

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Respuestas de la colonización micorrícica a los componentes del pastoreo
en *Paspalum dilatatum* (Poir)

Autor: Silvina García

Tutor: Dra. Fabiana Pezzani

Co-tutor: MSc. Felipe Lezama

Licenciatura en Ciencias Biológicas, Profundización en Ecología
Mayo de 2012

RESUMEN. Las micorrizas arbusculares están presentes en la mayoría de las gramíneas, y muestran diversas respuestas en relación al pastoreo (ser beneficiadas, perjudicadas o no ser afectadas). Esto podría deberse a la combinación de efectos de los componentes del pastoreo (intensidad y selectividad en la remoción de biomasa, pisoteo y deyecciones) los cuales no han sido estudiados en forma aislada. Una de las gramíneas más importantes en los pastizales uruguayos, debido a su alta abundancia, su gran palatabilidad y su alto valor forrajero es *Paspalum dilatatum*. En este trabajo se estudiaron los efectos de los componentes del pastoreo (en forma aislada y combinada) sobre la intensidad de colonización por micorrizas arbusculares en *P. dilatatum*. Esta especie presentó altos niveles de colonización por hongos micorrizógenos arbusculares en todos los tratamientos. En situación de clausura *P. dilatatum* presentó mayor presencia ovillos y menor presencia de arbusculos, siendo ambas estructuras fúngicas responsables del intercambio de sustancias entre la planta y el hongo. Se observó un efecto negativo del pisoteo sobre la colonización total y sobre las vesículas (estructuras de almacenamiento de los HMA). En las variables colonización total, colonización por arbusculos y por ovillos existen interacciones entre los factores analizados que muestran tanto efectos positivos como negativos sobre la micorrización. Dadas las diferencias en los efectos de cada uno de los componentes del pastoreo sobre la colonización por micorrizas y las interacciones entre ellos, se puede concluir que el resultado global del pastoreo está determinado por el balance en la importancia relativa de cada uno de los componentes. El estudio de las respuestas diferenciales de las distintas estructuras de los HMA a los componentes del pastoreo nos permite profundizar en el estudio de esta interacción.

Palabras clave: endomicorrizas, selectividad, deyecciones, pisoteo, pastizales.

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares juegan un papel fundamental en la estructuración de pastizales (Grime et al 1987; van der Heijden et al 1998; Hartnet & Wilson 1999). Se ha encontrado que están presentes en la mayoría de las plantas herbáceas, observándose mayores porcentajes de colonización en gramíneas con metabolismo fotosintético C_4 en comparación con plantas de metabolismo C_3 (Anderson et al. 1994; Hartnet & Wilson 1999; Parodi & Pezzani 2011). A pesar de la íntima interacción entre los dos simbioses (planta y hongo) no existe especificidad entre ellos y además varias especies de hongos pueden colonizar a una misma especie vegetal (van der Heijden et al. 1998; Smith & Read 2008; van der Heijden & Horton 2009). En estas interacciones las hifas de los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) penetran las células corticales de las raíces de las plantas y forman estructuras características: arbusculos, estructuras que resultan de la ramificación de las hifas; vesículas (presentes en la mayoría de los HMA) y finalmente ovillos, estructuras intrarradicales que se forman a partir de hifas muy desarrolladas. Desde el punto de vista funcional las vesículas sirven para el almacenamiento de lípidos y los arbusculos y ovillos tienen como función el intercambio metabólico de nutrientes entre los simbioses. Aunque tanto arbusculos como ovillos tienen la misma función, representan variaciones morfológicas de la colonización. Los arbusculos corresponden a la asociación descrita como de tipo *Arum*, donde una hifa intercelular muy desarrollada se ramifica y forma estructuras intracelulares. Los ovillos por otra parte corresponden a la asociación del tipo *Paris*, la cual no presenta hifas intercelulares, sino que se forman las estructuras dentro de las células debido a hifas intracelulares muy desarrolladas que adquieren una conformación torneada (Smith & Read 2008).

El estudio de la colonización por cada una de dichas estructuras de intercambio presenta escasos antecedentes y el mismo permitiría conocer acerca del grado de funcionamiento de esta interacción. Por

ejemplo, un mayor porcentaje de las estructuras de intercambio indicaría que se está realizando un alto intercambio metabólico entre los simbioses.

El efecto del pastoreo sobre la intensidad de micorrización ha resultado ser variable. En la mayoría de los estudios previos el pastoreo redujo la micorrización (Bethlenfalvay & Dakkessian 1984; Bethlenfalvay et al. 1988; Grigera & Oesterheld 2004). Gehring & Whitham (1994) en sus revisiones acerca de los impactos de la herbivoría sobre la colonización por HMA, explicaron la reducción de la micorrización por efecto del pastoreo mediante la hipótesis de limitación por C. La misma postula que la remoción de tejido fotosintético debido a pastoreo, provoca un decremento en el transporte de C hacia las raíces, reduciendo la energía disponible para el crecimiento de los HMA. Por otro lado, en algunos estudios la intensidad de colonización por micorrizas no se vio afectada por el pastoreo (Lugo et al. 2003), mientras que en otros la micorrización aumentó (Wallace 1981). Para estos casos se ha propuesto que la respuesta de los HMA puede depender de la intensidad de pastoreo: en situaciones de pastoreo intenso los microorganismos del suelo se han visto perjudicados respecto a situaciones con pastoreo moderado o de clausura (Qi et al. 2011). En otros estudios se ha encontrado que la respuesta de los hongos micorrizógenos a la herbivoría está regulada por condiciones bióticas del hábitat relacionadas a la composición florística de la comunidad (Mendoza et al. 2002; Ruotsalainen & Eskelinen 2011) así como también por el estadio fenológico de las plantas (Piipo et al. 2010). Recientemente, Barto & Rillig (2010) en un meta-análisis de experimentos acerca del efecto del pastoreo sobre las micorrizas, hallaron que la herbivoría tendría un efecto poco marcado sobre la colonización micorrícica.

Los estudios de los efectos del pastoreo sobre la colonización micorrícica se han centrado en la defoliación, sin embargo, el efecto del ganado sobre los pastizales puede separarse en cuatro componentes: la remoción de biomasa vegetal, las deyecciones, el pisoteo y la selectividad (Lezama &

Paruelo en prep.). La remoción de biomasa (la cual puede ser selectiva o no selectiva), favorece a las especies de baja altura y gran propagación lateral (Kholer et al. 2004). El estudio del efecto de las deyecciones, mostró que las mismas causan la aparición de parches de especies nitrófilas a una escala temporal corta, mientras que a escala estacional provocaron la reducción de la biodiversidad (Kholer et al. 2004). Finalmente el pisoteo provoca daños mecánicos sobre las raíces (Bethlenfalvay & Dakkessian 1984; Striker et al. 2006), al tiempo que presenta importantes efectos sobre el suelo provocando su compactación (Pinzón & Amézquita 1991; Steinfeld et al. 2006).

