reacción de *PCR*, a partir de la realizada con los *primers NS5/ITS4*, se obtuvieron resultados positivos de al menos una repetición de los sitios

XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

correspondientes a L1, L2, L3 y L5 cuando se utilizó el par de *primers* ACAU1660/ITS4 y la enzima *Taq DNA Polymerase*, por el contrario no amplificaron con la *GoTaq® DNA Polymerase*. Esto confirma la presencia del género *Acaulospora* en estos sitios. En cuanto a las reacciones con los pares de *primers* NS5/GIGA 5.8R, GLOM 1310/ITS4 y PARA1313/ITS4 no se obtuvieron resultados positivos con las dos enzimas utilizadas. A partir de suelo nativo de la Puna, no se logró la identificación de familias y géneros con las combinaciones de *primers* antes mencionadas.

Cuando se analizó con ADN procedente de PT, se obtuvieron resultados positivos en todas las muestras para la primera serie de reacción (*primers* universales LSU 0061/LSU 0599), empleando la enzima *Taq DNA Polymerase* (para detectar Hongos en general). Sin embargo y a pesar que se realizaron varias reacciones de PCR incluyendo modificaciones tales como: disminución en la concentración de *primers*, aumento de la temperatura de *annealing* en 1 °C y utilización de otro termociclador, se obtuvieron dobles bandas en todas las muestras amplificadas, en las que la banda superior correspondería al tamaño de banda esperado.

En la segunda serie de reacción (par de *primers* LSU RK4f/LSU RK7r), no se obtuvo producto de amplificación en las primeras reacciones utilizando la enzima de Promega. Luego de algunos intentos (con disminución de la temperatura de *annealing* en 1°C y utilización de enzima de Invitrogen y aumento en 5 en el número de ciclos) se logró la amplificación de todas las muestras de PT. En esta reacción se obtuvo un doble bandeo en el que la banda inferior correspondería al tamaño de amplificado esperado. Por esta razón, se siguieron intentando reacciones de amplificación (incluyendo aumento de 1°C de temperatura de *annealing*); si bien, se obtuvo la amplificación de todas las bandas, estos amplificados no presentaron un producto con tamaño de banda definido. La repetición de la misma reacción de PCR arrojó resultados similares.

Del análisis de los suelos nativos de la Puna se obtuvieron resultados negativos de las reacciones anidadas LSU 0061/LSU 0599 aunque no se observan bandas en esta reacción, sí las hubieron en la segunda con LSU RK4f/LSU RK7mr en las muestras L1 y L5 cuando se utilizó la enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase*.

El análisis de las muestras se suelos nativos puneños y de las PT mediante geles de SSCP (a partir de los amplificados de las reacciones anidadas LSU 0061/LSU 0599 y LSU RK4f/LSU RK7mr y se utilizó *Platinum® Taq DNA Polymerase*), solo mostró un patrón de bandas definido para los suelos nativos de los sitios L1 y L5. Por el contrario, no se registró ningún patrón de bandas definido para las muestras provenientes de PT para ninguna de las reacciones de PCR realizadas.

El análisis de los patrones obtenidos de los suelos nativos, determinó una Riqueza de bandas de 25 bandas para el sitio L1 y 32 bandas en el sitio L5. Además se detectaron bandas con diferente localización en el gel para los sitios L1 y L5. Se detectaron

XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

coincidencias de 12 *loci* entre los sitios y un total de 45 genotipos diferentes de HMA puneños. A su vez se observó que las bandas correspondientes a L5 fueron más intensas que las de L1.

