

**Efectos directos e indirectos del herbicida glifosato sobre los hongos  
micorrícicos arbusculares en pastizales de la Pampa Deprimida**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Magdalena Druille**

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires – 2007

Lugar de trabajo: IFEVA-CONICET-FAUBA



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Rodolfo A. Golluscio**

Ing. Agrónomo (UBA)

M. Sc. (UBA)

Dr. (UBA)

Co-directora

**Marta N. Cabello**

Licenciada en Ciencias Naturales (U.N.L.P.)

Dra. (U.N.L.P.)

Consejero de Estudios

**Marina Omacini**

Licenciada en Ciencias Naturales (C.A.E.C.E.)

M. Sc. (UBA)

Dr. (UBA)

## **JURADO DE TESIS**

Director de tesis

**Rodolfo A. Golluscio**

Ing. Agrónomo (UBA)

M. Sc. (UBA)

Dr. (UBA)

JURADO

**Pedro Daleo**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctor en Ciencias (Universidad Nacional de Mar del Plata)

JURADO

**Rodolfo Ernesto Mendoza**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**Alejandro Guillermo Pardo**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 26 de Marzo de 2014

*A mis padres y hermanos*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecerles a Rodolfo Golluscio, Marta Cabello y Marina Omacini, por haberme transferido sus conocimientos con absoluta paciencia y dedicación. Sin duda, me transmitieron parte de la pasión que cada uno de ellos siente por su profesión, y eso me ayudó a transitar el doctorado con muchas satisfacciones.

Asimismo, quisiera agradecerles a Martín Vila-Aiub, Patricia Del Fueyo, Susana Perelman, Agustín Grimoldi y Pedro Gundel por los aportes realizados a mi tesis, y a Daniel Gonzalez Martino, por permitirme realizar el ensayo en su Establecimiento, mostrando mucho interés y voluntad, sin siquiera conocerme.

Agradezco a la Cátedra de Forrajicultura por compartir conmigo el día a día, en especial a mis compañeros y amigos de oficina: Carla Di Bella, Mercedes Vassallo, Gonzalo Irisarri, Pilar Clavijo y Paula Aguirre, y a Fernando Cavagnaro por acompañarme estoicamente en todos los viajes al campo.

A Milena Manzur, Adelia González Arzac y Marina Cohen, por tantos Lunes rotos de música, risas y sesiones terapéuticas; a Laureano Ghirardi por sus charlas académicas y filosóficas, y a Pablo Picasso por compartirme sus libros y canciones.

Agradezco al grupo Simbioikos: Marina, María Semmartin, Romina Cavagnaro, Luis Ignacio Perez, Pablo García Parisi, Luciano Boyero, Luciana D'Acunto, Andrea Ueno, Marta Telesnicki e Ignacio Hernández Agrmaonte Caballero, por las lecturas compartidas.

También le agradezco a Gustavo Striker, Martín Garbulsky, Lucía Vivanco y Mirta Rabadán, quienes de diversas maneras han contribuido a esta tesis.

Por último, quiero agradecerle especialmente a Pedro Sosa, mi amor y compañero incondicional. Le agradezco por haber creído en mi desde el comienzo, y porque en cada etapa que fui transitando en este doctorado, festejó mis logros y me alentó en momentos bajos. Le agradezco su ayuda en los ensayos, su contención espiritual, y por dejarme ser en libertad.

*“Las luces del alma, sin muros y sin sed, habrán de encontrarse al final”*

Luis Alberto Spinetta

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

### Publicaciones derivadas de la tesis

- Druille M., Cabello M. N., Omacini M., Golluscio R. A. 2013. Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 64: 99– 103.
- Druille M., Omacini M., Golluscio R. A., Cabello M. N. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology* 72: 143-149.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>DECLARACION.....</b>	<b>v</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....</b>	<b>vi</b>
<b>INDICE DE CUADROS.....</b>	<b>ix</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
 <b>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
Importancia y ecología de los hongos micorrícicos arbusculares.....	<b>2</b>
Influencia de las prácticas agronómicas sobre los HMA.....	<b>5</b>
Separación de potenciales efectos directos de la aplicación de glifosato de los indirectos para evaluar el impacto sobre los hongos micorrícicos arbusculares.....	<b>9</b>
Objetivos e hipótesis generales.....	<b>11</b>
Aproximación metodológica y estructura de la tesis.....	<b>11</b>
Pastizal natural de la Pampa Deprimida como sitio de estudio.....	<b>12</b>
 <b>Capítulo 2: EFECTOS DIRECTOS DEL GLIFOSATO SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPORAS DE HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES</b>	
Introducción.....	<b>17</b>
Materiales y métodos.....	<b>19</b>
Resultados.....	<b>23</b>
Discusión.....	<b>27</b>

**Capítulo 3: SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE LA APLICACIÓN DE GLIFOSATO SOBRE LOS HMA**

Introducción.....	33
Materiales y métodos.....	35
Resultados.....	38
Discusión.....	43

**Capítulo 4: EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE GLIFOSATO SOBRE LOS HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES: ESTUDIO A CAMPO**

Introducción.....	48
Materiales y métodos.....	51
Resultados.....	58
Discusión.....	71

**Capítulo 5:**

Discusión general.....	77
------------------------	----

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>
--------------------------	-----------

<b>ANEXO.....</b>	<b>116</b>
-------------------	------------

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1.</b> Tasa de supervivencia y contenido de clorofila en plantas de <i>L. multiflorum</i> sometidas a distintas dosis de glifosato.....	<b>21</b>
<b>Cuadro 2.2.</b> Biomasa aérea de plantas de <i>L. multiflorum</i> expuestas a distintas dosis de glifosato, sembradas 10 y 30 días post-aplicación.....	<b>25</b>
<b>Cuadro 2.3.</b> Resultados del análisis de varianza (MANOVA) para los efectos del período de siembra post-aplicación y dosis de glifosato sobre los atributos de la colonización radical (colonización radical total, porcentaje de arbusculos y porcentaje de vesículas).....	<b>25</b>
<b>Cuadro 3.1.</b> Resultados del análisis multivariado de la varianza (MANOVA) para los efectos de las especies vegetales, dosis de glifosato y sitio de aplicación en los rasgos fúngicos .....	<b>39</b>
<b>Cuadro 3.2.</b> ANOVAs protegidos para el efectos de las especies vegetales ( <i>L. tenuis</i> o <i>P. dilatatum</i> ), la dosis de glifosato y el sitio de aplicación (suelo u hojas) sobre la colonización radical total, arbusculos y vesículas.....	<b>40</b>
<b>Cuadro 3.3.</b> Contenido de clorofila en hojas de <i>L. tenuis</i> y <i>P. dilatatum</i> , 15 días post-aplicación de glifosato.....	<b>42</b>
<b>Cuadro 4.1.</b> Propiedades químicas del suelo (0-20 cm) al momento de la aplicación de glifosato. Los valores representan la media de seis repeticiones $\pm$ el error estándar.....	<b>52</b>
<b>Cuadro 4.2.</b> Abundancia relativa (%) de esporas de cada una de las especies de HMA encontradas en 100 g de suelo seco tratados con distintas dosis de glifosato.....	<b>59</b>
<b>Cuadro 4.3.</b> Riqueza, equitatividad y diversidad de especies de HMA en suelos asociados a <i>L. tenuis</i> y <i>P. dilatatum</i> , expuestos a distintas dosis de glifosato.....	<b>60</b>

<b>Cuadro 4.4.</b> Resultados del análisis multivariado de la varianza (MANOVA) para el efecto de la dosis de glifosato sobre los rasgos fúngicos (colonización radical total, porcentaje de arbusculos y porcentaje de vesículas) en <i>L. tenuis</i> y <i>P. dilatatum</i> .....	<b>63</b>
<b>Cuadro 4.5.</b> Contenido de clorofila en hojas de <i>L. tenuis</i> y <i>P. dilatatum</i> , 15 días post-aplicación de glifosato.....	<b>65</b>
<b>Cuadro 4.6.</b> Riqueza (S), equitatividad (E) y diversidad (H) de especies vegetales en parcelas sometidas a distintas dosis de glifosato, en la primavera y verano siguientes a la aplicación.....	<b>67</b>
<b>Cuadro 4.7.</b> Abundancia relativa de las especies vegetales presentes en las parcelas tratadas con distintas dosis de glifosato, en primavera de 2012 y verano de 2013.....	<b>70</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de las estructuras de los HMA que se forman dentro de las raíces. Se aprecian vesículas (V), circunvoluciones (flecha), hifa intercelular (cabeza de flecha) y arbusculos (dos cabezas de flecha).....	<b>4</b>
<b>Figura 1.2.</b> Posibles efectos directos e indirectos del glifosato sobre los HMA. Las líneas continuas corresponden a los efectos directos del herbicida sobre las esporas e hifas externas. Las líneas discontinuas indican los efectos indirectos a corto plazo causados por cambios en la planta hospedante.....	<b>10</b>
<b>Figura 1.3.</b> Mapa de la provincia de Buenos Aires, con localización del área ecológica correspondiente a la Pampa Deprimida.....	<b>13</b>
<b>Figura 2.1.</b> Viabilidad de esporas de HMA (%) bajo diferentes dosis de glifosato, en dos períodos de muestreo (10 y 30 días post-aplicación) .....	<b>24</b>
<b>Figura 2.2.</b> Porcentaje de colonización radical (A), arbusculos (B) y vesículas (C) en plantas sembradas en suelos tratados con distintas dosis de glifosato, y en dos períodos de siembra (10 y 30 días post-aplicación). .....	<b>26</b>
<b>Figura 3.1.</b> Viabilidad de esporas de HMA en las comunidades asociadas a plantas de A) <i>L. tenuis</i> y B) <i>P. dilatatum</i> 15 días post-aplicación de glifosato en el suelo (vía directa) o en las hojas (vía indirecta).....	<b>38</b>
<b>Figura 3.2.</b> Colonización radical total, arbusculos y vesículas en plantas de <i>L. tenuis</i> y <i>P. dilatatum</i> 15 días después de la aplicación de glifosato en el suelo (vía directa) o aplicación en las hojas (vía indirecta).....	<b>41</b>

<b>Figura 4.1:</b> Número total de esporas (A), porcentaje de viabilidad (B) y número de esporas viables (C) en suelos asociados a <i>L. tenuis</i> y <i>P. dilatatum</i> , sometidos a distintas dosis de glifosato.....	<b>61</b>
<b>Figura 4.2.</b> Viabilidad de esporas de las cuatro especies dominantes de HMA, en suelos tratados con distintas dosis de glifosato.....	<b>63</b>
<b>Figura 4.3.</b> Porcentaje de colonización radical, arbuscúlos y vesículas en raíces de <i>L. tenuis</i> (A) y <i>P. dilatatum</i> (B) expuestas a distintas dosis de glifosato (0, 0,8 y 3 l.ha <sup>-1</sup> ), quince días post-aplicación del herbicida.....	<b>64</b>
<b>Figura 4.4.</b> Cobertura vegetal (%) y conductividad eléctrica en parcelas tratadas con distintas dosis de glifosato (0, 0,8 y 3 l.ha <sup>-1</sup> ).....	<b>66</b>
<b>Figura 4.5.</b> Cobertura basal de cada grupo funcional en función de las distintas dosis de herbicida (0, 0,8 y 3 l.ha <sup>-1</sup> ), correspondientes al mes de diciembre de 2012.....	<b>68</b>
<b>Figura 4.6.</b> Cobertura basal de cada grupo funcional en función de las distintas dosis de herbicida (0, 0,8 y 3 l.ha <sup>-1</sup> ), correspondientes al mes de marzo de 2013. ....	<b>69</b>
<b>Figura 5.1.</b> Efectos directos e indirectos del glifosato sobre los HMA. Las líneas continuas y signos entre paréntesis corresponden a los efectos directos del herbicida sobre las esporas e hifas externas. Las líneas discontinuas y signos entre corchetes indican los efectos indirectos a corto plazo causados por cambios en la planta hospedante, que afectan a las estructuras internas de hongos (hifas, arbuscúlos y vesículas) y/o a las esporas e hifas externas.....	<b>80</b>
<b>Figura 5.2.</b> Valor pastoral de las parcelas tratadas con distintas dosis de glifosato (0, 0,8 y 3 l.ha <sup>-1</sup> ) registrados en primavera de 2012 y verano de 2013.....	<b>83</b>
<b>Figura 5.3.</b> Variación en el porcentaje de viabilidad de esporas expuestas a distintas dosis de glifosato en los tres ensayos realizados en la tesis.....	<b>84</b>

<b>Figura 5.4.</b> Porcentaje de colonización radical, arbusculos y vesículas en plantas de <i>L. tenuis</i> (A, C y E) y <i>P. dilatatum</i> (B, D y F) tratadas con distintas dosis de glifosato, correspondientes al ensayo 2 (en invernáculo, líneas discontinuas) y al ensayo 3 (a campo, líneas continuas).....	<b>86</b>
<b>Figura 6.1.</b> Contenido de clorofila en plantas de <i>L. multiflorum</i> 15 días post-aplicación de glifosato a 0, 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 y 2,4 l.ha <sup>-1</sup> .....	<b>117</b>
<b>Figura 6.2.</b> Precipitaciones registradas en el Establecimiento “San Rafael” durante las semanas previas y posteriores a la aplicación de glifosato.....	<b>117</b>

## **Efectos directos e indirectos del herbicida glifosato sobre los hongos micorrícicos arbusculares en pastizales de la Pampa Deprimida**

### **RESUMEN**

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son simbiontes obligados, con un importante rol en el crecimiento de las plantas y en la estructura de la comunidad vegetal. El impacto del glifosato sobre los HMA no ha sido evaluado en pastizales naturales pampeanos, donde es aplicado para promover especies invernales anuales. Se propuso como **hipótesis general** que el glifosato afectaría negativamente a los HMA directamente sobre las estructuras del hongo expuestas al herbicida, e indirectamente al dañar el vigor de la planta hospedante (dependiendo esto último de la especie vegetal). Primeramente, se evaluó la viabilidad de las esporas y su capacidad de colonizar raíces en suelos de un pastizal de la Pampa Deprimida tratados con la dosis recomendada a campo y con una dosis subletal para las plantas. Se detectó una disminución en la viabilidad de esporas incluso en la dosis subletal y una menor colonización radical y arbusculos en plantas creciendo en suelos tratados con la dosis máxima. Luego, se discriminaron los efectos directos del glifosato de los indirectos sobre los HMA, utilizando *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum* como plantas hospedantes. Los resultados mostraron que en ambas especies la viabilidad de esporas se vio afectada solamente por los efectos directos del glifosato, la colonización radical fue reducida tanto por los efectos directos como por los indirectos en igual medida, mientras que en el porcentaje de arbusculos el efecto indirecto fue mayor. Por último, se evaluó el impacto a campo del glifosato sobre los HMA y la vegetación. La viabilidad de esporas se redujo cuando se aplicó la dosis máxima, siendo esta reducción distinta según la especie de HMA. La

colonización radical no fue afectada, y el porcentaje de arbusculos sólo se redujo en *P. dilatatum* y cuando se aplicó la dosis máxima. Respecto a la estructura de la vegetación, el glifosato provocó una reducción de la cobertura total y un aumento de la de dicotiledóneas no leguminosas. Los resultados respaldan la **hipótesis general**, ya que el glifosato afectó negativamente a los HMA tanto directa como indirectamente. Sin embargo, la identidad de la planta hospedante no influyó marcadamente los efectos indirectos. Esta práctica de manejo altera el funcionamiento de los HMA en el corto plazo y potencialmente en el largo plazo al alterar la comunidad vegetal. La información generada en esta tesis podrá utilizarse al momento de generar estrategias de manejo más sustentable en estos sistemas.

**Palabras claves:** Organismos no-blanco, Propágulos de HMA, *Lolium multiflorum*, Colonización radical, Viabilidad de esporas, *Lotus tenuis*, *Paspalum dilatatum*, Biodiversidad, Herbicidas.

## **Direct and indirect effects of glyphosate herbicide application on arbuscular mycorrhizal fungi in Flooding Pampa grasslands**

### **ABSTRACT**

Arbuscular mycorrhizal fungi (HMA) are obligate symbionts, with an important role in plant growth and on plant community structure. The impact of glyphosate on HMA has not been evaluated in natural grassland, where it is applied in order to promote cool-season annual grasses. The general hypothesis is that glyphosate adversely affect HMA directly on fungus structures exposed to the herbicide, and indirectly by damaging the host plant vigor (these indirect effects depending on plant identity). First, we assessed HMA spores viability and its ability to colonize roots in soil treated with recommended field dose and with a sublethal dose for plants. A decrease in spore viability was detected even in the sublethal dose, and lower root colonization and percentage of arbuscules was observed in plants growing in soils treated with the highest dose. Second, direct effects of glyphosate were discriminated from indirect on HMA, using *Paspalum dilatatum* and *Lotus tenuis* as host plants. The results showed that spore viability was only affected by the direct effect, root colonization was reduced to the same extent by both direct and indirect effects, and the percentage of arbuscules was more affected by indirect than by direct effects in *L. tenuis* and *P. dilatatum*. Third, we evaluated the impact of glyphosate application on HMA and vegetation under field conditions. Spore viability was reduced when the maximum dose was applied, being this reduction different depending on HMA species. Root colonization was not affected, and only a reduction in percentage of arbuscules was observed in *P. dilatatum* when the maximum dose was applied. Regarding the vegetation structure, glyphosate caused a

decrease in total plant cover and an increase in non-legume dicots. These results support the general hypothesis, since glyphosate negatively affected HMA both directly and indirectly. However, the identity of host plant did not markedly influence the indirect effects. The above leads to the conclusion that this practice disrupts the HMA functionality in the short term and potentially in the long term by altering plant community. The information generated in this thesis should be used when generating more sustainable management strategies in these systems.

**Key words:** Non-target organisms, HMA propagules, *Lolium multiflorum*, Root colonization, Spore viability, *Lotus tenuis*, *Paspalum dilatatum*, Biodiversity. Herbicides.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **Importancia y ecología de los hongos micorrícicos arbusculares**

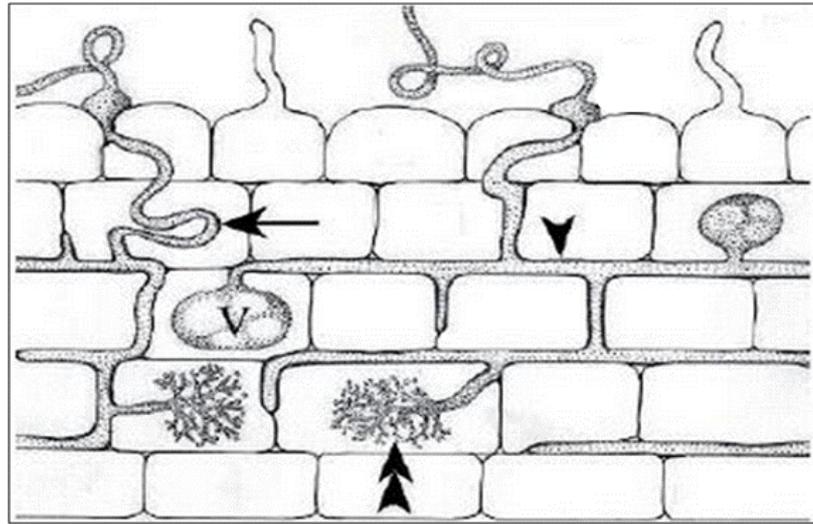
Durante los últimos años ha crecido el interés en el papel que tienen las interacciones entre las plantas y los microorganismos como determinante de la riqueza y abundancia de especies vegetales (Klironomos, 2002; Reynolds *et al.*, 2003; Omacini *et al.*, 2006; Berg, 2009). Conocer los factores que afectan la biodiversidad de plantas y microorganismos en los ecosistemas es clave porque la misma determina en gran medida tanto su productividad como su estabilidad (McNaughton, 1977; Tilman & Downing, 1994; Tilman *et al.*, 1996; Tilman *et al.*, 2006; Isbell *et al.*, 2009). Las diferencias interespecíficas en el uso de los recursos permitiría en una comunidad más diversa un mayor aprovechamiento de los recursos limitantes, y por ende alcanzar mayor productividad (McNaughton, 1993). Por otro lado, la pérdida de nutrientes del suelo por lixiviación sería menor a medida que la diversidad vegetal aumenta, debido a la mayor captura de nutrientes y/o a su mayor inmovilización, aumentando la estabilidad del ecosistema (Hooper *et al.*, 2002).

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) juegan un papel central como determinantes de la biodiversidad de los ecosistemas debido a su potencial control sobre el crecimiento de las plantas y sobre la diversidad y productividad de la comunidad vegetal (van der Heijden *et al.*, 1998b). Esto se debe a que los HMA a cambio de fotosintatos, proveen a las plantas hospedantes un mayor acceso a nutrientes poco móviles, protección contra patógenos y resistencia a la sequía (Smith & Read, 1997). La mayoría de las plantas necesitan en mayor o menor medida estar micorrizadas para captar nutrientes y crecer adecuadamente, probablemente debido a que plantas y HMA han coevolucionado (Brundrett, 2002). De hecho, se reconoce que el pobre desarrollo radical de las primeras plantas terrestres, en conjunto con la escasez de nutrientes minerales de suelos poco desarrollados, favoreció la evolución de la simbiosis

micorrízica, como estrategia exitosa de colonización terrestre (Pirozynski & Malloch, 1975; Malloch *et al.*, 1980). Este tipo de asociaciones es encontrado en ambientes altamente contrastantes, desde los trópicos (Huante *et al.*, 1993; Husband *et al.*, 2002) hasta los polos (Cabello *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1994; Newsham *et al.*, 2009), y desde ambientes desérticos (Bethlenfalvay *et al.*, 1984; O'Connor *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007) hasta acuáticos (Varma *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 2004). La dependencia de los HMA respecto a las plantas es muy marcada, porque al ser biótrofos obligados, no pueden completar su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora (Bonfante & Perotto, 1995).

Existen distintos tipos de propágulos de HMA en el suelo: esporas, micelio externo y segmentos de raíces infectadas (Smith & Read, 2008). Las esporas son de origen asexual, y otorgan una gran capacidad de crecimiento, dispersión y supervivencia (Allen, 1991). En condiciones específicas, las esporas germinan, y generan hifas aseptadas y multinucleadas que se expanden y ramifican en el suelo, formando un micelio o red hifal (Camargo-Ricalde, 2002). La relevancia de esta red hifal reside en el aumento de la superficie de absorción radical, la exploración de regiones del suelo que está por fuera de la zona de deficiencia de nutrientes y la traslocación de los nutrientes absorbidos hacia la raíz. Las hifas, al entrar en contacto con la superficie de una raíz, penetran en la misma y forman distintas estructuras morfológicamente especializadas, como hifas intra e intercelulares, circunvoluciones, arbusculos y vesículas (Fig. 1.1). Los arbusculos, son las estructuras en las cuales se produce el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988), mientras que las vesículas se consideran estructuras de almacenamiento temporario de reservas (Brundrett, 2009), y han demostrado ser particularmente infecciosas. Por lo tanto, los

fragmentos de raíces colonizadas, ya sea vivas o muertas, pueden funcionar como fuente de inóculo para raíces en desarrollo (Tommerup, 1984).