El pastizal es el ecosistema dominante en Uruguay ocupando el 70% del territorio (MGAP 2000) y en él se desarrolla la ganadería, una de las principales actividades económicas del país. Se han reportado importantes efectos del pastoreo sobre la composición florística de los pastizales (Rodríguez 2003) así como también sobre la productividad (Altesor 2005). Comprender los efectos del pastoreo sobre la colonización micorrícica de las especies de pastizales, podría contribuir a entender las respuestas de dichas especies.

En los trabajos mencionados acerca de los efectos del pastoreo sobre la colonización micorrícica se evaluó el efecto del pastoreo como un todo, sin discriminar entre los distintos componentes, que varían espacialmente. En el presente trabajo, se estudiaron los efectos de los componentes del pastoreo sobre la colonización micorrícica de una especie dominante de los pastizales naturales de Uruguay: *Paspalum dilatatum*. La misma ha mostrado ser afectada por el pastoreo, el cual redujo colonización total, vesículas y arbuscúlos en la mayor parte del año (Grigera & Oesterheld, 2004). El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la selectividad, las deyecciones y el pisoteo sobre la colonización micorrícica de las diferentes estructuras de los HMA de *P. dilatatum*, para entender el efecto del pastoreo en su conjunto. Adicionalmente, este trabajo permitirá evaluar la hipótesis de limitación por

C, y brindará nuevos elementos que contribuyan a explicar las diferencias encontradas en los antecedentes sobre los efectos del pastoreo en la interacción micorrícica.

MÉTODOS

Sitio de estudio

El presente trabajo se realizó en un área del establecimiento privado “El Relincho” ubicado en el departamento de San José, Uruguay (34°19'S; 57°02'W). En él se realiza ganadería extensiva con vacunos y ovinos, presentando una carga ganadera baja (aproximadamente 0.5 UG.ha⁻¹). Los suelos son de tipo vertisol rúptico (Altamirano et al. 1976). La temperatura media anual es de 16.7 °C, registrándose las temperaturas máximas en el mes de enero con una media de 27.3°C y las mínimas en julio con medias de 8.7°C. La precipitación media anual es de 1099 mm, siendo los meses junio y febrero, los que presentan menores y mayores precipitaciones respectivamente (<http://www.meteorologia.gub.uy/index.php/estadisticas-climaticas>).

Diseño experimental

El diseño experimental del presente trabajo está basado en el ensayo utilizado en el trabajo de tesis de doctorado de Felipe Lezama en el cual se midieron la composición y estructura de la comunidad vegetal y variables edáficas en respuesta a los componentes del pastoreo. Específicamente, para este trabajo se utilizó la información correspondiente a la frecuencia de *P. dilatatum*, la densidad aparente y el contenido de nitrógeno del suelo. El experimento mencionado se detalla a continuación.

El experimento, montado en el año 2006, se llevó a cabo en un área de 5000 m². Se establecieron una serie de cuatro parcelas pastoreadas y 112 parcelas excluidas, en las que se aplicaron tratamientos para simular los efectos del pastoreo durante tres años (2007 – 2009).

En el área excluida al pastoreo, se demarcó una grilla de 112 parcelas de 1.6 m², con un arreglo espacial de 4 x 28 parcelas y corredores de 0.4 m. El experimento consistió en cuatro tratamientos que simulaban los efectos desglosados del pastoreo: intensidad en la remoción de biomasa (intensiva o moderada), pisoteo, deyecciones y selectividad en la remoción, además de parcelas de referencia excluidas y sin tratamientos. Para el presente trabajo, se seleccionaron solo las combinaciones de tratamientos que incluían la remoción intensiva de biomasa que consistió en el corte estacional de 300 g de material vegetal fresco de cada parcela. De esta forma los factores evaluados fueron el pisoteo, las deyecciones y la selectividad.

Para simular el efecto del pisoteo vacuno (factor P), se realizó la aplicación cada tres meses de una pezuña artificial (de plomo, con un peso de 70kg) de forma homogénea sobre la superficie de la parcela (por detalles metodológicos ver Striker et al. 2011). Este factor presentó dos niveles: 0-no pisoteado y 1-pisoteado. El tratamiento que simuló las deyecciones del ganado (factor F) se logró mediante una fertilización anual realizada en los meses de junio con una solución de 200g de urea en 10 litros de agua (36 g N/m²) en base a trabajos que indican que el principal nutriente que se recicla a través de la orina es el N (Haynes & Williams 1993; Connor & Loomis 2002). Este factor presentó dos niveles: 0-no fertilizado y 1-fertilizado.

La remoción de biomasa (tanto selectiva como no selectiva) se llevó a cabo utilizando una grilla de 64 celdas de 20 x 20 cm, la cual se colocaba sobre cada parcela y se elegían al azar las celdas en las que se cortaba el material vegetal. La remoción no selectiva consistió en un corte de todo el material vegetal

por encima de los 2-3 cm de las celdas seleccionadas, mientras que en el modo selectivo (factor S) permanecieron sin remover las especies catalogadas en la bibliografía como “duras” o tóxicas como lo son *Baccharis trimera*, *Baccharis coridifolia*, *Eryngium horridum*, *Stipa charruana*, *Sporobolus indicus* y *Schizachyrium microstachyum* (Rosengurtt 1979). La selectividad en el consumo de biomasa presentó dos niveles: 0- no selectiva y 1-selectiva. La superficie defoliada de las parcelas con remoción selectiva fue un 80% mayor a las parcelas con remoción no selectiva (Lezama & Paruelo en prep.).

Para el presente trabajo los tratamientos resultantes de la combinación de los tres factores (P, F y S) fueron ocho: no selectivo (NS), no selectivo fertilizado (NSF), no selectivo fertilizado y pisoteado (NSFP), no selectivo pisoteado (NSP), selectivo (S), selectivo fertilizado (SF), selectivo pisoteado (SP) y selectivo pisoteado fertilizado (SPF). Cada uno de estos tratamientos tuvo cuatro repeticiones, resultando un total de 40 parcelas ($8 \times 4 = 32 + 4$ tratamiento pastoreo + 4 parcelas de referencia sin tratamientos).

Especie seleccionada para evaluar colonización micorrícica

Para estudiar los efectos del pastoreo sobre la interacción micorrícica arbuscular, se seleccionó la especie *Paspalum dilatatum* (Poir). *P. dilatatum* es una de las especies dominantes en el sitio de estudio donde presentó una ocurrencia del 66% en el total de las parcelas al inicio del experimento (2006) y una frecuencia promedio de 3% dentro de cada parcela (Lezama & Paruelo en prep.).