Discusión

Se determinó la colonización radical por los HMA en raíces de las PT correspondientes a todos los sitios (L1, L2, L3, L4 y L5), esto verificó la viabilidad de los HMA procedentes de la Puna. Sin embargo, en estas muestras la frecuencia de colonización micorrícica detectada fue baja (entre 0-5%). Si bien no siempre hay una relación directa entre la frecuencia de colonización radical de los HMA y la abundancia sus propágulos (hifas, esporas y raíces colonizadas senescentes) en el suelo rizosférico (Smith & Read 2008) en particular para representantes del género *Gigaspora* (Camprubí et al. 2010), se podría inferir que en este estudio la baja colonización de las PT podría indicar bajo contenido de propágulos de HMA y por lo tanto, de su ADN en la muestra. Así, es probable que las muestras analizadas tuviesen escaso material genético de HMA y por lo tanto, esto habría dificultado su localización por los *primers* genéricos y su posterior amplificación. Por otro lado, existen evidencias sobre un valor mínimo efectivo del 50% de colonización por HMA para la extracción de ADN de HMA (Covacevich *comm. pers.*); es decir, 10 veces mayor que el detectado en las PT de la Puna.

La estimación de la pureza mediante la absorbancia 260/280 resultó variable dentro del rango 0,6 a 2,11. Algunas muestras presentaron valores bajos lo que indicaría contaminación con proteínas, otras se acercaron a los valores óptimos (1,8-1,9) (van Pelt-Verkuil et al. 2010). Aunque la consideración de estos valores en la evaluación de la calidad del ADN es de gran popularidad, cabe mencionar que existen cuestionamientos sobre este test (Sambrook & Russell 2001). Sin embargo, no se puede descartar que los valores bajos de absorbancia 260/280 hayan condicionado los resultados obtenidos en las reacciones de *PCR*. Por otro lado, se pudo constatar la presencia de ADN en todas las muestras y sin signos visibles de degradación mediante la observación de bandas definidas (luego de la siembra del ADN extraído en geles de agarosa). Por estas razones, se consideró que el ADN extraído era utilizable para las *PCRs*.

En cuanto al *kit* de extracción utilizado, si bien funcionó eficientemente en trabajos previos del grupo dirigido por la Dra. F. Covacevich y en ecosistemas semiáridos (Hom et al. 2014), se conoce que el método de extracción recomendado por el fabricante puede fallar para algunas divisiones de hongos y que la eficacia de los métodos de extracción varía debido a diferentes factores tales como los taxones analizados y el tipo de suelo o sustrato (Young et al. 2015). Así, no existe una regla general para lograr el éxito de extracción del ADN fúngico y en particular de los HMA; por ello, otros autores (Lauber et al. 2008; Liang et al. 2008; Young et al. 2015) incorporaron a la metodología

XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

modificaciones enfocadas en aumentar la lisis celular (p. ej. aumento el tiempo de lisis, temperatura y tiempo de congelación, uso de nitrógeno líquido, entre otras) y por ende incrementar la disponibilidad del ADN para su extracción. Los valores obtenidos en la cuantificación de ADN se mantuvieron dentro del rango de 7,6 a 12,9 ng/ μ L. Estos valores fueron menores a los hallados por la extracción de ADN en muestras de suelo de la Provincia de Buenos Aires por Covacevich et al. (resultados no publicados). Hay que considerar sin embargo, que el contenido de ADN resultante de la extracción corresponde al genómico de todos los representantes de la biota de la muestra, no siendo específico para HMA. Si bien estos valores en general no se informan, otros autores registraron que la cantidad de ADN de HMA es en general baja en las muestras, incluso menor al 10% comparada con otros Fila fúngicos y además, no se relaciona con la riqueza de taxones (Young et al. 2015). De tal manera, y aun siendo los porcentajes de colonización de las PT bajos, si el sustrato hubiera contenido propágulos de HMA suficientes, el ADN de los mismos se hubiera extraído y los *primers* genéricos hubieran detectado los diferentes géneros de HMA. Futuros trabajos deberían considerar incorporar modificaciones que maximicen la lisis celular de las muestras tendientes a extraer mayor cantidad de ADN de los HMA.