**Figura 1.1.** Esquema de las estructuras de los HMA que se forman dentro de las raíces. Se aprecian vesículas (V), circunvoluciones (flecha), hifa intercelular (cabeza de flecha) y arbusculos (dos cabezas de flecha). Tomado de Peterson et al. (2004).

A pesar de que los HMA no presentan especificidad con las plantas hospedantes en su capacidad de colonizar raíces, existe variabilidad interespecífica en la efectividad de la interacción para cada uno de los participantes (Bever *et al.*, 1996). La especificidad se refiere al rango taxonómico de participantes con los cuales un organismo puede asociarse (Douglas, 2010), mientras que la efectividad hace referencia a la habilidad del hongo de beneficiar el crecimiento de la planta (Abbott *et al.*, 1992). Así, se han reportado distintas tasas de esporulación (Lugo & Cabello, 2002), crecimiento y supervivencia (Sanders & Fitter, 1992) para diferentes taxa de HMA con una misma planta hospedante, como también diferencias en crecimiento entre especies con síndrome fotosintético  $C_3$  y  $C_4$  como respuesta a la simbiosis con HMA (Hetrick *et al.*, 1990). Esto último estaría relacionado con los diferentes grados de dependencia micorrízica que se pueden encontrar entre las diferentes especies de plantas

(Gerdemann, 1975; Plenchette *et al.*, 1983; Habte & Manjunath, 1991), entendiendo como tal al nivel menor de disponibilidad de nutrientes al cual las plantas pueden crecer sin micorrizas (Janos, 2007). La variabilidad en la efectividad mencionada anteriormente determina no sólo que los HMA afecten la diversidad, productividad y estabilidad de las comunidades vegetales, sino que también exista una respuesta de las comunidades de HMA ante cambios en la diversidad de plantas (Burrows & Pflieger, 2002). Esta influencia recíproca entre las comunidades de plantas y de HMA juega un papel fundamental en la determinación de la composición y diversidad de ambas comunidades (Kernaghan, 2005).

### **Influencia de las prácticas agronómicas sobre los HMA**

Los agroecosistemas son sistemas biológicos disturbados, que comprenden algunas prácticas que pueden ser perjudiciales para el funcionamiento de la comunidad de HMA, y su interacción con la comunidad vegetal. Entre estas prácticas pueden mencionarse el uso ganadero de pasturas y pastizales naturales, la producción de cultivos agrícolas, y el uso de fertilizantes y pesticidas.

El uso ganadero de pasturas y pastizales podría afectar a los HMA en dos niveles jerárquicos: planta individual y comunidad vegetal (Grigera & Oesterheld, 2004). A nivel de planta individual, el consumo de tejido fotosintético por herbívoros causa una disminución en la producción de fotosíntesis y un menor flujo de C hacia raíces (Bardgett *et al.*, 1998), lo que perjudica la capacidad de las plantas para mantener a sus mutualistas micorrícicos (Trent *et al.*, 1988). A nivel comunidad, el pastoreo podría afectar a los HMA a través de los cambios que éste genera en la composición de la comunidad vegetal (Sala *et al.*, 1986; Sternberg *et al.*, 2000; Osem *et al.*, 2002). Los

trabajos que estudiaron el efecto de la ganadería sobre los HMA han reportado aumentos, disminuciones o efectos nulos en el porcentaje de colonización radical (Wallace, 1981; Bethlenfalvay *et al.*, 1985; Ferraro & Oosterheld, 2002; Grigera & Oosterheld, 2004; García & Mendoza, 2012). La variabilidad en las respuestas encontradas se deberían a las cargas animales utilizadas, frecuencia de defoliación, la duración del experimento y a las especies de HMA y plantas presentes en cada estudio (Ferraro & Oosterheld, 2002; Gehring & Whitham, 2002; Gehring & Bennett, 2009).

La producción de cultivos agrícolas puede alterar significativamente a los HMA, dependiendo de las especies sembradas, el sistema de rotaciones y tipo de labranza empleado. En Argentina los principales cultivos que se desarrollan son soja, trigo, maíz y girasol. Si bien todas estas especies poseen la capacidad de formar asociaciones micorrícicas, difieren en su grado de dependencia (Jeffries & Dodd, 1991). Asimismo, la secuencia de cultivos que se desarrollan dentro de una rotación parece cambiar la composición de especies de las comunidades fúngicas e impactar en su diversidad, aunque los impactos de esos cambios no han sido evaluados extensamente (Hendrix *et al.*, 1995). Los suelos agrícolas poseen una menor densidad y diversidad de HMA en comparación con sistemas naturales (Menéndez *et al.*, 2001; Escudero & Mendoza, 2005), llevando a un aumento de las especies del género *Glomus* (Oehl *et al.*, 2003; Troeh & Loynachan, 2003; Sjoberg *et al.*, 2004). En parte esto está explicado por la menor diversidad vegetal en comparación con sistemas naturales, llegando al extremo de los monocultivos (An *et al.*, 1993; Burrows & Pflieger, 2002; Oehl *et al.*, 2003). Por otro lado, las prácticas culturales ejercen una fuerte presión de selección, permitiendo que dominen aquellas especies de HMA más tolerantes a estos disturbios (Johnson & Pflieger, 1992; Oehl *et al.*, 2003; Schalamuk *et al.*, 2013a).

Diversos trabajos han demostrado efectos negativos de la fertilización (principalmente el agregado de P y N) sobre los HMA (Braunberger *et al.*, 1991; Johnson & Pflieger, 1992; Kahiluoto *et al.*, 2001; Mendoza, 2001; Oehl *et al.*, 2004; Jumpponen *et al.*, 2005; Gryndler *et al.*, 2006). Estas respuestas estarían relacionadas con la partición de carbohidratos hacia otros destinos de las plantas que no son las raíces y subsiguientes limitaciones en el crecimiento del componente fúngico de la simbiosis, relacionadas con el menor suministro de C (Read, 1991). En relación a la fertilización nitrogenada, se han encontrado diferencias según la fuente utilizada. Chambers *et al.* (1980) sostienen que el ión  $\text{NH}_4^+$  tiene un efecto más deletéreo sobre la colonización micorrícica que el  $\text{NO}_3^-$ , posiblemente debido a que el  $\text{NH}_4^+$  afecta el crecimiento de las hifas en forma directa (Hawkins & George, 2001). Además de reducir la colonización radical y número de propágulos, la fertilización puede generar cambios en la estructura de la comunidad de HMA, al ejercer una selección sobre aquellas especies que sean inferiores en términos de proveer beneficios a la planta hospedante (Johnson, 1993).

En relación al efecto de los pesticidas, los resultados han sido más variables aún, ya que pueden depender de la formulación del principio activo, la dosis y momento de aplicación, el tipo de suelo, las condiciones ambientales y la identidad de las especies hospedantes y de las especies de HMA (Johnson & Pflieger, 1992; Schreiner & Bethlenfalvay, 1996; Menendez *et al.*, 1999; Jansa *et al.*, 2006; Schalamuk *et al.*, 2013a). Se han reportado efectos negativos de nematicidas e insecticidas sobre la colonización radical y esporulación cuando se aplican las dosis recomendadas a campo, pero en dosis menores estos efectos desaparecen (Sreenivasa & Bagyaraj, 1989). De hecho, ni siquiera el efecto de los fungicidas sobre los HMA es sencillo de describir (Schreiner & Bethlenfalvay, 1997), encontrándose casos en los cuales el fungicida no perjudica a los HMA, o incluso aumenta el porcentaje de colonización y captura de

nutrientes, sobre todo en bajas dosis (Afek *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 1993; Gosling *et al.*, 2006).

Dentro de los herbicidas, el glifosato (N-fosfometilglicina) es uno de los más utilizados a nivel mundial, debido a su efectivo control de malezas y su baja toxicidad en mamíferos (Busse *et al.*, 2001). Luego de su absorción, la sustancia activa es transportada a través del floema hacia los tejidos que son destinos metabólicos de sacarosa (McAllister & Haderlie, 1985), incluyendo el sistema radical (Duke, 1988). Actúa inhibiendo la EPSP (enol-piruvil shikimato fosfato) sintasa (Amrhein *et al.*, 1980), lo que interrumpe la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), deteniéndose la formación de proteínas y productos secundarios (Franz *et al.*, 1997). Su uso no se limita a sistemas agrícolas, sino que también es utilizado en plantaciones forestales, espacios recreativos, y en pastizales naturales con el objetivo de erradicar especies exóticas o promover especies invernales (Barnes, 2007; Rodriguez & Jacobo, 2010; Helander *et al.*, 2012).

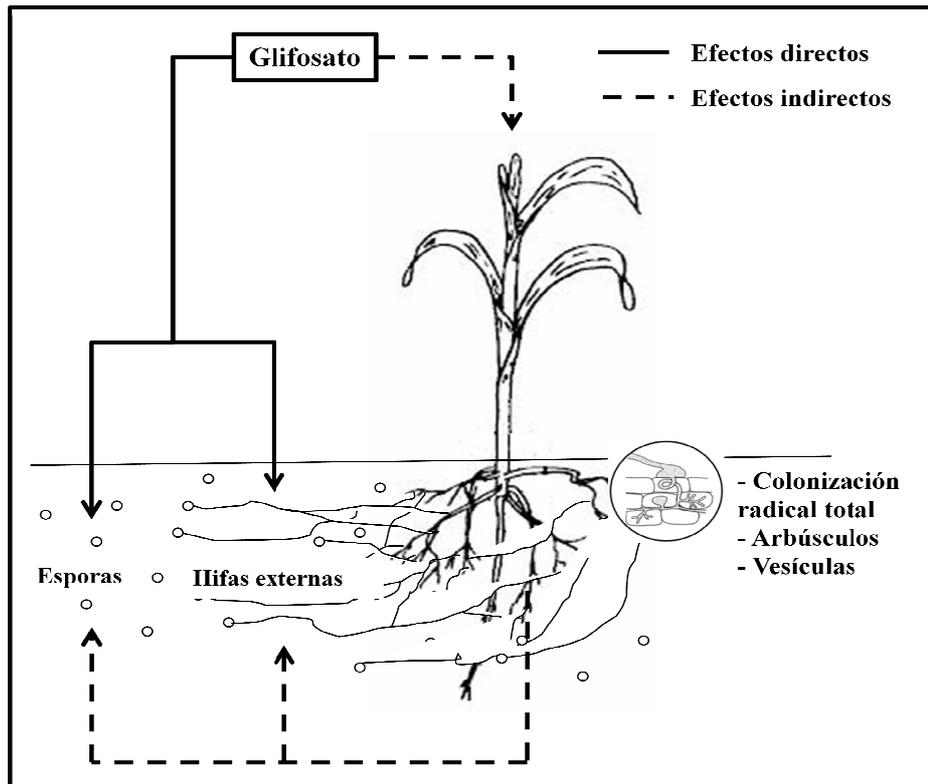
Tal como ocurre con los pesticidas en general, los resultados acerca del efecto del glifosato sobre la colonización radical por los HMA son contradictorios, encontrándose aumentos, disminuciones o efectos neutros (Morandi, 1989; Mujica *et al.*, 1999; Maly *et al.*, 2006; Ronco *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2009; Savin *et al.*, 2009). En lo que respecta a las esporas de HMA, Maly y colaboradores (2006) encontraron que el glifosato disminuyó el porcentaje de germinación y el tamaño del tubo germinativo. Otros autores, sin embargo, no encontraron reducciones en el porcentaje de germinación de esporas expuestas a este herbicida (Giovannetti *et al.*, 2006; Pasaribu *et al.*, 2011). Cabe destacar que los tres trabajos mencionados anteriormente, fueron realizados en medios de cultivo. La evaluación del porcentaje de germinación en condiciones de campo es limitada, ya que materiales del suelo y/o bacterias suelen

recubrir las esporas, interfiriendo en este proceso (An *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta esto último, y que las esporas pueden presentar períodos de dormancia (Tommerup, 1984), evaluar el número de esporas vivas a través del porcentaje de germinación puede llevar a errores de subestimación. La viabilidad de esporas puede ser estimada de manera más certera y sencilla utilizando el método propuesto por An & Hendrix (1988) que utiliza el bromuro de tetrazolio (MTT) para evaluar la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. Hasta el momento, y aún a la escala de especie vegetal individual, no parece haberse estudiado el impacto de este herbicida sobre la viabilidad de esporas y su diversidad. El estudio de las mismas es fundamental, debido a su importancia como fuente de propágulos para la permanencia y dispersión de los HMA en el sistema (Sieverding, 1991; Smith & Read, 1997). En general en esos estudios se analizan los efectos a nivel especie, tanto de HMA como de planta hospedante, faltando un análisis a nivel de comunidad, tanto fúngica como vegetal.

### **Separación de potenciales efectos directos de la aplicación de glifosato de los indirectos para evaluar el impacto sobre los hongos micorrícicos arbusculares**

En los casos en que se registraran efectos negativos del glifosato sobre los HMA, los mismos se reflejarían en una disminución en el porcentaje de colonización radical y/o en la abundancia de especies de HMA dentro de todas o algunas de las especies de plantas de la comunidad. Tal reducción podría deberse a efectos directos o a efectos indirectos del herbicida (Figura 1.2). Los primeros estarían asociados con los daños causados por el glifosato a las hifas y/o esporas de los HMA al llegar al suelo. Los efectos indirectos, por su parte, podrían suceder en dos niveles distintos de organización y en distintas escalas de tiempo: 1) a nivel individuo, a través del estrés inmediato que este herbicida causa sobre la planta hospedante (por ejemplo al reducir su

tejido fotosintético el flujo de C destinado al hongo puede disminuir) o a través del efecto que estas plantas expuestas al herbicida generan sobre el suelo, y 2) a través del cambio florístico inducido a largo plazo por el glifosato.



**Figura 1.2.** Posibles efectos directos e indirectos del glifosato sobre los HMA. Las líneas continuas corresponden a los efectos directos del herbicida sobre las esporas e hifas externas. Las líneas discontinuas indican los efectos indirectos a corto plazo causados por cambios en la planta hospedante, que afectarían a las estructuras internas de hongos (hifas, arbusculos y vesículas) y/o a las esporas e hifas externas.

Tales efectos indirectos de corto y largo plazo, sumados a los potenciales efectos directos sobre los HMA, podrían afectar severamente el funcionamiento del ecosistema teniendo en cuenta el papel crucial de esta asociación en la tolerancia a la sequía (Davies *et al.*, 1993), la reducción de infecciones patogénicas (Newsham *et al.*, 1995) y

especialmente en la nutrición fosforada de las plantas (Smith & Read, 1997). Este último aspecto es clave en sistemas deficientes en P edáfico como los de la Pampa Deprimida (García *et al.*, 2002), en los que se enfocará este trabajo. El efecto neto del glifosato (efecto indirecto de corto plazo al dañar a las plantas hospedantes, sumado a los efectos directos), dependerá de la cobertura aérea vegetal, tomando mayor importancia los efectos indirectos de corto plazo a medida que ésta aumenta. Al momento de la aplicación del glifosato, la cobertura aérea dependerá de la densidad de plantas por m<sup>2</sup> (que puede variar según el grado de deterioro del pastizal), y de los días transcurridos desde el último pastoreo.

### **Objetivo e hipótesis generales**

El **objetivo general** de esta tesis es evaluar los efectos de la aplicación de glifosato sobre las distintas estructuras de los hongos micorrícicos arbusculares en pastizales de la Pampa Deprimida. La **hipótesis general** que se propone es que el glifosato afectará negativamente a los HMA a través de dos vías: directamente sobre las estructuras del hongo expuestas al herbicida, e indirectamente al dañar el vigor de la planta hospedante. Se espera que los posibles efectos indirectos varíen según la identidad de la especie hospedante, por lo que se utilizaron dos especies pertenecientes a grupos funcionales distintos al momento de evaluar esta vía.

### **Aproximación metodológica y estructura de la tesis**

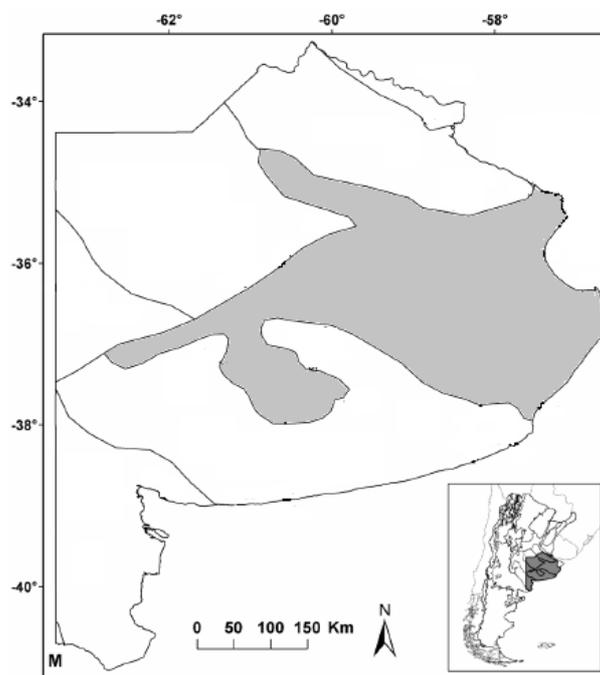
En esta tesis se utilizó una aproximación exploratoria para estudiar los efectos directos e indirectos provocados por la aplicación de glifosato sobre los HMA en pastizales de la Pampa Deprimida. En el **primer capítulo experimental** (Capítulo II) se

evaluaron los efectos directos de la aplicación de glifosato sobre la viabilidad de esporas de HMA, y su capacidad de colonizar raíces. En el **segundo capítulo experimental** (Capítulo III) en invernadero, se discriminaron los efectos directos del glifosato sobre los HMA, de los indirectos de corto plazo mediados por cambios producidos en la planta hospedante. En el **tercer capítulo experimental** (Capítulo IV) se analizaron los efectos de la aplicación de glifosato sobre el porcentaje de colonización radical, la densidad, diversidad y viabilidad de esporas de HMA y la estructura de la vegetación. La originalidad de esta tesis radica principalmente en dos aspectos: por un lado, no se han evaluado hasta el momento los efectos del glifosato sobre los HMA en comunidades de pastizal. Por otro lado, el daño generado por el glifosato sobre estos hongos es evaluado generalmente sobre la colonización radical, faltando información acerca de lo que sucede con las esporas expuestas a este herbicida. Este proyecto aportará conocimiento en este sentido, ya que no sólo se evaluará el número de esporas, sino que se determinará la viabilidad de las mismas y los cambios en la diversidad de la comunidad de HMA en suelos expuestos al glifosato.

### **Pastizal natural de la Pampa Deprimida como sitio de estudio**

La Pampa Deprimida incluye las áreas de la Depresión del Río Salado al noreste (Vervoorst, 1967) y la denominada Región de Laprida al sudoeste (Etchevehere, 1961) (Fig. 1.3). En esta zona, el clima es templado húmedo con temperaturas medias anuales desde los 13,8 °C en el sur a los 15,9 °C en el norte. Las precipitaciones medias anuales varían entre 850 y 900 mm, distribuidas a lo largo de todo el año. Los suelos característicos de la Pampa Deprimida son los Natracuales, que forman asociaciones con Natracualfes y Natralboles. Estos suelos tienen típicamente un horizonte arcilloso, baja permeabilidad y alto contenido de sales sódicas (Salazar Lea Plaza & Moscatelli,

1989; Lavado, 1992). La vegetación presenta un arreglo espacial complejo en mosaicos de comunidades herbáceas (Burkart *et al.*, 1990). Desde el punto de vista fisonómico – florístico, se distinguen cinco tipo de ambientes, que se encuentran fuertemente diferenciados en función del grado de hidro y halomorfismo y la ubicación en el relieve: las praderas de mesófitas, las praderas húmedas de mesófitas, las praderas de higrófitas, las estepas de halófitas y las estepas húmedas de halófitas (Perelman *et al.*, 2001).



**Figura 1.3.** Mapa de la provincia de Buenos Aires, con localización del área ecológica correspondiente a la Pampa Deprimida. Adaptado de Abba & Vizcaíno (2011).

La Pampa Deprimida es un área predominantemente ganadera, que basa su producción en la utilización del pastizal natural. Este recurso forrajero sufrió durante los últimos 100 años un proceso de degradación debido al pastoreo continuo, que modificó su composición florística. La alteración de la composición de especies nativas, la introducción de exóticas y la disminución de especies  $C_3$ , ha llevado a una mayor

estacionalidad en la producción de forraje (Perelman *et al.*, 2001). Debido a que la Productividad Primaria Neta Aérea (PPNA) resulta hasta 10 veces superior en primavera que en invierno (Sala *et al.*, 1981), la principal limitante para la producción ganadera es el déficit de forraje invernal (Deregibus *et al.*, 1995). Para superarla, en la última década se ha difundido la aplicación, a fin de verano, de 2-4 l.ha<sup>-1</sup> de glifosato con fertilización nitrogenada, en los ambientes cuya comunidad vegetal corresponde a la de pradera húmeda de mesófitas. El conjunto de estas prácticas permite la eliminación principalmente de las especies C<sub>4</sub> y malezas, lo que permite una mejor germinación y establecimiento de gramíneas anuales de síndrome fotosintético C<sub>3</sub>, cuyo mayor componente es *Lolium multiflorum* (Rodríguez & Jacobo, 2010).

Numerosas evidencias sugieren que en estos sistemas bajo pastoreo, la aplicación de glifosato junto con la fertilización nitrogenada reduce significativamente la cobertura de otras especies muy valiosas del pastizal (Jacobo *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007), la biomasa verde estival (Sabbioni Pérez, 2006), la riqueza florística y la diversidad de especies vegetales (Rodríguez & Jacobo, 2010). Entre las especies que más ven afectada su cobertura por efecto de la aplicación de glifosato, se destacan *Lotus tenuis*, y *Paspalum dilatatum* (Jacobo *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007). *L. tenuis* es una leguminosa herbácea naturalizada en los pastizales de la Pampa Deprimida (Sevilla *et al.*, 1996), muy apreciada por su plasticidad, productividad, capacidad para crecer en suelos pobres en nutrientes, y su alto valor nutritivo para el ganado vacuno (Mazzanti *et al.*, 1988, citado por Escudero & Mendoza, 2005)(Escudero & Mendoza, 2005). *P. dilatatum* es una gramínea C<sub>4</sub> nativa de América del Sur, también valorada en pastizales de la Pampa Deprimida debido a su palatabilidad y su potencialidad de producir más forraje tempranamente en primavera y entrado el otoño, en comparación con otras gramíneas perennes estivales (Venuto *et al.*, 2003). De lo mencionado anteriormente se

desprende que la pérdida de estas especies conlleva a una reducción en el valor pastoral, y por ende en la receptividad animal de estos pastizales.