P. dilatatum es una especie autóctona de América del Sur y se cree que su biotipo común se originó en el oeste de Uruguay (Burson 1991). Presenta metabolismo fotosintético C_4 (Bungenstab 2009) y es de ciclo estival, aunque con gran tolerancia al frío (Da Costa & Scheffer-Basso 2003). Se caracteriza por

presentar rizomas cortos, ser muy frondosa y crecer hasta 50 cm de altura. Presenta una alta palatabilidad y buen valor forrajero para el ganado (Benech 1975; Bungenstab 2009). Resiste altos niveles de pastoreo (Burson & Watson 1995). Por un lado se ha encontrado que tolera la defoliación debido a la acumulación de carbohidratos en la base de los macollos y a la producción de yemas capaces de crecer después de la defoliación (Ball et al. 2002). Por otro lado, es relativamente tolerante al pisoteo debido a la resistencia de sus raíces, medida como la presión requerida para causar el colapso de las mismas (Striker et al. 2006).

Muestreo de campo

Se realizó un muestreo de raíces de la gramínea *P. dilatatum*, tres años después de iniciados los tratamientos, en marzo de 2010 en las 40 parcelas seleccionadas para este trabajo. En cada parcela se seleccionaron tres individuos al azar. Las raíces fueron separadas de la parte aérea y conservadas en vinagre puro para su posterior procesamiento en el laboratorio.

Trabajo de laboratorio (tinción y cuantificación de HMA)

Las raíces fueron lavadas y aclaradas con una solución de KOH al 10% y posteriormente teñidas con azul de tripano (0.05%) según el método de Koske & Gemma (1989). Para cada individuo seleccionado en el campo se montaron en portaobjetos 30 segmentos de raíz de 1 cm de largo. Mediante observación al microscopio se identificaron estructuras típicas de los HMA: hifas, vesículas, arbuscúlos y ovillos. Para cada individuo se cuantificó la intensidad de colonización total, estimada como el cociente de campos con presencia de alguna estructura fúngica y el número de campos observados (n=90)

(Brundrett, 1996). También se calculó la intensidad de colonización para cada una de las siguientes estructuras: vesículas, arbusculos y ovillos.

Procesamiento de datos y análisis estadísticos

Se calculó para cada tratamiento (10 = 8 combinaciones con tratamientos + pastoreo + excluido sin tratamiento) la intensidad de colonización total y la intensidad de colonización para cada una de las estructuras fúngicas señaladas en el ítem anterior. Todas las variables fueron expresadas en porcentaje (promedio \pm e.e.).

El modelo utilizado para el análisis de los resultados fue un Modelo Lineal Generalizado (MLG), con función de enlace logit. Se hizo un primer análisis incluyendo los 10 tratamientos estudiados sin considerar la estructura factorial del experimento (ecuación 1). A continuación se hizo un análisis considerando el diseño factorial de tres factores con dos niveles cada uno lo que generó los 8 tratamientos para el análisis desglosado de los efectos del pastoreo (ecuación 2). Los datos fueron analizados con el procedimiento GENMOD del sistema SAS (2008). La significancia con la que se trabajó es de 0.05 para todas las comparaciones realizadas.

$$(1) \text{Log} \left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i} \right) = \mu + \alpha_i \quad i=1, \dots, 10$$

μ = media general
 α_i = efecto del i ésimo tratamiento

$$(2) \text{Log} \left(\frac{\pi}{1-\pi} \right)_{ijk} = \mu + F_i + P_j + S_k + (F \times P)_{ij} + (F \times S)_{ik} + (P \times S)_{jk}$$

$i=1,2 \quad j=1,2 \quad k=1,2$
 μ = media general
 F_i = efecto del tratamiento Fertilización
 P_j = efecto del tratamiento Pisoteo
 S_k = efecto del tratamiento Selectividad
 $(F \times P)_{ij}$ = efecto de interacción Fertilización-Pisoteo.
 $(F \times S)_{ik}$ = efecto de la interacción Fertilización-Selectividad.
 $(P \times S)_{jk}$ = efecto de la interacción Pisoteo-Selectividad

RESULTADOS

P. dilatatum presentó altos niveles de colonización total por micorrizas arbusculares en todos los tratamientos, siendo el promedio general 97.8 %. En relación a la presencia de estructuras de HMA, los valores promedio considerando todos los tratamientos fueron: 3.3 % para arbusculos, 42.2 % para vesículas y 6.3 % para ovillos.

El análisis a través del MLG con 10 tratamientos mostró diferencias significativas en las cuatro variables ($p < 0.001$). Tanto para la colonización total, como para la colonización por vesículas no existieron diferencias significativas entre las parcelas pastoreadas y las clausuradas al pastoreo. Sin embargo, las estructuras fúngicas correspondientes a arbusculos y ovillos fueron afectadas por el pastoreo ($p < 0.001$). La colonización por arbusculos aumentó en un 400 % en parcelas pastoreadas (Figura 1a), mientras que la colonización por ovillos se redujo en un 79 % (Figura 1b).

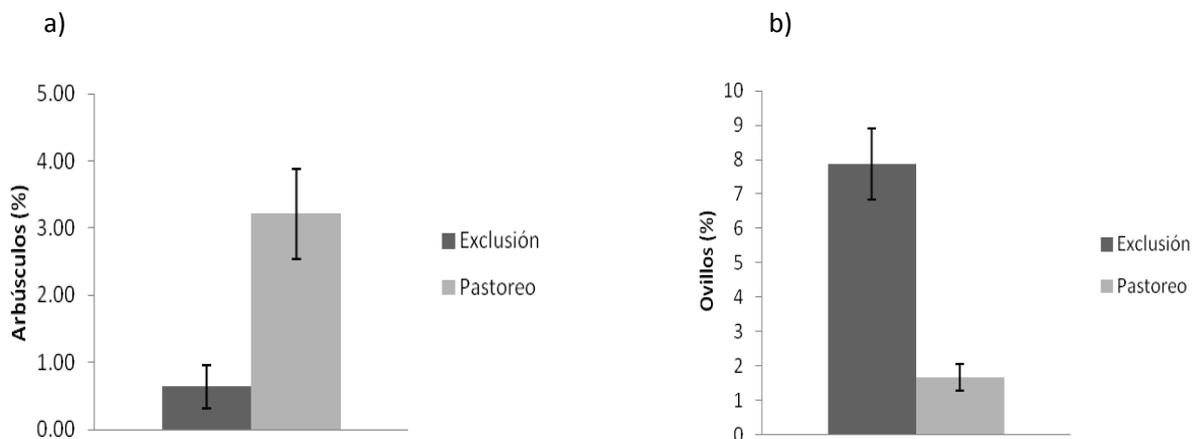


Figura 1. Porcentaje de colonización micorrícica ($n=4$, promedio \pm e.e.) en *Paspalum dilatatum* de estructuras fúngicas correspondientes a a) arbusculos y b) ovillos en parcelas pastoreadas y excluidas al pastoreo.