De las *PCR* realizadas a partir de los *primers* universales **NS5/ITS4**, puede destacarse que se hayan obtenido resultados positivos mediante las reacciones de amplificación del ADN extraído solo a partir de PT de todos los sitios muestreados y que no se obtuvieron amplificaciones a partir de suelo nativo, ello indicaría que el ADN extraído presentó la calidad necesaria para ser amplificado por reacciones de *PCR*, solo en el caso de las PT. En esta reacción se utilizaron *primers* generales para Eucariotas (White et al. 1990) que constituyen un paso previo para la detección de los HMA. Si bien se conocen los efectos inhibidores sobre la extracción del ADN del suelo por las sustancias húmicas (Persoh et al. 2008), en nuestro caso el sustrato suelo de las PT fue el mismo que en las muestras de suelo nativo, ya que se utilizó éste como sustrato de cultivo; es decir, la extracción diferencial de ADN entre PT y suelo nativo no pueden explicarse por la presencia de ácidos húmicos. La extracción exitosa de ADN eucariota a partir del sustrato de las PT podría deberse a que este tipo de cultivo haya estimulado el crecimiento vegetativo de los organismos que se encontraban en quiescencia o con baja actividad en las muestras de suelos nativos originales conservado en heladera a 4°C.

De las reacciones anidadas a partir de los amplificados por los *primers* **NS5/ITS4**, los resultados positivos obtenidos en los sitios L1, L2, L3 y L5 con el par de *primers* **ACAU1660/ITS4** para discriminar *Acaulosporaceae sensu stricto* (Redecker 2000), evidenciaría de la presencia de esta familia en todos los niveles altitudinales estudiados excepto a 3870 msnm (L4). Además, estos *primers* permiten la amplificación de regiones del genoma las especies *Acaulospora laevis* y *Acaulospora spinosa* (Redecker 2000). Esto también podría considerarse como la confirmación molecular de la presencia de ambas especies en los sitios mencionados, las que habían sido también

XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

“Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo”

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

registradas por métodos morfológicos previamente por Lugo et al. (2008) en los sitios denominados L3 y L1 respectivamente. En este sentido, la estrategia molecular utilizada estaría confirmando la presencia de la familia Acaulosporaceae y las especies *A. laevis* y *A. spinosa* en los sitios L1 y L3. Además que se amplía su distribución a 3790 msnm (L2) y a 3404 msnm (L5), en los que estos taxones no se hallaban determinados por los métodos morfológicos. Sin embargo, futuras estrategias de clonado y secuenciamiento deberían ser conducidas para confirmar los resultados obtenidos en este estudio.

Por su parte, no se obtuvieron amplificaciones positivas visibles con los pares de *primers* NS5/GIGA 5.8R y GLOM 1310/ITS4 en ninguna de las muestras analizadas. Se conoce que el primer par de *primers* amplifica para la familia Gigasporaceae y el segundo para el “grupo *Glomus mosseae* / *intraradices*” en el que se incluye a *Sclerocystis sinuosa* (Redecker 2000), actualmente considerados en géneros distintos (*Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices*, respectivamente) en Schübler y Walker (2010). Esto no se correspondería con los resultados morfológicos hallados por Lugo et al. (2008) que sí encontraron especies de Gigasporaceae y *Sclerocystis sinuosa* (= *Glomus sinuosum*). Si bien se desconocen las causas de estos resultados negativos aplicando las herramientas moleculares, se podría especular que, a pesar de habitar en los sitios analizados representantes de Gigasporaceae y *Sclerocystis sinuosa* (Lugo et al. 2008), es probable que su abundancia en la muestra de las PT fuese escasa y su ADN no pudo ser amplificado por los *primers* específicos. Esta falta de detección mediante técnicas moleculares podrían adjudicarse a fallas en la maceración o lisis celular previas a la extracción de ADN y éstas se deberían a la dificultad para romper las paredes celulares de espesores importantes de las Gigasporaceae (que fluctúan entre 3 a 47 μm) y en el caso de *S. sinuosa*, se sumaría su extenso peridio (de 6 a 60 μm) formado por hifas de paredes anchas al igual que las que poseen las esporas (1.5 a 5 hasta 12.5 μm) (Schenck & Perez 1990, Lugo et al. 1995).

