

TESINA DE GRADO DE LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Restauración de un pastizal post forestación con *Pinus taeda*: estudio del potencial de hongos micorrizógenos y septados oscuros presentes en el suelo.



ESTUDIANTE: MARÍA SARA TERRA TRILLO

ORIENTADORA: FABIANA PEZZANI



Grupo Ecología de Pastizales (GEP)

Facultad de Ciencias – Facultad de Agronomía, UDELAR.

Índice

Contenido

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 4 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| Cambios en el uso del suelo y restauración de ecosistemas | 5 |
| Restauración de pastizales | 7 |
| Transformación de pastizales a forestación en Uruguay | 9 |
| Interacciones planta – microorganismos en un contexto de cambio en el uso del suelo: micorrizas y hongos septados oscuros | 10 |
| Las comunidades de hongos del suelo en una experiencia pionera de restauración de pastizales en Uruguay | 12 |
| Objetivos | 14 |
| Hipótesis y Predicciones..... | 14 |
| MATERIALES y MÉTODOS | 15 |
| Área de estudio | 15 |
| Diseño experimental..... | 16 |
| Trabajo de campo..... | 16 |
| Trabajo de laboratorio..... | 17 |
| Análisis de datos | 20 |
| RESULTADOS | 21 |
| DISCUSIÓN..... | 24 |
| CONCLUSIONES | 31 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Fabiana Pezzani por la ayuda y el seguimiento en todo el proceso del trabajo, al equipo de la Quebrada de los Cuervos por la disposición y permitir el acceso a los experimentos y a Federico Gallego y Andrea Tommasino por la colaboración en el trabajo de campo y análisis de suelos. También se agradece a Letiana Clavero, Rebeca Gonnet y Silvina García por la ayuda en la instancia de laboratorio y el apoyo en general, y a Adriana Montañez y Federico Gallego por la corrección del trabajo.

RESUMEN

En la restauración de pastizales, la interacción entre plantas y microbiota resulta de gran interés. Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y los hongos endófitos septados oscuros (ESO) forman simbiosis con la vegetación establecida en un sitio. Éstos cumplen un rol importante en los procesos ecosistémicos. La microbiota asociada a la vegetación nativa se diferencia de la asociada a la vegetación exótica, lo que será significativo a la hora de estudiar la restauración de pastizales. En el presente trabajo se estudió el potencial de colonización de HMA y ESO asociados a la vegetación herbácea de los pastizales, teniendo en cuenta su posible rol en la restauración de un pastizal luego de verse afectado por una forestación con *Pinus taeda*. En 2019 se colectó suelo de un experimento iniciado en 2017 en el Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yerbal, Uruguay. Luego de talar los pinos, que se habían plantado hace 7 años, se delimitó un área pastoreada y otra clausurada al ganado para estudiar la restauración del pastizal. Para el estudio del potencial micorrícico y de septados oscuros se instaló un ensayo en macetas con *Allium cepa* como planta trampa con suelo proveniente de parcelas pastoreadas y clausuradas (que habían sido forestadas) y de un pastizal natural (control) adyacente. Se pudo observar una mayor colonización por HMA y ESO en el predio en recuperación, contrario a lo esperado ya que las micorrizas se asocian a especies herbáceas y la forestación con pinos podría haber afectado negativamente el potencial micorrícico del suelo. Se observó una mayor colonización por HMA en el tratamiento clausurado que en el pastoreado. Se encontraron arbusculos y ovillos de HMA solo en plantas crecidas en suelo del pastizal en restauración. Se evidenció un efecto positivo del pastoreo sobre la colonización por hongos septados oscuros asociados a las plantas utilizadas en este trabajo. Estos resultados aportan al estudio de restauración ecológica en general y la presencia de hongos benéficos puede estar dando indicios positivos del potencial que posee la vegetación del pastizal para recuperarse luego de la perturbación que generó la forestación.

INTRODUCCIÓN

Cambios en el uso del suelo y restauración de ecosistemas

Los esfuerzos por restaurar ecosistemas han recibido mayor atención y se han incrementado en los últimos años a nivel mundial y local (SER, 2004). Este aumento se debe fundamentalmente a los cambios en el uso del suelo provocados al transformar ecosistemas naturales a zonas destinadas a agricultura y forestación. La conversión de un ecosistema natural a uno artificial -por ejemplo, de un pastizal natural a un sistema agrícola o a una plantación forestal con especies exóticas- puede llegar a cambiar por completo su estructura y funcionamiento (Sala *et al.*, 2000). Si bien estas actividades son esenciales para los humanos a la hora de producir insumos y alimentos, también generan efectos negativos, por ejemplo: afectar los ciclos hidrológicos, disminuir la biodiversidad, generar pérdidas de hábitat, favorecer a las invasiones biológicas y también pueden generar un efecto en las propiedades del suelo al promover la erosión, la acidificación (Hobbs & Norton, 1996; Aronson *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2006; Cuevas & Zalba, 2010; Koziol & Bever, 2016; Modernel *et al.*, 2016) e impactando en las comunidades microbianas (Andrade *et al.*, 2015; Torchelsen *et al.*, 2018).

Para llevar a cabo una restauración de manera exitosa, es necesario contar con el mayor conocimiento posible de los componentes del ecosistema natural, como la diversidad, la composición de especies y los factores abióticos; también es importante estudiar el rol de las interacciones ecológicas presentes en las comunidades, en especial las interacciones benéficas (e.g. polinización, micorrizas, etc) (Dhillon & Friese, 1994). La restauración ecológica hace referencia al proceso de recuperación de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido (SER, 2004), para recuperar valores considerados inherentes al ecosistema y para que continúe proporcionando bienes y servicios que las personas valoran (Martin, 2017). Para restaurar un área que sufrió alguna perturbación es necesario enfocarse en aplicar estrategias de forma programada para lograr la recuperación de las funciones ecosistémicas, la estructura y la composición de la comunidad (Cuevas & Zalba, 2013).

La diversidad de una comunidad se forma por fluctuaciones del ambiente en grandes escalas espaciales, temporales y organizacionales (Pimm, 1991). Las comunidades van cambiando en esas escalas y pueden tomar varias direcciones en las que se generan sucesiones, las cuales se producen por procesos estocásticos y por perturbaciones. Por lo tanto, la estabilidad de una comunidad nunca se va a mantener a largo plazo (Ohsowski *et al.*, 2012). El ecosistema pasa por muchos estados estables alternativos separados por transiciones inestables. Los estados estables alternativos dependen de la comunidad biótica del entorno, el orden en que llegan los organismos de las diferentes poblaciones en el transcurso del proceso sucesional, y el azar inherente del sistema (Suding *et al.*, 2004). Si se pone foco en la restauración, los sistemas degradados a menudo están en un estado estable persistente. El establecimiento vegetal y la formación del suelo en hábitats degradados pueden recuperarse de manera lenta por procesos sucesionales naturales sin la intervención humana. En la restauración se manipulan procesos como cambios en la formación de la comunidad, en la biodiversidad y en los ciclos biogeoquímicos para acelerar el establecimiento de la comunidad objetivo (Ohsowski *et al.*, 2012).

El éxito de una restauración depende de varios factores y puede ser evaluado teniendo en cuenta tres vías. Se puede alcanzar la restauración con respecto a: a) la diversidad (e.g. riqueza y abundancia de organismos), b) la estructura vegetal (e.g. porcentaje de cobertura, biomasa, perfiles de vegetación), y c) los procesos del ecosistema, como por ejemplo el ciclado de nutrientes o interacciones biológicas (Ruiz-Jaen & Aide, 2005). Si la restauración se evalúa por los procesos, el ecosistema al que se quiere llegar no necesariamente debe tener los mismos componentes estructurales del ecosistema original, existe la posibilidad de que otras especies u otros tipos de organismos diferentes realicen las mismas funciones y se generen los mismos procesos que permiten al ecosistema seguir el curso de la restauración (Ruiz-Jaen & Aide, 2005; Ohsowski *et al.*, 2012). La restauración ecológica no solo contribuye a la conservación de la biodiversidad, también favorece al mantenimiento de servicios ecosistémicos de gran importancia para los humanos. Sin embargo, muchos intentos de restauración en el pasado han resultado en fracaso por no tomar en cuenta las comunidades diversas de microorganismos activos que habitan en el suelo y están asociados a los sistemas de raíces (Turnau & Haselwandter, 2002). Si bien en los últimos años la

importancia potencial de las interacciones planta-microorganismo han recibido una atención mayor (Lingfei *et al.*, 2005; Bonfarte & Genre, 2010; Koziol & Bever, 2016; García *et al.*, 2017; Powell & Rillig, 2018), los estudios de restauración con enfoque en los hongos del suelo con potencial benéfico para todo el ecosistema siguen siendo escasos a escala global y regional (Parodi & Pezzani, 2011; Asmelash *et al.*, 2016; Wipf *et al.*, 2019; Vahter *et al.*, 2020)

Restauración de pastizales

La restauración de hábitats y ecosistemas degradados se considera una práctica importante, en particular en ambientes como los pastizales templados, que presentan pocos relictos en buen estado de conservación (Cuevas & Zalba, 2010). Si bien casi todos los estudios sobre restauración de pastizal se han realizado en áreas agrícolas abandonadas, en los últimos años han crecido las experiencias enfocadas en la restauración de pastizales invadidos por especies vegetales exóticas (Cuevas & Zalba, 2013). Los pastizales son uno de los ecosistemas más extensos (Gibson, 2009) ocupando aproximadamente 40 millones de km² en todo el mundo. Se caracterizan por presentar un estrato herbáceo dominado por especies de pastos (Familia Poaceae). Los pastizales son muy importantes ya que proporcionan una amplia gama de bienes y servicios ecosistémicos (Bilenca & Miñarro, 2004), son uno de los ecosistemas que contienen mayor riqueza de especies en el mundo y son clave en el mantenimiento de funciones ecológicas como la regulación de los gases de la atmósfera, el ciclo hidrológico, el control de la erosión, la polinización y la producción de alimentos (Cuevas & Zalba, 2013). Este ecosistema representa el principal recurso forrajero para el ganado, facilita la infiltración de agua en el suelo, y también contribuye a la belleza paisajística de muchas regiones. Es el ecosistema más utilizado por los humanos, principalmente como zonas de pastoreo (Bilenca & Miñarro, 2004). Sin embargo, en los últimos años el área ocupada por los pastizales naturales ha disminuido o desaparecido (Andrade *et al.*, 2015), particularmente por efecto de la agricultura y la forestación con especies exóticas (Gibson, 2009). A nivel mundial se estima que un 50% de los pastizales naturales se encuentran degradados en alguna medida (Bardett *et al.*, 2021). A su vez, apenas el 0,7% de la superficie de pastizales templados se encuentra dentro de algún sistema de áreas protegidas (Bilenca & Miñarro, 2004).

Teniendo en cuenta este alto grado de degradación y bajo grado de protección que poseen los pastizales, se observa que las experiencias de restauración son escasas (Cuevas & Zalba, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Cuevas & Zalba, 2013; Andrade *et al.*, 2015; Koziol & Bever, 2017; Ohsowski *et al.*, 2018).