El segundo MLG consistió en el análisis factorial de los efectos del pastoreo sobre la colonización micorrícica en *P. dilatatum* y sus resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del análisis factorial del MLG de los efectos de los componentes del pastoreo (selectividad, pisoteo y deyecciones) sobre las variables de colonización micorrícica en *P. dilatatum*. Las flechas indican efecto significativo, positivo o negativo, de cada componente del pastoreo sobre las estructuras de la colonización micorrícica (NS indica efecto no significativo). Para cada variable se indican las interacciones significativas.

Variables Componentes del pastoreo	Colonización total (%)	Colonización por arbusculos (%)	Colonización por ovillos (%)	Colonización por vesículas (%)
Pisoteo (P)	↓	NS	NS	↓
Selectividad (S)	↑	NS	↑	NS
Deyecciones (F)	↓	↑	↓	↓
Interacciones Significativas	SXP SXF	SXP	SXP SXF PXF	

La variable colonización total de HMA fue afectada significativamente por el pisoteo ($p= 0.0079$), la selectividad ($p=0.0002$) y por las interacciones SxP ($p=0.0273$) y SxF ($p<0.001$). La simulación de la selectividad aumentó un 1.6 % la colonización total en ausencia de pisoteo, mientras que este aumento fue del 2.2 % en presencia del mismo (Figura 2). El efecto de la selectividad también dependió de los niveles de fertilización, observándose que en ausencia de fertilización la colonización total permaneció constante al variar la selectividad, mientras que en presencia de fertilización se encontró un aumento del 3.8 % de la colonización micorrícica en las plantas de parcelas con tratamiento selectivo de remoción de biomasa (Figura 3).

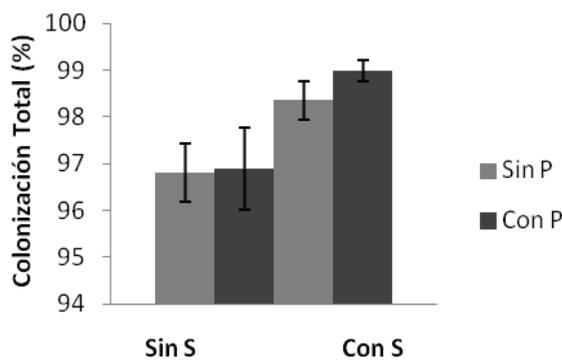


Figura 2. Efecto de la interacción entre el pisoteo (P) y la selectividad (S) sobre el porcentaje de colonización micorrícica total ($n=4$, promedio \pm e.e.) de *Paspalum dilatatum*.

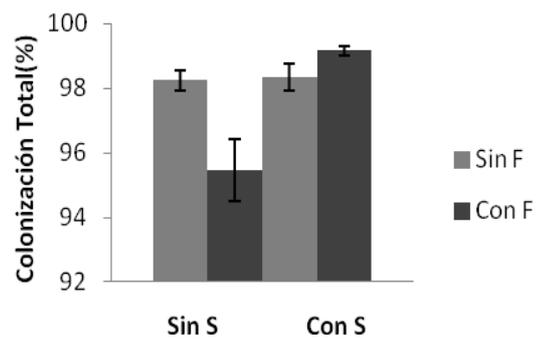


Figura 3. Efecto de la interacción entre la fertilización (F) y la selectividad (S) sobre el porcentaje de colonización micorrícica total ($n=4$, promedio \pm e.e.) de *Paspalum dilatatum*.

La colonización por vesículas se vio afectada negativamente por el tratamiento de pisoteo ($p<0.0001$) y por el de fertilización ($p=0.0522$) disminuyendo en un 17% y un 4 % respectivamente. No se detectaron efectos de las interacciones de los factores sobre la variable colonización por vesículas.

La colonización por arbusculos se vio afectada significativamente solo por efecto de la fertilización ($p=0.0293$) y de la interacción SxP ($p=0.0325$). La presencia de arbusculos aumentó en un 51% en respuesta a la fertilización (Figura 4a). El efecto de la selectividad dependió de los niveles de pisoteo: en ausencia de pisoteo la selectividad produjo una reducción de la presencia de arbusculos del 28.2%, mientras que en presencia de pisoteo la selectividad no tuvo un efecto sobre esta variable (Figura 4b).

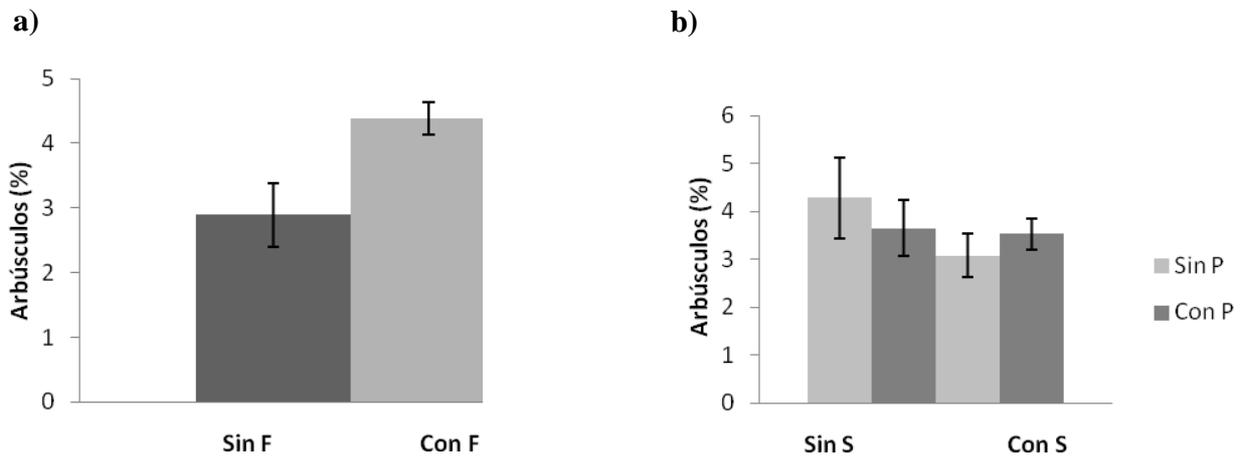


Figura 4. a) Porcentaje de colonización por arbusculos en *Paspalum dilatatum* ($n=4$, promedio \pm e.e.) en parcelas fertilizadas y sin fertilizar. **b)** Efecto de la interacción entre el pisoteo (P) y la selectividad (S) sobre la colonización por arbusculos ($n=4$, promedio \pm e.e)

Para la variable colonización por ovillos existen interacciones significativas entre todos los factores analizados: SxP, SxF, y PxF. La interacción SxP ($p<0.0001$) muestra que el efecto de la selectividad sobre la presencia de ovillos es mucho mayor en ausencia de pisoteo (se incrementa 417 % la colonización por estas estructuras fúngicas) que en plantas de parcelas pisoteadas, en las cuales también hay un incremento de la presencia de ovillos pero del orden del 47 % (Figura 5a). La

interacción SxF para la variable ovillos también resultó significativa ($p < 0.0001$). En ausencia de fertilización el factor selectividad provocó un aumento en estas estructuras del 123 %, mientras que en presencia de fertilización este aumento fue del 300% (Figura 5b). Finalmente, la interacción PxF ($p = 0.0008$) resultó en un cambio de signo de la variable colonización por ovillos: en ausencia de fertilización el pisoteo provocó un decremento de la presencia de ovillos de un 34%, mientras que al combinarse los efectos del pisoteo y la fertilización se observó un aumento de un 45% de estas estructuras fúngicas (Figura 5c).