Los dos grupos funcionales mencionados anteriormente (leguminosas y gramíneas C<sub>4</sub>) se caracterizan por poseer mayor dependencia micorrícica que las dicotiledóneas no leguminosas y gramíneas C<sub>3</sub> (Wilson & Hartnett, 1998). En el caso de las leguminosas, la dependencia micorrícica es mayor en suelos deficientes en P, debido a que la falta de este nutriente limita tanto su establecimiento como la fijación de N<sub>2</sub> (Barea *et al.*, 2005). En el caso de las gramíneas C<sub>4</sub> la mayor dependencia micorrícica estaría relacionada con el escaso desarrollo radical, en comparación con las especies C<sub>3</sub> (Baylis, 1970; Tawaraya, 2003). Por lo tanto, el cambio florístico producido por el glifosato, podría deberse al perjuicio que éste causa sobre ciertas especies vegetales de la comunidad, que podría modificar a su vez la comunidad de HMA, y/o al posible efecto directo sobre la comunidad de HMA, que podría a su vez alterar la comunidad vegetal.

**EFFECTOS DIRECTOS DEL GLIFOSATO SOBRE LA VIABILIDAD DE  
ESPORAS DE HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES**

- Druille M., Cabello M., Omacini M., Golluscio R. A., 2013. Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 64: 99– 103.

## INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en el capítulo anterior, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) presentan distintos tipos de propágulos en el suelo: esporas, micelio externo y segmentos de raíces infectadas (Smith & Read, 2008). De todos ellos, las esporas son consideradas como la forma de propágulo más resistente a condiciones adversas (Abbott & Robson, 1991), debido en parte a la presencia de melanina dentro de sus paredes, que pueden ayudar a proteger su contenido (Daniels Hetrick, 1984). Este tipo de estructura también está relacionado con la capacidad de dispersión de los HMA en el sistema, ya que se demostró la existencia de transporte de esporas a través de hormigas, lombrices, roedores, avispas (McIlveen & Cole Jr, 1976; Warner *et al.*, 1987) y agentes erosionantes como viento y agua (Allen, 1987; Warner *et al.*, 1987).

El número de esporas presentes en el suelo es el resultado de un complejo balance entre pérdidas y generación de nuevas esporas (esporulación). En ecosistemas naturales las pérdidas no sólo pueden deberse a su germinación, sino también a factores bióticos como depredación y parasitismo (Rabatin & Stinner, 1988), o a factores abióticos como pH y humedad edáfica (Udaiyan *et al.*, 1996; Shukla *et al.*, 2012). En agroecosistemas, las esporas quedan expuestas directamente a los pesticidas utilizados en las prácticas agrícolas, los cuales también pueden afectar su desarrollo (Pasaribu *et al.*, 2011). Algunos trabajos han reportado inhibiciones en la germinación de esporas de HMA expuestas a determinados fungicidas, insecticidas y herbicidas (Carr & Hinkley, 1985; Menendez *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2006; Maly *et al.*, 2006). La esporulación por su parte, está influenciada por varios factores, entre los que se mencionan la planta hospedante y condiciones edáficas (Brundrett, 2009).

En el caso particular del glifosato, Maly *et al.* (2006) reportaron reducciones en la germinación y crecimiento del tubo germinativo, siendo la magnitud de esa reducción

distinta según la especie de HMA evaluada (*Gigaspora margarita*, *Claroideoglossum etunicatum* y *Scutellospora heterogama*). Sin embargo, otros autores no encontraron estos efectos en *Funneliformis mosseae* (Giovannetti *et al.*, 2006; Pasaribu *et al.*, 2011). Esta diferente sensibilidad al glifosato encontrada entre las distintas especies de HMA, podría llevar a modificaciones en la diversidad de la comunidad de estos hongos, lo que podría repercutir a su vez sobre la diversidad de la comunidad vegetal (Bever, 1999).

Luego de la aplicación de tratamientos drásticos, esporas muertas pero de apariencia saludable pueden persistir en el suelo durante largos períodos de tiempo (McGraw & Hendrix, 1986). Por esta razón, es esencial evaluar la viabilidad de las esporas a fin de determinar su potencial como propágulos (An *et al.*, 1998). Realizar esta evaluación midiendo la germinación y la habilidad de infectar plantas es muy laborioso, lleva mucho tiempo y los resultados pueden ser imprecisos debido a la posible dormición de las esporas (Tommerup, 1987; An & Hendrix, 1988). En cambio, el uso de bromuro de tetrazolio (MTT) permite arribar a un valor más certero de viabilidad (An & Hendrix, 1988).

La reducción o incluso la desaparición de los propágulos de HMA provocada por prácticas culturales en los sistemas agrícolas, tales como el uso de fertilizantes y agroquímicos, es un indicador de que la estabilidad del sistema planta-suelo se redujo (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994; Helgason *et al.*, 1998). Como consecuencia, los HMA pueden considerarse como los microorganismos no-blanco más importantes para ser monitoreados en los estudios de impacto ambiental de productos químicos utilizados en el sector agrícola (Giovannetti *et al.*, 2006). El **objetivo** de este capítulo es evaluar los efectos directos del glifosato sobre la viabilidad de esporas de HMA, y la capacidad de éstas de germinar y colonizar raíces en suelos tratados con este herbicida,

bajo la **hipótesis** de que el glifosato disminuirá la viabilidad de las esporas de HMA y esto repercutirá negativamente sobre la colonización radical.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Sitio de estudio y recolección de muestras*

Las muestras de suelo se recogieron en la primavera de 2010 de un pastizal bajo pastoreo situado en un establecimiento ganadero cercano a la localidad de Azul, en el centro de la Pampa Deprimida (36° 40' S, 59° 32' O, 80 m.s.n.m). La temperatura promedio anual es de 14,6 °C y la precipitación media anual es de 895 mm.año<sup>-1</sup> (Perelman *et al.*, 2001). El suelo fue clasificado como Natracuol típico, con 3,5% de materia orgánica y 5,6 ppm de P. El pastizal estaba dominado por una comunidad de pradera húmeda de mesófitas (Perelman *et al.*, 2001), y entre las especies dominantes se encontraron *Lolium multiflorum* Lam., *Paspalum dilatatum* Poir., *Bothriochloa laguroides* (DC) Herter, *Sporobolus indicus* (L.) R. Br., *Panicum milioides* Nees ex Trin., *Nassella neesiana* (Trin. & Rupr.) Barkworth, *Briza subaristata* Lam., *Piptochaetium montevidensis* (Spreng.) Parodi, y *Danthonia montevidensis* Hack. & Arechav. En estos pastizales, el glifosato es aplicado a finales de verano con el objetivo de promover el crecimiento de especies anuales de invierno (Rodríguez & Jacobo, 2010), pero este campo no tenía antecedentes de tratamientos con herbicida. Se recolectaron muestras de suelo de los primeros 10 cm ubicadas al azar. Las mismas se homogeneizaron y se tamizaron utilizando una malla de 2 mm para eliminar los tejidos vegetales.

### *Diseño experimental*

El equivalente a 4,8 Kg de suelo seco se colocó en 30 bandejas de 21 × 16 cm, y 2 cm de profundidad (160 g por bandeja). Las mismas se dispusieron de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado, con un arreglo factorial combinando tres dosis de glifosato y dos períodos de muestreo post-aplicación. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones, siendo cada bandeja una unidad de muestreo. Las dosis de glifosato evaluadas fueron 0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup> (0, 400 y 1.500 g de ácido equivalente.ha<sup>-1</sup>, respectivamente). La última corresponde a la dosis recomendada a campo y la intermedia a una dosis sub-letal para las plantas. Esta dosis sub-letal fue escogida luego de un ensayo preliminar en el que se evaluó el contenido de clorofila en plantas de *L. multiflorum* 15 días después de la aplicación de siete dosis de glifosato (Fig. 6.1, Anexo). Se evaluó la viabilidad de esporas de HMA en dos períodos: 10 y 30 días después de la aplicación del glifosato. Con el objetivo de evaluar la capacidad de éstas de germinar y colonizar raíces, se estimó la colonización radical y biomasa aérea en plantas de *L. multiflorum* de cinco semanas de edad, sembradas al momento de muestrear su viabilidad (10 y 30 días post-aplicación).

Conjuntamente con la determinación del efecto de la aplicación de glifosato sobre la viabilidad de las esporas de HMA, se evaluó el efecto de cada dosis sobre las plantas, a fin de confirmar el carácter subletal para éstas de la dosis intermedia. Para ello, se incorporaron cinco bandejas por dosis, con 15 plantas de *L. multiflorum* durante la aplicación de glifosato. Estas plantas fueron sembradas cuatro semanas antes de la aplicación de glifosato, y se mantuvieron en invernáculo a 25-35 °C. Siete días después de aplicar el herbicida, se evaluó la tasa de supervivencia y el contenido de clorofila en las hojas con un medidor de clorofila Minolta SPAD- 502 (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Tasa de supervivencia y contenido de clorofila en plantas de *L. multiflorum* sometidas a distintas dosis de glifosato<sup>a</sup>.

Dosis (l ha <sup>-1</sup> )	Tasa de supervivencia (%)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
0	94,8 <sup>a</sup> ± 3,18	24,51 <sup>a</sup> ± 0,97
0,8	66,6 <sup>b</sup> ± 6,96	12,89 <sup>b</sup> ± 1,55
3	32,2 <sup>c</sup> ± 4,91	9,24 <sup>b</sup> ± 0,67

<sup>a</sup> Los valores corresponden a las medias ± E.E. de cinco repeticiones. Letras similares indican medias similares entre tratamientos, de acuerdo al test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### *Aplicación del herbicida y condiciones de crecimiento*

El glifosato fue aplicado utilizando una pulverizadora estacionaria con una boquilla de abanico plano (Bertolotti 110SF04), que entrega un volumen de 120 l.ha<sup>-1</sup> a una velocidad de 4,6 km.h<sup>-1</sup> y una presión de 3 bar. Los tratamientos control sólo recibieron agua. Luego de la aplicación, las bandejas fueron regadas con 200 cm<sup>3</sup> de agua para permitir la incorporación del herbicida en profundidad.

Parte del suelo de cada bandeja se utilizó para coleccionar las esporas y cuantificar su viabilidad. El suelo restante se utilizó como sustrato para el crecimiento de *L. multiflorum* en macetas de 300 cm<sup>3</sup>, a las que se le evaluó la biomasa aérea y porcentaje de colonización radical a las cinco semanas desde la siembra. Luego de la aplicación del glifosato, las bandejas se mantuvieron en invernáculo a 25-35 °C hasta la cosecha del *L. multiflorum*. Las bandejas se distribuyeron aleatoriamente y fueron rotadas semanalmente. El suelo fue mantenido a niveles cercanos a la capacidad de campo durante todo el experimento.

### *Mediciones realizadas*

#### *- Separación de esporas y estimación de viabilidad*

Las esporas se extrajeron a partir de 50 g de sub-muestras de suelo secado al aire para cada muestra. Se utilizó la técnica de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann & Nicolson, 1963) seguido por centrifugación en gradiente de sacarosa (Walker *et al.*, 1982). Las esporas obtenidas se sumergieron en una solución de Bromuro de Tetrazolio (MTT) y se las incubó por 40 horas (An & Hendrix, 1988). La evaluación de viabilidad se realizó bajo microscopio estereoscópico contabilizando como viables aquellas esporas que presentaron tonalidades rosado-rojizas y como inviables a aquellas que permanecieron del color propio de la espora en la naturaleza o bien se tornaron negras durante la incubación en MTT.

#### *- Biomasa aérea*

Cinco semanas luego de cada siembra, se realizó una cosecha de la biomasa aérea de las plantas de *L. multiflorum*. El material fue secado en estufa a 80 °C hasta peso constante para la determinación de biomasa seca.

#### *- Porcentaje de colonización radical*

Las raíces de *L. multiflorum* se clarificaron en hidróxido de potasio (KOH) al 10% durante 15-20 minutos a 90 °C. Luego se acidificaron en ácido clorhídrico (HCl) al 1% por 10 minutos a temperatura ambiente para ser teñidas posteriormente con azul de tripano al 0,05% (Phillips & Hayman, 1970). Finalmente las raíces fueron lavadas y montadas en alcohol polivinílico para su observación con microscopio óptico (200x). Se cuantificaron el porcentaje de colonización micorrícica total (hifas + vesículas + arbusculos), colonización por vesículas y colonización por arbusculos de acuerdo a la metodología propuesta por Mc Gonigle *et al.* (1990).

- *Análisis estadístico*

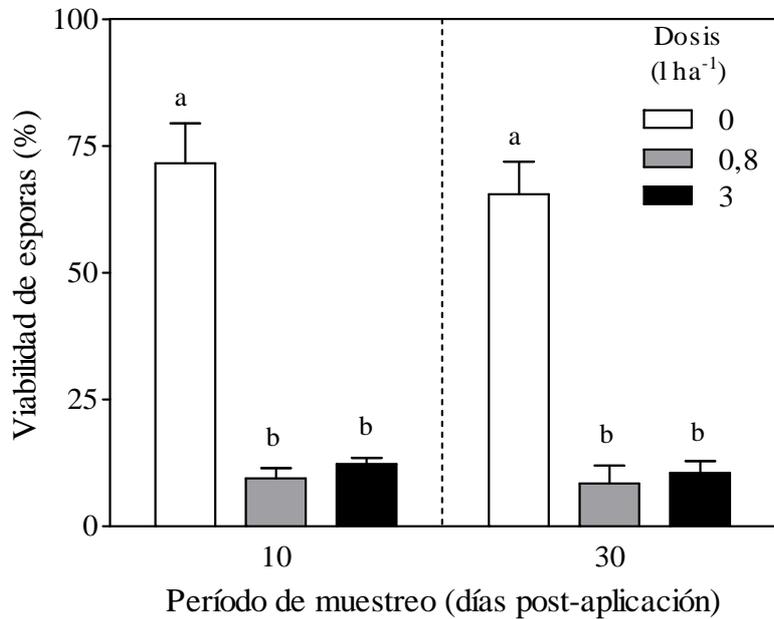
Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las dosis de glifosato sobre la tasa de supervivencia y contenido de clorofila en las hojas (Cuadro 2.1), y el efecto de las dosis de glifosato y período de muestreo sobre la viabilidad de esporas. Los atributos de la colonización (porcentaje de colonización radical total, porcentajes de arbusculos y de vesículas) se analizaron mediante un MANOVA de tres vías. Cuando el MANOVA mostró resultados significativos, se utilizó el análisis univariado ANOVA para determinar cuál de las variables de respuesta fueron las más afectadas por los tratamientos (Scheiner, 2001). A los datos expresados en porcentaje se les realizó una transformación angular ( $y = \arcsen\sqrt{x}$ ) antes de llevar a cabo cada análisis estadístico, con el objetivo de obtener varianzas homogéneas. El nivel de significancia se fijó en  $\alpha = 0,05$ . Las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey cuando los valores  $F$  fueron significativos.

## RESULTADOS

### *Viabilidad de esporas*

La aplicación de glifosato redujo significativamente la viabilidad de las esporas de HMA ( $F_{[2,24]} = 85,60$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 2.1). La viabilidad de las esporas en suelos no tratados con el herbicida fue entre 5,8 y 7,7 veces mayor que en los suelos tratados. Aunque el impacto de la aplicación de glifosato sobre la tasa de supervivencia de *L. multiflorum* fue estadísticamente diferente entre los tres tipos de dosis (Cuadro 2.1), la viabilidad de las esporas de HMA no fue significativamente diferente entre las dosis de 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>. Ni el período de muestreo post-aplicación ( $F_{[1,24]} = 1,23$ ;  $P = 0,2801$ ) ni la interacción entre la dosis de glifosato y período de muestreo post-aplicación ( $F_{[2,24]} =$

0,07;  $P = 0,9312$ ) mostraron efectos significativos, lo que indica que la magnitud de esta reducción fue similar después de 10 y 30 días de la aplicación del herbicida.



**Figura 2.1.** Viabilidad de esporas de HMA (%) bajo diferentes dosis de glifosato, en dos períodos de muestreo (10 y 30 días post-aplicación). Los valores corresponden a las medias  $\pm$  D.E., para 5 repeticiones. La misma letra sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los seis tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ).

#### *Biomasa aérea y colonización radical*

Se encontró un efecto significativo de la interacción entre la dosis de glifosato y el período de siembra post-aplicación sobre la biomasa aérea de las plantas de *L. multiflorum* ( $F_{[2, 24]} = 7,46$ ;  $P = 0,0030$ ). Las plantas sembradas 10 días post-aplicación del glifosato, presentaron menor biomasa aérea que las sembradas 30 días post-aplicación, y sólo en estas últimas la biomasa aérea fue significativamente mayor cuando se aplicó la dosis máxima de herbicida (Cuadro 2.2).

**Cuadro 2.2.** Biomasa aérea de plantas de *L. multiflorum* expuestas a distintas dosis de glifosato, sembradas 10 y 30 días post-aplicación. En ambos casos las plantas fueron cosechadas a las cinco semanas desde su siembra.

Dosis (l.ha <sup>-1</sup> )	Biomasa (g.planta <sup>-1</sup> )	
	Período de siembra (días post-aplicación)	
	10	30
0	0,09 <sup>c</sup>	0,15 <sup>b</sup>
0,8	0,10 <sup>c</sup>	0,17 <sup>b</sup>
3	0,09 <sup>c</sup>	0,22 <sup>a</sup>

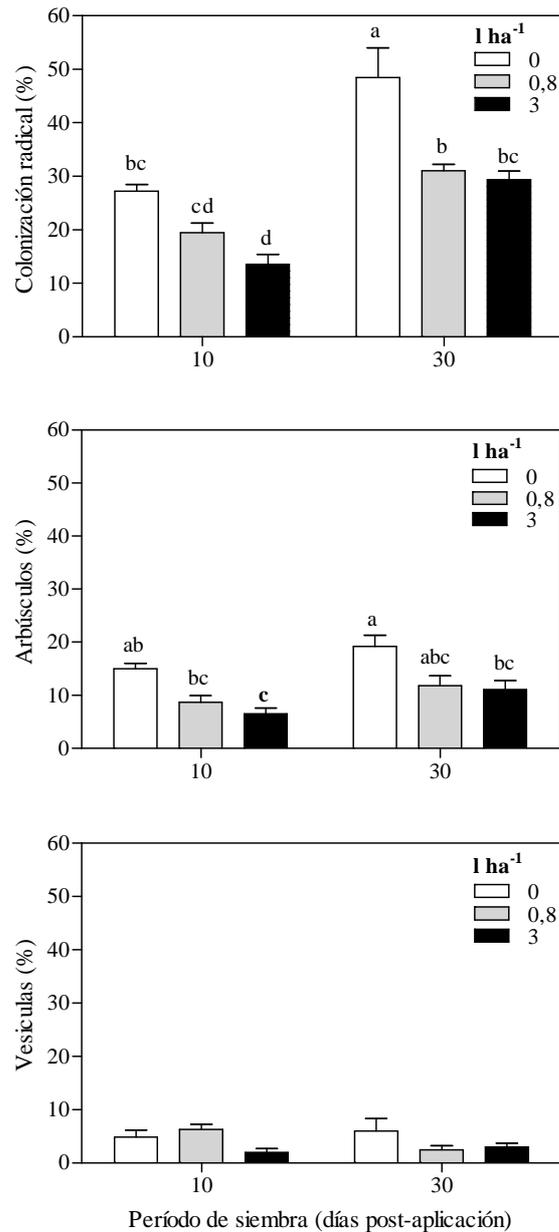
Los valores corresponden a la media de cinco repeticiones. Letras similares indican medias similares entre tratamientos, de acuerdo al test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Se detectó un efecto significativo del período de siembra post-aplicación y la dosis de glifosato (pero no de la interacción entre ellos) en los atributos de la colonización radical (MANOVA, Cuadro 2.3). El ANOVA univariado mostró que el porcentaje de colonización radical fue significativamente menor en las plantas que crecieron en suelos tratados con glifosato que en los suelos no tratados ( $F_{[2,24]} = 21,14$ ;  $P < 0,0001$ ) y en el primer que en el segundo período de siembra post-aplicación ( $F_{[1,24]} = 61,82$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 2.2A). No se encontró interacción entre la dosis de glifosato y período de siembra post-aplicación para la colonización radical ( $F_{[2,24]} = 1,25$ ;  $P = 0,3071$ ).

**Cuadro 2.3.** Resultados del análisis de varianza (MANOVA) para los efectos del período de siembra post-aplicación y dosis de glifosato sobre los atributos de la colonización radical (colonización radical total, porcentaje de arbusculos y porcentaje de vesículas).

Efecto	Traza de Pillai	g.l. (numerador, denominador)	F
Período de siembra (P)	0,74	3, 22	21,30 **
Dosis de glifosato (G)	0,74	6, 46	4,53 *
P x G	0,29	6, 46	1,27

La traza de Pillai se utilizó como criterio multivariante. El formato en negrilla denota efectos significativos a \*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,0001$ .



**Figura 2.2.** Porcentaje de colonización radical (A), arbúsculos (B) y vesículas (C) en plantas sembradas en suelos tratados con distintas dosis de glifosato, y en dos períodos de siembra (10 y 30 días post-aplicación). Los valores representan las medias  $\pm$  D.E. de cinco repeticiones. La misma letra sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Analizando las diferentes estructuras del hongo dentro de la raíz, se encontró que la aplicación de glifosato redujo el porcentaje de arbúsculos ( $F_{[2,24]} = 14,36$ ;  $P$

<0,0001). Esta reducción fue significativa sólo entre las plantas que crecieron en suelos no tratados y en suelos tratados con la dosis máxima (Fig. 2.2B). También se encontró un efecto del período de siembra, con un mayor porcentaje de arbusculos en plantas sembradas 30 días después de la aplicación ( $F_{[1,24]} = 8,85$ ;  $P = 0,0066$ ). La interacción entre la dosis de glifosato y el período de siembra post-aplicación no fue significativa ( $F_{[2,24]} = 0,20$ ;  $P = 0,8$ ).

La aplicación de glifosato determinó una reducción en el porcentaje de vesículas a un nivel de  $P = 0,0503$  (Fig. 2.2C). Esta reducción se evidencia en los tratamientos de 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup> sólo en plantas sembradas 30 días después de la aplicación, lo que muestra un efecto de la interacción entre dosis de glifosato y período de siembra post-aplicación a un nivel de  $P = 0,0513$ .

## DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo apoyan nuestra hipótesis de que la aplicación de glifosato reduce la viabilidad de las esporas de HMA y la colonización radical de las plantas que crecen en suelos previamente expuestos a este herbicida. El riesgo de toxicidad del glifosato sobre los organismos no-blanco del suelo es por lo general considerado marginal, ya que el glifosato en la solución del suelo es propenso a una rápida degradación microbiana o casi inmediata inactivación por adsorción en la matriz del suelo (Giesy *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados de este estudio indican que el tiempo de residencia del glifosato y/o su metabolito tóxico AMPA (ácido aminometilfosfónico) en el suelo fue suficiente para reducir la viabilidad de las esporas de HMA y su capacidad de colonizar las raíces. Una disminución en la viabilidad de las esporas puede conducir a cambios en la dinámica poblacional de los HMA y en la

funcionalidad de la simbiosis, teniendo en cuenta la importancia de las esporas como fuente de propágulo para la permanencia y propagación de los HMA en el sistema, y para una colonización radical óptima de las plantas (Smith & Read, 2008).

La reducción en la viabilidad de las esporas se detectó incluso cuando se aplicó la dosis más baja del herbicida ( $0,8 \text{ l.ha}^{-1}$ ). En esta dosis, la aplicación de glifosato redujo la tasa de supervivencia de *L. multiflorum* en un 29,7% y del contenido de clorofila en un 47,4%, mientras que la disminución de la viabilidad de las esporas fue de un 87%. Esto sugiere que hay diferentes sensibilidades al glifosato entre los componentes del ecosistema y en este caso fue superior en un organismo para el que el producto agroquímico no fue diseñado (organismo no-blanco). Hay evidencias de otros organismos no-blanco que fueron afectados por el glifosato. Por ejemplo, Casabé et al. (2007) evaluaron el efecto de este herbicida en lombrices, y hallaron una disminución de la viabilidad de los capullos con  $1,440 \text{ g de ácido equivalente.ha}^{-1}$ . Otro estudio ha observado efectos negativos del glifosato sobre la biomasa de nódulos de bacterias fijadoras de N y contenido en leghemoglobina en soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (Reddy et al., 2000).

El porcentaje de colonización radical fue significativamente menor en plantas sembradas en suelos tratados con glifosato que en los suelos no tratados. Se detectó un efecto del período de siembra sobre la colonización radical, siendo mayor en las plantas sembradas 30 días después de la aplicación del herbicida, respecto a las sembradas 10 días post-aplicación. Esto podría deberse al efecto de una temperatura de crecimiento levemente mayor en el invernadero durante esta fecha, que resultó en plantas de mayor tamaño (Cuadro 2.2). Sin embargo, el efecto de la aplicación de glifosato sobre el porcentaje de colonización radical fue similar en ambas fechas de muestreo. Estos resultados son similares a los reportados por Ronco et al. (2008), quienes encontraron

una reducción en el porcentaje de colonización radical del 18% y del 33% en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) que crecieron en un suelo tratado con 0,4 y 4 l.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los reportados por Maly et al. (2006), que no encontraron cambios en el porcentaje de colonización radical por HMA en soja (*Glycine max* L.) que creció en suelos expuestos a glifosato a una dosis equivalente a 10 l.ha<sup>-1</sup>. Posiblemente, estas diferencias se deben a la planta hospedante, las especies de HMA y los niveles de P utilizados en cada uno de los ensayos, ya que las dosis y la textura del suelo fueron similares. Nuestros resultados también muestran que el porcentaje de arbusculos se redujo significativamente en plantas cultivadas en suelos tratados con la dosis de glifosato recomendada a campo (3 l.ha<sup>-1</sup>). Esto implicaría que la funcionalidad de la simbiosis se podría ver afectada, dado que estas estructuras son el sitio principal de intercambio de nutrientes entre la planta hospedante y el hongo (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988).

La biomasa aérea fue similar en plantas de *L. multiflorum* sembradas en suelos tratados y no tratados con glifosato, en el primer período de siembra (10 días post-aplicación). Sin embargo, las plantas sembradas en suelos tratados con 3 l.ha<sup>-1</sup> de glifosato presentaron una biomasa aérea mayor que las que crecieron en suelos sin tratar, en el segundo período de siembra (30 días post-aplicación). En este último período, la relación inversa encontrada entre el porcentaje de colonización y biomasa aérea podría deberse a que las mediciones fueron realizadas en un estadio temprano del desarrollo de las plantas (cinco semanas desde la siembra). En estos casos, el crecimiento de las plantas puede verse deprimido ante la presencia del simbionte, debido al flujo de C que es destinado al hongo (Johnson *et al.*, 1997). Por lo tanto, las plantas con menor porcentaje de raíz colonizada (creciendo en suelos con la dosis máxima de herbicida) podrían haber destinado más C al crecimiento aéreo que las

plantas con mayor porcentaje de colonización radical. De todas maneras, lo mencionado anteriormente no explica las respuestas encontradas en su totalidad, ya que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de colonización radical y arbusculos en plantas que crecieron en suelos tratados con 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>, pero sí se observaron diferencias en la biomasa aérea.

Aunque en este estudio no se examinaron posibles mecanismos por los cuales la aplicación de glifosato afecta la viabilidad de esporas de HMA, es razonable asumir que la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSP) sintasa es en parte responsable de este efecto. El glifosato inhibe esta enzima en la vía del ácido shikímico (Amrhein *et al.*, 1980), y como se mencionó anteriormente, esto conduce a la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y la detención en la producción de proteínas y productos secundarios (Grossbard & Atkinson, 1985; Franz *et al.*, 1997). La EPSP sintasa no sólo se encuentra en las plantas, sino que también está presente en bacterias y hongos (Padgett *et al.*, 1995). Por lo tanto, la inhibición de esta enzima puede explicar, al menos parcialmente, la disminución en la viabilidad de esporas de HMA cuando se expone al glifosato. Además, se deben considerar posibles efectos tóxicos del AMPA sobre los HMA, dado que se han reportado efectos inhibitorios de este metabolito en la germinación de semillas de trigo (Barry, 2009; Bott *et al.*, 2011).

Los datos mostrados en este capítulo resultan de la aplicación de glifosato en el suelo contenido en bandejas (2 cm de profundidad), con un riego post-aplicación a fin de asegurar el contacto entre el herbicida y esporas. Bajo condiciones de campo, las posibilidades de que las esporas de HMA estén en contacto con glifosato, y la magnitud del efecto de este herbicida sobre las mismas, no están exclusivamente relacionados con la dosis y momento de aplicación. Para una misma dosis, la magnitud del efecto será mayor a medida que disminuya la cobertura vegetal, y el tiempo entre la aplicación y un

evento de precipitaciones se acorte, ya que ambos factores pueden aumentar la cantidad y movilidad de glifosato en el suelo. Las prácticas de manejo, tales como la fertilización fosforada, generar una nueva movilización de los residuos de glifosato en el suelo, ya que el P compite con aquellos por los sitios de adsorción en el suelo (Bott *et al.*, 2011). Por lo tanto el aporte externo de P debe ser considerado como un potencial factor que acentúe la toxicidad del glifosato. Adicionalmente, el glifosato puede llegar a las esporas a través de exudados radicales hacia la rizósfera de plantas tratadas con el herbicida (Neumann *et al.*, 2006). Este proceso puede tener un impacto importante en el número de propágulos de HMA debido al mayor número de esporas en el suelo rizosférico en comparación con los suelos no-rizosféricos (Hindumathi & Reddy, 2011). En este caso, la magnitud del efecto será mayor a medida que aumenta la cobertura vegetal al momento de la aplicación del glifosato.

En conclusión, los resultados presentados en este capítulo nos permiten afirmar que la aplicación de glifosato y su llegada al suelo, reduce la viabilidad de esporas de HMA, y su capacidad de colonizar las raíces. Esta disminución en el número de propágulos se podría añadir a un posible efecto indirecto de este herbicida sobre estos hongos, debido a alteraciones en el flujo de carbohidratos hacia el hongo como resultado del estrés en la planta hospedante tratada. La combinación de los efectos directos e indirectos de la aplicación de glifosato sobre los HMA puede afectar la diversidad vegetal por dos razones. Por un lado, considerando los diferentes grados de dependencia micorrícica que presentan las distintas especies de plantas que coexisten en estos pastizales. Por otro lado, la sensibilidad al glifosato podría variar entre especies de HMA, lo que llevaría a un cambio en la diversidad de estos hongos, y por ende en la comunidad vegetal (Bever, 1999).

**SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EFECTOS DIRECTOS E  
INDIRECTOS DE LA APLICACIÓN DE GLIFOSATO SOBRE LOS HMA**

- Druille M., Omacini M., Golluscio R. A., Cabello M. N., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology* 72: 143-149.

## INTRODUCCIÓN

Como se mencionó anteriormente, el glifosato podría dañar a los HMA directamente al entrar en contacto con el micelio externo y las esporas (Fig. 1.2). Al llegar al suelo, el glifosato se adsorbe fuertemente a través de enlaces de hidrógeno en la materia orgánica y por procesos de intercambio de aniones en los minerales de arcilla, óxidos de hierro y de aluminio (Aubin & Smith, 1992; Haney *et al.*, 2000; Veiga *et al.*, 2001). Sin embargo, tanto la adsorción al suelo como la degradación del glifosato exhiben una gran variación dependiendo de la composición y las propiedades del suelo (de Jonge *et al.*, 2001; Gimsing *et al.*, 2004b; Gimsing *et al.*, 2007), así como de las condiciones climáticas (Borggaard & Gimsing, 2008; Helander *et al.*, 2012). Algunos informes reportaron valores de persistencia en el suelo para cientos y miles de días, y la persistencia de la actividad fitotóxica para más de 19 semanas después de la aplicación (Heinonen-Tanski, 1989; Feng & Thompson, 1990; Weber, 1994).

El glifosato también podría perjudicar a los HMA en forma indirecta debido al daño inmediato que este herbicida le ocasiona a la planta hospedante (Fig. 1.2). Al inhibir la enzima enol-piruvil shikimato fosfato sintasa (EPSP), se interrumpe la formación de tres aminoácidos esenciales (Franz *et al.*, 1997) deteriorando procesos metabólicos generales, tales como la síntesis de proteínas y la fotosíntesis. El estrés generado en la planta hospedante podría reducir el flujo de C hacia el hongo, lo que llevaría a una reducción en el porcentaje de colonización radical. Desde el punto de vista del hongo, la generación de micelio interno es una fase crítica a través del cual estos simbioses obligados obtienen C orgánico de la planta, y lo utilizan para sostener el crecimiento tanto dentro de la raíz como en el suelo (Smith & Smith, 2012). Esto podría repercutir a su vez en el número de esporas, ya que se ha demostrado que la

esporulación de los HMA es directamente dependiente de flujo C desde la planta hospedante (Ijdo *et al.*, 2010).

En este capítulo se puso a prueba la hipótesis de que la aplicación de glifosato perjudica a los HMA tanto de forma directa, al tomar contacto con las esporas e hifas externas, como indirectamente, a través de los cambios generados en la planta hospedante. Para probar esta hipótesis se utilizaron dos especies de plantas, pertenecientes a diferentes grupos funcionales: *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. ex Willd. (leguminosa) y *Paspalum dilatatum* Poir (gramínea). Ambos grupos funcionales se caracterizan por poseer una mayor dependencia micorrícica que las especies gramíneas C<sub>3</sub> y dicotiledóneas no leguminosas (Wilson & Hartnett, 1998). Sin embargo, difieren en la morfología de su sistema radical y en la capacidad de generar simbiosis con bacterias fijadoras de N. El uso de dos especies vegetales distintas para evaluar los efectos del glifosato sobre los HMA se debe a que la respuesta de estos hongos a los tratamientos químicos (Jalali & Domsch, 1975) u otros estreses puede variar según la planta hospedante.

El **objetivo** de este capítulo es discriminar mediante bioensayo en invernadero, los efectos directos del glifosato sobre los HMA, de los indirectos mediados por cambios producidos en la planta hospedante. Las **hipótesis** planteadas son: 1) que la aplicación de este herbicida perjudica a los HMA tanto directamente, al tomar contacto con esporas e hifas externas, e indirectamente a través de cambios generados en la planta hospedante; y 2) que el efecto indirecto va a depender de la identidad de la especie hospedante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Sitio de estudio y recolección de muestras*

Se recolectaron plantas de *P. dilatatum* y *L. tenuis* durante el verano de 2011, en el mismo pastizal descrito en el capítulo anterior. Se trata de un pastizal dominado por una comunidad de praderas húmedas de mesófitas (Perelman *et al.*, 2001), ubicado en la localidad de Azul, en el centro de la región de Pampa Deprimida. La temperatura promedio anual en la región es de 14,6 ° C y la precipitación anual es de 895 mm.año<sup>-1</sup> (Perelman *et al.*, 2001). El suelo se clasifica como un natracuol típico, con 3,5% de materia orgánica y 5,6 ppm de P. Aunque en este tipo de praderas, el glifosato se aplica al final del verano para promover el crecimiento de anuales de invierno (Rodríguez y Jacobo, 2010), el sitio de estudio no tenía antecedentes de tratamiento con herbicidas. Plantas de *P. dilatatum* y *L. tenuis* de similar edad y tamaño fueron recolectadas a mediados de febrero, con su suelo asociado. El mismo fue manipulado con precaución, con el objetivo de mantener lo mejor posible su estructura. Las plantas con su suelo asociado se colocaron individualmente en macetas de 1 l, y luego de un período de aclimatación de 10 días en invernáculo, se realizó la aplicación de glifosato.

### *Diseño experimental y aplicación de herbicida*

El experimento tuvo un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial de tres factores: 1) Especie vegetal, en dos niveles (*P. dilatatum* y *L. tenuis*), 2) dosis de glifosato, en tres niveles (0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>), y 3) sitio de aplicación, en dos niveles: suelo (vía directa) y hojas (vía indirecta). En el primer caso (vía directa), el glifosato se aplicó sobre el suelo de las macetas previamente disuelto en 200 cm<sup>3</sup> de agua, asegurando que la solución no entrara en contacto con tejido de la planta. En el segundo caso, el herbicida se aplicó a las plantas usando un pincel para cubrir

cuidadosamente la superficie de la hoja, sin que entre en contacto con el suelo. Las plantas de este tratamiento se regaron con 200 cm<sup>3</sup> de agua, para igualar el agua suministrada cuando el glifosato se aplicó sobre el suelo. Se realizaron cinco repeticiones para cada tratamiento. Las plantas se colocaron en invernáculo a 25-35 °C hasta el momento de cosecha, y el suelo fue mantenido a niveles cercanos a la capacidad de campo. Las macetas fueron rotadas dentro del invernáculo semanalmente de manera aleatoria.

#### *Mediciones realizadas*

##### *- Separación de esporas y estimación de viabilidad*

La separación de esporas se realizó utilizando la técnica de tamizado en húmedo y decantación (Gerdemann & Nicolson, 1963), seguido por centrifugación en gradiente de sacarosa (Walker *et al.*, 1982). Luego se incubaron durante 40 horas en bromuro de tetrazolio (MTT) para determinar su viabilidad (An & Hendrix, 1988), tal como se describió en el capítulo 2. Se contabilizaron como viables aquellas esporas que presentaron tonalidades rosado-rojizas y como inviables a aquellas que permanecieron del color propio de la espora en la naturaleza o bien se tornaron negras durante la incubación en MTT.

##### *- Colonización radical*

Las raíces de *L. multiflorum* y *L. tenuis* fueron clarificadas con KOH (10%), y luego teñidas con azul de tripano al 0,05%, siguiendo el protocolo de Phillips y Hayman (1970). Se cuantificaron el porcentaje de colonización micorrícica total (hifas + vesículas + arbusculos), colonización por vesículas y colonización por arbusculos de acuerdo a la metodología propuesta por Mc Gonigle *et al.* (1990).

*- Contenido de clorofila y biomasa aérea viva*

Para estimar el vigor de las plantas, se cuantificó la concentración de clorofila en hojas y la biomasa aérea viva de las plantas hospedantes. El contenido de clorofila se midió de forma no destructiva, utilizando un medidor de clorofila (SPAD-502, Minolta) 15 días después de la aplicación de glifosato y al cabo de 25 días de crecimiento en invernáculo. Las mediciones consistieron en 10 lecturas, cinco a cada lado de la nervadura central. Luego de realizarse la medición de clorofila, las plantas fueron cosechadas desde la superficie del suelo, y la biomasa aérea viva se separó de la biomasa aérea muerta. El peso seco se determinó mediante secado en estufa durante 72 horas a 70 °C.

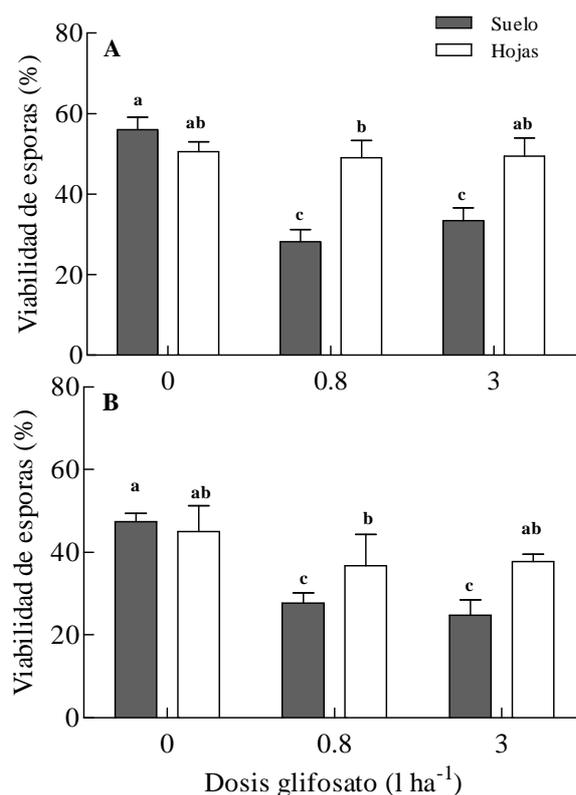
*Análisis estadístico*

La viabilidad de esporas, el contenido de clorofila y los datos de biomasa verde se compararon entre tratamientos mediante análisis de varianza (ANOVA). Los rasgos fúngicos (colonización radical total, y los porcentajes de arbusculos y vesículas) se analizaron mediante un análisis multivariado de la varianza (MANOVA) de tres vías. Cuando el MANOVA mostró resultados significativos, se realizó un análisis ANOVA protegido para determinar cuál de las variables de respuesta fue la más afectada por los tratamientos (Scheiner, 2001). Para homogeneizar varianzas, a los datos expresados en porcentajes se les realizó una transformación angular ( $y = \arcsen \sqrt{x}$ ). El nivel de significancia se fijó en  $\alpha = 0,05$ . Las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey cuando los valores de  $F$  encontrados fueron significativos. Aunque las plantas extraídas del pastizal eran de tamaño similar, la biomasa aérea fue utilizada como una covariable en el análisis de la varianza (MANOVA y ANOVA) al evaluar el efecto de glifosato sobre la colonización radical.

## RESULTADOS

### *Viabilidad de esporas*

Se encontró una interacción significativa entre la dosis de glifosato y el sitio de aplicación ( $F_{[2, 47]} = 5,17$ ;  $P = 0,0093$ ). Se detectó una reducción de 40-46% en la viabilidad de esporas de HMA cuando el glifosato se aplicó sobre el suelo (vía directa). Esta disminución fue de magnitud similar en la dosis intermedia y en la dosis recomendada a campo, y este efecto fue independiente de las especies de plantas evaluadas. Cuando el glifosato se aplicó sobre las hojas, no afectó la viabilidad de las esporas (Fig. 3.1 A y B).



**Figura 3.1.** Viabilidad de esporas de HMA en las comunidades asociadas a plantas de A) *L. tenuis* y B) *P. dilatatum* 15 días post-aplicación de glifosato en el suelo (vía directa) o en las hojas (vía indirecta). Los valores representan las medias  $\pm$  D.E. de cinco repeticiones. La misma letra sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### *Colonización radical*

Tanto la especie vegetal, como la dosis de glifosato y el sitio de aplicación tuvieron un efecto significativo sobre los rasgos fúngicos, y no se encontró un efecto de la interacción entre ellos (MANOVA, Cuadro 3.1).

**Cuadro 3.1.** Resultados del análisis multivariado de la varianza (MANOVA) para los efectos de las especies vegetales, dosis de glifosato y sitio de aplicación en los rasgos fúngicos (colonización radical total, porcentaje de arbuscúlos y porcentaje de vesículas).

<b>Efecto</b>	<b>Traza de Pillai</b>	<b>g.l. (numerador, denominador)</b>	<b>F</b>
<b>Especie (E)</b>	<b>0.29</b>	<b>3, 43</b>	<b>5.99 *</b>
<b>Dosis de glifosato (G)</b>	<b>0.54</b>	<b>6, 88</b>	<b>5.44 **</b>
<b>Sitio de aplicación (S)</b>	<b>0.23</b>	<b>3, 43</b>	<b>4.30 *</b>
Biomasa viva	0.04	3, 43	0.55
E x G	0.25	6, 88	2.07
E x S	0.03	3, 43	0.47
G x S	0.06	6, 88	0.42
E x G x S	0.22	6, 88	1.86

La traza de Pillai se utilizó como criterio multivariante. El formato en negrilla denota efectos significativos a \* P <0,001; \*\* P <0,0001.

La colonización radical total fue significativamente mayor en *L. tenuis* que en *P. dilatatum*, y en las plantas sin aplicación de glifosato que en las plantas tratadas con algunas de las dos dosis evaluadas. No se encontraron diferencias significativas entre los sitios de aplicación (ANOVA protegido, Cuadro 3.2, Fig. 3.2 A y B).