La introducción de especies exóticas con fines comerciales es considerada una de las principales actividades a nivel mundial que contribuyen al cambio en el uso del suelo (Farley *et al.*, 2008; Cuevas & Zalba, 2010). Las plantaciones han generado pérdidas o fragmentación en grandes áreas de pastizales templados, y muchas de las especies utilizadas se han vuelto invasoras de pastizales naturales o seminaturales (Chaneton *et al.*, 2012). Debido a que las plantaciones forestales en los pastizales de América del Sur están creciendo rápidamente, ha aumentado la preocupación sobre el riesgo y los impactos potenciales que acarrearán estos cambios en el uso del suelo en la biodiversidad y los servicios ecosistémicos, especialmente en las áreas de pastizales con alto valor de conservación (García *et al.*, 2018). Aquí menos del 0,3% de la extensión de pastizales templados está incluida en áreas protegidas (Cuevas & Zalba, 2013). Esto refleja la necesidad de dirigir esfuerzos hacia la restauración de este ecosistema, pero la situación es desfavorable ya que los trabajos vinculados a la restauración de pastizales del Río de la Plata son muy pocos (Cuevas & Zalba 2010, 2013; Torchelsen *et al.*, 2018; Andrade *et al.*, 2015).

En América del Sur, para la mayoría de las plantaciones de árboles se utilizan especies introducidas, en especial coníferas y en particular especies del género *Pinus*. Las coníferas han sido reconocidas como uno de los taxones más invasores (García *et al.*, 2018). La distribución original de la familia Pinaceae y del género *Pinus* está casi completamente restringida al hemisferio norte. Sin embargo, muchas especies de pinos se han introducido al hemisferio sur y se han establecido como importantes especies madereras (Brewer *et al.*, 2008). Durante los últimos 40 años, la intervención humana en los Pastizales del Río de la Plata (RPG) se ha intensificado, lo que se refleja en un aumento en el área destinada a cultivos. Esta región es una de las áreas de pastizales subhúmedos templados más grandes en el mundo. Ocupa más de 700 mil km² en la parte centro-este de Argentina, casi todo Uruguay y el sur de Brasil, y son uno de los pastizales con mayor diversidad (Texeira & Altesor, 2009), son hábitat de más de 4000 especies de plantas, más de 300 especies de aves y de 90 especies de mamíferos. En los

RPG predominan en especial las gramíneas C₄ y en menor medida las gramíneas C₃ (Tiscornia & Jaurena, 2019).

Transformación de pastizales a forestación en Uruguay

En Uruguay el ecosistema que predomina es el pastizal natural que ocupa más de 140 mil km² y corresponde al 64% del territorio (MGAP, 2011), y representa la base forrajera para la ganadería extensiva, una de las actividades económicas principales del país (Lezama *et al.*, 2019). Entre 2000 y 2019 en el país hubo una pérdida de vegetación nativa del 10%, fundamentalmente de pastizales, debido a un efecto combinado del avance de la agricultura y la silvicultura. Especialmente el área con cultivos aumentó un 69% en el período estudiado (Vallejos *et al.*, 2021). Cerca de 1 millón de ha de los suelos del país destinados para forestación han sido plantados principalmente con *Eucalyptus grandis*, *E. globulus* y *Pinus taeda*, con el fin de fabricar madera compensada y pulpa. La forestación puede generar un impacto grande en la vegetación herbácea local o en sitios adyacentes que no estén plantados, ya que la introducción de este tipo de especies genera un cambio en las condiciones de luz, las características del suelo y los regímenes de humedad del sistema (Six *et al.*, 2014). La dirección y magnitud de estos cambios dependen de varios factores, como son las características climáticas de la región o la identidad de las especies arbóreas plantadas (Torchelsen *et al.*, 2018).

La conversión del uso del suelo ha afectado significativamente no solo la composición y la estructura de las comunidades vegetales sino también de las comunidades microbianas del suelo (Wolfe & Klironomos, 2005; Reinhart & Callaway, 2006; Paruelo *et al.*, 2010). Diversos estudios han mostrado que las comunidades microbianas del suelo responden de manera diferente a la forestación, debido a que existen diferencias en las condiciones de los sitios, los tipos de suelo, la historia del uso del suelo, las especies y edad de los árboles (Wang *et al.* 2019). Diferentes manejos de los pastizales, como segar, fertilizar, el pastoreo o restaurar pueden afectar la colonización y diversidad de uno de los grupos más importantes de hongos benéficos del suelo como son los que forman micorrizas (Su & Guo 2007). A su vez cambios que ocurran en la comunidad de hongos benéficos son capaces de afectar el crecimiento vegetal y los patrones de sucesión del sistema (Fuchs & Haselwandter, 2008; Turnau & Haselwandter, 2002;

Ruis-Jaen & Aide, 2005). Por eso, para tener una aproximación más completa del éxito de las prácticas a implementarse en una posible restauración de los ecosistemas naturales es posible estimar el potencial que presenta el suelo para formar asociaciones entre las raíces de las plantas con microorganismos promotores del crecimiento vegetal (por ejemplo hongos micorrizógenos y hongos septados oscuros) ya que se prevé que una perturbación, como puede ser la introducción de especies arbóreas en un ambiente de pastizal, produzca cambios en la comunidad de hongos presentes en el sistema del suelo de ecosistema.

Interacciones planta – microorganismos en un contexto de cambio en el uso del suelo: micorrizas y hongos septados oscuros

En los últimos años, la importancia potencial de las interacciones benéficas entre plantas y microorganismos ha recibido cada vez más atención (Bonfante & Genre, 2010; Asmelash *et al.*, 2016; Garcia de Leon *et al.*, 2016; Saparrat *et al.*, 2020). Una de las asociaciones más comunes, las micorrizas, son un nexo entre las plantas y el sistema del suelo. Las plantas son capaces de modificar la composición de la comunidad local de hongos simbióticos, ya sea reprimiendo o promoviendo el crecimiento de ciertos taxa o grupos funcionales (Korb *et al.*, 2003; Zobel & Öpik, 2014). En este sentido, muchas especies de pinos exóticos son considerados problemáticos en el hemisferio sur ya que al ser introducidos generan efectos desproporcionados en algunos procesos ecosistémicos (Gazol *et al.*, 2016).

Micorrizas

El término *micorriza* (del griego *mykes*: hongo, *rhiza*: raíz) refiere a la asociación simbiótica que se genera entre algunos hongos y las raíces de aprox. el 90% de las plantas terrestres. En esta simbiosis las dos partes se benefician: el hongo micorrizógeno recibe carbohidratos de la planta para poder crecer y reproducirse, y a su vez, la planta hospedera puede aumentar su crecimiento gracias a la mayor absorción de nutrientes y de agua y la resistencia a las enfermedades que proporcionan estos hongos (Allen, 1989; Bonfante & Perotto, 1995; Smith & Read, 2008; Bonfante & Genre, 2010). Las micorrizas se encuentran en casi todos los ecosistemas y existen dos tipos dependiendo si el hongo coloniza los espacios intercelulares de la raíz (ectomicorrizas) o si penetra las células de la raíz (endomicorrizas). Las ectomicorrizas se dan principalmente entre hongos Asco- y

Basidiomicetes y árboles, mientras que las endomicorrizas son asociaciones características con la mayoría de las plantas terrestres, en especial herbáceas. Las endomicorrizas se dividen a su vez en micorrizas de orquídeas, ericoides y arbusculares (Bonfante & Genre, 2010). Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), pertenecientes al filo Glomeromycota, son los más comunes y además de hifas, forman estructuras especializadas para la absorción y almacenamiento de los nutrientes (arbusculos, ovillos y vesículas) en el interior de las células corticales radiculares de las plantas hospederas (Asmelash *et al.*, 2016). Se han encontrado micorrizas arbusculares en la mayoría de las especies herbáceas y algunas familias de plantas leñosas (Mandyam & Jumpponen, 2005); son características de pastizales o de cultivos agrícolas, y en términos generales, este tipo de micorrizas se encuentran en ecosistemas que contienen alta riqueza de especies vegetales (Smith & Read, 2008). Por el contrario, las ectomicorrizas predominan en ecosistemas boscosos en donde solo se encuentran pocas especies hospederas. Los miembros de la familia Pinaceae son predominantemente ectomicorrizógenos (Smith & Read, 2008).

Diferentes tipos de micorrizas poseen modos y tasas de reclutamiento de propágulos diferenciales en determinados ecosistemas (Allen, 1992). A pesar de que muchos taxa de HMA tienen una distribución global, la composición de la comunidad de hongos está influenciada por las condiciones ecológicas locales, por ello la presencia de especies de árboles exóticos que forman ectomicorrizas pueden alterar la presencia de HMA al cambiar la química del suelo y el mantillo, y también pueden reducir la disponibilidad de nutrientes para las especies de plantas que forman micorrizas arbusculares (Zobel & Öpik, 2014; Gazol *et al.*, 2016). Se ha observado que los suelos degradados se caracterizan por tener niveles bajos de abundancia y riqueza de HMA, y se considera que esta simbiosis es de las primeras que colonizan ecosistemas que se encuentran en recuperación luego de ser dañados. Es decir, que cuando ocurre una restauración la biodiversidad, los HMA tiende a aumentar (Turnau & Haselwandter, 2002; Johnson *et al.*, 2003; Asmelash *et al.*, 2016). A la hora de estudiar el progreso de una restauración, es importante que se encuentren propágulos infectivos (esporas, fragmentos de raíces colonizadas e hifas) de HMA en la regeneración de la vegetación. Estos propágulos benefician a las plantas en la colonización, la cual depende de la densidad y el tipo de inóculo que siga viable luego de la perturbación (Guadarrama *et al.*, 2008).

Hongos septados oscuros

Los tejidos internos de las plantas albergan una gran diversidad de hongos, en general llamados “endófitos”. Miembros del género Ascomycota son prominentes en estas asociaciones con las raíces hospederas. Los hongos de este grupo presentan hifas con septos regulares con paredes desde hialinas hasta pigmentadas. Las hifas crecen dentro y entre las células de la epidermis, de la corteza y, a veces del tejido vascular de las raíces. Las especies que tienen las paredes de las hifas pigmentadas se llaman “Endófitos Septados Oscuros” o “ESO”. Los ESO se asocian con más de 600 especies vegetales y parecen no tener especificidad de huésped, ya que se han aislado de plantas no micorrizógenas y de plantas micorrizógenas (Mandyam & Jumpponen, 2005). Al ser capaces de asociarse tanto con vegetación leñosa como herbácea, se encuentran en una amplia variedad de ambientes, incluido bosques y pastizales templados, y así logran coexistir con endo- y ectomicorrizas. Sin embargo, se cree que están más adaptados que los HMA a ambientes extremos, ya que presentan mayor abundancia en ambientes fríos y hostiles, a altas elevaciones y latitudes, y en hábitats inundados y acuáticos. Los ESO cumplen múltiples roles en la planta hospedera, y pueden generar tanto efectos negativos como positivos. Ciertos estudios sugieren que pueden llegar a formar asociaciones mutualistas con las plantas hospederas, siendo algunas de las funciones benéficas: mejorar la captación de N y P, aumentar la absorción de agua y aumentar la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Addy *et al*, 2005; Lugo *et al.*, 2018).