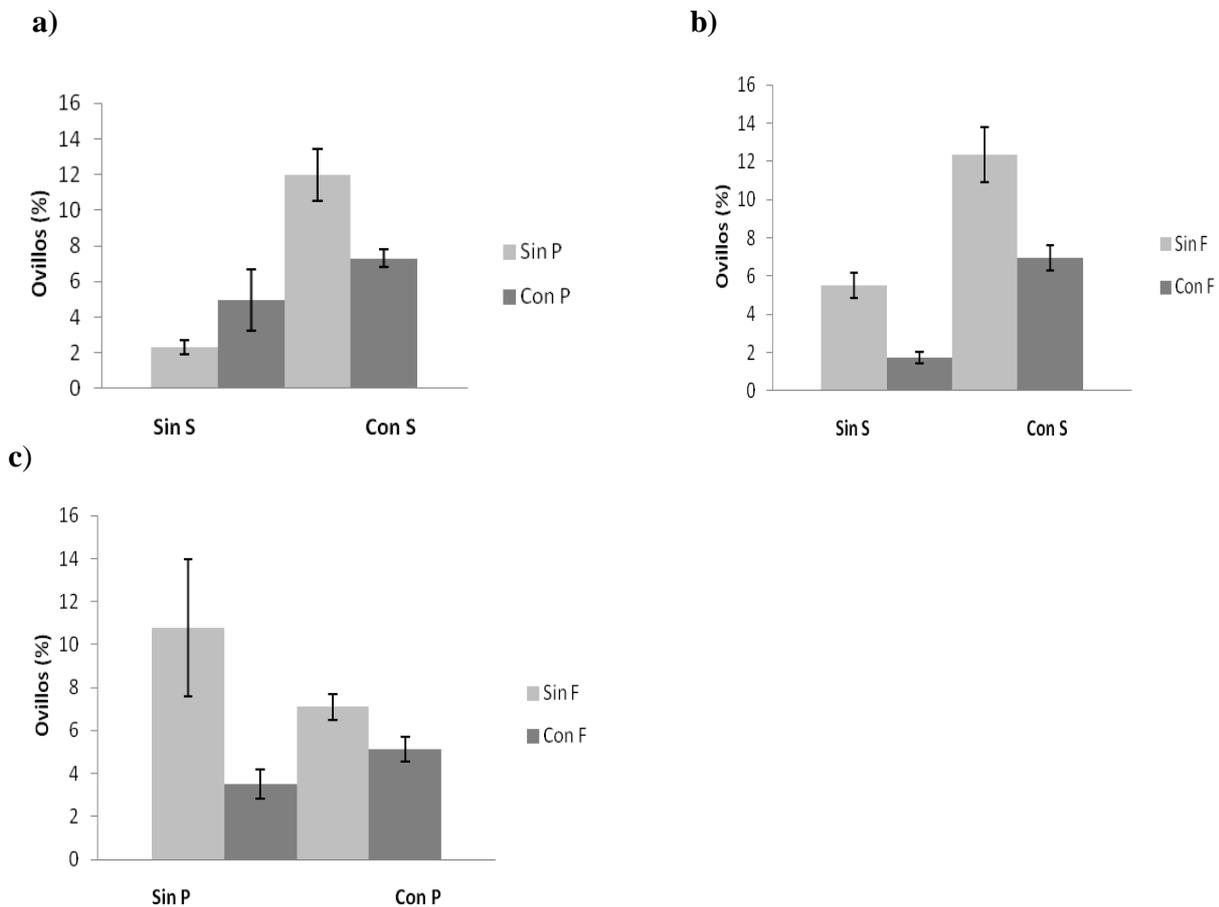


Figura 5. Colonización (%) de ovillos en *Paspalum dilatatum* ($n=4$ promedio \pm e.e.) a) Efecto de la interacción entre el pisoteo (P) y la selectividad (S) b) Efecto de la interacción entre la fertilización (F) y la selectividad (S) c) Efecto de la interacción entre el pisoteo (P) y la fertilización (F).

DISCUSIÓN

En el primer análisis realizado en el cual se tienen en cuenta los 10 tratamientos estudiados, se observó que *P. dilatatum* presentó altos niveles de colonización por micorrizas arbusculares en todos los tratamientos, lo cual era esperable ya que esta especie presenta metabolismo fotosintético C_4 (Bungenstab 2009) y en estudios anteriores, se ha observado que las plantas con este tipo de metabolismo, presentan altos y mayores valores de colonización micorrícica en comparación con las C_3 (Anderson 1994; Lugo 2003; Parodi & Pezzani 2011). Esto podría deberse a que las raíces finas de las especies C_3 , son más eficientes en la absorción de agua y nutrientes, mientras que las raíces gruesas y fibrosas de las C_4 , requerirían en mayor medida de la interacción micorrícica para obtener estos recursos (Hetrick et al 1988,1989). Además podría existir otra explicación morfológica para esto: las raíces gruesas de las especies C_4 presentan mayor aerénquima permitiendo un transporte más eficiente de oxígeno hacia las raíces y una mayor mineralización y disponibilidad de nutrientes (Cornwell et al 2001).

No existieron diferencias significativas para la colonización total entre situaciones de clausura y pastoreo. Estos resultados concuerdan con los hallados en varios antecedentes (Bethlenfalvay & Dakessian, 1984; antecedentes citados en Gehring & Whitham 1994; Lugo 2003). Por ejemplo, Lugo et al. (2003), plantean dos posibles explicaciones para la ausencia de efecto del pastoreo: por un lado esto puede deberse a que en suelos pobres en fósforo como los hallados en dicho estudio el micelio extrarradical se encuentra mas desarrollado y actúa como un sistema estabilizador interconectando diferentes plantas hospedadoras minimizando las diferencias entre zonas pastoreadas y no pastoreadas. Otra posible explicación que podría dilucidar mejor los resultados encontrados y ligada a la hipótesis de limitación por C, es que existiría un crecimiento compensatorio de las plantas debido al pastoreo por

lo que éste provocaría un aumento de la fotosíntesis y del crecimiento de la planta favoreciendo de esta manera la interacción micorrícica. Esto podría ocurrir en *P. dilatatum* dado que presenta reservas en la base de los macollos que permiten compensar la pérdida de biomasa por defoliación.