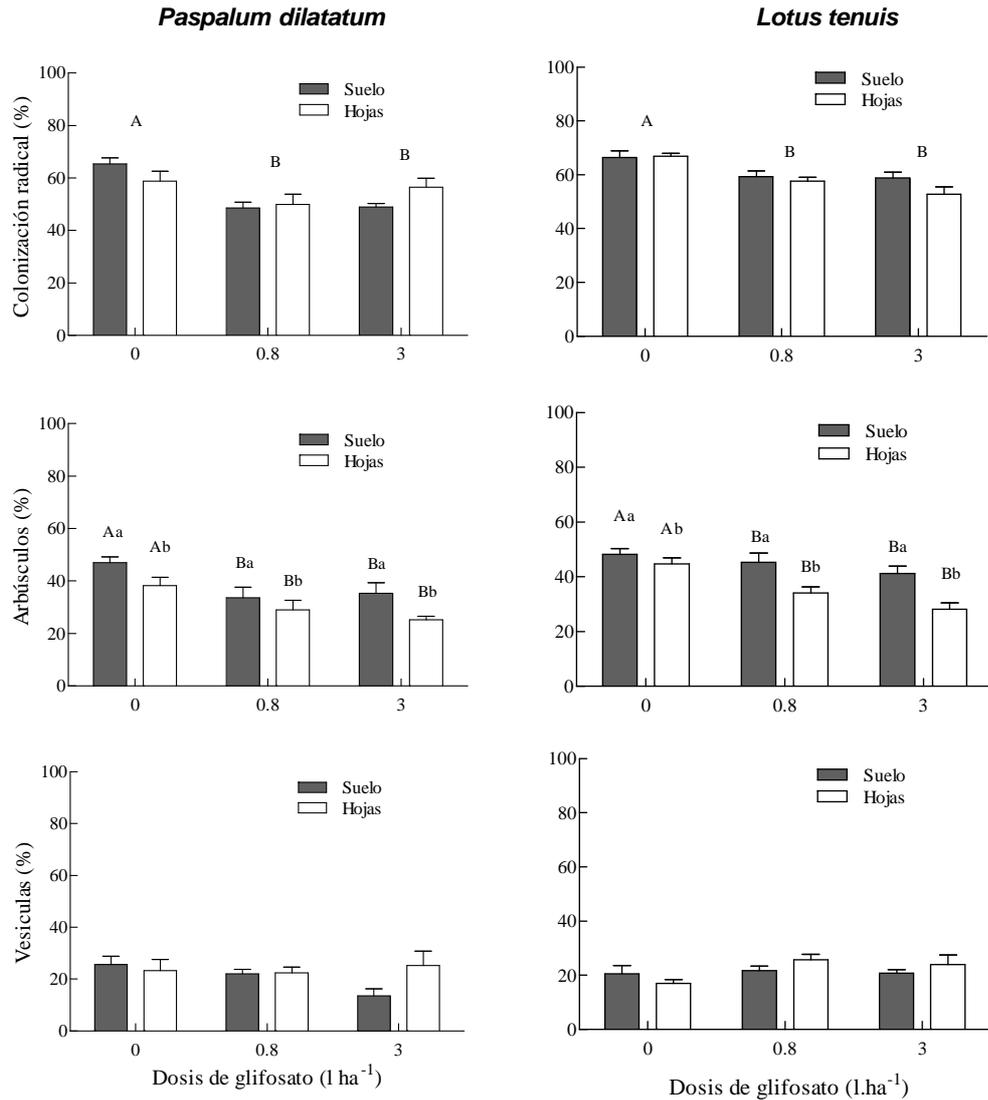
En relación al porcentaje de arbuscúlos, se encontró una respuesta similar a la descrita para la colonización radical total, pero en este caso sí se detectó un efecto significativo del sitio de aplicación (Cuadro 3.2). El número de arbuscúlos resultó 20% menor cuando el glifosato se aplicó sobre las hojas (vía indirecta), que cuando se aplicó sobre el suelo (vía directa) (Fig. 3.2 C y D). Ninguno de los factores principales analizados tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de vesículas (Cuadro 3.2,

Fig. 3.2 E y F). Tanto en el MANOVA como en los ANOVAs protegidos, la biomasa viva introducida como covariable no tuvo un efecto significativo (Cuadro 3.1 y 3.2), mostrando que los efectos encontrados en la colonización radical fueron independientes de esta variable y únicamente dependieron de la aplicación de glifosato.

**Cuadro 3.2.** ANOVAs protegidos para el efectos de las especies vegetales (*L. tenuis* o *P. dilatatum*), la dosis de glifosato (0, 0,8 o 3 l.ha<sup>-1</sup>), y el sitio de aplicación (suelo u hojas) sobre la colonización radical total, arbuscúlos y vesículas.

	g.l.	Colonización radical		Arbuscúlos		Vesículas	
		<i>F</i>	P	<i>F</i>	P	<i>F</i>	P
<b>Especie vegetal</b>	1, 53	<b>14.38</b>	<b>0.0004</b>	<b>9.90</b>	<b>0.0027</b>	0.04	0.8393
<b>Dosis de glifosato</b>	2, 53	<b>17.41</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>12.80</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	0.75	0.4774
<b>Sitio de aplicación</b>	1, 53	0.90	0.3461	<b>17.91</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	0.20	0.6544
Biomasa viva	1, 53	0.54	0.4644	2.13	0.1500	2.74	0.1040

La negrilla denota efectos significativos ( $\alpha = 0.05$ )



**Figura 3.2.** Colonización radical total, arbúsculos y vesículas en plantas de *L. tenuis* y *P. dilatatum* 15 días después de la aplicación de glifosato en el suelo (vía directa) o aplicación en hojas (vía indirecta). Los valores representan las medias  $\pm$  D.E. de cinco repeticiones. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre dosis de glifosato, y letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre sitios de aplicación, de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

#### Contenido de clorofila y biomasa viva

En lo concerniente al contenido de clorofila en hojas, se encontró una interacción significativa entre la dosis de glifosato y el sitio de aplicación ( $F_{[2, 47]} = 28,81$ ;  $P < 0,0001$ ). El glifosato redujo el contenido de clorofila cuando se aplicó sobre

las hojas, pero no cuando se aplicó sobre el suelo (Cuadro 3.3). El comportamiento descrito anteriormente no varió entre las especies de plantas analizadas ( $F_{[1, 47]} = 1,66$ ;  $P < 0,2035$ ).

**Cuadro 3.3.** Contenido de clorofila en hojas de *L. tenuis* y *P. dilatatum*, 15 días post-aplicación de glifosato.

Especie vegetal	Dosis de glifosato ( $l \cdot ha^{-1}$ )					
	0		0.8		3	
	Sitio de aplicación					
	Suelo	Hojas	Suelo	Hojas	Suelo	Hojas
Contenido de clorofila en <i>L. tenuis</i> (unidades SPAD)	$40.2 \pm 2.5^a$	$34.3 \pm 1.4^a$	$36.3 \pm 4.1^a$	$19.5 \pm 0.7^b$	$34.1 \pm 0.8^a$	$12.8 \pm 0.8^b$
Contenido de clorofila en <i>P. dilatatum</i> (unidades SPAD)	$37.9 \pm 2.4^a$	$34.9 \pm 1.0^a$	$36.6 \pm 1.2^a$	$13.8 \pm 1.8^b$	$36.3 \pm 1.1^a$	$11.4 \pm 3.1^b$
Biomasa viva de <i>L. Tenuis</i> (g/planta)	$1,5 \pm 0,1^{ab}$	$2,2 \pm 0,4^a$	$1,3 \pm 0,2^b$	$0,9 \pm 0,2^c$	$1,9 \pm 0,1^{ab}$	$0,9 \pm 0,1^c$
Biomasa viva <i>P. dilatatum</i> (g/planta)	$1,8 \pm 0,1^{ab}$	$2,1 \pm 0,1^a$	$1,7 \pm 0,1^b$	$0,5 \pm 0,1^c$	$1,8 \pm 0,1^{ab}$	$0,3 \pm 0,1^c$

Los valores representan la media de cinco repeticiones  $\pm$  el error estándar. Letras similares sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

En cuanto a la biomasa viva, no se encontró un efecto significativo del factor especie vegetal ( $F_{[1, 48]} = 1,92$ ;  $P = 0,1721$ ). Como era esperable, se encontró una interacción entre la dosis de glifosato y sitio de aplicación ( $F_{[2, 48]} = 26,93$ ;  $P < 0,0001$ ). Hubo una disminución en la biomasa viva cuando el glifosato se aplicó sobre las hojas, y esta disminución fue similar cuando se aplicó la dosis máxima y la dosis intermedia. En cambio, cuando el glifosato se aplicó sobre el suelo, los valores de biomasa viva fueron similares al tratamiento control (Cuadro 3.3).

## DISCUSIÓN

Los resultados presentados apoyan la hipótesis de que estos hongos son afectados directa e indirectamente por la aplicación de glifosato. La importancia de cada vía dependió de la estructura fúngica evaluada. Sin embargo, a diferencia de lo postulado en la segunda hipótesis, los efectos indirectos no dependieron de la especie hospedante. Teniendo en cuenta los diferentes grados de dependencia micorrícica que pueden presentar las diferentes especies de plantas (Habte & Manjunath, 1991), la alteración de las estructuras de HMA en el suelo y la formación de arbusculos para el intercambio de nutrientes podrían conducir a cambios florísticos de la comunidad vegetal (Gange *et al.*, 1993; van der Heijden *et al.*, 1998b; Bever, 1999; Gange *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, se ha comprobado que reiteradas aplicaciones de glifosato en estos pastizales provoca cambios en la composición florística en el corto-medio plazo (Rodríguez & Jacobo, 2010), lo que podría afectar la diversidad de HMA teniendo en cuenta la dependencia entre ambas comunidades (Bever, 1999).

La viabilidad de las esporas se redujo sólo cuando el glifosato se aplicó sobre el suelo (vía directa), siendo esta reducción similar entre las dosis intermedia (no letal para las plantas) y alta. La magnitud de este efecto directo fue menor que la encontrada en el ensayo anterior, y esto podría deberse al grado de perturbación causado en el suelo en cada caso. En el experimento previo (Capítulo 2), el suelo se tamizó con una malla de 2 mm de diámetro y se homogeneizó, mientras que en este experimento, el suelo mantuvo su estructura y la planta hospedante estaba presente. Maly y colaboradores (2006) encontraron que el glifosato inhibe la germinación y el crecimiento de esporas de HMA en medios de cultivo, pero no cuando se aplica al suelo antes de la siembra de soja. El trabajo citado anteriormente demostró que el efecto directo del glifosato sobre las esporas puede depender de las especies de HMA evaluadas. La inhibición causada por

este herbicida sobre la germinación y el crecimiento de tubos germinales de las esporas mostraron una tendencia decreciente desde *Claroideoglonus etunicatum* a *Scutellospora heterogama* y *Gigaspora margarita* (Malty *et al.*, 2006), y nulo en *Funneliformis mosseae* (Giovannetti *et al.*, 2006). La ausencia de efectos indirectos indica que, aunque el glifosato puede ser exudado por las raíces de las plantas tratadas con el herbicida (Neumann *et al.*, 2006), la cantidad de este producto en la rizósfera no fue suficiente para afectar la viabilidad de las esporas.

La colonización radical total se redujo en la misma magnitud cuando el glifosato se aplicó a 0,8 o 3 l.ha<sup>-1</sup>, lo que demuestra la alta sensibilidad de estos microorganismos a la aplicación de glifosato. Esto implica que el daño causado por el herbicida no sólo se puede percibir en el área a tratar, sino que también en las áreas circundantes como consecuencia de la deriva ocasionada por el viento. Los vientos fuertes y procedimientos inapropiados de aplicación pueden resultar en una deriva que puede alcanzar el 37% de la dosis total pulverizada (Nordby & Skuterud, 1974). Si bien la disminución en el porcentaje de colonización radical fue significativa pero no de gran magnitud, es importante remarcar que pequeños efectos del glifosato en componentes importantes para el funcionamiento de los agroecosistemas pueden tener fuertes impactos cuando grandes áreas están involucradas continuamente (Sheng *et al.*, 2012).

No hubo diferencias significativas en la magnitud de la reducción de la colonización radical cuando el glifosato se aplicó sobre el suelo o sobre las hojas. Sin embargo, las causas de esta reducción deberían ser diferentes en función del sitio de aplicación del herbicida. Cuando el glifosato se aplicó en suelo (vía directa), la reducción en la colonización radical estaría relacionada con los daños que el glifosato (el ingrediente activo, cualquiera de los adyuvantes y/o algunos de su producto de degradación, como el AMPA) podría haber causado en hifas externas y/o esporas de

HMA. Ronco et al. (2008) encontraron una reducción en la colonización radical, arbusculos y vesículas en plantas de pimiento sembradas en suelo previamente tratado con glifosato. Esto indicaría que la aplicación de este herbicida reduce la cantidad de propágulos agregados previamente al sustrato (esporas, fragmentos de raíces infectadas, y micelio de *F. mosseae*). No se deberían descartar otras causas que podrían estar involucradas en las respuestas encontradas. Como se mencionó anteriormente, el glifosato puede dañar otros microorganismos presentes en el suelo, que, a su vez, pueden modificar la funcionalidad de los HMA (Garbaye, 1994; Siddiqui & Akhtar, 2008; Pivato *et al.*, 2009).

La reducción en la colonización radical cuando el glifosato se aplicó sobre las hojas (vía indirecta), podría en cambio deberse al estrés de carbono producido en la planta hospedante. Como se muestra en el Cuadro 3.3, la aplicación de glifosato redujo el contenido de clorofila en hojas cuando se aplicó sobre las hojas, y esto tendría un impacto en la tasa de fotosíntesis (Fleischer, 1935). Esta reducción, junto con la menor área foliar verde en las plantas tratadas con este herbicida, podría reducir el flujo de carbono hacia las raíces, lo que afecta la colonización radical (Bethlenfalvay & Dakessian, 1984; Hampp & Schaeffer, 1999).

El efecto indirecto del glifosato sobre la colonización radical encontrado en este estudio, no coincide con algunas investigaciones previas. En parte, el efecto nulo informado en otros trabajos puede deberse al uso de plantas genéticamente modificadas (principalmente soja) que resisten la aplicación de glifosato (Mujica *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2009; Savin *et al.*, 2009). Por lo tanto, las plantas no sufren estrés de carbono ya que las tasas fotosintéticas y el área foliar permanecen sin cambios. Aunque no se midió en este experimento, posibles cambios en los exudados radicales (incluyendo la posible liberación de glifosato), producidas en las plantas tratadas con el herbicida podría

afectar a la actividad microbiana en la rizósfera (Kremer *et al.*, 2005) y en parte explicar la disminución de la colonización radical.

El porcentaje de arbusculos también se redujo debido a la aplicación de glifosato, pero en este caso el sitio de aplicación tuvo un efecto significativo. Esta reducción fue mayor cuando el glifosato se aplicó sobre las hojas (vía indirecta) que cuando se aplicó sobre el suelo (vía directa). Esto indicaría una mayor sensibilidad de los arbusculos a cambios en el suministro de hidratos de carbono por parte de la planta hospedante, en relación con el efecto directo sobre las esporas e hifas externas y su capacidad de generar arbusculos dentro de la raíz en suelos tratados con este herbicida. En ambos casos, la reducción en el porcentaje de arbusculos implicaría que la funcionalidad de la simbiosis se podría ver afectada, dado que estas estructuras son el sitio principal para el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988).

En conclusión, los resultados presentados en este capítulo permiten concluir que el glifosato daña directa e indirectamente a los HMA, afectando a la interacción entre estos simbioses y sus plantas hospedantes en los pastizales. En condiciones de campo, la probabilidad de ocurrencia de efectos directos e indirectos dependerá de la cobertura vegetal en el momento de la aplicación de glifosato. Esto tendrá un impacto diferente en el ciclo de vida de los HMA, ya que la importancia de cada vía dependía de la estructura fúngica evaluada. En los pastizales donde se efectúa la aplicación de glifosato con el objetivo de promover especies de invierno (Rodríguez & Jacobo, 2010), la cobertura vegetal dependerá de la densidad de plantas por unidad de superficie (que puede variar en función del grado de deterioro del pastizal), los días transcurridos desde el último pastoreo, y de los efectos ambientales que puedan afectar las propiedades del suelo, como sequía, inundación, entre otros.

**EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE GLIFOSATO SOBRE LOS HONGOS  
MICORRÍMICOS ARBUSCULARES: ESTUDIO A CAMPO**

## INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han demostrado que la presencia de HMA altera la estructura de la comunidad vegetal al afectar la abundancia relativa de las especies vegetales y la diversidad vegetal (Grime *et al.*, 1987; Gange *et al.*, 1990; Sanders & Koide, 1994; Hartnett & Wilson, 1999). Entre los mecanismos involucrados en estas respuestas, se han propuesto el transporte de nutrientes desde plantas dominantes a plantas subordinadas, conectadas por una misma red hifal (Grime *et al.*, 1987; Caruso *et al.*, 2012; Simard *et al.*, 2012), y las distintas dependencias micorrícicas que presentan las especies vegetales (Plenchette *et al.*, 1983; Habte & Manjunath, 1991). Por otro lado, se comprobó que estas alteraciones en la comunidad vegetal no sólo podrían deberse a la abundancia, sino que también la composición de la comunidad de HMA estaría involucrada (van der Heijden *et al.*, 1998a). Esto último se debe a que los beneficios que obtienen las plantas hospedantes varían según la especie de HMA (Bever, 1999), lo que conlleva a cambios en las habilidades competitivas de las mismas.

La composición y la diversidad de las comunidades de HMA pueden ser afectadas tanto cualitativa como cuantitativamente por las prácticas de manejo agrícola (Oehl *et al.*, 2003; Jansa *et al.*, 2006; Schalamuk *et al.*, 2006; Mathimaran *et al.*, 2007; Alguacil *et al.*, 2010; Schalamuk & Cabello, 2010; Schalamuk *et al.*, 2013b). Si bien aún no son claros, algunos de los mecanismos involucrados podrían estar relacionados con características morfológicas de las esporas de cada especie de HMA, y/o con modificaciones en las propiedades del suelo. Lo primero estaría asociado con las variaciones en el número y grosor de las paredes de las esporas, y presencia o ausencia de ornamentaciones entre las distintas especies de HMA (Schenck & Pérez, 1990), que podrían influir en la resistencia de las esporas ante factores de stress. Por su parte, las

prácticas de manejo agrícola y el ambiente podrían generar alteraciones en distintas propiedades del suelo (como compactación, cambios en pH, humedad edáfica, disponibilidad de C, N y P) y estas modificaciones repercuten en la composición y diversidad de las comunidades de HMA (Anderson *et al.*, 1984; Porter *et al.*, 1987; Treseder, 2004; Isobe *et al.*, 2007; Schalamuk *et al.*, 2011).

La Pampa Deprimida es un área predominantemente ganadera, que basa su producción principalmente en la utilización del pastizal natural. La Productividad Primaria Neta Aérea (PPNA) de estos recursos forrajero resulta hasta 10 veces superior en primavera que en invierno (Sala *et al.*, 1981), y por ende el déficit de forraje invernal es la principal limitante para la producción ganadera (Deregibus *et al.*, 1995). Para superarla, en la última década se ha difundido en los establecimientos ganaderos la promoción de raigrás (*Lolium multiflorum*) (Fernández *et al.*, 2008). La promoción consiste en la reducción de la competencia ejercida por especies estivales a través de glifosato, y la adición de fertilizante nitrogenado. La reducción de la competencia estival promueve de forma anticipada la germinación de esta gramínea C<sub>3</sub> anual al favorecer la llegada de luz directa a las semillas (Deregibus *et al.*, 1995). Esto genera una elevada producción de forraje de calidad en momentos en que las especies nativas que componen la comunidad del pastizal disminuyen su crecimiento (Fernandez Grecco, 2000).

Como se mencionó en capítulos anteriores, diversos trabajos han evaluado el efecto de la aplicación de glifosato sobre los HMA. Con respecto a las esporas, se han detectado disminuciones en la germinación y crecimiento del tubo germinativo en algunas de las especies de HMA evaluadas (Giovannetti *et al.*, 2006; Maly *et al.*, 2006; Pasaribu *et al.*, 2011). Cabe destacar que en todos los trabajos citados anteriormente, las

evaluaciones se realizaron en medio de cultivo. En los dos capítulos anteriores de esta tesis, se demuestra que en condiciones controladas en invernáculo, existe una disminución en la viabilidad de las esporas cuando se aplica glifosato (Figuras 2.1 y 3.1). En relación a los efectos de este herbicida sobre la colonización radical, si bien existen más antecedentes, éstos son contradictorios (Morandi, 1989; Mujica *et al.*, 1999; Maly *et al.*, 2006; Ronco *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2009; Savin *et al.*, 2009). Tanto los antecedentes citados anteriormente como los resultados obtenidos en los capítulos anteriores surgen de ensayos en invernáculo. Es necesario, por ende, evaluar los efectos de la aplicación de este herbicida sobre las esporas de HMA y sobre la colonización radical en condiciones de campo.

En pastizales naturales de la Pampa Deprimida bajo pastoreo vacuno, las aplicaciones reiteradas de glifosato y fertilizantes nitrogenados reducen significativamente la riqueza florística y la diversidad de especies vegetales (Rodríguez & Jacobo, 2010). Entre los grupos funcionales que se ven perjudicados por esta práctica de manejo, se destacan las gramíneas y leguminosas estivales, que poseen mayor dependencia micorrícica en relación a las gramíneas perennes y dicotiledóneas no leguminosas (Wilson & Hartnett, 1998). Estos efectos del glifosato generados en la comunidad vegetal pueden alterar significativamente la composición y la estructura de la comunidad de HMA, a través de distintas tasas de esporulación, crecimiento y supervivencia de diferentes especies de HMA (Hetrick & Bloom, 1986; Giovannetti *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1991; Sanders & Fitter, 1992; Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994; Westover *et al.*, 1997; Eom *et al.*, 2000). Adicionalmente, los HMA podrían verse afectados debido a posibles alteraciones en las propiedades del suelo generadas por la aplicación de glifosato. Rodríguez & Jacobo (2010) observaron en lotes tratados con este herbicida y fertilizados con N, una disminución en la cobertura

vegetal lo que podría llevar a un aumento en la salinidad, y por ende en la disponibilidad de agua tanto para las plantas como para los HMA (Lamsal *et al.*, 1999). Por lo tanto, el **objetivo** de este capítulo es analizar a campo el efecto de la aplicación de glifosato sobre el número, diversidad y viabilidad de esporas de HMA, el porcentaje de colonización radical, la estructura de la vegetación y la salinidad del suelo. El efecto de este herbicida sobre los HMA se evaluó en plantas de *Lotus tenuis* y *Paspalum dilatatum* presentes en cada una de las parcelas, y en las esporas presentes en el suelo asociado a esas especies. Las mismas fueron elegidas debido a que si bien son similares en cuanto a su dependencia micorrícica, pertenecen a grupos funcionales distintos, y esto puede influir sobre los efectos indirectos. Adicionalmente, ambas especies son de alto valor forrajero y mostraron ser afectadas marcadamente en lotes donde se realiza la promoción de *L. multiflorum*.