Las comunidades de hongos del suelo en una experiencia pionera de restauración de pastizales en Uruguay

Esta investigación se realizó en un pastizal ubicado dentro del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yerbal (PPQC y SY), en el departamento de Treinta Y Tres. El PPQC ingresó al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) como el primer paisaje protegido en el año 2008. Hasta el 2019 el área protegida del PPQC ocupaba 4.413 ha, y en enero de 2020 se aprobó la ampliación del área protegida (PPQC y SY) en 14.779 ha. Actualmente el PPQC y SY ocupa una superficie total de 19.192 ha dentro de la cuenca del Arroyo Yerbal Grande (MVOTMA-DINAMA, 2020). El área protegida presenta diferentes ambientes,

predominan los bosques de quebrada y de galería junto al sistema fluvial, considerados importantes para que exista conectividad de hábitats y para la protección del suelo y cuenca. También se destacan los pastizales que cubren el 50% del área protegida. Este ambiente está muy poco representado a nivel internacional, sin embargo, en Uruguay ocupa la mayor parte del territorio, y está altamente amenazado. Se considera de gran importancia para la conservación debido a que presenta especies de flora y fauna identificadas como prioritarias para el SNAP. En toda el área predominan los pastizales con vegetación escasa, le siguen los pastos altos y matorrales y luego los pastizales con vegetación densa, el restante corresponde mayormente a forestación, y un grado bajo de bosques nativos y cultivos de invierno (Gallego *et al.*, 2020). En la zona de las Sierras del Este se ha detectado a la forestación con especies exóticas como una fuente de presión, ya que disminuye la biodiversidad y las especies claves de ambientes amenazados, como el pastizal. A su vez, una de las principales especies identificadas como exótica invasora en el área protegida PPQC y SY es *Pinus spp*, para la cual se han desarrollado controles constantes ya que supone una fuente de presión sobre los objetivos de conservación propuestos para el área protegida (SNAP, 2011; MVOTMA-DINAMA, 2020). En el PPQC y SY, Casás (2019) estudió el estado de la restauración del pastizal luego de 7 años de forestación con *Pinus taeda* y de los efectos del pastoreo con foco en la diversidad de la comunidad vegetal en cada sitio. Representa un antecedente importante para el presente trabajo que se centra en las comunidades de hongos endófitos asociados a las especies vegetales presentes en dicho ecosistema en restauración.

El PPQC y SY ofrece una gran oportunidad para el estudio y la evaluación de trabajos que den evidencia del rol que cumplen determinados organismos que de otra manera se considerarían insignificantes para la restauración de estos pastizales, y también para estudiar cómo cambian su diversidad frente a diferentes medidas de manejo para la restauración. Las investigaciones que hacen foco en las comunidades de hongos benéficos pueden generar información para una conservación de pastizales naturales de manera más precisa y abarcativa.

El estudio del potencial de hongos edáficos con efectos benéficos sobre las plantas como un componente esencial en la recuperación de un ecosistema natural -en este caso un pastizal que fue forestado con *Pinus taeda*- resulta de interés para instrumentar diferentes prácticas de manejo para lograr la restauración del pastizal.

Objetivo general

Estudiar el potencial edáfico de las comunidades de hongos endófitos benéficos asociados a la vegetación herbácea de los pastizales que puedan ayudar a la restauración de un pastizal luego de haber sido transformado a una forestación con *Pinus taeda*.

Objetivos específicos

- Estimar y comparar la presencia de propágulos de hongos micorrizógenos arbusculares (hifas, vesículas, arbusculos) y de hongos septados oscuros (hifas) en sitios de pastizal natural y de pastizal en restauración (ex forestado).
- Comparar el potencial micorrícico y de hongos septados oscuros de sitios de pastizal en restauración con diferente manejo del pastoreo.

Hipótesis y predicciones

- 1) Debido a que las especies de árboles utilizadas en las plantaciones forestales (en este caso *Pinus taeda*) son exclusivamente ectomicorrizógenas, al contrario de la vegetación de pastizales que se asocia con hongos micorrizógenos arbusculares, se esperaría encontrar mayor colonización de micorrizas arbusculares en el pastizal control que en el predio previamente forestado.
- 2) A diferencia de los HMA, los ESO son capaces de coexistir y formar asociaciones no solo con vegetación herbácea, sino también con especies leñosas, entonces se espera que la presencia de ESO en suelo del sitio previamente forestado y del sitio del pastizal de referencia sea similar.
- 3) Puesto que los pastizales han evolucionado junto con el pastoreo, se ha observado que una presión de pastoreo intermedia puede ser beneficiosa para la diversidad de la comunidad vegetal, y, por consiguiente, puede generar un aumento en la presencia de hongos asociados a las raíces de esas plantas. Entonces, se esperaría observar una mayor colonización en las parcelas que fueron forestadas y están siendo pastoreadas que en las parcelas forestadas y

se encuentran clausuradas al ganado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio se encuentra en el departamento de Treinta y Tres, a 50 km de la ciudad de Treinta y Tres, y forma parte del área protegida del PPQC y SY a partir del año 2020 en el que se concretó la extensión del paisaje protegido (MVOTMA-DINAMA, 2019). El paisaje protegido PPQC y SY y su área adyacente se encuentran dentro de la cuenca del Arroyo Yermal Grande; el clima es templado y presenta un relieve enérgico, cuenta con una sucesión regular de cerros, con cursos de agua intercalados entre ellos y manchas de vegetación arborescente, en ocasiones presenta afloramientos rocosos y pedregales (SNAP, 2011). Predominan los suelos superficiales (Litosoles Subéutricos Dístricos) con riesgo de erosión y la rocosidad alcanza entre 10 y 40% del área. La zona tiene aptitud para la producción de pasturas y forestación, con fertilidad natural reducida, lo que hace inviabilizar los cultivos (MVOTMA-DINAMA, 2019). Cuenta con ambientes diversos que van desde bosques de quebrada y galería junto al sistema fluvial hasta pastizales abiertos. Los pastizales naturales asociados a la actividad ganadera extensiva ocupan el 50% del área protegida y presentan especies de flora y fauna identificadas como prioritarias para el SNAP (SNAP, 2011).

Este trabajo se realizó en el sitio del ex-proyecto forestal “Obdulio”, predio que cuenta con 274 ha de superficie, de las cuales 180 fueron efectivas para la implantación de la forestación con *Pinus taeda* en el año 2009 por la empresa Forestal El Arriero S.A. En enero de 2016 la DINAMA denegó la autorización ambiental al emprendimiento forestal de pinos sembrados. Se le solicitó “restituir el ambiente a las condiciones anteriores a la realización en el predio de las plantaciones forestales sin la autorización ambiental correspondiente...” (Resolución Ministerial 60/2016). En junio de 2016 fueron talados por la empresa todos los ejemplares de pinos, y fueron puestos en pilas perpendiculares a la pendiente. Aproximadamente 6 meses más tarde se introdujo ganado ovino y bovino. Esto permitió evaluar la restauración del pastizal luego de la cosecha de una plantación forestal.

Diseño experimental

En 2017 el grupo de Ecología de Pastizales de Facultad de Ciencias instaló un experimento a campo en 2 ha del establecimiento Obdulio, luego de 8 meses que se cosecharan todos los ejemplares de *Pinus taeda*. Se seleccionaron 3 sitios con características ambientales similares: 2 se encuentran dentro del pastizal en restauración (PR) y otro es un pastizal natural, utilizado como sitio control (PC), que se encuentra adyacente al sitio forestal y está bajo pastoreo por ganado doméstico (Figura 1). Dentro del sitio forestal se realizaron dos manejos, uno pastoreado (PRP) y otro clausurado al ganado (PRC). Se establecieron de manera aleatoria 5 bloques entre las filas de los árboles talados en el sitio pastoreado y en el clausurado. Cada bloque está formado por parcelas contiguas de 5x5 metros a las cuales de forma aleatoria se les asignó un tratamiento: sin remoción de acículas (P+), con remoción de acículas (P-), con remoción de acículas y agregado de broza del pastizal natural (B). Estos tratamientos fueron duplicados y se agregó el factor remoción y no remoción de plántulas de pino. Se instalaron 60 parcelas dentro del sitio forestal, 30 para cada manejo (PRP y PRC), con 10 réplicas para cada tratamiento. Las parcelas se ordenaron en bloques (1 - 5). En el pastizal control se instalaron al azar 5 parcelas de igual tamaño.

Trabajo de campo

Los tratamientos que fueron evaluados en el presente trabajo son: el sitio clausurado (PRC) y el pastoreado (PRP), ambos dentro del sitio en restauración y con remoción de pinos, y el sitio control (PC) que corresponde al pastizal natural adyacente. No se tuvo en cuenta el tratamiento PRC sin remoción de pinos debido a que en el sitio contrastante (PRP) los pinos que habían germinado fueron ingeridos por el ganado ovino. En abril de 2019 se recolectó una muestra compuesta de suelo por cada bloque seleccionado en cada sitio. En los sitios clausurado y pastoreado se seleccionaron tres bloques teniendo en cuenta los valores más contrastantes de fósforo en el suelo, y en el sitio de pastizal natural se seleccionaron tres parcelas (Figura 1). De cada bloque se recogió suelo solamente de las parcelas a las que se les dejó la pinocha de los árboles (P+), ya que esta sería la situación normal sin modificar el suelo luego de cortar los pinos. Por lo

tanto, no se tuvo en cuenta las parcelas en las que se agregó broza o se removió la pinocha.



Figura 1. Captura de Google Earth de la ex-forestación “Obdulio” dentro del Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos y Sierras del Yerbal. En el polígono amarillo se encuentra el sitio clausurado (PRC) y dentro de él están los bloques que se seleccionaron para este estudio (en blanco y con asterisco: B2, B3, B4). Lo mismo para el sitio pastoreado (PRP) en el polígono azul. Los cuadrados verdes claro en la parte superior de la imagen corresponden a las parcelas del pastizal de referencia (PC) (de las cuales se seleccionaron 3) marcado con un polígono verde.