El momento del muestreo puede haber incidido en estos resultados ya que el mismo fue realizado en verano momento de mayor crecimiento de *P. dilatatum*. Esto se asocia con una mayor presencia de tejido fotosintético en las plantas, lo que podría explicar la falta de efectos sobre la colonización micorrícica porque la disponibilidad de fotoasimilados sería suficiente para sustentar la interacción. Esto se observó en el trabajo de Grigera & Oosterheld (2004), en el cual se encontraron efectos negativos del pastoreo sobre la colonización micorrícica en *P. dilatatum* en las estaciones de invierno y primavera, no observándose efectos en verano.

Según el meta-análisis realizado por Barto & Rillig (2010) la herbivoría, tuvo un impacto bajo sobre la colonización micorrícica. En ese mismo trabajo se encontró que en pastos perennes, el tipo de tratamiento (ya sea herbivoría real o simulada mediante corte) influye en la respuesta de los HMA ya que se observó una reducción mucho mayor de la colonización por estos hongos en tratamientos con defoliación simulada que en situaciones de pastoreo real. Esto sugiere que los resultados en este tipo de plantas estarían dados por los distintos componentes del pastoreo (deyecciones, pisoteo, selectividad) y sus interacciones.

Arbúsculos y ovillos, que representan estructuras de intercambio de la interacción micorrícica arbuscular sí se vieron afectados por el pastoreo, al tiempo que mostraron entre sí patrones opuestos de comportamiento. Los arbúsculos se incrementaron, mientras que se observó una reducción de los ovillos debido al pastoreo. El patrón opuesto de estas variables podría explicarse debido a que diferentes estructuras corresponderían a diferentes taxones de hongos (Smith & Read 2008) y estarían

colonizando las raíces de la planta en estudio, lo que es esperable dado que varios grupos de HMA pueden colonizar una misma planta (van der Heijden et al. 1998; Smith & Read 2008; van der Heijden & Horton 2009). Los resultados del presente trabajo sugieren que aunque la abundancia total de hongos no se vea afectada por pastoreo puede existir un recambio de especies, alterando la composición de la comunidad micorrícica ya que algunas especies de estos hongos podrían verse favorecidas por el pastoreo mientras que otras serían perjudicadas por el mismo (Eom et al. 2001; Saito et al. 2004; Su & Guo 2007; Saravesi et al. 2008 citados en Barto & Rillig 2010).

Al estudiar los efectos desglosados del pastoreo sobre la colonización micorrícica se obtuvo que tanto la colonización total como la colonización por vesículas se vieron perjudicadas por el pisoteo, lo cual es esperable ya que este provoca daños mecánicos sobre las raíces (Bethlenfalvay & Dakkessian 1984) lo que perjudicaría también la colonización de los HMA. Se ha determinado que el aumento en la compactación del suelo provoca la reducción del volumen de los poros, lo que afecta el intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera, impidiendo el desarrollo de las raíces (Russell 1977 citado en Pinzón y Amézquita 1991). En el experimento sobre el cual se hizo el presente estudio se incrementó la densidad aparente del suelo aproximadamente un 10 % en las parcelas con tratamiento de pisoteo (Lezama & Paruelo en prep.). Esto podría afectar negativamente la colonización micorrícica. Por otro lado el pisoteo tuvo un efecto positivo sobre la frecuencia de *P. dilatatum*, aumentándola en un 580% (Lezama & Paruelo en prep.) Esto podría deberse a que dado que esta especie es muy tolerante al pisoteo (Striker et al. 2006), este factor perjudicaría en mayor medida a las especies vegetales que compiten con ella, quedando mayores recursos disponibles para la especie en estudio, por lo que quizás no requeriría de la micorrización.

El tratamiento de selectividad aumentó la colonización total así como también el porcentaje de ovillos, lo que se explicaría por una mayor presión de herbivoría en parcelas con tratamiento selectivo ya que

la superficie defoliada de las mismas fue un 80% mayor a las parcelas con remoción no selectiva (Lezama & Paruelo en prep.). La interacción micorrícica se vería aumentada ya que tendería a compensar estas pérdidas de biomasa incrementando de esta forma el abastecimiento de nutrientes hacia las plantas. Estos resultados, coinciden con la bibliografía, donde se ha visto que en algunos casos la colonización aumenta con la defoliación (Wallace 1981). Asimismo, Piipo et al. (2011) encontraron un aumento en la colonización micorrícica debido a pastoreo en plantas con floración tardía y un efecto neutro sobre dicha colonización en plantas con floración temprana. Por otro lado, Ferraro & Oesterheld (2002) hallaron que la defoliación debido a pastoreo en pastos perennes provocó una reducción en la biomasa aérea pero no en la radicular, lo que podría explicar la falta de efectos negativos sobre la colonización micorrícica. Finalmente otro mecanismo que podría explicar el aumento en la colonización total y por ovillos, se relaciona con una mayor producción de exudados de C hacia la rizósfera luego de la defoliación, lo que estimula el crecimiento microbiano y la mineralización de N, aumentando el N disponible en el suelo (Hamilton & Frank 2001; Ayres et al. 2004; Hamilton et al. 2008 citados en Barto & Rillig 2010).

En el tratamiento de fertilización se observó una disminución en la colonización total, en el porcentaje de vesículas y en el porcentaje de ovillos, lo que es esperable ya que al existir mayor cantidad de nutrientes disponibles para la planta, la misma no requiere de la interacción micorrícica para acceder a ellos. Los beneficios de la interacción micorrícica serían más importantes en ambientes pobres en nutriente por lo que al agregar nutrientes al sistema, se reduciría la colonización micorrícica. Esto se debe a que para la planta sería más beneficioso obtener nutrientes del suelo que de la interacción ya que la misma implica un costo de C para la planta (Tuomi et al. 2001). Además se ha encontrado que ante condiciones de escasos nutrientes como nitrógeno y fósforo, hecho que ocurre antes de aplicar el tratamiento de fertilización en este trabajo, la planta produce exudados con señales de reconocimiento

para atraer HMA, lo que aumentaría la colonización en dichas condiciones (Yoneyama et al. 2007). Para el caso de los arbusculos, estos resultaron ser favorecidos por el factor fertilización, nuevamente esto podría explicarse debido a que se trata de grupos de hongos diferentes que se ven favorecidos ante la adición de nutrientes, existiendo un recambio en las especies de HMA. La fertilización aumentó la frecuencia de *P. dilatatum* debido a que habría un aumento en la disponibilidad de nitrógeno, lo que le permitiría aumentar su tejido fotosintético, dando como resultado que en una mayor cantidad de fotosintatos se transfieran al hongo, aumentando la colonización por arbusculos. Asimismo en las parcelas fertilizadas se produjo un aumento del 40% de nitrógeno mineral en el suelo y no se vieron variaciones en el nitrógeno orgánico (Lezama & Paruelo en prep.).