Los ensayos en invernáculo desarrollados en los capítulos anteriores, permitieron estudiar en forma discriminada y controlada los efectos directos e indirectos de la aplicación de glifosato sobre los HMA. Sin embargo los resultados obtenidos son limitados para predecir el comportamiento a campo, ya que varios factores no controlados podrían modificar las respuestas encontradas. La información generada a partir de ensayos en invernáculo en combinación con la generada en ensayos a campo, permite realizar inferencias en forma más nítida y convincente (Harrison & List, 2004).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Sitio de estudio y recolección de muestras*

El ensayo se realizó en un pastizal de media loma (pradera húmeda de mesófitas), sin historia previa de aplicación de glifosato. El mismo se encuentra ubicado en la localidad de Ignacio Correas (Pcia. de Buenos Aires), al noreste de la Pampa Deprimida (35° 01' S, 57° 50' O). La temperatura promedio anual en la región es de 15,9 ° C y la precipitación anual es de 885 mm.año<sup>-1</sup> (Perelman et al., 2001). Según la Taxonomía de Suelos, el suelo es clasificado como Natracuol típico (sus propiedades químicas se presentan en el Cuadro 4.1). Previamente a la aplicación de glifosato, se realizó un relevamiento florístico mediante el método de intersección lineal (Canfield, 1941). Las especies dominantes del pastizal fueron *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze, *Phyla canescens* (H.B.K.) Greene, *L. tenuis* Waldst. & Kit., *Eryngium ebracteatum* Lam., *L. multiflorum* Lam., *P. dilatatum* Poir., *Bothriochloa laguroides* (DC) Herter, *Setaria geniculata* (Lam.) Beauv., *Chaetotropis elongata* (Kunt) Björkman, *Panicum gouinii* Fournier y *Paspalum vaginatum* Sw. El pastizal presentaba una cobertura vegetal del 69%, broza en un 14% y 17% de suelo desnudo. En la Figura 6.2 del Anexo se presentan las precipitaciones registradas en el Establecimiento durante las semanas previas y posteriores a la aplicación del herbicida.

**Cuadro 4.1.** Propiedades químicas del suelo (0-20 cm) al momento de la aplicación de glifosato. Los valores representan la media de seis repeticiones ± el error estándar.

MO (%)	C (%)	N (%)	P (ppm)	pH	CE (dS/m)
3,52 ± 0,30	2,03 ± 0,17	0,22 ± 0,02	9,06 ± 1,01	7,61 ± 0,18	0,52 ± 0,06

#### *Diseño experimental y aplicación de herbicida*

Las unidades experimentales fueron 30 parcelas de 2,25 m<sup>2</sup> (con una distancia de 0,90 m entre cada una de ellas) con similar composición florística. Las mismas se

ubicaron dentro de una clausura de 200 m<sup>2</sup> instalada en un potrero de 44 ha cuyo pastizal natural se encontraba bajo pastoreo por ganado vacuno al momento de iniciar el ensayo. El experimento tuvo un diseño completamente aleatorizado, con tres niveles de dosis de glifosato: 0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>, con 10 repeticiones por tratamiento. La aplicación de glifosato se realizó utilizando una mochila pulverizadora a fines de verano, ya que es el momento en el que se aplica este herbicida en la práctica para la promoción de *L. multiflorum* en los pastizales de la Pampa Deprimida. Durante el transcurso del ensayo, la clausura se mantuvo rodeada con alambre eléctrico, para evitar el pastoreo del ganado vacuno.

#### *Mediciones realizadas*

##### *- Diversidad, número y viabilidad de esporas de HMA*

Transcurridos 15 días desde la aplicación del glifosato, se tomaron muestras de suelo asociado a *L. tenuis* y *P. dilatatum*. Parte del suelo se llevó a estufa (105 °C) hasta peso constante, con el objetivo de estimar el porcentaje de humedad. Con el resto de la muestra se realizaron dos extracciones de esporas, a través de la técnica de tamizado en húmedo y decantación (Gerdemann & Nicolson, 1963), seguido por centrifugación en gradiente de sacarosa (Walker *et al.*, 1982). Una de ellas se utilizó para la estimación de diversidad y número de esporas, y otra para cuantificar viabilidad de las mismas.

Para evaluar la **diversidad** de HMA, cada morfotipo fue montado en polyvinyl-alcohol-ácido láctico-glicerina (PVLG) y PVLG + reactivo de Melzer para su identificación. La taxonomía se basó en el color, tamaño, ornamentación de la pared externa y estructuras de las paredes y láminas, siguiendo criterios taxonómicos usuales descriptos en INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu>) y en Schenck y Perez (1990). Para la

estimación del **número** de esporas sólo se contabilizaron los morfotipos externamente saludables, mediante observación directa bajo estereomicroscopio. El número total de esporas de cada muestra se corrigió por su porcentaje de humedad para expresar este valor por gramos de suelo seco. La abundancia relativa de cada especie de HMA fue calculada teniendo en cuenta el número de esporas de la misma especie y el número de esporas total presentes en cada muestra. Para la estimación de la **viabilidad** de las esporas se utilizó la metodología de An y Hendrix (1988). Esta determinación se realizó sobre toda la comunidad, y sobre las cuatro especies dominantes de la comunidad por separado.

- *Colonización radical*

Quince días después de la aplicación del glifosato, se recolectaron raíces de *P. dilatatum* y *L. tenuis* en cada una de las parcelas. Las raíces fueron clarificadas con KOH (10%) y luego teñidas con azul de tripano, siguiendo el protocolo de Phillips y Hayman (1970). La cuantificación del porcentaje de colonización se realizó mediante la técnica propuesta por Mc Gonigle *et al.* (1990). Se estimó el porcentaje de colonización micorrícica total (hifas + vesículas + arbusculos), colonización por vesículas y colonización por arbusculos.

- *Contenido de clorofila*

Para estimar el vigor de las plantas de *P. dilatatum* y *L. tenuis* a las que se les cuantificó el porcentaje de colonización radical, se cuantificó el contenido de clorofila en hojas 15 días post-aplicación de glifosato. Para ello se utilizó un medidor de clorofila

(SPAD-502, Minolta). Al igual que en los ensayos anteriores, las mediciones consistieron en 10 lecturas por planta, cinco a cada lado de la nervadura central.

*- Cobertura vegetal y salinidad*

En el mes de diciembre de 2012 se realizaron mediciones de cobertura vegetal y salinidad. En la estimación de cobertura vegetal se incluyó tanto la cobertura vegetal viva como la muerta (ya sea material muerto en pie o broza). Para la estimación de salinidad se realizaron 3 mediciones de conductividad eléctrica (C.E.) en cada parcela, utilizando para ello un conductímetro portátil (HI993310, HANNA<sup>®</sup>, Rhode Island, USA). El mismo posee un sensor de temperatura, de modo que el medidor compensa la temperatura automáticamente y refiere las lecturas a 25 °C. Al momento de realizar las mediciones de salinidad el suelo se encontraba con un nivel de humedad cercano a la capacidad de campo.

*- Relevamiento florístico*

Se realizó un relevamiento florístico de cada parcela en la primavera y verano siguiente de la aplicación (diciembre 2012 y principios de marzo de 2013, respectivamente). Las dos mediciones se realizaron con el objetivo de poder relevar las especies con ciclo de crecimiento otoño-invierno-primaveral y primavera-estivo-otoñal. Se utilizó el método de intersección lineal, o líneas de Canfield (Canfield, 1941). La cobertura interceptada de cada especie se midió con una cinta. La cifra total interceptada de cada especie es sumada en cada línea, calculándose posteriormente el porcentaje de cobertura. Además de la especie vegetal, se cuantificó el porcentaje de suelo desnudo, material vegetal muerto en pie y broza. Posteriormente, para evaluar cambios en la

estructura de la vegetación generados por el glifosato, las especies vegetales se clasificaron utilizando un enfoque jerárquico (Lavorel *et al.*, 1997) de acuerdo con la forma de crecimiento (especies dicotiledóneas, gramíneas y graminoides), la historia de vida (anual, perenne), fijación simbiótica de nitrógeno (leguminosas y no leguminosas), la vía fotosintética (especies C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) y estación de crecimiento (estivales e invernales). Quedaron definidos los siguientes grupos funcionales: gramíneas invernales C<sub>3</sub> anuales, gramíneas invernales C<sub>3</sub> perennes, gramíneas estivales C<sub>4</sub>, leguminosas estivales, leguminosas invernales, dicotiledóneas no leguminosas invernales y dicotiledóneas no leguminosas estivales.

*- Estimación de la diversidad vegetal y de HMA*

Para evaluar cambios en la estructura de las comunidades tanto de plantas como de HMA, se calcularon para cada parcela la riqueza de especies (*S*), el índice de diversidad de Shannon (*H*) y la equitatividad (*E*). La riqueza es simplemente el número de especies diferentes que se encuentran en cada una de las muestras. La diversidad de especies (*H*), puede ser cuantificada de acuerdo con Magurran (1988):

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i (\log_2 P_i) \quad (1)$$

donde *P<sub>i</sub>* es la probabilidad de encontrar cada especie *i* en una muestra. La equitatividad (*E*), mide la equidad de la presencia de cada especie en la muestra, y está dada por:

$$E = \frac{H}{\log_2 S} \quad (2)$$

De la ecuación 2 se deduce que

$$H = E \log_2 S \quad (3)$$

en donde el índice de Shannon-Weaver aparece como el producto de los dos principales componentes de la diversidad: la equitatividad y el número de especies.

*- Análisis estadístico*

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de la dosis de herbicida sobre la diversidad, número y viabilidad de las esporas, contenido de clorofila, cobertura vegetal y salinidad, y sobre la riqueza, equitatividad y diversidad de la comunidad vegetal. Los atributos de la colonización (porcentaje de colonización radical total, porcentajes de arbusculos y de vesículas) y los grupos funcionales se analizaron mediante un MANOVA. Cuando el MANOVA mostró resultados significativos, se utilizó el análisis univariado ANOVA protegido para determinar cuáles de las variables de respuesta fueron las más afectadas por los tratamientos (Scheiner, 2001). A los datos expresados en porcentaje se les realizó una transformación angular ( $y = \arcseno \sqrt{x}$ ) para aumentar la normalidad y la homogeneidad de varianza (Sokal y Rohlf 1969). Para todos los parámetros mencionados anteriormente, las diferencias entre tratamientos se evaluaron utilizando el test de Tuckey ( $\alpha = 0,05$ ). Las diferencias en diversidad ( $H$ ), riqueza ( $S$ ) y equitatividad ( $E$ ) entre las muestras se analizaron mediante la prueba  $t$  a  $P \leq 0,05$ .

Para evaluar si la aplicación de glifosato afecta la composición de especies fúngica y vegetal, se realizó un análisis de clasificación de las comunidades, mediante el análisis de agrupamientos, utilizando el Programa PC-ORD6 (McCune & Mefford, 2011). Se eligió el índice de Sørensen (1948) como medida de distancia para definir la similitud, siendo éste el más robusto para datos ecológicos. A este análisis se le aplicó el método de Procesamientos de Permutaciones para Respuestas Múltiples (MRPP) para evaluar el grado de significancia de los grupos. El MRPP es una técnica multivariada no paramétrica que tiene ventajas sobre las técnicas paramétricas similares tales como el análisis discriminante, ya que no requiere normalidad multivariante u homogeneidad de las varianzas. Las dosis de glifosato formaron los grupos *a priori* para este análisis.

## RESULTADOS

### *Diversidad, número y viabilidad de esporas de HMA*

En las muestras de suelo de todos los tratamientos, se distinguieron un total de 19 especies de HMA, siete de las cuales no pudieron ser clasificadas a nivel específico (Cuadro 4.2). Considerando la abundancia relativa, entre un 74% y 89% de la comunidad de esporas de HMA en cada tratamiento fue explicado por cuatro especies: *Funneliformis mosseae*, *Claroidoglomus etunicatum*, *Septoglomus constrictum* y *Funneliformis caledonium*.

**Cuadro 4.2.** Abundancia relativa (%) de esporas de cada una de las especies de HMA encontradas en 100 g de suelo seco tratados con distintas dosis de glifosato.

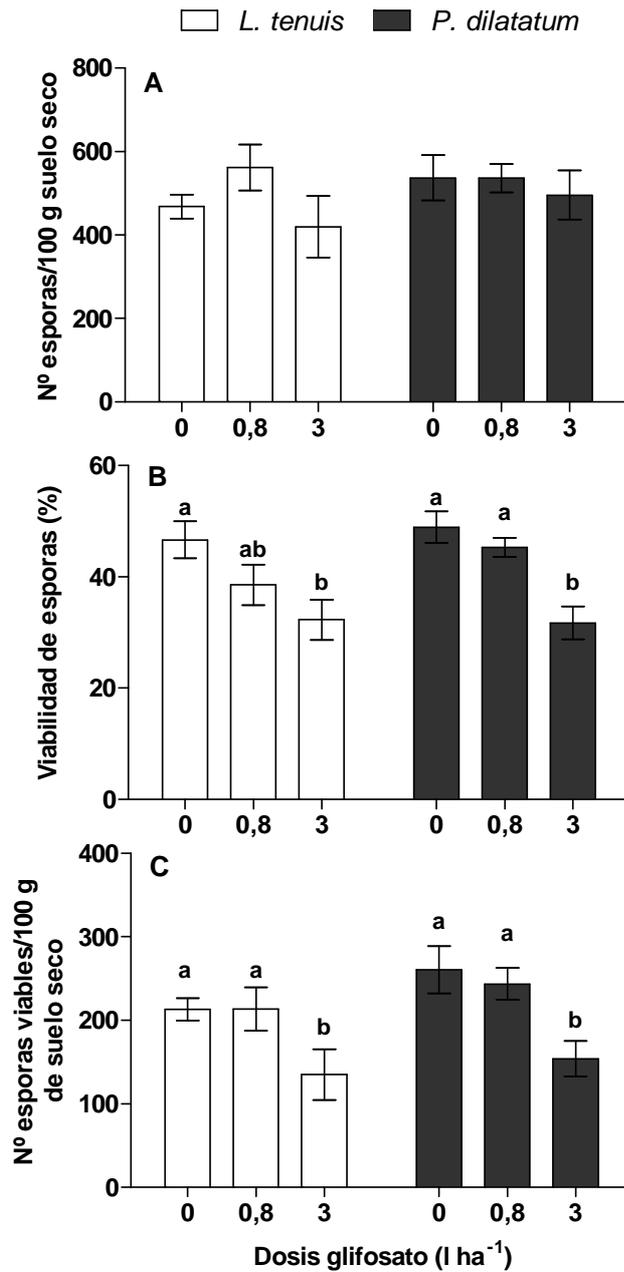
Especie	L. tenuis			P. dilatatum		
	Dosis de glifosato (l.ha <sup>-1</sup> )					
	0	0,8	3	0	0,8	3
<i>Claroideoglopus etunicatum</i> (Becker & Gerdemann)	34,53	54,11	28,20	47,81	8,46	34,02
<i>Funneliformis caledonius</i> (Nicolson & Gerdemann)	26,25	14,73	15,95	24,05	20,94	19,84
<i>Septoglopus constrictum</i> (Trappe)	12,01	5,66	9,33	8,28	11,62	7,17
<i>Funneliformis mosseae</i> (Nicolson & Gerdemann)	10,89	14,48	29,47	9,03	33,37	17,74
<i>Claroideoglopus claroideum</i> (Schenck & Smith)	5,90	2,89	7,51	2,50	3,85	1,48
<i>Ambispora fecundispora</i> (Schenck & Smith)	2,26	-	0,46	0,67	3,62	0,48
<i>Acaulospora mellea</i> (Schenck & Smith)	2,25	0,42	0,47	0,69	0,72	0,89
<i>Entrophospora nevadensis</i> (Palenzuela, Barea, Ferrol, Azcón-Aguilar & Oehl)	1,73	1,14	-	0,38	0,89	1,00
<i>Entrophospora infrequens</i> (Hall)	1,39	0,21	1,93	-	1,69	-
<i>Claroideoglopus clarum</i> (Schenck & Smith)	1,04	4,47	1,33	0,17	0,87	14,32
<i>Acaulospora laevis</i> (Gerdemann & Trappe)	0,82	0,30	4,37	2,43	0,18	1,93
<i>Acaulospora sp. 1</i>	0,37	-	-	0,46	0,66	-
<i>Acaulospora sp. 2</i>	0,30	-	-	0,09	1,16	-
<i>Glomus sp. 1</i>	0,25	0,32	0,98	0,28	0,77	0,20
<i>Funneliformis geosporus</i> (Nicolson & Gerdemann)	-	-	-	0,25	-	-
<i>Glomus sp. 2</i>	-	-	-	2,71	0,22	0,92
<i>Glomus sp. 3</i>	-	-	-	-	0,11	-
<i>Glomus sp. 4</i>	-	1,27	-	-	10,88	-
<i>Acaulospora sp. 3</i>	-	-	-	0,19	-	-

No se encontraron efectos significativos de la aplicación de glifosato sobre la riqueza, equitatividad y diversidad de esporas de HMA en las comunidades asociadas a *L. tenuis* ni a *P. dilatatum* (Cuadro 4.3). La composición de especies tampoco fue afectada por la aplicación de este herbicida (MRPP:  $T = 1,27$ ,  $P = 0,9287$ ;  $T = 1,13$ ,  $P = 0,9097$  para la comunidad de esporas presentes en el suelo asociado a *L. tenuis* y *P. dilatatum*, respectivamente).

**Cuadro 4.3.** Riqueza (S), equitatividad (E) y diversidad (H) de especies de HMA en suelos asociados a *L. tenuis* y *P. dilatatum*, expuestos a distintas dosis de glifosato. Los valores representan la media de 7 repeticiones  $\pm$  el error estándar.

	Dosis de glifosato			<i>p</i>
	0	0,8	3	
<i>L. tenuis</i>				
S	6,86 $\pm$ 0,59	5,86 $\pm$ 0,70	6,14 $\pm$ 0,69	0,5284
E	0,75 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,06	0,8467
H	1,43 $\pm$ 0,13	1,24 $\pm$ 0,14	1,23 $\pm$ 0,08	0,4367
<i>P. dilatatum</i>				
S	7,00 $\pm$ 0,90	8,00 $\pm$ 0,98	6,71 $\pm$ 0,36	0,4989
E	0,64 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,04	0,3571
H	1,21 $\pm$ 0,14	1,43 $\pm$ 0,10	1,41 $\pm$ 0,08	0,3213

El número total de esporas de HMA no se vio afectado por la aplicación de glifosato, en ninguna de las dosis evaluadas (Fig. 4.1 A). Este resultado fue encontrado tanto para la comunidad de esporas asociadas al *L. tenuis* como en las asociadas al *P. dilatatum* ( $F_{[2, 27]} = 1,69$ ;  $P = 0,2027$  y  $F_{[2, 27]} = 0,22$ ;  $P = 0,8075$ , respectivamente). Los valores promedio para cada tratamiento variaron entre 419 y 561 esporas/100 g suelo seco.

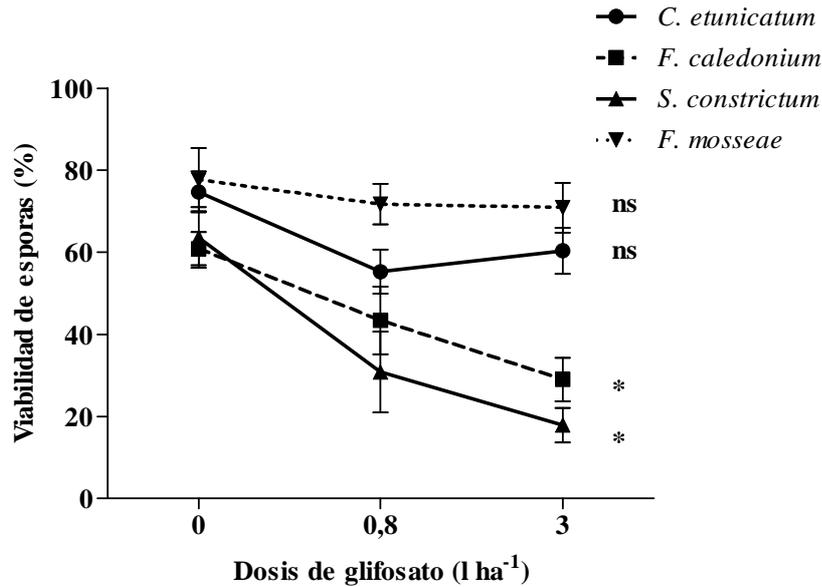


**Figura 4.1:** Número total de esporas (A), porcentaje de viabilidad (B) y número de esporas viables (C) en suelos asociados a *L. tenuis* y *P. dilatatum*, sometidos a distintas dosis de glifosato. Los valores representan las medias  $\pm$  E.E. de diez repeticiones. La misma letra sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Con respecto a la viabilidad de esporas, se detectó un efecto de la aplicación de glifosato, tanto en la comunidad asociada a *L. tenuis* ( $F_{[2, 27]} = 4,21$ ;  $P < 0,0257$ ) como en la

asociada a *P. dilatatum* ( $F_{[2, 27]} = 11,69$ ;  $P < 0,0002$ ). La viabilidad se vio reducida significativamente cuando se aplicó la dosis máxima del herbicida ( $3 \text{ l.ha}^{-1}$ ), aunque en el caso de la comunidad asociada a *L. tenuis* se evidenció una tendencia a disminuir la viabilidad cuando se aplicó  $0,8 \text{ l.ha}^{-1}$  (Fig. 4.1 B). Por lo tanto, el número de esporas viables (resultantes de multiplicar para cada tratamiento el número de esporas viables por el porcentaje de viabilidad) se vio reducido al aplicar la dosis máxima de glifosato (Fig. 4.1 C) en la comunidad de HMA asociada a *L. tenuis* y *P. dilatatum* ( $F_{[2, 27]} = 3,44$ ;  $P = 0,0467$  y  $F_{[2, 27]} = 5,80$ ;  $P < 0,0083$ , respectivamente).

Los resultados presentados anteriormente, surgen de evaluar el porcentaje de viabilidad de la comunidad de HMA en forma conjunta. Cuando se estudió en forma discriminada las 4 especies de HMA que dominaban la comunidad (*F. mosseae*, *C. etunicatum*, *S. constrictum* y *F. caledonium*), se observó una interacción significativa entre la especie y dosis de glifosato ( $F_{[6, 115]} = 2,25$ ;  $P = 0,0435$ ) (Fig. 4.2). La misma obedeció a que la viabilidad de esporas se redujo significativamente en *F. caledonium* y *S. constrictum* pero no en las otras dos especies.



**Figura 4.2.** Viabilidad de esporas de las cuatro especies dominantes de HMA, en suelos tratados con distintas dosis de glifosato. Los valores representan las medias  $\pm$  E.E. de cinco repeticiones. Se indica con asterisco las diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ), y con “ns” las no significativas.