Trabajo de laboratorio

El suelo recolectado de cada tratamiento y de cada bloque fue utilizado como sustrato en un ensayo en cuarto de crecimiento con plantas trampa. En mayo de 2019 el suelo proveniente de cada tratamiento y de cada bloque (que se mantuvo, desde su colecta en campo aprox. 20 días antes, en las bolsas abiertas y a temperatura ambiente en el laboratorio) se colocó en 15 macetas por tratamiento, 5 macetas por bloque (45 macetas en total, cada una con 150 g de suelo y 50 g de vermiculita estéril) y se sembraron semillas de *Allium cepa* (cebolla). Esta especie

es utilizada de forma convencional en los ensayos con planta trampa por presentar alta afinidad para formar micorrizas (no se encontraron antecedentes de esta u otras especies utilizadas para estudiar el potencial del suelo de los septados oscuros). Se agregaron 5 macetas de tratamiento control de laboratorio utilizando como sustrato vermiculita estéril (C). Todas las macetas fueron regadas a demanda y se les proporcionó una fuente de luz para favorecer el crecimiento de las plantas. Se realizó un raleo de plántulas a los 11 días de haber germinado, dejando tres plantas por maceta, la cual corresponde a la unidad de estudio. A los 90 días aproximadamente de la siembra se cosecharon las plantas y se procedió a separar las raíces de la parte aérea de cada planta. Luego se procesaron las raíces para evaluar la colonización de hongos micorrizógenos arbusculares y hongos endófitos septados oscuros. Para el procesamiento de las raíces, primero se lavaron para eliminar residuos del suelo y se enjuagaron varias veces con agua. Las raíces de cada planta se subdividieron en varios segmentos y se colocaron con vinagre en frascos separados para conservarlas antes de aclararlas. El aclarado se realizó con KOH al 10% disuelto en agua, por un día. Luego el KOH se descartó y las raíces se enjuagaron con agua para quitar el exceso del producto. Las raíces se tiñeron en una solución de lactoglicerol (Glicerina:Lactato:Agua destilada; 1:1:1) y azul de tripano al 0,05% por dos días, luego se enjuagaron quitándoles el exceso de tinta y se conservaron en lactoglicerol para su posterior montaje y observación al microscopio. Para la observación en el microscopio se procedió a seleccionar 10 segmentos de 1 cm aproximadamente cada uno, de las raíces de cada maceta de cada tratamiento y de cada bloque. Los segmentos se colocaron en portaobjetos correctamente identificados para su análisis. Se utilizó el microscopio óptico para observar y estimar la presencia (1) o ausencia (0) de las estructuras de micorrizas arbusculares y de septados oscuros en cada segmento de raíz. Se calculó el porcentaje de colonización micorrícica (identificando la presencia de hifas, vesículas, arbusculos y ovillos) y de colonización por ESO (hifas) de cada unidad muestral.



Figura 2. Ensayo con plantas trampa.

- a. Preparación del suelo proveniente de cada tratamiento en estudio (27/5/2019)
- b. Siembra de semillas de cebolla en macetas identificadas (27/5/2019)
- c. Germinación de las plantas en un ambiente con luz y riego controlado
- d. Cosecha de las plantas trampa crecidas después de 90 días de la siembra (25/8/2019)

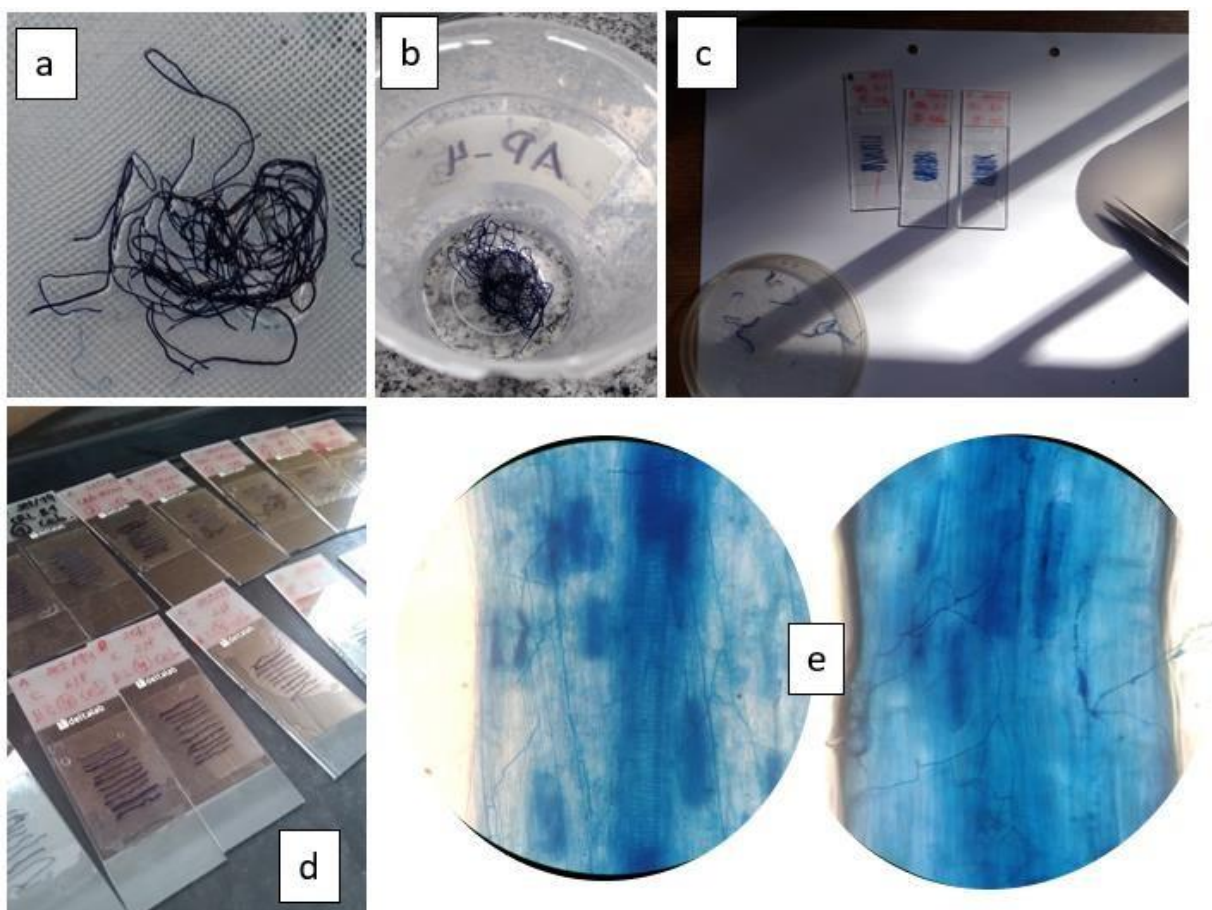


Figura 3. Procesamiento de las raíces para observación de las estructuras fúngicas.

- a. Tinción de las raíces con azul de Tripano (27/8/2019)
- b. Conservación de las raíces ya teñidas (27/8/2019)
- c. Montaje de 10 segmentos de 1 cm aprox. de las raíces en portaobjetos (05/9/2019)
- d. Secado de las raíces en los portaobjetos
- e. Observación de los hongos en las raíces al microscopio óptico

Análisis estadístico

Se estudiaron las diferencias en la colonización de hongos micorrizógenos arbusculares y de hongos septados oscuros entre las plantas crecidas en suelo del pastizal de referencia, del pastizal en recuperación pastoreado y del pastizal en recuperación clausurado. Para estudiar las diferencias se realizó un análisis ANOVA con LSD Fisher en el software Infostat (versión 2017) dado que se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.

RESULTADOS

Todas las raíces observadas presentaron colonización por los grupos de hongos que se estudiaron en este trabajo, a excepción de aquellas plantas que crecieron en el tratamiento control (solo vermiculita) en las cuales la presencia de alguna estructura fúngica fue insignificante.

La presencia de hongos septados oscuros fue mayor que la de micorrizas en las raíces de la especie trampa utilizada ya sea que hayan crecido en suelo del pastizal de referencia como en suelo de los sitios previamente forestados (Figura 4).

De modo general, una primera comparación entre las plantas que crecieron en suelo proveniente del pastizal control y aquellas que lo hicieron en suelo del pastizal en restauración (sin considerar los tratamientos ni los bloques) mostró que tanto el potencial de colonización por micorrizas arbusculares como el de hongos septados oscuros fue mayor en suelo proveniente de los sitios que se encuentran en etapa de restauración del pastizal natural (Figura 4). En cuanto a las micorrizas, las plantas que crecieron en suelo proveniente del pastizal en recuperación presentaron en promedio una colonización de $16,5\% \pm 4,2$, mientras que aquellas que crecieron en suelo del pastizal de referencia dicha colonización fue de $2,7\% \pm 1,6$, y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). Con respecto a los septados oscuros, las plantas crecidas en suelo del pastizal en proceso de restauración mostraron en promedio una colonización de $25,7\% \pm 4,1$, mientras que las crecidas en suelo proveniente del pastizal de referencia presentaron una colonización de $14,2\% \pm 2,1$. Esta diferencia también fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

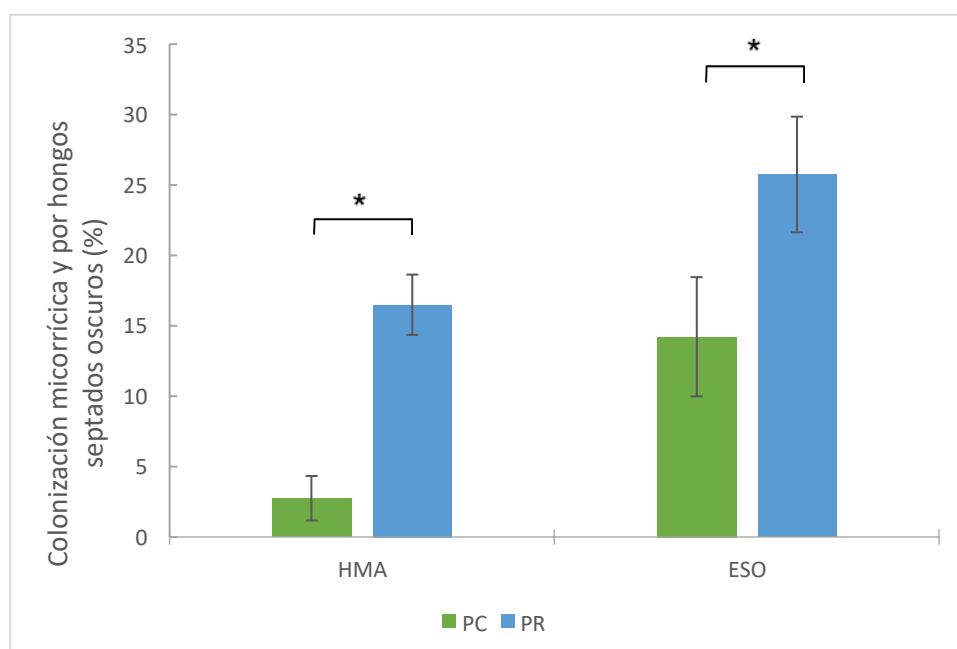


Figura 4. Colonización por hongos micorrizógenos arbusculares y por hongos septados oscuros (% promedio \pm de) en el sitio control pastizal de referencia (PC) en verde y en el pastizal en restauración (PR, clausura y pastoreo) en azul. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los sitios para cada grupo de hongos ($p < 0,0001$).

Al comparar la colonización total por hongos micorrizógenos en raíces de las plantas que crecieron en suelo provenientes de los tratamientos pastoreado y clausurado dentro del pastizal en recuperación, se pudo observar la presencia de micorrizas en ambos sitios. En plantas crecidas en suelo del sitio clausurado al ganado se observó una micorrización de $19,5\% \pm 9,6$, mientras que, en plantas crecidas en suelo proveniente del sitio pastoreado la presencia de micorrizas fue de $13,5\% \pm 7,3$. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con un p-valor de 0,0012 (Figura 5a).