Por otro lado, tampoco se obtuvieron amplificaciones positivas visibles con los pares de *primers* PARA1313/ITS4 tanto de PT como de suelo nativo; si bien las posibles causas podrían ser las ya indicadas (por ejem. la baja colonización y abundancia de propágulos de HMA en los suelos estudiados, los inhibidores existentes en el suelo, etc.), este resultado sí se correspondería con las determinaciones de taxonomía clásica en los que no se registró la presencia de *Paraglomus* en las muestras analizadas morfológicamente en la Puna (Lugo et al. 2008).

En cuanto a las PCR directas destinadas a amplificar también parte de la región 18S e ITS; mediante la utilización de los *primers* ITS T2/ITS4 y FM6/GIGA5.8R, no se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los sitios estudiados. Es decir, no se confirmó la presencia de *Scutellospora castanea* (Hijri et al. 1999) ni de otros representantes (p. ej., *Gigaspora* spp., *Scutellospora* spp.) de la familia Gigasporaceae (De Souza et al. 2004). Así, los métodos moleculares no detectaron estos taxones que

XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

sí fueron registrados con determinaciones morfológicas y anatómicas de los HMA puneños realizadas previamente en los sitios analizados, en los que hallaron representantes de los géneros *Scutellospora* y *Gigaspora* (Lugo et al. 2008).

Las reacciones a partir de los *primers* LSU 0061/LSU 0599, a pesar de haber observado doble bandeo, indicarían nuevamente ADN extraído de calidad tal que permite su amplificación por reacciones de PCR. En la segunda serie de reacciones anidadas en las que se utilizó el par de *primers* LSU RK4f/LSU RK7r que amplifica para representantes de *Funnelformis* (Kjøller & Rosendahl 2000; Stukenbrock & Rosendahl 2005 a y b), no se obtuvo producto de amplificación en las reacciones de rutina cuando se trabajó con templados procedentes de PT; para lograr amplificar el material, se debieron incluir modificaciones que dieron como resultado amplificadas con doble bandeo, éste probablemente indique inespecificidad en la amplificación en al menos una banda o signos de degradación. Estos productos de amplificación no presentaron la calidad necesaria para los análisis de variabilidad genética por SSCP programados. Aun así, podría decirse que al haberse obtenido amplificaciones positivas, se confirmaría la presencia de HMA pertenecientes al grupo de especies de *Funnelformis* ya mencionadas (Kjøller & Rosendahl 2000; Stukenbrock & Rosendahl 2005 a y b) en todas las muestras de PT analizadas. Así, se sumarían este grupo de especies de HMA a los resultados obtenidos mediante técnicas taxonómicas clásicas por Lugo et al. (2008), quienes registraron previamente en los suelos puneños a *Glomus* sp., *G. aggregatum*, *G. ambisporum* y *G. sinuosum*, actualmente denominado *Sclerocystis sinuosa* (Schubler y Walker 2010).

Cuando se realizó la amplificación anidada en las muestras de ADN proveniente de suelo nativo, solo se logró amplificar las muestras correspondientes a los sitios L1 y L5. Si bien esto confirmaría la presencia de representantes del grupo de especies de *Funnelformis* (Kjøller & Rosendahl 2000; Stukenbrock & Rosendahl 2005 a y b) en estos sitios, no puede afirmarse que en los restantes (L2, L3 y L4) no existan representantes de éstos taxones de HMA ya que en las PT de esos mismos sitios si pudieron detectarse por identificación morfológica. Entonces, sería probable que la cantidad del material genético de estos HMA no fuera la necesaria para que la extracción eficiente del ADN en los sitios donde no fueron detectados, impidiendo su amplificación por la reacción de PCR. Además, se comprobó que la pureza del ADN extraído en L2, L3 y L4 (estimada mediante la absorbancia 260/280) fue escasa según los parámetros utilizados por van Pelt-Verkuil et al. (2010). Esto reforzaría aún más la hipótesis del bajo contenido generalizado del ADN de los HMA para todo este estudio.