#### *Colonización radical*

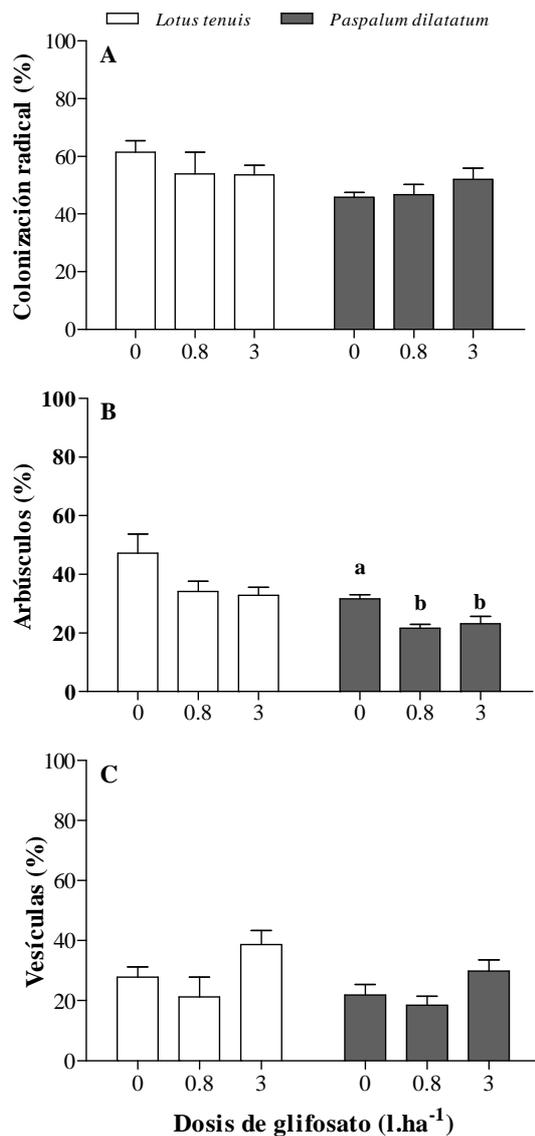
Se detectó un efecto de la aplicación de glifosato sobre los atributos de la colonización radical (colonización radical total, arbusculos y vesículas en conjunto) en *P. dilatatum*, pero no en *L. tenuis* (MANOVA, Cuadro 4.4; Fig. 4.5).

**Cuadro 4.4.** Resultados del análisis multivariado de la varianza (MANOVA) para el efecto de la dosis de glifosato sobre los rasgos fúngicos (colonización radical total, porcentaje de arbusculos y porcentaje de vesículas) en *L. tenuis* y *P. dilatatum*.

Especie	Traza de Pillai	<i>g.l.</i> (num., den.)	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>L. tenuis</i>	0,20	6, 52	0,40	0,8710
<i>P. dilatatum</i>	0,71	6, 52	4,18	0,0020

La traza de Pillai se utilizó como criterio multivariante.

El ANOVA protegido demostró que en *P. dilatatum* el glifosato afectó significativamente el porcentaje de arbusculos ( $F_{[2, 27]} = 8,75$ ;  $P = 0,0014$ ), pero el porcentaje de colonización radical y el porcentaje de vesículas no fueron afectados ( $F_{[2, 27]} = 0,02$ ;  $P = 0,9850$  y  $F_{[2, 27]} = 1,79$ ;  $P = 0,1890$ , respectivamente).



**Figura 4.3.** Porcentaje de colonización radical (A), arbusculos (B) y vesículas (C) en raíces de *L. tenuis* y *P. dilatatum* expuestas a distintas dosis de glifosato (0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>), quince días post-aplicación del herbicida. Los valores representan las medias ± E.E. de diez repeticiones. La misma letra sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### Contenido de clorofila

Las plantas expuestas al glifosato presentaron valores significativamente menores en el contenido de clorofila, en relación a las plantas control. Esta respuesta fue encontrada tanto en *L. tenuis* ( $F_{[2, 27]} = 3,60$ ;  $P = 0,0486$ ) como en *P. dilatatum* ( $F_{[2, 27]} = 18,96$ ;  $P < 0,0001$ ) y no hubo diferencias entre las dosis de 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup> (Cuadro 4.5).

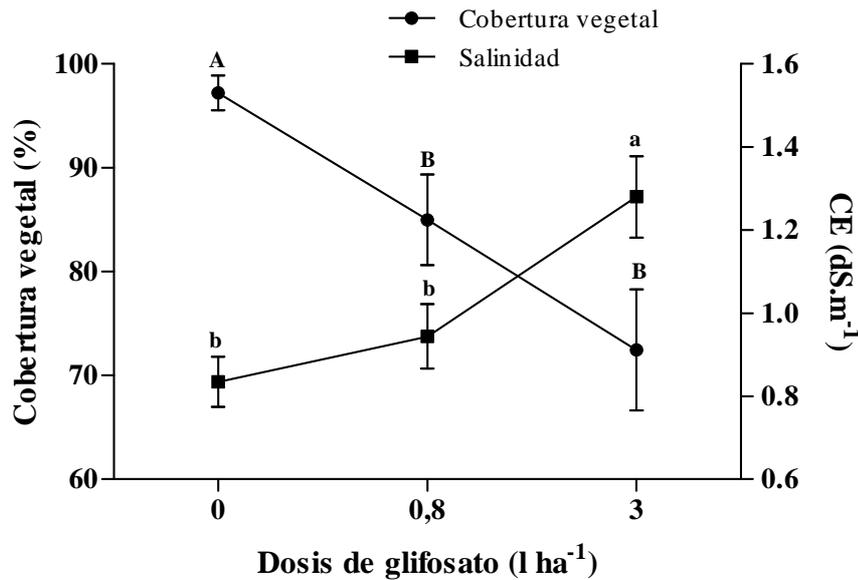
**Cuadro 4.5.** Contenido de clorofila en hojas de *L. tenuis* y *P. dilatatum*, 15 días post-aplicación de glifosato. Los valores representan la media de cinco repeticiones  $\pm$  el error estándar.

	Especie vegetal	Dosis de glifosato (l.ha <sup>-1</sup> )		
		0	0,8	3
Contenido de clorofila (unidades SPAD)	<i>L. tenuis</i>	34,24 $\pm$ 6,69 <sup>a</sup>	18,70 $\pm$ 4,04 <sup>b</sup>	16,31 $\pm$ 4,23 <sup>b</sup>
	<i>P. dilatatum</i>	32,99 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	14,10 $\pm$ 4,04 <sup>b</sup>	10,46 $\pm$ 2,43 <sup>b</sup>

Letras similares sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### Cobertura vegetal y salinidad edáfica

Tanto la cobertura vegetal como la salinidad edáfica fueron afectadas significativamente por la aplicación de glifosato ( $F_{[2, 27]} = 9,69$ ;  $P = 0,0007$  y  $F_{[2, 27]} = 8,64$ ;  $P = 0,0036$ , respectivamente). En el caso de la cobertura vegetal, ésta fue disminuida por la aplicación del herbicida, siendo esta reducción similar cuando se aplicó la dosis de 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>. Por el contrario, la salinidad edáfica aumentó significativamente en las parcelas tratadas con la dosis máxima de glifosato, superando en un 50% a la conductividad eléctrica respecto al testigo (Fig. 4.4).



**Figura 4.4.** Cobertura vegetal (%) y conductividad eléctrica en parcelas tratadas con distintas dosis de glifosato (0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>). Los valores representan las medias  $\pm$  E.E. de diez repeticiones. Las mismas letras indican que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

#### *Diversidad y estructura de la comunidad vegetal*

En el relevamiento florístico realizado en primavera, se detectaron cambios significativos en la vegetación generados por la aplicación de glifosato. Si bien la riqueza no se vio afectada, la equitatividad fue mayor en parcelas tratadas con 0,8 l.ha<sup>-1</sup>, y la diversidad fue mayor en parcelas tratadas con 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>, en relación a las parcelas control (Cuadro 4.6). Sin embargo, en el relevamiento realizado al año de la aplicación (verano de 2013) estas diferencias desaparecieron, siendo la riqueza, equitatividad y diversidad similares entre las parcelas tratadas y no tratadas (Cuadro 4.6).

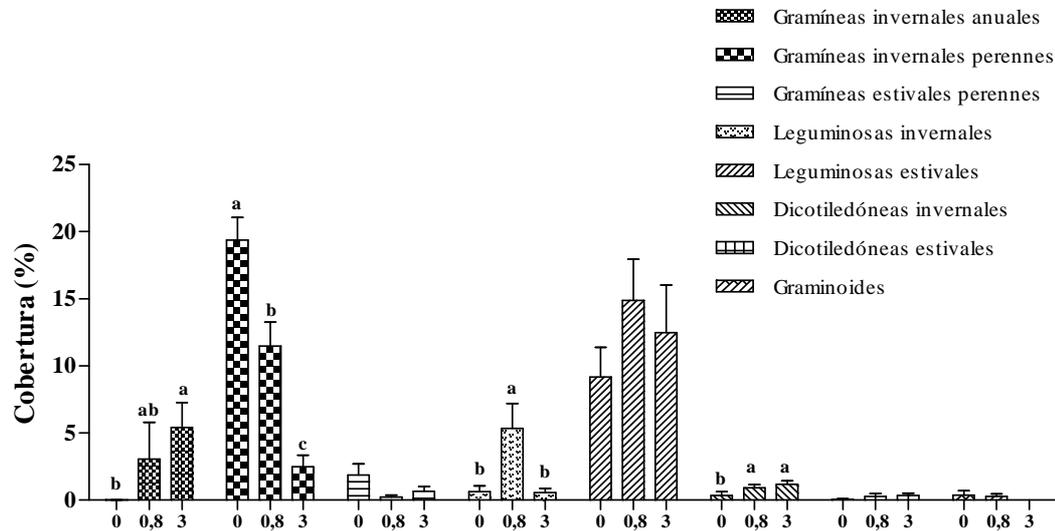
**Cuadro 4.6.** Riqueza (S), equitatividad (E) y diversidad (H) de especies vegetales en parcelas sometidas a distintas dosis de glifosato, en la primavera y verano siguientes a la aplicación. Los valores representan la media de 10 repeticiones  $\pm$  el error estándar.

	Dosis de glifosato			<i>p</i>
	0	0,8	3	
Primavera 2012				
S	6,30 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	8,20 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	7,90 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	0,1885
E	0,63 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,75 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	0,0447
H	1,12 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	1,55 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	1,51 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,0119
Verano 2013				
S	6,60 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	9,30 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	8,80 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	0,0907
E	0,61 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,76 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,0739
H	1,11 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,44 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	1,62 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,0652

Letras similares sobre las barras indica que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

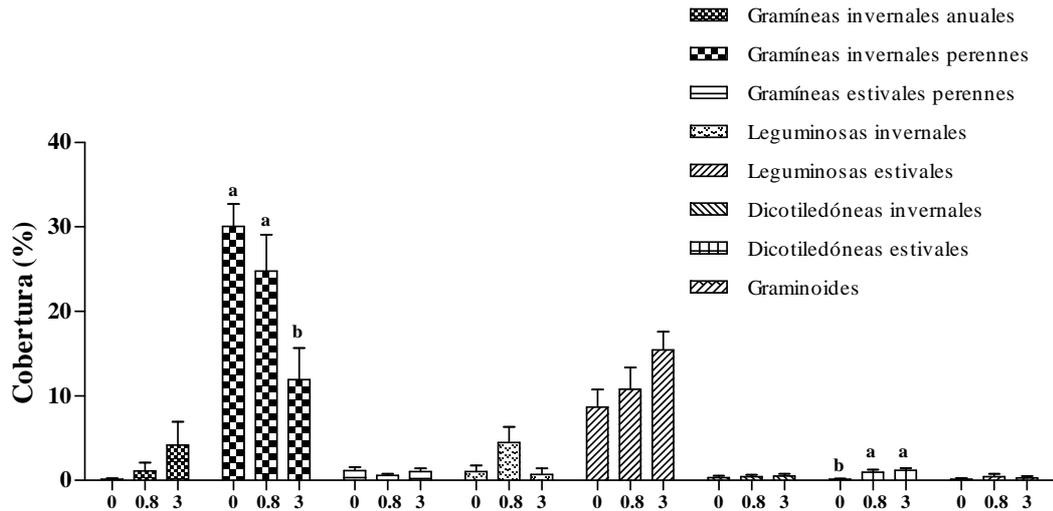
La composición de especies fue altamente afectada por la aplicación de glifosato tanto en primavera (MRPP:  $T = -8,62$ ,  $P < 0,0001$ ) como en verano (MRPP:  $T = -4,59$ ,  $P = 0,0009$ ). En la primavera de 2012 se detectaron efectos significativos de la aplicación de glifosato sobre cuatro grupos funcionales: gramíneas invernales anuales ( $F_{[2, 27]} = 4,68$ ;  $P = 0,0180$ ), gramíneas invernales perennes ( $F_{[2, 27]} = 29,89$ ;  $P < 0,0001$ ), leguminosas invernales ( $F_{[2, 27]} = 5,74$ ;  $P = 0,0086$ ) y dicotiledóneas invernales ( $F_{[2, 27]} = 6,00$ ;  $P = 0,0070$ ). Tanto las gramíneas invernales anuales como las dicotiledóneas invernales se vieron favorecidas con la aplicación de este herbicida, mientras que las gramíneas invernales perennes fueron afectadas negativamente (Fig. 4.5). La leguminosa invernal (*Trifolium repens*), se vio favorecida con la dosis intermedia, mientras que en la dosis máxima su cobertura fue igual que en las parcelas testigo. Respecto a la cobertura de gramíneas estivales perennes, si bien no fue significativamente distinta entre tratamientos, se observó una reducción marginal en

parcelas tratadas con glifosato ( $F_{[2, 27]} = 2,75$ ;  $P = 0,0818$ ). El porcentaje de broza no se vio afectado por la aplicación del herbicida en ninguna de las dosis evaluadas ( $F_{[2, 27]} = 1,00$ ;  $P = 0,3816$ ).



**Figura 4.5.** Cobertura basal de cada grupo funcional en función de las distintas dosis de herbicida (0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>), correspondientes al mes de diciembre de 2012. Los valores representan las medias  $\pm$  E.E. de diez repeticiones. Las mismas letras indican que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

En el relevamiento realizado en el verano de 2013 se detectaron efectos significativos de la aplicación de glifosato sobre las gramíneas invernales perennes ( $F_{[2, 27]} = 7,88$ ;  $P = 0,0020$ ) y sobre las dicotiledóneas estivales ( $F_{[2, 27]} = 8,81$ ;  $P = 0,0011$ ). Al igual que lo ocurrido en el relevamiento de primavera, la aplicación de este herbicida perjudicó a las gramíneas invernales perennes, y favoreció la presencia de especies dicotiledóneas estivales (Fig. 4.6). Al igual que lo ocurrido en primavera, el porcentaje de broza no fue modificado significativamente por la aplicación de glifosato ( $F_{[2, 27]} = 2,02$ ;  $P = 0,1521$ ).



**Figura 4.6.** Cobertura basal de cada grupo funcional en función de las distintas dosis de herbicida (0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>), correspondientes al mes de marzo de 2013. Los valores representan las medias  $\pm$  E.E. de diez repeticiones. Las mismas letras indican que los valores no difieren significativamente entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

Se reconocieron 39 especies vegetales (Cuadro 4.7). Si bien el porcentaje de cobertura de la anual *L. multiflorum* aumentó con la aplicación de glifosato, puede notarse que el cambio más notorio se produjo en la cobertura de la perenne *L. arundinaceum*. Esta especie presentó una cobertura cercana al 60% en las parcelas testigo, tanto en primavera como en verano, mientras que en las parcelas tratadas este porcentaje fue marcadamente menor (7,49 - 23,89% en parcelas con la dosis máxima de herbicida, en primavera y verano, respectivamente). Esta especie explica el aumento mencionado anteriormente en la cobertura basal de gramíneas invernales perennes.

**Cuadro 4.7.** Abundancia relativa de las especies vegetales presentes en las parcelas tratadas con distintas dosis de glifosato, en primavera de 2012 y verano de 2013.

Especie	Primavera 2012			Verano 2013		
	Dosis de glifosato (1.ha <sup>-1</sup> )					
	0	0,8	3	0	0,8	3
<b>Gramíneas invernales anuales</b>						
<i>Lolium multiflorum</i>	0,02	5,59	6,46	0,31	2,24	8,33
<i>Gaudinia sp.</i>	0,02	0,51	4,39	-	-	-
<b>Gramíneas invernales perennes</b>						
<i>Lolium arundinaceum</i>	57,87	34,28	7,49	60,01	49,40	23,89
<i>Danthonia montevidensis</i>	0,23	0,12	-	0,12	0,15	-
<i>Hordeum sp.</i>	-	0,03	-	-	-	-
<b>Gramíneas estivales perennes</b>						
<i>Stenotaphrum secundatum</i>	10,91	-	-	8,48	-	-
<i>Bothriochloa laguroides</i>	0,51	-	0,03	-	0,37	1,45
<i>Leersia hexandra</i>	0,02	0,27	-	-	0,48	0,12
<i>Paspalum vaginatum</i>	0,23	-	-	-	-	0,24
<i>Chaetotropis elongata</i>	0,72	1,10	4,48	0,13	0,25	3,34
<i>Paspalum notatum</i>	0,82	-	-	-	-	-
<i>Paspalum dilatatum</i>	-	0,26	0,14	1,50	1,55	4,27
<i>Setaria geniculata</i>	-	-	-	0,25	-	1,77
<i>Panicum milioides</i>	-	-	-	0,72	1,75	0,26
<i>Cynodon dactylon</i>	-	-	-	1,50	0,12	-
<i>Panicum gouinii</i>	-	-	-	-	0,80	-
<i>Panicum bergii</i>	-	-	-	-	1,07	-
<b>Leguminosa invernales</b>						
<i>Trifolium repens</i>	0,63	7,97	7,64	1,06	6,85	7,35
<b>Leguminosa estival</b>						
<i>Lotus tenuis</i>	8,25	13,41	12,48	8,68	10,79	15,44
<b>Hierbas</b>						
<i>Lactuca serriola L.</i>	0,38	0,22	3,94	-	-	1,25
<i>Eryngium ebracteatum</i>	0,42	1,19	0,78	0,24	0,38	-
<i>Sisyrinchium</i>	0,12	0,17	-	-	-	0,11
<i>Leontodon taraxoides</i>	0,90	1,77	2,85	-	-	-
<i>Phyla canescens</i>	1,47	2,72	0,13	1,51	1,65	1,35
<i>Plantago sp.</i>	-	0,48	0,54	-	0,36	0,06
<i>Carex sp.</i>	-	-	0,14	0,12	0,37	0,49
<i>Baccharis pingraea</i>	-	0,23	0,38	-	0,47	1,72
<i>Conyza bonaeriensis</i>	-	-	0,07	-	-	-
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	-	-	0,36	0,06	-	0,06

**Cuadro 4.7.** (Continuación)

Especie	Primavera 2012			Verano 2013		
	Dosis de glifosato (l.ha <sup>-1</sup> )					
	0	0,8	3	0	0,8	3
<i>Rumex sp.</i>	-	-	-	-	0,25	-
<i>Stellaria media</i>	0,13	0,35	0,13	-	-	-
<i>Lepidium sp.</i>	-	-	0,62	-	-	-
<i>Hypochaeris</i>	-	-	0,66	-	-	-
<i>Centaureum pulchellum</i>	-	0,98	-	-	-	-
<i>Aster squamatus</i>	-	-	-	0,25	3,06	2,92
<b>Ciperáceas</b>						
<i>Eleocharis palustris</i>	1,40	-	-	0,60	1,29	0,24
<i>Juncus umbricatus</i>	-	0,95	0,03	-	0,23	0,61
<i>Graminoides</i>	-	-	-	0,06	0,57	0,19
<i>Cyperus eragrostis</i>	-	-	-	-	-	0,72
Suelo desnudo	2,78	15,02	27,54	0,48	2,67	7,04
Broza	12,14	11,94	18,72	5,87	11,19	13,12
Muerto en pie	-	-	-	8,03	1,69	3,63

## DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo permiten concluir que, aunque en menor magnitud que en ensayos realizados en invernáculo (Druille *et al.*, 2013a; Druille *et al.*, 2013b), en condiciones de campo la aplicación de glifosato también afecta negativamente a los HMA. Por un lado, el daño generado se evidencia en una reducción en el número de esporas viables, existiendo distintas sensibilidades al herbicida entre especies de HMA. Por otro lado, se detectó una disminución en el porcentaje de arbusculos, aunque esto último sólo fue encontrado en una de las dos especies evaluadas. Adicionalmente, existieron efectos significativos de la aplicación de glifosato sobre la comunidad vegetal, y sobre los niveles de salinidad edáfica. Todo lo mencionado anteriormente permite concluir que esta práctica de manejo altera el

funcionamiento de los HMA en el corto plazo y potencialmente en el largo plazo al alterar la comunidad vegetal y las condiciones edáficas.

No se detectaron efectos significativos de la aplicación de glifosato sobre la riqueza, equitatividad, diversidad (Cuadro 4.3) y número total de esporas de HMA (Fig. 4.1 A). Sin embargo, sí se evidenció una caída en la viabilidad de las esporas al analizar el efecto de este herbicida sobre la totalidad de la comunidad (Fig. 4.1 B), y sobre dos de las cuatro especies de HMA que la dominan (Fig. 4.2). Lo expuesto anteriormente indicaría que la falta de respuesta encontrada en las variables mencionadas en primer término, se debería a que las esporas expuestas al glifosato pierden viabilidad, pero permanecen externamente saludables, al menos en el corto plazo. Estos resultados permiten afirmar por un lado que la abundancia de HMA se reduce ante la aplicación de glifosato, ya que al disminuir el porcentaje de viabilidad, el número total de esporas viables se ve afectado. Por otro lado, es esperable que la estructura de la comunidad de HMA también se vea afectada, ya que la reducción en la viabilidad no fue similar entre las cuatro especies que dominan la comunidad de esporas. Ante reiteradas aplicaciones de glifosato, se podría esperar en el mediano/largo plazo una disminución en el número total de esporas, una disminución en la abundancia relativa de *S. constrictum* y *G. caledonum* y un aumento en la de *C. etunicatum* y *F. mosseae*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Sheng *et al.*(2012), quienes en un estudio realizado a campo detectaron cambios en la estructura de la comunidad de HMA ante la aplicación de glifosato, siendo *F. mosseae* la especie con menor sensibilidad a este herbicida.

La colonización radical depende de la especie hospedante (Pawłowska *et al.*, 1997; García & Mendoza, 2007; Urcelay & R., 2007); y en este caso también el efecto de la aplicación del glifosato afectó la colonización radical dependiendo si era *P. dilatatum* o *L. tenuis*. En el caso de *L. tenuis* no hubo diferencias significativas entre

plantas tratadas y no tratadas con este herbicida en el porcentaje de colonización radical total, arbusculos y vesículas (Fig. 4.3 A, B y C) a pesar de que el contenido de clorofila se vio reducido (Cuadro 4.5). Por el contrario, sí se evidenció un efecto significativo de la aplicación de glifosato sobre el porcentaje de arbusculos en *P. dilatatum* (Fig. 4.3 B) tanto en la dosis recomendada a campo como en la dosis subletal. Este efecto nulo de la aplicación de glifosato sobre el porcentaje de colonización radical coincide con otros trabajos realizados a campo (Baumgartner *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2012), pero no con los encontrados en el ensayo descrito en el capítulo 3. En este último se evidencia reducciones en el porcentaje de colonización radical total y porcentaje de arbusculos en ambas especies vegetales, incluso en la dosis subletal de glifosato ( $0,8 \text{ l.ha}^{-1}$ ). Una explicación a esta falta de concordancia puede ser el método empleado para la aplicación del herbicida. En el ensayo correspondiente al capítulo 3, el glifosato se aplicó cuidadosamente con el agua de riego (para evaluar los efectos directos) y en hojas a través de un pincel (para evaluar los efectos indirectos). Por el contrario, en el ensayo a campo la aplicación se realizó con una mochila pulverizadora, existiendo en estas condiciones mayor error experimental. Adicionalmente, cabe mencionar que las plantas del ensayo correspondiente al capítulo 3 fueron trasplantadas a macetas, poseyendo posiblemente mayor fragilidad que las plantas que se encontraban en el campo al momento de la aplicación. Además de no haber sido estresadas a causa del trasplante, las plantas del ensayo a campo están conectadas a otras plantas del pastizal a través de redes hifales (Simard *et al.*, 2012), que podrían subsidiar al menos temporalmente el C necesario para que se mantenga la colonización radical.