Con relación a las estructuras especializadas en el intercambio de sustancias que presentan las micorrizas como son los arbusculos y ovillos, solo fueron encontradas en raíces de las plantas crecidas en suelo del pastizal forestado y que ahora está en proceso de restauración, tanto en el sitio pastoreado como en el clausurado. Con respecto a la cantidad de arbusculos, no se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre plantas crecidas en suelo proveniente de los tratamientos de pastoreo y clausura ($p = 0,2060$), siendo el promedio $5,4\% \pm 4,4$ en la clausura y $6,3\% \pm 4,9$ en el pastoreo. La presencia de los ovillos en plantas que crecieron en suelo del pastizal en recuperación fue escasa, siendo $0,2\% \pm 0,1$ en el sitio clausurado y $0,07\% \pm 0,1$ en el sitio pastoreado. En cuanto a la presencia de vesículas de los HMA (estructuras de reserva) se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0005$) entre plantas que crecieron en suelo de los sitios pastoreado y clausurado. Dicha cantidad fue de $2,7\% \pm 0,8$ en el sitio clausurado y $0,5\% \pm 0,5$ en el sitio pastoreado (Figura 5b).

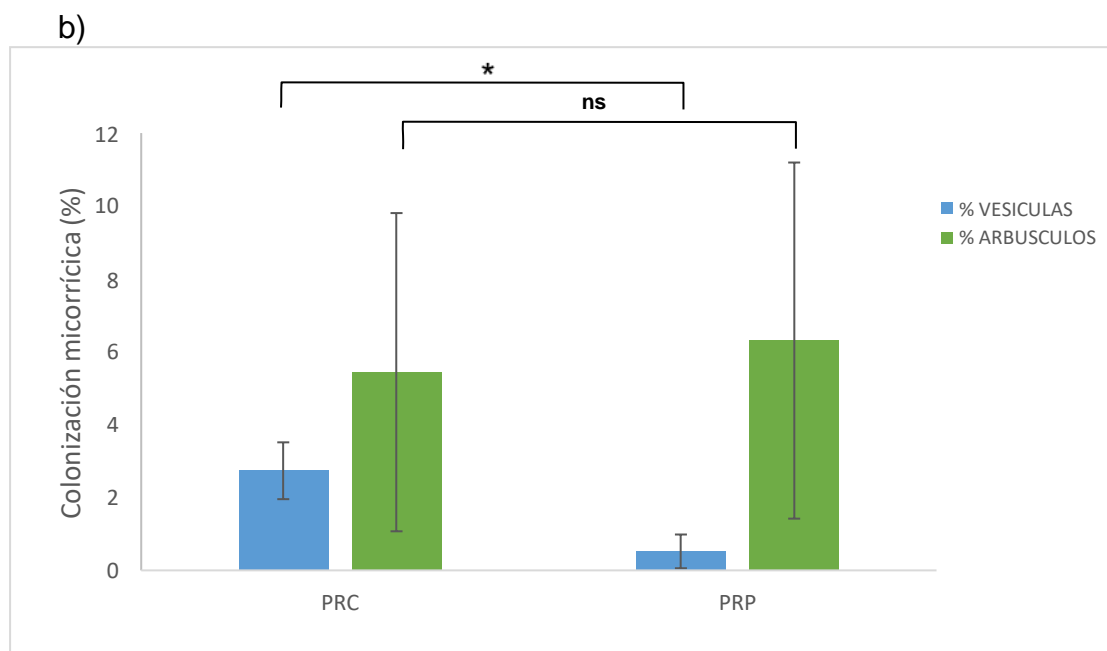
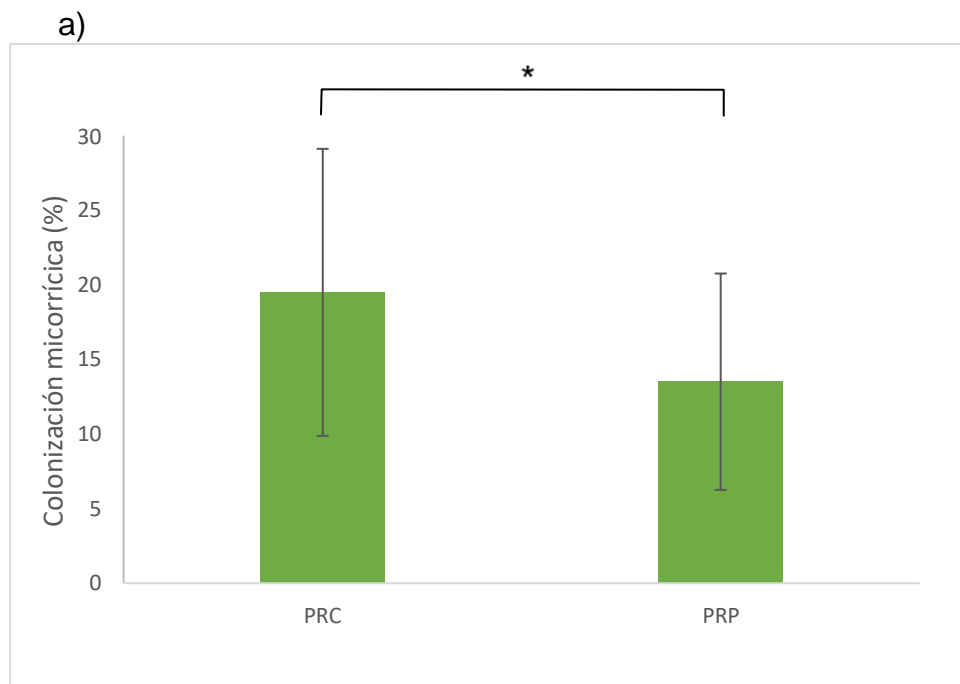


Figura 5. a. Colonización total (hifas) por micorrizas (% , promedio \pm de) en plantas crecidas en suelo del pastizal en recuperación en el tratamiento clausurado al pastoreo (PRC) y en el tratamiento con pastoreo (PRP). **b.** Presencia de arbusculos (barras verdes) y vesículas (barras azules) (% , promedio \pm de) de hongos micorrizógenos arbusculares para el tratamiento clausurado al pastoreo (PRC) y en el tratamiento con pastoreo (PRP). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, para cada tipo de estructura fúngica y ns indica ausencia de diferencias significativas ($p > 0,05$).

Con relación a la presencia de hongos septados oscuros en las raíces de las plantastrampa que crecieron en suelo de los dos sitios del pastizal en recuperación que presentan diferente tratamiento en relación al pastoreo (clausurado y pastoreado), se pudo observar que la colonización por estos hongos fue mayor significativamente en el sitio que está pastoreado que en el sitio que está clausurado ($p = 0,0009$), siendo $28,6\% \pm 6,5$ en el pastoreado y $22,8\% \pm 10,7$ en el clausurado (Figura 6).

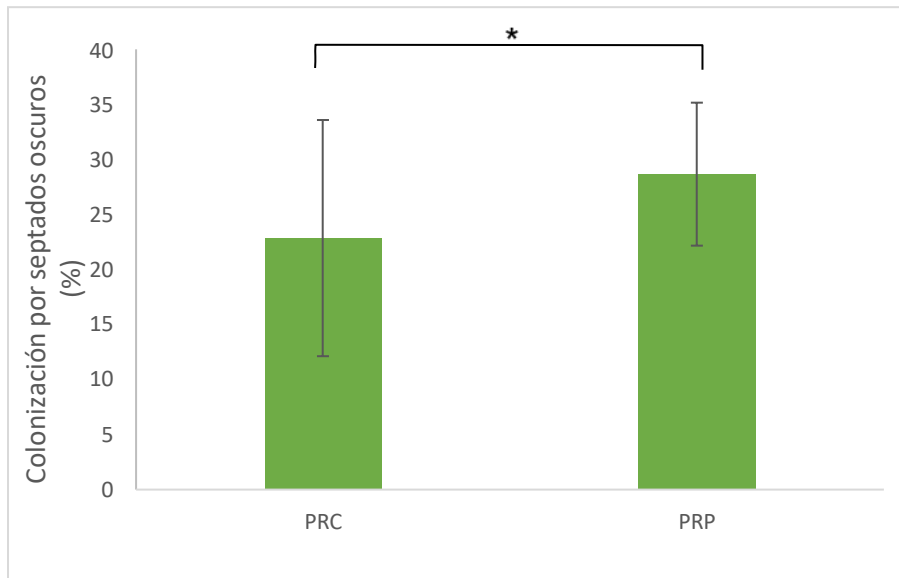


Figura 6. Colonización por hongos septados oscuros (% , promedio \pm de) en plantas trampa que crecieron en suelo proveniente del pastizal en recuperación clausurado (PRC) y pastoreado (PRP). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p = 0,0009$).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evidenció la presencia de hongos endófitos, tanto micorrizógenos arbusculares como septados oscuros, en suelos de pastizales y fue posible evaluar los efectos residuales que generó el cambio en el uso del suelo en dichos pastizales que fueron transformados a forestación con *Pinus taeda* y que se encuentran actualmente en un proceso de restauración de la comunidad vegetal natural. Asimismo, se pudo observar un efecto diferencial en relación al uso del pastoreo durante la restauración del pastizal.

¿La colonización por hongos micorrizógenos y hongos septados oscuros reflejó un efecto residual de la forestación sobre el pastizal?

Contrario a lo esperado en las dos primeras hipótesis, se observó mayor porcentaje de colonización de micorrizas arbusculares y hongos septados oscuros en las raíces de la especie trampa utilizada (cebolla) que crecieron en suelo proveniente de los sitios que fueron forestados que en suelo del pastizal nativo de referencia. En estudios previos realizados en pastizales con cambios de uso del suelo, luego de que esos ecosistemas experimentaron una perturbación transitaron un proceso de sucesión, en el que los hongos benéficos del suelo cumplieron un rol esencial al asociarse con la comunidad vegetal nativa capaz de establecerse en esos ambientes (García de León *et al.*, 2016; Asmelash *et al.*, 2016; Neuenkamp, 2018). En este sentido podría esperarse una alta colonización por los dos grupos de hongos en estudio en el predio en recuperación de la forestación, tal como se pudo observar. En las parcelas de estudio en el predio Obdulio, a 9 meses del inicio del experimento, Casás (2019) encontró que la cobertura y riqueza de especies vegetales aumentaron en el pastizal en restauración hasta alcanzar valores similares al pastizal control. Entonces se podría haber esperado que la presencia de hongos estimada en los dos sitios en el presente trabajo fuera similar, sin embargo, en el estudio de Casás se observó que la composición de la comunidad vegetal en el sitio en proceso de restauración se diferenció de la composición vegetal del pastizal control. Esto apoya las observaciones recabadas en el presente estudio. Si bien los hongos benéficos se encuentran en casi todas las plantas, pueden diferenciar su actividad frente a diferentes condiciones abióticas y huéspedes. Entonces, debido a que la composición de las comunidades vegetales en el pastizal en recuperación es diferente al del pastizal nativo, esto pudo repercutir en la presencia de hongos micorrizógenos y septados oscuros.