El mayor número de bandas obtenido en el gel SSCP se evidenció en el sitio L5 comparado con el L1. También se detectó coincidencia de 12 *loci* en L1 y L5, lo que demuestra que existen taxones que se encuentran en ambos sitios. Aunque las bandas se visualizaron en un solo gel de todos los realizados, el mayor número de bandas en



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

L5 podría indicar un mayor grado de polimorfismo y/o mayor número de taxones en este sitio de estudio, lo que podría ser indicativo de mayor diversidad de los HMA del género *Funneliformis* en el sitio L5. Sin embargo, la confirmación por corte de bandas y secuenciamiento sería el paso a seguir para confirmar estos resultados.

Debido a que en general no se lograron todas las amplificaciones esperadas y teniendo en cuenta que las PCR's fueron realizadas en diferentes condiciones, empleando tres Taq polimerasa diferentes y realizando distintas diluciones, nos lleva a inferir que el ADN de los HMA de las muestras procedentes de PT y del suelo nativo de la Puna presentó una abundancia menor a la mínima necesaria para su detección y amplificación. Otra posible explicación es que las muestras analizadas fueran resistentes a la lisis celular y por ello, sería necesario implementar ajustes al método de extracción aquí utilizado.

Conclusiones

En los suelos de la Puna estudiados, los resultados de las metodologías moleculares obtenidos a partir de cultivos trampa no fueron idénticos sino que complementarios a los hallados a partir de suelo nativo, demostrando que los métodos utilizados en este trabajo muestran variabilidad. Así, los resultados moleculares se complementaron con los obtenidos por métodos morfológicos, sumando nuevas especies a las previamente registradas mediante la metodología morfo-anatómica y ampliando la distribución de otras. De esta manera, se sugiere el abordaje de métodos complementarios para los estudios ambientales tendientes a ampliar el conocimiento sobre la taxonomía de HMA. Los resultados obtenidos indicarían que la mayor representatividad de HMA en el volumen total de las muestras procesadas, podría resultar en una mayor cantidad de ADN de Glomeromycota en la cantidad total extraída. Esto podría permitir mayor eficiencia en la detección de los *primers* específicos para géneros de HMA a través de la reacción en cadena de la polimerasa, siendo el primer paso en la confirmación molecular de géneros de HMA de muestras ambientales. Por lo tanto, mayor esfuerzo en la multiplicación de los propágulos de HMA así como en la extracción de ADN de estructuras de difícil lisis, permitiría arribar a resultados más exitosos.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue financiado por los Proyectos PROICO 2-2214 (SeCyT FQByF-UNSL), PICT 2008-0781 y proyectos de INTA.

Bibliografía

Bentivenga SP y Morton, JB. 1994. Systematics of Glomalean endomycorrhizal fungi: current views and future directions. En: *Mycorrhizae and Plant Health*, pp. 283-308.



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T y Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. CSIRO, Australia

Cabrera AL. 1976. Territorios fitogeográficos de la República Argentina. En: *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, 2da. ed. ACME, Argentina, págs. 1-85.

Cabrera AL, Willink A. 1980. Biogeografía de América Latina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington.

Camprubí A, Calvet, CP. Pitet CM y Estaún V. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with psammophilic vegetation in Mediterranean coastal sand dunes. INIA.

Covacevich F, Hernandez Guijarro K, Sainz Rozas HR, Echeverría HE. 2012. Variabilidad de hongos micorrízicos (*Glomus* spp.) Mediante PCR-SSCP en suelos de buenos aires con diferentes manejos. XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Argentino de la Ciencia del Suelo, Mar del Plata, Abril 2012.

De Souza FA, Kowalchuk GA, Leeflang P, van Veen JA y Smit E. 2004. PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecies 18S rRNA Gene Sequence Heterogeneity Is an Accurate and Sensitive Method To Assess Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the Genus *Gigaspora*. *Am Soc Microbiol* 70: 1413-1424.