Al combinar la remoción selectiva con la presencia de pisoteo, se encontró que esta interacción produce efectos diferentes sobre las estructuras de intercambio de las micorrizas. La selectividad en ausencia de pisoteo provocó una disminución de la colonización por arbusculos y un aumento muy importante (417%) de la colonización por ovillos. Mientras que la selectividad en parcelas pisoteadas no tuvo efectos sobre la presencia de arbusculos y aumentó la cantidad de ovillos, aunque en un 47%. Estas diferencias contribuyen a reafirmar la hipótesis de que las plantas de *P. dilatatum* pueden presentar diferentes especies de HMA colonizando sus raíces, y que dichas especies de hongos responden de manera diferencial a los efectos del pastoreo.

Los efectos de la selectividad sobre la colonización micorrícica también dependieron de la fertilización, tratamiento que simuló los efectos de las deyecciones de los animales en pastoreo, observándose un efecto positivo tanto para la colonización total como para los ovillos debido a esta interacción. Se observó además que los mayores aumentos en la frecuencia de *P. dilatatum* se dieron al combinarse estos dos factores, aumentando en un 488 % (Lezama & Paruelo en prep.). Esto podría deberse a que por un lado la defoliación dada por la selectividad desencadenaría mecanismos de compensación del crecimiento en estas plantas al tiempo que la fertilización (deyecciones) estaría aportando nutrientes

aprovechables para su crecimiento. Esto podría explicar el aumento en la colonización total y por ovillos ya que al verse favorecida la planta se dispondría de mayor cantidad de fotosintatos destinados a los hongos micorrizógenos tal como lo sugiere la hipótesis de limitación por C.

Finalmente la interacción entre los factores pisoteo y fertilización, tuvo efecto significativo sobre los ovillos y resultó en un cambio de signo de la variable: en ausencia de fertilización el pisoteo redujo la presencia de ovillos mientras que en las parcelas fertilizadas se observó un aumento de dichas estructuras de intercambio. Si bien se ha encontrado que la fertilización estaría aportando nutrientes al ambiente y el pisoteo ayudaría a que se produzca la mezcla de estos con el suelo (Qi et al. 2011), parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían reflejar este hecho.

El estudio de las diferentes estructuras de los HMA permite conocer acerca del funcionamiento de la interacción micorrícica. El hecho de que la colonización total no se viera afectada por el pastoreo mientras que las estructuras de intercambio (arbusculos y ovillos) sí lo hicieron sugiere que el funcionamiento de las micorrizas sí pudo verse afectado debido al pastoreo. Además, los patrones opuestos de respuesta de las estructuras de intercambio podrían explicar que existe un recambio en las especies de HMA, cambiando la composición de la comunidad fúngica debido a la perturbación que representa el pastoreo.

Por otra parte, al estudiar los componentes del pastoreo de manera aislada, se pudo observar que cada uno ejerce efectos diferentes sobre la colonización por micorrizas. La importancia relativa de cada componente podría afectar el resultado global, hecho que podría explicar los efectos poco consistentes del pastoreo sobre la colonización por micorrizas arbusculares encontrados en los numerosos antecedentes bibliográficos. Por este motivo el abordaje del estudio de cada uno de los componentes del pastoreo y sus interacciones nos permite comprender mejor los efectos del pastoreo en su conjunto sobre la colonización micorrícica arbuscular.

A modo de perspectivas, sería interesante analizar el desempeño de las plantas en situaciones de pastoreo, de clausura y contar además con un tratamiento sin micorrizas. Además, los estudios moleculares tendientes a la identificación de las especies de HMA que colonizan *P. dilatatum*, permitirán aumentar el conocimiento de esta interacción.

Agradecimientos

Agradezco a mis orientadores Dra. Fabiana Pezzani y MSc. Felipe Lezama por guiarme durante la elaboración de esta tesis, al Dr. José Paruelo y a la Dra. Adriana Montañez por participar en el tribunal, por sus aportes y sugerencias. Gracias a la MSc. Estela Priore por haberme guiado en el análisis estadístico, a la familia Macció propietarios del establecimiento “ El Relincho” por brindarnos el sitio de estudio, al grupo de Ecología de Pastizales (GEP) por su ayuda durante el muestreo de campo y al laboratorio de Microbiología donde se llevó a cabo el procesamiento de las muestras. Finalmente agradezco a mi familia y amigos por estar presentes en las dificultades y en los buenos momentos de esta etapa.

Este trabajo contó con el apoyo económico de ANII a través de la Beca de Iniciación INI_2010_2928.

BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, A ; H Da Silva; A Durán; A Echeverría; D Panario & R Puentes.1976. *Clasificación de Suelos*. Dirección de Suelos y Fertilizantes. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Tomo I. Montevideo.
- Altesor, A; M Oesterheld; E Leoni; F Lezama & C Rodríguez. 2005. Effect of grazing on community structure and productivity of a Uruguayan grassland. *Plant Ecology* 179:83-91.
- Anderson, RC; BAD, Hetrick & WT, Wilson. 1994. Mycorrhizal dependence of *Andropogon gerardii* and *Schizachyrium scoparium* in two prairie soils. *Am. Mid. Nat.* 132:366-376.
- Aires E; J Heath; M Possell; HIJ Black; G Kerstien & RD Bardgett. 2004. Tree physiological responses to above-ground herbivory directly modify below-ground process of soil carbon and nitrogen cycling. *Ecol. lett.*7:469-479.
- Ball, DM; CS Hoveland & GD Lacefield. 2002. Southern Forages. Potash and Phosphate Institute and Foundation for Agronomic Research, Norcross, GA.
- Barto, EK & MC Rillig. 2010. Does herbivory really suppress mycorrhiza? A meta-analysis. *J. Ecol.* 98:745-753.
- Benech, ER. 1975. *Estudios sobre producción y calidad del forraje en dos biotipos de Paspalum dilatatum Poir.* Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Agronomía.

- Bethlenfalvai, G & S Dakkessian. 1984. Grazing effects on mycorrhizal colonization and floristic composition of the vegetation on a semiarid range in Northern Nevada. *J. Range Manag.* 37:312-316.
- Bethlenfalvai, G; RS Thomas; S Dakkessian; MS Brown & RN Ames. 1988 Mycorrhizae in stressed environments: Effects on plant growth, endophyte development, soil stability and Physiol, Planl. 76. 1989 231 soil water. - In *Arid Lands, Today and Tomorrow* (E. E.Whitehead, C. F. Hutchinson, B. N. Timmermann and R.G. Varady, eds), pp. 1015-1029. Westview Press, Boulder.
- Bethlenfalvai, G & S Dakkessian. 1984. Effects of grazing on mycorrhizal colonization and floristic composition of the vegetation on semi-arid range in northern Nevada. *J Range Manage.* 37:312-316.
- Brundrett, M; N Bougher; B Dell; T Grove & N Malajczvk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR.
- Bungenstab, E. 2009. *Productivity, nutritive, quality and utilization of Dallis Grass (Paspalum dilatatum) for beef cattle production as influenced by fertilization regime and grazing management.* Tesis de doctorado, Auburn University, Alabama.
- Burson, BL. 1991. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Bot. Gaz.* 152:219-223
- Connor DJ & RS Loomis. 2002. Procesos de Nitrógeno (8) 215-246. *Ecología de Cultivos, Productividad y manejo en sistemas agrarios.* Mundi Prensa. Madrid.
- Cornwell, WK; BL Bedford & CT Chapin. 2001. Ocurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus-poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *Am. J. Bot.* 88:1824-1829.