En varios estudios se ha evidenciado una rápida colonización de hongos micorrizógenos arbusculares en la recuperación de algún ecosistema luego de sufrir una perturbación (Hart & Reader, 2004; García de León *et al.*, 2016; Gazol *et al.*, 2016; van der Heyde *et al.*, 2017). Los cambios que ocurren en la composición de hongos benéficos debido a cambios antropogénicos pueden afectar la sucesión de las comunidades vegetales y los procesos del ecosistema (Koziol *et al.*, 2018). También se ha observado que la diversidad de HMA aumenta con el tiempo que

transcurre desde que sucede una perturbación (Koziol & Bever, 2015). Las plantas características de la sucesión tardía, a diferencia de las de sucesión temprana, por lo general son más dependientes y sensibles a los mutualistas microbianos acumulados en los suelos, que se asocian con los sistemas radiculares (Middleton & Bever, 2012; Bauer *et al.* 2015; Koziol & Bever, 2018). A su vez, se espera que la retroalimentación del suelo cambie durante el proceso sucesivo, por ello las comunidades del suelo de sucesión tardía pueden ser más beneficiosas en la restauración que las comunidades de sucesión temprana (Middleton & Bever, 2012). Esto podría explicar por qué se observó una alta colonización por hongos micorrizógenos arbusculares y septados oscuros en raíces con suelo proveniente del pastizal en restauración.

En Teste *et al.* (2019) se hace una revisión de trabajos que dan evidencia de ciertos grupos de plantas “micorriza duales” que pueden llegar a asociarse con ectomicorrizas y endomicorrizas, ya sea de forma simultánea o en diferentes etapas de la vida de la planta. De todos modos, existen controversias acerca de su existencia por cómo se define cada tipo de micorriza, por el signo que puede llegar a tomar la interacción y por la naturaleza de las estructuras que se estudian en cada uno. Teniendo en cuenta esas salvedades, se menciona que hay algunas plantas que a menudo se consideran exclusivamente ectomicorrizógenas, pero que hay registros de que se asocian también con HMA, en especial especies de la familia Pinaceae. Si bien no se menciona *P. taeda*, existe la posibilidad de que esta especie sea micorriza dual, y eso explicaría por qué la colonización micorrícica fue mayor en las plantas que crecieron en suelo del sitio que tuvo forestación con *P. taeda* en el presente estudio. Si bien las plantas con micorrizas duales son más comunes de lo que se pensaba, el conocimiento sobre ellas y su relevancia ecológica está en sus comienzos (Teste *et al.*, 2019).

Por otra parte, Varela (2010) menciona la existencia de diferentes morfoespecies de hongos micorrizógenos arbusculares, las especies dominantes en los suelos son generalistas, mientras que las especies que se encuentran en un sitio en particular se consideran especialistas. Esto puede estar explicando el hallazgo de una mayor colonización de HMA en el sitio que había sido forestado, comparado con el pastizal control, siendo esa colonización principalmente por especies generalistas, ya que son capaces de asociarse a comunidades vegetales presentes en diferentes sitios con usos del suelo diferenciales. Futuros estudios podrían

enfocarse a estudiar la diversidad de los HMA en situaciones de pastizal natural y áreas con otros usos del suelo para conocer los posibles efectos del cambio en el uso del suelo sobre este atributo de las comunidades fúngicas. Gazol *et al.* (2016) estimaron el impacto de los pinos exóticos en la riqueza y composición de las comunidades locales de HMA en Argentina y Sudáfrica. En Sudáfrica, particularmente estudiaron (3 años luego de quitar los pinos, al igual que en este trabajo) el efecto de la remoción de pinos sobre la regeneración de las comunidades originales de HMA y, al contrario de los resultados en el presente trabajo, en las áreas donde se quitaron los pinos la diversidad de HMA fue menor a la diversidad encontrada en el ambiente nativo. Ellos, además, estudiaron la colonización por HMA en la vegetación nativa al tiempo que la plantación con pinos seguía vigente, y sus resultados concluyeron que la diversidad de los hongos allí fue menor que en las otras dos situaciones. Podría implementarse un estudio para estimar la colonización por micorrizas arbusculares y septados oscuros de plantas en suelo de una plantación de pinos en pie en algún área cercana al PPQC y SY, para complementar el estudio de la importancia de estos hongos en la restauración de los pastizales nativos en Uruguay. Otra posible explicación para los resultados encontrados puede ser que haya ocurrido una inmigración de nuevos propágulos desde áreas cercanas hacia el pastizal en recuperación. También pudieron sobrevivir y dispersarse propágulos residuales del pastizal que existió anterior a la plantación, esta explicación soporta la idea de que las asociaciones micorrícicas pueden facilitar la sucesión de la comunidad ya que fueron capaces de persistir en condiciones no restauradas y también respondieron rápidamente a la extracción de los pinos (Korb *et al.*, 2003).

En relación con los hongos septados oscuros, estos han recibido poca atención en la literatura comparado con los hongos micorrizógenos. Las comunidades de ESO que habitan en las raíces están poco caracterizadas, y en general se agrupan todas como “septados oscuros” o “endófitos finos”. Sin embargo, pueden llegar a ser tan importantes como las micorrizas a la hora de influir en plantas hospedadoras, insectos y otros microbios (Wearn *et al.*, 2012). Solo algunos pocos estudios han intentado evaluar y cuantificar la colonización por micorrizas y septados oscuros en raíces. Se sabe hace ya varias décadas que los ESO con frecuencia coocurren con los HMA, y se ha evidenciado que estos pueden ser tan abundantes como los HMA (Mandyam & Jumpponen, 2005). En el presente estudio fue notable que todas las

muestras de raíces se vieron co-colonizadas por HMA y ESO, incluso en cada tratamiento se observó una mayor colonización por ESO que por HMA. Los hongos septados oscuros pueden encontrarse asociados a diferentes tipos de vegetación, tanto con plantas herbáceas (típicas de pastizal) como con plantas leñosas (plantación de pinos), pueden llegar a ser muy abundantes (tanto como los hongos micorrizógenos), son capaces de coocurrir tanto con endomicorrizas como con ectomicorrizas y están más presentes en ambientes estresantes (Lingfei *et al.* 2005). Esto se pudo evidenciar al encontrar una mayor colonización por estos hongos asociados a plantas que crecieron en suelo proveniente del sitio que fue forestado que en el sitio control.

¿La presencia de pastoreo afectó a las comunidades de hongos edáficos en el pastizal que se encuentra en restauración?

El impacto que pueda llegar a producir el pastoreo en la función de los HMA y en la estructura de la comunidad depende en gran parte de la intensidad del pastoreo, debido a que afecta de manera desigual a la productividad y la biodiversidad por encima y por debajo del suelo. Se ha observado que el pastoreo moderado es beneficioso para las condiciones de la vegetación y el suelo de los pastizales ya que constituye una “fertilización natural”, ayuda a la dispersión de semillas, permite el crecimiento y la expansión de especies vegetales anuales y bianuales, y la defoliación aérea periódica regula la sucesión en las comunidades vegetales (Faghihinia *et al.*, 2020a).

El pastoreo a una intensidad moderada puede aumentar la biodiversidad de la comunidad vegetal, al suprimir el dominio de las especies de plantas más competitivas con tasas de crecimiento más rápidas, y así promover la coexistencia de especies menos competitivas con tasas de crecimiento más bajas (Pulungan *et al.*, 2019). Cuando la diversidad aumenta, también permite que haya más tipos de raíces de plantas y exudados de raíces y, en consecuencia, aumenta la variabilidad de los recursos del suelo y de raíces para los microorganismos del suelo (Faghihinia *et al.*, 2020b). En este sentido, se esperaba encontrar mayor colonización por los dos grupos de hongos benéficos estudiados en el área pastoreada, ya que en algunos trabajos se ha visto que el pastoreo promueve estas interacciones (Eom *et al.*, 2001; Kula *et al.*, 2005). Si bien la colonización por

hongos septados oscuros se vio favorecida por el efecto del pastoreo, al comparar la colonización por hongos micorrizógenos entre el sitio clausurado y el pastoreado, se observó una mayor colonización por HMA en la clausura, García *et al.* (2012) observaron estos mismos efectos para HMA y ESO con clausura y con pastoreo. Si bien se ha reportado que el pastoreo aumenta la productividad aérea, el efecto que produce en los componentes del suelo es menos claro (Ferraro & Oesterheld, 2002). La mayoría de los estudios muestran que la biomasa subterránea en áreas pastoreadas es igual o mayor que en áreas no pastoreadas dependiendo de la estación del año y de la carga ganadera (López *et al.*, 2015), pero también se conocen algunos estudios que muestran un efecto negativo del pastoreo en la biomasa y la productividad subterránea (Soriano *et al.*, 1991; Schuman *et al.*, 1999; Smit & Kooijman, 2001). La carga ganadera en el pastizal que está siendo pastoreado dentro del sitio en estudio se ha mantenido baja (com. pers. Gallego, 2021), lo que no explicaría los resultados obtenidos con respecto a los HMA. Una posibilidad es que el ganado se agrupe en determinadas zonas, lo que hace que se generen efectos puntuales de sobrepastoreo en algunos parches (com. pers. Gallego, 2021). Con respecto a los HMA, en algunos estudios no se encontraron efectos del pastoreo sobre la simbiosis micorrícica estimada en raíces de gramíneas de pastizales naturales en Uruguay (Parodi & Pezzani, 2011, García *et al.*, 2019). Sin embargo, los resultados en otros trabajos (Eom *et al.*, 2001; Su & Guo, 2007; Ba *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2013) concuerdan con los resultados en este trabajo que muestran un efecto negativo en la colonización micorrícica por el pastoreo. El efecto que puede generar el pastoreo sobre el potencial de ESO y sobre el de HMA de forma simultánea ha sido muy poco estudiado, pero en la mayoría de los trabajos se ha visto un efecto positivo del pastoreo sobre los ESO y un efecto negativo sobre los HMA (Lingfei *et al.*, 2005; Medina-Roldán *et al.*, 2008; García *et al.*, 2012; Saravesi *et al.*, 2013).