De Souza FA, Lima Da Silva IC y Louro Barbara RL. 2008. Capítulo 15. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. En: Moreira FMS, Siqueira JO y Brussard L (Eds.), *Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros*. UFLA, Lavras, pp. 483-536.

Grace C y Stribley DP. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 95: 1160-1162.

Hempel S, Renker C y Buscot F. 2007. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environ Microbiol* 9: 1930-1938.

Hijri I, Sýkorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder p, Wiemken A y Dirk D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molec Ecol* 15: 2277-2289.



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

Hijri M, Hosny M, van Tuinen D y Dulieu H. 1999. Intraspecific ITS Polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) Is Structured within Multinucleate Spores. *Fungal Genet Biol* 26: 141-151.

Hoagland DR y Arnon DI. 1950. The water-culture method of growing plants without soil. *Calif. Agr. Expt. Sta. Circ.* 347. Univ. of Calif. Agric. Exp. Station, Berkley, pp. 1-32.

Horn S, Caruso T, Verbruggen E, Matthias, Rillig MC y Hempel S. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungal communities are phylogenetically clustered at small scales. *ISME Journal*: 1-12.

<http://invam.wvu.edu>. West Virginia University. Last modified: November 22, 2015.

<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo>. 2013. Last updated 02 Jan, 2013.

Kivlin SN, Hawkes CH y Treseder KK. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 43: 2294-2303.

Kjøller R y Rosendahl S. 2000. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant Soil* 226: 189-196.

Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H y Schüßler A. 2011b. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol* 183: 212-223.

Krüger M, Walker C y Schüßler A. 2011a. *Acaulospora brasiliensis* comb. nov. and *Acaulospora alpina* (Glomeromycota) from upland Scotland: morphology, molecular phylogeny and DNA-based detection in roots. *Mycorrhiza* 21: 577-587.

Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA y Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem* 40: 2407-2415.

Liang Z, Drijber Ra, Lee DJ, Dwiekat IM, Harris SD y Wedin DA. 2008. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biol Biochem* 40: 956-966.

Lugauskas A, Levinskaitė L, Pečiulytė D, Repeškienė J, Motuzas A, Vaisvalavičius R, Prosyėevas I. 2005. Effect of copper, zinc and lead acetates on microorganisms in soil. *Ekologija* 1: 61-69.



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

Lugo MA, Anton AM y Domínguez de Toledo L. 1995. *Sclerocystis sinuosa* (Glomales, Zycomycetes) en cuatro Poaceae argentinas. *Kurtziana* 24:145-152.

Lugo MA, Ferrero M, Menoyo E, Estevez M, Siñeriz F y Anton A. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosferic bacteria diversity along an altitudinal gradient in South American Puna grassland. *Microb Ecol* 55: 705-713.

Morrone JJ. 2001. Biogeografía de América Latina y el Caribe. Manuales y Tesis SEA. Vol. 3 SEA (Sociedad Entomológica Aragonesa), CYTED (Cooperación Iberoamericana Subprograma II, Diversidad Biológica) & UNESCO (ORCYT), México.

Morton JB y Benny GL. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.

Morton JB, Koske RE, Stümer SL, Bentivenga SP. 2004. Mutualistic arbuscular endomycorrhizal fungi. In: G. M. Mueller, G. F. Bills & M. S. Foster (eds.) Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods, pp. 317-336. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Öehl F, Silva GA, Goto BT, Maia LC y Sieverding E. 2011. Glomeromycota: two new classes and a new order. *Mycotaxon* 116: 365-379.

Öpik M, Moora M, Zobel M, Saks U, Wheatley R, Wright F y Daniell T. 2008. High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytol* 179: 867-876.

Qing H, Hong-yan QI, Jing-hai Z, Hong-xun Z. 2007. Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine. *Journal of Environmental Sciences* 19: 74-79.

Persoh, DS, Buscot TF y Rambold G. 2008. Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil. *J Microbiol Methods* 75: 19-24.