- da Costa, DI; SM Scheffer-Basso. 2003. Caracterização Morfofisiológica e Agronômica de *Paspalum dilatatum* Poir. Biótipo Virasoro e *Festuca arundinacea* Schreb. 1. Desenvolvimento Morfológico. *R. Bras. Zootec.* 32: 1054-1060.
- Dirección Nacional de Meteorología (en línea). Noviembre 2011.
<http://www.meteorologia.gub.uy/index.php/estadisticas-climaticas>
- Eom, AH; GWT Wilson; DC Harnett. 2001. Effects of ungulates grazers on arbuscular mycorrhizal symbiosis and fungal community structure in tallgrass prairie. *Mycologia* 93: 233-242.
- Ferraro D.O. & M Oesterheld. 2002. Effect of defoliation on grass growth. A quantitative review. *Oikos* 98:125-133.
- Gehring, C & T Whitham. 1994. Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Tree* 9: 251-255.
- Gehring C & T Whitham. 2002. Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences. *Mycorrhizal Ecology* 295-320.
- Grigera, G & M Oesterheld. 2004. Mycorrhizal colonization patterns under contrasting grazing and topographic conditions in the flooding pampa (Argentina). *J. Range Manag.* 57:601-605.
- Grime, JP; JM Mackey; SH Hillier & DJ Read. 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature* 328:420-422.
- Hamilton, EW & DA Frank. 2001. Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology* 82:2397-2402.
- Hamilton, EW; DA Frank; PM Hinchey & TR Murray. 2008. Defoliation induces root exudation and triggers positive rhizospheric feedbacks in a temperate grassland. *Soil Biol. Biochem.* 40:2865-2873.

- Hartnett, D & T Wilson. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology*. 80: 1187-1195.
- Haynes RJ & PH Williams. 1993. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. Donald L. Sparks (ed). *Advances in Agronomy*. Academic Press San Diego, California. 49: 119-144
- Johnson, NC; DL Rowland; L Corkidi; LM Egerton-Warburton & EB Allen. 2003. Nitrogen enrichment alters mycorrhizas allocation at five mesic to semiarid grassland. *Ecology* 84:1895-1908
- Koske R & J Gemma. 1989. A modified procedur for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92: 486-505.
- Kholer, F; F Gillet; JM Gobat & A Buttler. 2004. Seasonal vegetation changes in mountain pastures due to simulated effects of cattle grazing. *J. Veg. Sci.* 15:143-150.
- Lezama, F & JM Paruelo (en prep). Simulación de los componentes del pastoreo y sus efectos en un pastizal natural de Uruguay.
- Lugo, M; M González Maza & M Cabello. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland II: seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycologia* 93: 407-415.
- Mendoza R; V Goldman; J Rivas; V Escudero; E Pagani; M Collantes & L Marbán. 2002. Poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares en relación con las propiedades del suelo y de la planta hospedante en pastizales de Tierra del Fuego. *Ecol. Austral* 12:105-116.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2000. Censo general agropecuario 2000. Dirección de censos y encuestas. Montevideo.
- Parodi, G & F Pezzani. 2011. Micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas de Uruguay en áreas con y sin pastoreo. *Agrociencia* 15 2:1-10.

- Piippo S; A Markkola; E Härmä & J Tuomi. 2011. Do compensatory shoot growth and mycorrhizal symbionts act as competing above- and below-ground sinks after simulated grazing? *Plant. Ecol.* 212:33–42
- Pinzón A & E Amézquita. 1991. Compactación del suelo por el pisoteo de animales en pastoreo en el piedemonte amazónico de Colombia. *Pasturas Tropicales* 13: n°2.
- Rodríguez, C; E Leoni; F Lezama & A Altesor. 2003. Temporal trends in species composition and plant traits in natural grasslands of Uruguay. *J. Veg. Sci* 14:433-440.
- Rosengurtt, B. 1979. Tablas de comportamiento de las especies de plantas de campos naturales en el Uruguay. Facultad de Agronomía. Montevideo.
- Ruotsalainen, A & A Eskelinen. 2011. Root fungal symbionts interact with mammalian herbivory, soil nutrient availability and specific hábitat conditions. *Oecologia.* 166:807-817.
- Rusell EW. 1977. Soil conditions and plant growth. 10° ed. Longman, New York. 849p.
- Qi, S; Zheng H; Lin Q; Li G; Xi Z & Zhao X. 2011. Effects of livestock grazing intensity on soil biota in a semiarid steppe of Inner Mongolia. *Plant Soil* 340:117–126.
- Saito, K; Y Suyama; S Sato & K Sugawara. 2004. Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18s rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14:363-373.
- Saravesi K; A Makkola; P Rautio; M Roito & J Tuomi. 2008. Defoliation causes parallel temporal responses in a host tree and its fungal symbionts. *Oecologia* 156: 117-123.
- SAS INSTITUTE. 2008. GENMOD, version 9.2. Cary, N.C.
- Smith, SE & DJ Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. Academic Press. NY. 787 pp.
- Steinfeld, H; P Gerber; T Wasenaar; V Castel; M Rosales & C Haan. 2006. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Roma.
- Striker, G; P Insausti; A Grimoldi & R León. 2006. Root strength and trampling tolerance in the grass *Paspalum dilatatum* and the dicot *Lotus glaber* in flooded soil. *Funct. Ecol.* 20:4-10.

- Striker, G; FPO Mollard; AA Grimoldi; RJC León & P Insausti. 2011. Trampling enhances the dominance of graminoids over forbs in flooded grassland mesocosms. *Applied Vegetation Science* 14 (2011) 95–106
- Su Y & LD Guo. 2007. Arbuscular mycorrhiza fungi in non-grazed, restored and over- grazed grassland in the Inner Mongolia steppe. *Mycorrhiza* 17: 689-693.
- Tuomi J; MM Kytöviita & R Härdling. 2001. Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos*. 92:62-70
- van der Heijden, M; J Klironomos; M Ursic; P Moutoglis; R Stritwolf-Engel; T Boller; A Wiemken & I Sanders. 1998. Mycorrhizal fungi diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 395:69-72.
- van der Heijden M & TR Horton. 2009. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *J. Ecol.* 97: 1139–1150.
- Wallace LL. 1985. Growth, morphology and gas exchange of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Panicum coloratum* L., a C4 grass species, under different clipping and fertilization regimes. *Oecologia*. 49: 272-278.
- Yoneyama, K; X Xiaonan; Kasumoto D; Sekimoto, H; Sugimoto Y; Takeuchiand Y; 2007. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227:125-132.