La colonización de la vegetación de pastizal por micorrizas no consiste solamente en hifas, sino que también se forman otras estructuras intraradicales especializadas en la adquisición y el intercambio de los nutrientes, como son los arbusculos y ovillos, y/o estructuras de almacenamiento o reserva como las vesículas. Ya que los arbusculos y los ovillos son considerados interfases de intercambio, su abundancia indica un período de intercambio activo de carbono y fósforo entre los hongos micorrizógenos arbusculares y las plantas hospederas (Mandyam &

Jumpponen, 2008). En este estudio no se observaron diferencias significativas en la cantidad de arbusculos y ovidios entre las raíces de plantas que crecieron en suelo proveniente del pastizal en recuperación clausurado y pastoreado. Lo que puede significar que, aunque la cantidad de hifas se haya visto negativamente afectada por el pastoreo, la asociación de los HMA con las plantas siga funcional gracias a la presencia de arbusculos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los arbusculos tienen una vida media muy corta, de unos pocos días. Es decir que la cantidad que se observó muestra una situación acotada al momento en que se cosecharon las plantas de *A. cepa*. En lo que respecta a las vesículas dentro del sitio en restauración, una mayor presencia en plantas que crecieron en suelo proveniente del sitio clausurado en comparación con el sitio pastoreado puede relacionarse con la presencia de hifas encontrada en cada uno de los tratamientos. Este resultado concuerda con García y colaboradores (2019) que observaron un efecto negativo por el pisoteo del ganado en la intensidad de colonización por vesículas y a su vez no encontraron efecto en la presencia de arbusculos por ninguno de los componentes del pastoreo estudiados. Con respecto a los efectos del pastoreo sobre los hongos septados oscuros se obtuvieron los resultados esperados en la tercera hipótesis, al observar una mayor colonización por este grupo de hongos en las plantas correspondientes al tratamiento pastoreado versus el clausurado dentro del sitio en recuperación. A su vez la colonización de los ESO fue mayor a la alcanzada por los HMA, resultado también encontrado por Medina-Roldan y colaboradores (2008) en los pastizales semiáridos de México. Si bien hubo una diferencia en los porcentajes de colonización por los dos grupos de hongos, en última instancia estarían dadas las condiciones para que se formen los dos. Esto puede sugerir que los dos simbiontes fúngicos estén cumpliendo roles complementarios esenciales en este ecosistema y su restauración.

En este trabajo se estimó la colonización por micorrizas arbusculares en plantas crecidas en los diferentes sitios, mediante la presencia de hifas, arbusculos, vesículas y ovidios. Sin embargo, hay que tener en cuenta que además de las estructuras antes mencionadas, las cuales se forman dentro de las raíces de las plantas, los hongos micorrizógenos arbusculares forman otro tipo de estructuras por fuera de las células de las raíces, las esporas asexuales. Estas son las estructuras de donde se forma y comienza a crecer una hifa primaria que va a

penetrar en alguna célula de la raíz de la planta. Se ha observado que los distintos subórdenes de hongos micorrizógenos arbusculares presentan estrategias de colonización diferentes, ya sea mayormente por esporas o por micelio vivo, y esto afecta la respuesta que tengan frente a un disturbio (Hart & Reader, 2004). Por lo tanto, si bien se deben tener en cuenta y existen muchos estudios los cuales contemplan y estiman la presencia de estas estructuras, excede los objetivos del presente estudio. El estudio del banco de esporas de HMA podría complementar nuestros resultados sobre el potencial micorrícico del suelo y su rol en la restauración de sistemas naturales.

CONCLUSIONES

En general, es necesario continuar generando estudios para comprender mejor el rol que cumplen las interacciones entre las comunidades de los hongos benéficos con la vegetación en los procesos de restauración. A su vez es importante evaluar las respuestas que pueden presentar estos simbiontes fúngicos hacia determinados disturbios y cambios en el uso del suelo, en condiciones y tratamientos diferenciales hacia la recuperación de pastizales.

Los principales resultados de este trabajo son:

- Se pudo observar la presencia de hongos endófitos septados oscuros y hongos micorrizógenos arbusculares en las raíces de la especie de planta trampa utilizada en el ensayo (*A. cepa*) evidenciando el potencial de ambos grupos de hongos en suelos de pastizales, ya sea que se encuentren en proceso de restauración o pastizales de referencia (control).
- Una mayor colonización de micorrizas y septados oscuros en las raíces de plantas crecidas en suelo del pastizal en restauración que en plantas crecidas en suelo del pastizal de referencia puede estar dando indicios positivos del potencial que posee la vegetación del pastizal para recuperarse luego de la perturbación que generó la forestación.
- Solo se observaron estructuras micorrícicas especializadas para el intercambio (ovillos y arbusculos) en raíces de plantas que crecieron en suelo del pastizal en

recuperación, indicando que la interacción mutualista planta – hongo puede estar más activa en esos sitios.

- En relación al efecto del pastoreo sobre la restauración del pastizal, se observó un efecto negativo en la colonización por HMA y un efecto positivo en la colonización por ESO. No hubo diferencias en la cantidad de arbusculos y ovillos en sitios pastoreados como clausurados, en cambio se observó un efecto negativo en la cantidad de vesículas por el pastoreo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addy H., Piercey M. & Currah R. (2005) Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany* 83: 1-13
- Allen E. (1989) The restoration of disturbed arid landscapes with special reference to mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environments* 17: 279-286
- Allen M. (1992) *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process*. (Primera Edición) Springer US. pp 534.
- Altesor A., Di Landro, E., May, H & Ezcurra, E. (1998) Long-term species change in a Uruguayan grassland. *Journal of Vegetation Science* 9: 173-180
- Andrade B., Koch C., Boldrini I., Vélez-Martin E., Hasenack H., Hermann J-M, Kollmann J., Pillar V. & Overbeck G. (2015) Grassland degradation and restoration: A conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. *Natureza & conservação* 13: 95-104
- Aronson J., Clewell A., Blignaut J & Milton S. (2005) Ecological restoration: A new frontier for nature conservation and economics. *Journal for Nature Conservation* 14: 135-139
- Asmelash F., Bekele T. & Birhane E. (2016) The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in the restoration of degraded lands. *Frontiers of Microbiology* 7:1095-1095
- Ba L., Ning J., Wang D., Facelli E., Facelli J.M., Yang Y. & Zhang L. (2012) The relationship between the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and grazing in a meadow steppe. *Plant Soil* 352: 143-156
- Bai G., Bao Y., Du G. & Qi Y. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with vegetation and soil parameters under rest grazing management in a desert steppe ecosystem. *Mycorrhiza* 23: 289-301
- Bauer J., Mack K. & Bever J. (2015) Plant-soil feedbacks as drivers of succession: evidence from remnant and restored tallgrass prairies. *Ecosphere* 6:158
- Bendix J., Wiley J. J. & Commons M. G. (2017) Intermediate disturbance and patterns of species richness. *Physical Geography* 38: 393-403

- Bethlenfalvay G. & Dakessian S. (1984) Grazing effects on mycorrhizal colonization and floristic composition of the vegetation on a semiarid range in northern Nevada. *AGRIS*. 312-316
- Bilenca D. & Miñarro F. (2004) Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las pampas y campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. (Primera Edición) Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires. pp 213.
- Bonfante P. & Perotto S. (1995) Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *Tansley Review No. 82. New Phytologist* 130: 3-21
- Bonfante P. & Genre A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant - Fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1: 48
- Brewer J., Souza F., Callaway R. & Durigan G. (2018) Impact of invasive slash pine (*Pinus elliottii*) on groundcover vegetation at home and abroad. *Biological Invasions* 20: 2807-2820
- Casás M. (2019) Restauración de un pastizal post-forestación: análisis de la primera etapa sucesional. Tesina de Licenciatura en Ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. pp 25
- Chaneton E., Mazía N., Batista W., Rolhauser A. & Ghera C. (2012) Woody plant invasions in Pampa Grasslands: A biogeographical and community assembly perspective. Springer-Verlag New York 115-144. En: *Ecotones Between Forest and Grassland* (Primera edición) pp 330
- Cuevas Y. & Zalba S. (2010) Recovery of Native Grasslands after Removing Invasive Pines. *Restoration Ecology* 18: 711-719
- Cuevas Y. & Zalba S. (2013) Efecto del tipo de corte y de tratamientos en el mantillo para la restauración de pastizales naturales invadidos por *Pinus halepensis* *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 48: 315-329
- Dhillon, S., & Friese, C. (1994). The occurrence of mycorrhizas in prairies: application to ecological restoration. En: *The Proceedings of the 13th North American Prairie Conference*. The University of Windsor, Canada 103-114
- Eom A., Wilson G. & Hartnett D. (2001) Effects of ungulate grazers on arbuscular

mycorrhizal symbiosis and fungal community structure in tallgrass prairie. *Mycologia* 93: 233-242

Faghihinia M., Zou Y., Chen Z., Bai Y., Li W., Marrs R. & Staddon L. (2020a) Environmental drivers of grazing effects on arbuscular mycorrhizal fungi in grasslands. *Applied Soil Ecology* 153: 1-11
Faghihinia M., Zou Y., Bai Y., Marrs R & Staddon P. (2020b) Seasonal variation in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to grazing intensity. *Mycorrhiza* 30: 635-646

Farley K., Piñeiro G., Palmer S., Jobbágy E. & Jackson R. (2008) Stream acidification and base cation losses with grassland afforestation. *Water resources research* 44: 1-11

Ferraro D. & Oesterheld M. (2002) Effect of defoliation on Grass growth. A quantitative review. *Oikos* 98: 125-133

Fuchs B. & Haselwandter K. (2008) Arbuscular mycorrhiza of endangered plant species: Potential impacts on restoration strategies. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 565-579 En: *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* (Tercera Edición) pp 797

Gallego F., Paruelo J., Baeza S. & Altesor A. (2020) Distinct ecosystem types respond differentially to grazing exclusion. *Austral Ecology* 45: 548-556

García de Leon D., Moora M., Öpik M., Neuenkamp L., Gerz M., Jairus T., Vasar M., Bueno C., Davison J. & Zobel M. (2016) Symbiont dynamics during ecosystem succession: co-occurring plant and arbuscular mycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 92: 1-25

García I., Mendoza R & Pomar M. (2012) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes under contrasting grazing modes in the Magellanic steppe of Tierra del Fuego. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 155: 194-201

García R., Franzese J., Policelli N. & Sasal Y. (2018) Non-native pines are homogenizing the ecosystems of South America. Springer International Publishing 245-263 En: *From Biocultural Homogenization to Biocultural*

- Conservation (Primera edición) pp 481 From book series: Ecology and Ethics
- García S., Pezzani F., Lezama F. & Paruelo J. (2019) Los componentes del pastoreo afectan de forma diferencial las micorrizas en *Paspalum dilatatum* Por.Ecología Austral 29: 156-165
- García S., Pezzani F. & Rodríguez-Blanco A. (2017) Long-term phosphorus fertilization effects on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in Uruguayan grasses. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 17: 1013-1027
- Gazol A., Zobel M., Cantero J., Davison J., Esler K., Jairus T., Öpik M., Vasar M. & Moora M. (2016) Impact of alien pines on local arbuscular mycorrhizal fungal communities-evidence from two continents. Microbiology Ecology. 92: 1-14
- Gehring C. & Whitham T. (1994) Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. Trends in Ecology and Evolution 9: 251-5
- Gibson D. (2009) Grasses and grassland ecology. Oxford University Press. Southern Illinois University, Carbondale. 305 pp.
- Guadarrama P., Castillo-Argüero S., Ramos-Zapata J., Camargo-Ricalde S. & Álvarez-Sánchez J. (2008) Propagules of arbuscular mycorrhizal fungi in a secondary dry forest of Oaxaca, Mexico. Revista de Biología Tropical 56: 269-77
- Hart M. & Reader R. (2004) Do arbuscular mycorrhizal fungi recover from soil disturbance differently? Tropical Ecology 45: 97-111
- Hobbs R. & Norton D. (1996) Towards a conceptual framework for restoration ecology. Restoration Ecology 4: 93-110
- Johnson N., Rowland D., Corkidi L., Egerton-Warburton L. & Allen E. (2003) Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. Ecology 84: 1895-1908
- Korb J., Johnson N. & Covington W. (2003) Arbuscular mycorrhizal propagule densities respond rapidly to ponderosa pine restoration treatments. Journal of Applied Ecology 40: 101-110
- Koziol L. & Bever J. (2015) Mycorrhizal response trades off with plant growth rate