Rajapakse S y Miller JC. 1992. Chapter 15. Methods for studying Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Root Colonization and Related Root Physical Properties. En: Norris JR, Read DJ y Varma AK (Eds.) *Methods in Microbiology* (Vol. 24), pp. 301-316. AP.

Redecker D, Hijri I y Wiemken A. 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobot* 38:113-124.



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB y Walker C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515-531.

Redecker D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.

Rillig MC, Mummey DL. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171:41-53.

Sambrook JF. y Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Sambrook, JF y Russell, DW (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schenck NC y Perez Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Synergistic Publications, Gainesville, Florida.

Schulz B, Wanke U, Draeger S. y Aust HJ. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* 97: 1447-1450.

Schüßler A y Walker C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Gloucester, England. In libraries of The Royal Botanic Garden, Kew.

Schüßler A, Schwarzott D, y Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421.

Simon L, Levesque RC y Lalonde M. 1993. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 59: 4211-4215.

Smith SE y Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Smith SE y Read DJ (Eds.). 3rd edition. AP, NY, London, Singapur, Tokio.

Stukenbrock EH y Rosendahl S. 2005 a. Development and amplication of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genet Biol* 42: 73-80.

Stukenbrock EH y Rosendahl S. 2005 b. Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. *Mol Ecol* 14: 743-752.

Stürmer SL. 2012. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza* 22: 247-258.



XXV CONGRESO ARGENTINO DE LA CIENCIA DEL SUELO

"Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo"

Río Cuarto, 27 de Junio - 01 de Julio de 2016

Thougnon Islas AJ; Covacevich F; Hernandez Guijarro K. 2014. Diversidad genética de suelo y esporas de hongos micorrícicos nativos de Buenos Aires. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Bahía Blanca 5 al 9 de Mayo de 2014.

van Pelt-Verkuil E, van Belkum A y John P. Hays JP. 2010. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer.

Wang B. y Qiu YL. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.

White TJ, Bruns T, Lee S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ (Eds.), *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. California, pp. 315-322.

Yang C, Hamel C, Schellenberg MP, Perez JC y Berbara RL. 2010. Diversity and functionality of arbuscular mycorrhizal fungi in three plant communities in semiarid Grasslands National Park, Canada. *Microb Ecol* 59: 724-733.

Young JM, Weyrich LS, Clarke LJ y Cooper A. 2015. Residual soil DNA extraction increases the discriminatory power between samples. *Forensic Sci Med Pathol*: DOI 10.1007/s12024-015-9662-z

XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo



Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo

Carmen G. Cholaky y José M. Cisneros (Comp.)

El XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo cuyo lema es Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo, se ha organizado con el objetivo de instalar en las agendas científicas, académicas y políticas la necesidad de estudiar, proponer y ejecutar acciones para ordenar las actividades en el territorio aprovechando las múltiples funciones del sistema suelo: producir, conservar, recuperar, acumular y depurar entre las más relevantes.

En este sentido, la presente obra sintetiza los principales avances logrados de la disciplina en nuestro País. Dichas contribuciones están organizadas y presentadas en los siguientes campos temáticos: Física, Química y Físico-química de Suelos; Biología de Suelos; Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal; Manejo, Conservación y Ordenamiento de Suelos y Aguas. Riego y Drenaje; Génesis, Clasificación, Cartografía y Mineralogía del Suelos; Contaminación del Suelo y Calidad del Medio Ambiente y Educación, Extensión y Transferencia de la Ciencia del Suelo.

Esta obra está destinada a docentes, investigadores, estudiantes y profesionales quienes hacen de la Ciencia del Suelo su quehacer cotidiano. También está dirigida a todos aquellos que, directa o indirectamente, usufructúan de los servicios del suelo: productores agropecuarios, organismos públicos nacionales, provinciales y municipales, empresas de servicios agropecuarios, agroindustrias, asociaciones profesionales, civiles y público en general.

e-book

ISBN 978-987-888-173-9



9 789876 881739



AACCS

ASOCIACION ARGENTINA
CIENCIA DEL SUELO

UniRío
editora



Universidad Nacional
de Río Cuarto