- and increases with plant successional status. *Ecology* 96: 1768-1774
- Koziol L. & Bever J. (2016) AMF, phylogeny, and succession: specificity of response to mycorrhizal fungi increases for late-successional plants. *Ecosphere* 7: 1-11
- Koziol L. & Bever J. (2016) The missing link in grassland restoration: arbuscular mycorrhizal fungi inoculation increases plant diversity and accelerates succession. *Journal of Applied Ecology* 54: 1301-1309
- Koziol L. & Bever J. (2018) Mycorrhizal feedbacks generate positive frequency dependence accelerating grassland succession. *Journal of Ecology* 107:622–632.
- Kula A., Hartnett D. & Wilson G. (2005) Effect of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant–herbivore interactions. *Ecology Letters* 8: 61-69
- Lezama F., Pereira M., Altesor A & Paruelo J. (2019) ¿Cuán heterogéneos son los pastizales naturales en Uruguay? En: Altesor A., López L. & Paruelo J. (Eds.) Bases ecológicas y tecnológicas para el manejo de pastizales II. INIA, Montevideo (Serie FPTA: 69) pp 15-26
- Lingfei L., Anna Y. & Zhiwei Z. (2005) Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 367-373
- López L., Altesor A., Oyarzabal M., Baldassini P., Paruelo J. (2015) Grazing increases below-ground biomass and net primary production in a temperate grassland. *Plant and Soil* 392: 155-162
- Lugo M., Menoyo E., Allione L., Negritto M., Henning J. & Anton A. (2018) Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes associated with grasses from the Argentine puna. *Mycologia* 110: 1-12
- Mandyam K. & Jumpponen A. (2005) Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* 53: 173-189
- Mandyam K. & Jumpponen A. (2008) Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. *Mycorrhiza* 18:145-155

- Martin D. (2017) Ecological restoration should be redefined for the twenty-first century. *Restoration ecology* 25: 668-673
- Medina-Roldán E., Arredondo J., Huber-Sannwald E., Chapa-Vargas L & Olalde-Portugal V. (2008) Grazing effects on fungal root symbionts and carbon and nitrogen storage in a shortgrass steppe in Central Mexico. *Journal of Arid Environments* 72: 546-556
- Middleton E. & Bever J. (2012) Inoculation with a native soil community advances succession in a grassland restoration. *Restoration Ecology* 20: 218-226
- Miñarro F., Martínez U., Bilenca D. & Olmos F. (2008). Río de la Plata Grasslands or Pampas & Campos (Argentina, Uruguay and Brazil). En: *Temperate Grasslands of South America*. The World Temperate Grasslands Conservation Initiative Workshop. Hohhot, China. 24-31
- Modernel P., Rossing W., Dogliotti S., Picasso V. & Tittone P. (2016) Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environmental Research Letters* 11: 113002
- MVOTMA - DINAMA (2020) Proceso de ampliación de Quebrada de los Cuervos Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Proyecto de ampliación del área. Montevideo, Uruguay.
- Neuenkamp L. (2018) The dynamics of plant and arbuscular mycorrhizal fungal communities in grasslands under changing land use. *Dissertationes biologicae universitatis tartuensis*. Department of Botany, Institute of Ecology and Earth Sciences, Faculty of Science and Technology, University of Tartu, Estonia.
- Ohlowski B., Klironomos J., Dunfield K. & Hart M. (2012) The potential of soil amendments for restoring severely disturbed grasslands. *Applied Soil Ecology* 60:77-83
- Palmer M., Zedler J. & Falk D. (2006) Ecological Theory and Restoration Ecology. In: *Foundations of Restoration Ecology*. Island Press, Washington, DC. 3-26
- Paruelo J., Piñeiro G., Baldi G., Baeza S., Lezama F., Alice A & Oesterheld M. (2010) Carbon Stock and Fluxes in Rangelands of the Río de la Plata Basin. *Rangeland Ecology & Management* 63: 94-108

- Parodi G. & Pezzani F. (2011) Micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas de Uruguay en áreas con y sin pastoreo. *Agrociencia Uruguay* 2: 1-10
- Pietikäinen A., Kytöviita M & Vuoti U. (2005) Mycorrhiza and seedling establishment in a subarctic meadow: Effects of fertilization and defoliation. *Journal of Vegetation Science*. 16: 175-182.
- Pimm S. (1991) *The balance of Nature?: Ecological Issues in the Conservation of Species and Communities*. University of Chicago press pp 448
- Powell J. & Rillig M. (2018) Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. *New Phytologist* 220: 1059-1075
- Pulungan M., Suzuki S., Gavina M., Tubay J., Ito H., Nii M., Ichinose G., Okabe T., Ishida A., Shiyomi M., Togashi T., Yoshimura J & Morita S. (2019) Grazing enhances species diversity in grassland communities. *Scientific Reports* 9: 1-8
- Reinhart K. & Callaway R. (2006) Soil biota and invasive plants. *New Phytologist* 170: 445-457
- Ruiz-Jaen M. & Aide T. (2005) Restoration success: How is it being measured? *Restoration Ecology* 13: 569-577
- Sala O., Chapin F., Armesto J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald H., Huenneke L., Jackson R., Kinzig A., Leemans R., Lodge D., Mooney H., Oesterheld M., Poff N., Sykes M., Walker B., Walker M. & Wall D. (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774
- Saparrat M., Ruscitti M. & Arango M. *Micorrizas arbusculares: biología y aplicaciones en el sector agro-forestal*. Libros de Cátedra. (Primera edición) Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina pp 134
- Saravesi K., Routsalainen L. & Cahill J. (Contrasting impacts of defoliation on root colonization by arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Medicago sativa*. *Mycorrhiza* 24: 239-245
- Schuman G., Reeder J., Manley J., Hart R. & Manley W. (1999) Impact of grazing management on the carbon and nitrogen balance of a mixed-grass rangeland. *Ecological Applications* 9: 65-71

- Six L., Bakker J. & Bilby R. (2014) Vegetation dynamics in a novel ecosystem: Agroforestry effects on grassland vegetation in Uruguay. *Ecosphere* 5: 74-88
- Smit A. & Kooijman A. (2001) Impact of grazing on the input of organic matter and nutrients to the soil in a Grass-encroached Scots pine forest. *Forest Ecology and Management* 142: 99-107
- Smith S. & Read D. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press (Tercera Edición) pp 800
- SNAP (2011) Plan de Manejo Paisaje Protegido Quebrada de los Cuervos. Proyecto Fortalecimiento del Proceso de Implementación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Montevideo, Uruguay.
- Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group (SER) (2004) *The SER International Primer on Ecological Restoration*. Society for Ecological Restoration International. (Versión 2) 1-13
- Soriano A., León R., Sala O., Lavado R., Deregibus V., Cauhépé M., Scaglia O., Velázquez C. & Lemcoff J. (1991) Río de la Plata grasslands. In: *Coupland R (ed) Natural grasslands: introduction and western hemisphere*. Elsevier, Amsterdam, pp 367-407
- Su Y. & Guo L. (2007) Arbuscular mycorrhizal fungi in non-grazed, restored and over-grazed grassland in the Inner Mongolia steppe. *Mycorrhiza* 17: 689-693
- Suding K., Gross K. & Houseman G. (2004) Alternative states and positive feedbacks in restoration ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 46-53
- Teste F., Jones M. & Dickie I. (2019) Dual-mycorrhizal plants: their ecology and relevance. *New Phytologist* 225: 1835-1851
- Texeira M. & Altesor A. (2009) Small-scale spatial dynamics of vegetation in a grazed Uruguayan grassland. *Austral Ecology* 34: 386-394
- Tiscornia G., Jaurena M. & Baethgen W. (2019) Drivers, process, and consequences of native grassland degradation: Insights from a literature review and a survey in Río de la Plata grasslands. *Agronomy* 9: 239-260
- Torchelsen F., Cadenazzi M. & Overbeck G. (2018) Do subtropical grasslands

recover spontaneously after afforestation? *Journal of Plant Ecology* 12: 228-234

- Turnau K. & Haselwandter K. (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi, an essential component of soil microflora in ecosystem restoration. In: *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhäuser, Basel 137-149
- Vahter T., Bueno C., Davison J., Herodes K., Hiiesalu I., Kasari-Toussaint L., Oja J., Olsson P., Sepp S., Zobel M., Vasar M & Opik M. (2020) Co-introduction of native mycorrhizal fungi and plant seed accelerates restoration of post-mining landscapes. *Journal of Applied Ecology* 57: 1741-1751
- Vallejos M., Gallego F., Barbieri A., Bruzzone L., Ramos S & Baeza S. (2021) MapBiomias pampa sudamericano: una iniciativa trinacional para conocer los cambios en el uso y cobertura del suelo. *Revista INIA*, N° 65 pp 88
- Van der Heyden M., Ohsowski B., Abbott L. & Hart M. (2017) Arbuscular mycorrhizal fungus responses to disturbance are context-dependent. *Mycorrhiza*. 27: 431-440
- Varela L, Trejo D, Álvarez-Sánchez F, Barois I, Amora-Lazcano E, Guadarrama P, Lara L, Olivera L, Sánchez-Gallén I, Sangabriel W & Zulueta R (2010) Uso de Suelo y Diversidad de Hongos Micorrizógenos Arbusculares en Ecosistemas Tropicales Mexicanos. Síntesis de la divulgación de los trabajos realizados en el marco del proyecto “Conservación y Manejo Sostenible de la Biodiversidad en el Suelo” en la Región de Los Tuxtlas, Veracruz, México 2002–2010. Barois, I. García-Pérez, J. Delos Santos, M., pp. 10-12
- Wang K., Zhang Y., Tang Z., Shangguan Z, Chang F., Jia F., Chen Y., He X., Shi W and Deng L. (2019). Effects of grassland afforestation on structure and function of soil bacterial and fungal communities. *Science of the Total Environment* 676: 396- 406
- Wearn J., Sutton B., Morley N & Gange A. (2012) Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology* 100: 1085-1092
- Wipf D., Krajinski F., van Tuinen D., Recorbet G., Courty P. (2019) Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal

networks. *New Phytologist* 223: 1127-1142

Wolfe B. & Klironomos J. (2014) Breaking New Ground: Soil Communities and Exotic Plant Invasion. *BioScience* 55: 477-487

Yang W., Zheng Y., Gao C., He X., Ding Q., Kim Y., Rui Y., Wang S., Guo L. (2013). The arbuscular mycorrhizal fungal community response to warming and grazing differs between soil and roots on the Qinghai-Tibetan plateau. *PLoS One* 8

Zobel M. & Öpik M. (2014) Plant and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities - which drives which? *Journal of Vegetation Science* 25: 1133-1140