La aplicación de glifosato generó en el corto plazo una reducción en la cobertura vegetal, coincidiendo con lo encontrado por Rodríguez & Jacobo (2010) en lotes tratados con este herbicida durante cinco años. Este aumento en el suelo desnudo se vio

acompañado por un aumento en los niveles de salinidad en las parcelas tratadas con la dosis máxima ( $3 \text{ l.ha}^{-1}$ ) (Fig. 4. 4). Tanto la cobertura vegetal como el nivel de salinidad se estimaron a fines de primavera (diciembre). En este momento de año, el suelo descubierto alcanza temperaturas mayores respecto al suelo con cubierta vegetal, lo que genera un mayor ascenso de agua y sales solubles desde horizontes profundos como consecuencia de mayores tasas evaporativas (Lavado & Taboada, 1987; Taboada *et al.*, 2011). Estas sales quedan depositadas en superficie, y explican la mayor conductividad eléctrica encontrada en suelos tratados con la dosis máxima de glifosato.

Únicamente en la medición realizada en primavera se observaron cambios significativos en la comunidad vegetal entre las parcelas tratadas con glifosato y las parcelas testigo. La aplicación de este herbicida aumentó la equitatividad (en la dosis intermedia), y la diversidad tanto en parcelas tratadas con 0,8 como  $3 \text{ l.ha}^{-1}$ . En la medición correspondiente a verano, se observó una tendencia similar a lo ocurrido en primavera ( $P = 0,0739$  y  $P = 0,0652$  para equitatividad y diversidad, respectivamente). Si bien estos cambios se deben en parte a que la aplicación de glifosato generó un aumento en el porcentaje de *L. multiflorum* y de dicotiledóneas no leguminosas, el impacto más fuerte sobre la equitatividad y la diversidad lo explica el cambio en la cobertura de *L. arundinaceum*. En las parcelas no tratadas, esta especie dominó la comunidad vegetal, mientras que en las parcelas tratadas su cobertura fue significativamente menor. Al tratarse de una especie  $C_3$  perenne, se encuentra presente en el momento de la aplicación del herbicida (fines de verano), y esto pudo haber alterado su habilidad competitiva. Por ende, similarmente a lo que ocurre en pastizales bajo pastoreo, la menor competencia ejercida por las especies dominantes permite el aumento en cobertura de especies subordinadas (Milchunas *et al.*, 1988; Crawley, 2009). De hecho, en pastizales bajo pastoreo donde no se aplica glifosato, la cobertura

de *L. arundinaceum* se mantiene en valores relativamente bajos (Rodríguez & Jacobo, 2010; Semmartin *et al.*, 2010). El haber excluido el ganado vacuno en las parcelas de este ensayo nos limita por ende la extrapolación de las respuestas encontradas en la comunidad vegetal a pastizales bajo pastoreo, pero nos permite separar el efecto del glifosato del efecto provocado por la herbivoría sobre los HMA.

Si bien por el diseño experimental, los resultados de este ensayo no pueden ser extrapolados a todos los pastizales de la Pampa Deprimida (Hurlbert, 1984), la información generada aporta conocimiento acerca de los cambios generados en la comunidad de HMA y vegetal y las alteraciones en las propiedades edáficas como consecuencia de la aplicación de glifosato a campo. Las respuestas encontradas podrán variar entre años debido a la cobertura vegetal y el estado nutricional de las plantas al momento de la aplicación de glifosato, y a los días transcurridos entre la aplicación y las primeras precipitaciones. Adicionalmente, se destaca la importancia de considerar la viabilidad y no sólo el número de esporas al evaluar el efecto de un agroquímico sobre los HMA, ya que como se observó, las mismas pueden estar muertas pero mantener un aspecto externo saludable luego de la aplicación del tratamiento.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

La información generada en esta tesis aporta al conocimiento acerca del impacto de la aplicación de glifosato sobre los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), desde un enfoque teórico y un enfoque práctico. El primero está relacionado con el hecho de que hasta el momento no se conocía con claridad la existencia de efectos directos de este herbicida sobre la colonización radical, la viabilidad de las esporas y la estructura de la comunidad de los HMA, ni la existencia de efectos indirectos mediado por cambios en el vigor de la planta hospedante. Como se mencionó anteriormente, los estudios previos han evaluado el efecto del glifosato en monocultivos (principalmente soja), y en su mayoría sólo evaluaron el porcentaje de colonización radical. La información acerca del impacto del glifosato sobre las esporas de HMA es muy escasa, y a excepción de un trabajo (Sheng *et al.*, 2012), el análisis se ha realizado sólo en medios de cultivo. Por otro lado, el enfoque práctico hace referencia puntualmente a la promoción de *Lolium multiflorum* en estos pastizales. Si bien el diseño experimental del ensayo a campo no permite realizar inferencias sobre lo que el uso de este herbicida generaría en todos los pastizales de la Pampa Deprimida (Hurlbert, 1984), la información que surge de esta tesis podrá utilizarse al momento de generar estrategias de manejo más sustentable en estos sistemas.

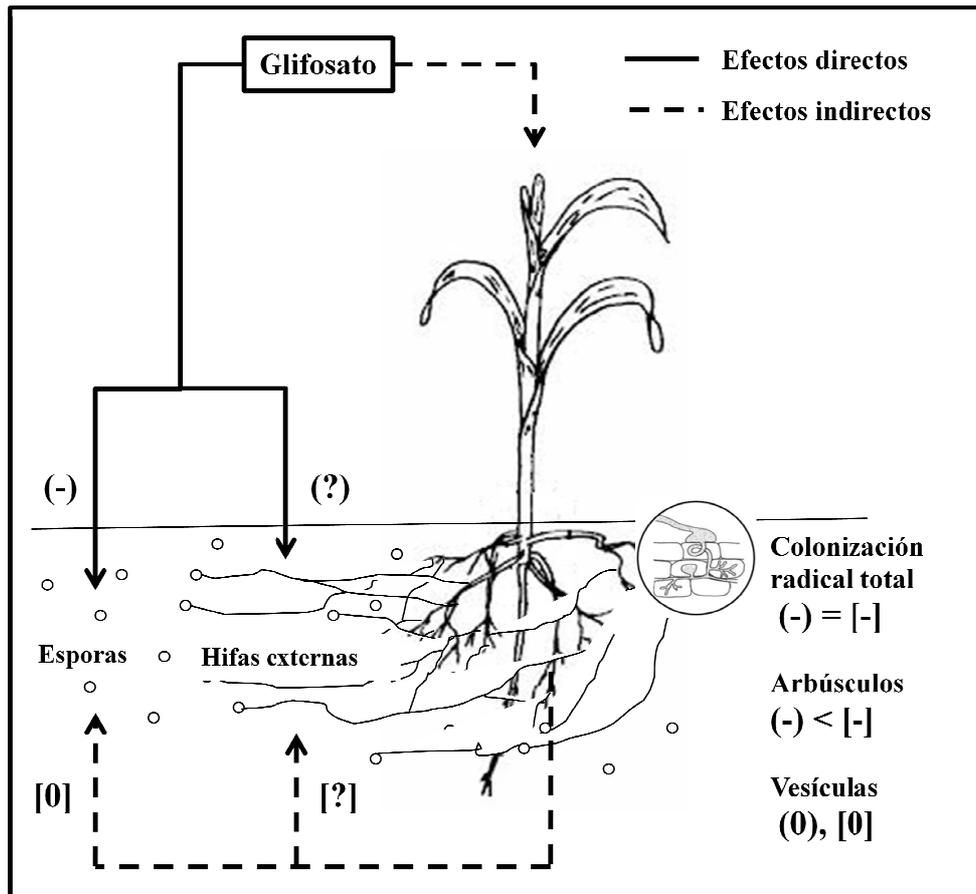
Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron tres ensayos manipulativos para lograr objetivos específicos. El **objetivo 1** fue evaluar los efectos directos del glifosato sobre la viabilidad de las esporas de HMA, y la capacidad de éstas de colonizar raíces en suelos tratados con este herbicida. Los resultados obtenidos permitieron apoyar la hipótesis planteada, que postulaba que el glifosato disminuye la viabilidad de las esporas de HMA y esto repercute negativamente sobre la colonización radical. El **objetivo 2** fue discriminar, mediante bioensayo en invernadero, los efectos directos del glifosato sobre los HMA de los indirectos, mediados por cambios

producidos en la planta hospedante. Nuevamente, los resultados del ensayo permitieron aceptar la hipótesis de que la aplicación de este herbicida perjudica a los HMA tanto directamente, al tomar contacto con esporas e hifas externas, como indirectamente, a través de cambios generados en la planta hospedante. Por último, el **objetivo 3** de la tesis fue analizar a campo el efecto de la aplicación de glifosato sobre el número, diversidad y viabilidad de esporas de HMA, el porcentaje de colonización radical, la estructura de la vegetación y la salinidad del suelo. En este caso, el número y diversidad de esporas de HMA y la colonización radical no se vieron afectadas por la aplicación de glifosato, pero si se detectó una disminución en la viabilidad de esporas y una reducción en el porcentaje de arbusculos en *Paspalum dilatatum*. Las parcelas tratadas con la dosis máxima de glifosato presentaron un aumento en la cobertura de especies dicotiledóneas no-leguminosas, y un mayor porcentaje de suelo desnudo y salinidad. Los resultados mencionados anteriormente, respaldan la **hipótesis general** propuesta en el Capítulo 1, ya que el glifosato afectó negativamente a los HMA a través de dos vías: directamente sobre las estructuras del hongo expuestas al herbicida, e indirectamente al dañar el vigor de la planta hospedante. Sin embargo, los efectos indirectos no variaron en función de la identidad de la planta hospedante (a excepción del efecto del glifosato sobre el porcentaje de arbusculos en el ensayo a campo). A continuación se describirán brevemente los resultados más relevantes de cada uno de los capítulos experimentales, y los interrogantes que surgen a partir de esta tesis.

Los resultados correspondientes al ensayo 1 (realizado para lograr el objetivo 1) mostraron un claro efecto negativo de la aplicación de glifosato sobre las esporas de HMA, incluso en la dosis subletal para las plantas de *L. multiflorum*. La viabilidad de las esporas en suelos sin aplicación de este herbicida fue entre 5,8 y 7,7 veces mayor que en suelos tratados. Esta disminución en el número de esporas, una de las tres

fuentes de propágulos de HMA en los suelos, repercutió posteriormente en el porcentaje de colonización radical en plantas de *L. multiflorum* que fueron sembradas 10 y 30 días post-aplicación. Resultados similares fueron reportados por Ronco *et al.* (2008) en plantas de pimiento sembradas en suelos tratados con 0,4 y 4 l.ha<sup>-1</sup> de glifosato, pero no con lo encontrado por Maly *et al.* (2006) en plantas de soja sembradas en suelos tratados con 10 l.ha<sup>-1</sup>. Esta discordancia entre los distintos trabajos puede ser atribuible por un lado a la identidad de la planta hospedante (con distintas dependencias micorrícicas), y por otro lado a las distintas especies de HMA que fueron utilizadas para evaluar estos efectos del glifosato. Independientemente de lo que ocurra en otros sistemas, con la información generada en este ensayo se puede inferir que, en suelos tratados con glifosato, la funcionalidad de la simbiosis se verá afectada en los pastizales naturales de la Pampa Deprimida. Considerando que en estos suelos el contenido de P es bajo (García *et al.*, 2002), y por ende la simbiosis con HMA es relevante, un menor número de propágulos podría afectar el crecimiento de las especies con más dependencia micorrícica y alterar la estructura de la comunidad vegetal.

En la figura 5.1 se resumen los resultados que surgieron del ensayo 2, realizado con el objetivo de discriminar los efectos directos e indirectos de la aplicación de glifosato sobre los HMA. Se utilizaron dos especies de plantas pertenecientes a distintos grupos funcionales para evaluar los efectos indirectos, pensando en que la identidad del hospedante podría influir en las respuestas encontradas. Si bien existió un efecto significativo de la especie vegetal (*Lotus tenuis* presentó mayores valores de colonización radical y porcentaje de arbusculos que *P. dilatatum*), ambas especies respondieron de la misma manera ante la aplicación de glifosato. Por lo tanto en el esquema de la figura 5.1, si bien se representa a la gramínea, el mensaje es igualmente aplicable a la leguminosa.



**Figura 5.1.** Efectos directos e indirectos del glifosato sobre los HMA. Las líneas continuas y signos entre paréntesis corresponden a los efectos directos del herbicida sobre las esporas e hifas externas. Las líneas discontinuas y signos entre corchetes indican los efectos indirectos a corto plazo causados por cambios en la planta hospedante, que afectan a las estructuras internas de hongos (hifas, arbusculos y vesículas) y/o a las esporas e hifas externas.

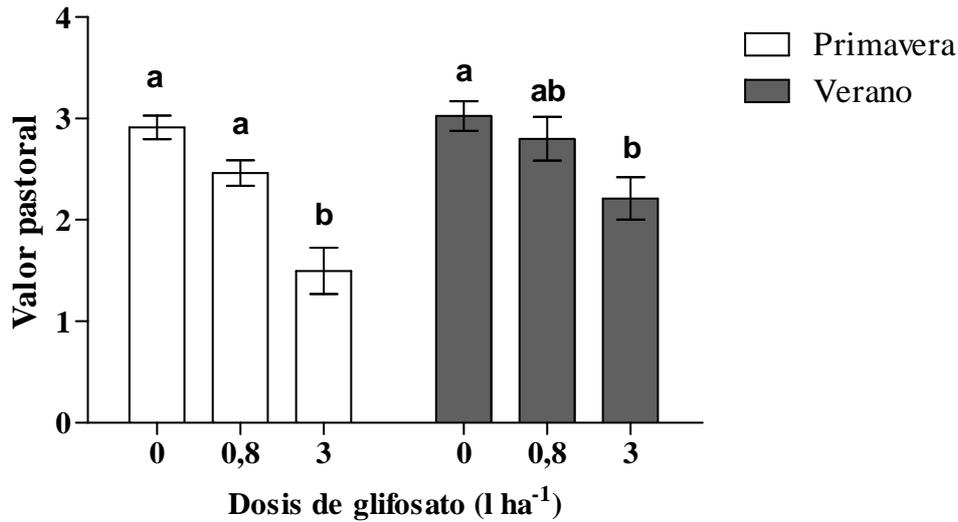
El efecto negativo de la aplicación de glifosato sobre la viabilidad de esporas de HMA sólo se manifestó a través de la vía directa. La ausencia de efectos indirectos significaría que si bien el glifosato puede llegar a la rizósfera a través de exudados radicales (Neumann *et al.*, 2006), la cantidad no sería suficiente como para afectar la viabilidad de las esporas. La colonización radical total fue afectada tanto directa como indirectamente por el glifosato, y en la misma magnitud. Sin embargo, las causas de esta reducción serían distintas. El efecto directo se debería al efecto tóxico que este herbicida

causa sobre las esporas y posiblemente sobre las hifas externas (esto último no fue medido), que llevó a una menor colonización radical. Nuestra aproximación experimental no permite descartar la posible toxicidad de este herbicida sobre otros microorganismos edáficos que estén involucrados en la funcionalidad de la simbiosis (Siddiqui & Akhtar, 2008; Pivato *et al.*, 2009). El efecto indirecto, por su parte, se debería al menor flujo de C destinado a las estructuras internas del hongo, como consecuencia de la pérdida de biomasa verde y contenido de clorofila en plantas tratadas con glifosato. En relación al porcentaje de arbusculos, la respuesta fue similar a la detallada para la colonización radical total, con la diferencia que en este caso los efectos indirectos fueron mayores que los directos. Cabe resaltar que en los trabajos en los cuales encontraron efectos nulos del glifosato sobre la colonización radical (Mujica *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2009; Savin *et al.*, 2009), se utilizaron plantas hospedantes genéticamente modificadas para resistir a este herbicida. Por ende, el vigor de esas plantas no se modifica al ser tratadas, y tampoco el flujo de C hacia el hongo dentro de la raíz. Por último, las vesículas no fueron afectadas directa ni indirectamente por la aplicación de glifosato.

El ensayo 3 se realizó a campo, y permitió una evaluación tanto de la comunidad de HMA como de la vegetal en condiciones no controladas. Si bien a los 15 días post-aplicación de glifosato no se evidenciaron cambios en el número y diversidad de esporas, sí se detectó una disminución en su viabilidad. La reducción en el porcentaje de viabilidad no fue igual en las cuatro especies de HMA que dominan la comunidad, lo que permite inferir que la estructura de la comunidad será afectada ante reiteradas aplicaciones de este herbicida. A diferencia de lo ocurrido en el ensayo 2, el porcentaje de colonización radical no se diferenció en plantas de *L. tenuis* y *P. dilatatum* tratadas y no tratadas con glifosato (sólo en *P. dilatatum* se observó una reducción en el

porcentaje de arbúsculos). Esto coincide con trabajos previos realizados a campo con distintas especies de plantas hospedantes (Baumgartner *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2012). Por un lado, podría estar explicado por un mayor error experimental al momento de la aplicación del glifosato en comparación con estudios realizados en invernáculo. Por otro lado, esto podría deberse al hecho de que las plantas del ensayo a campo están conectadas a otras plantas del pastizal a través de redes hifales, que podrían subsidiar, al menos temporalmente, el C necesario para que se mantenga la colonización radical (Simard *et al.*, 2012).

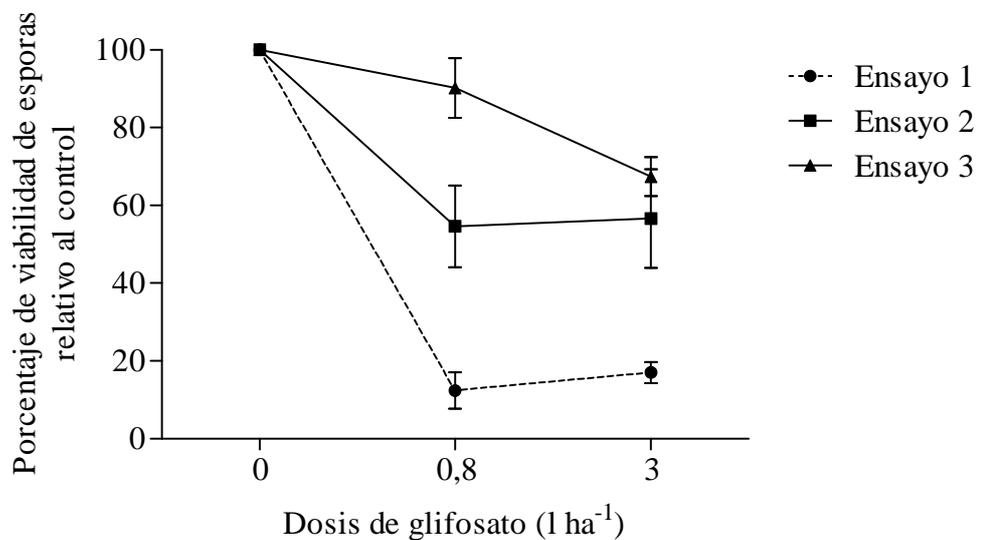
La estructura de la comunidad vegetal fue alterada por la aplicación de glifosato a fines de primavera, con un aumento de la cobertura de dicotiledóneas no leguminosas y suelo desnudo en parcelas tratadas con la dosis recomendada a campo ( $3 \text{ l.ha}^{-1}$ ). El mayor porcentaje de suelo desnudo se asoció con un aumento en su salinidad, lo que podría llevar en el largo plazo a cambios en la comunidad de HMA directamente al modificarse las propiedades edáficas (Anderson *et al.*, 1984; Porter *et al.*, 1987; Treseder, 2004; Isobe *et al.*, 2007) o indirectamente al modificarse la comunidad vegetal (Bever, 1999). Si bien no fue objetivo de esta tesis evaluar el impacto de la aplicación de glifosato sobre el subsistema ganadero, cabe destacar que este cambio en la estructura de la comunidad vegetal podría conducir a reducciones en la calidad de la oferta forrajera primavero-estival. Si se afecta la proporción de cada especie vegetal en la muestra por su valor de calidad específico para estimar el valor pastoral (los mismos toman valores entre 0 y 5 correspondiendo a situaciones de nula o excelente calidad forrajera, respectivamente) (Daget & Poissonnet, 1971), se observa que este valor es reducido cuando se aplica glifosato, tanto cuando la comunidad es dominada por especies de ciclo otoño-invierno-primaveral como cuando las dominantes son las de ciclo primavero-estivo-otoñal (Fig. 5.2).



**Figura 5.2.** Valor pastoral de las parcelas tratadas con distintas dosis de glifosato (0, 0,8 y 3 l.ha<sup>-1</sup>) registrado en la primavera de 2012 (comunidad dominada por especies de ciclo otoño-invierno-primaveral) y el verano de 2013 (comunidad dominada por especies de ciclo primavero-estivo-otoñal). Los valores de calidad para las especies del pastizal bajo estudio fueron extraídos del trabajo de Cahuepe *et al.* (1985). Las barras representan las medias  $\pm$  E.E. de diez repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (prueba de Tukey;  $p < 0,05$ ).

En conclusión, los resultados de esta tesis permiten confirmar, por un lado, que existe un efecto directo y negativo de la aplicación de glifosato sobre la viabilidad de esporas de HMA. Esta respuesta fue consistente en los tres ensayos, aunque su magnitud varió en relación al grado de disturbio del suelo y de control sobre las variables ambientales. En la figura 5.3 se puede observar que la reducción en la viabilidad de esporas en suelos tratados con glifosato fue menor a medida que el grado de disturbio en el suelo y el control sobre el ambiente fue menor. Respecto a esto último, en el primer ensayo se realizó un riego post-aplicación de glifosato, y en el segundo, el glifosato se incorporó con agua de riego en el tratamiento correspondiente. Esto garantizó un contacto entre el herbicida y las esporas de HMA mucho más eficiente que el logrado en el tercer ensayo, en el que no se realizó riego, y la cantidad

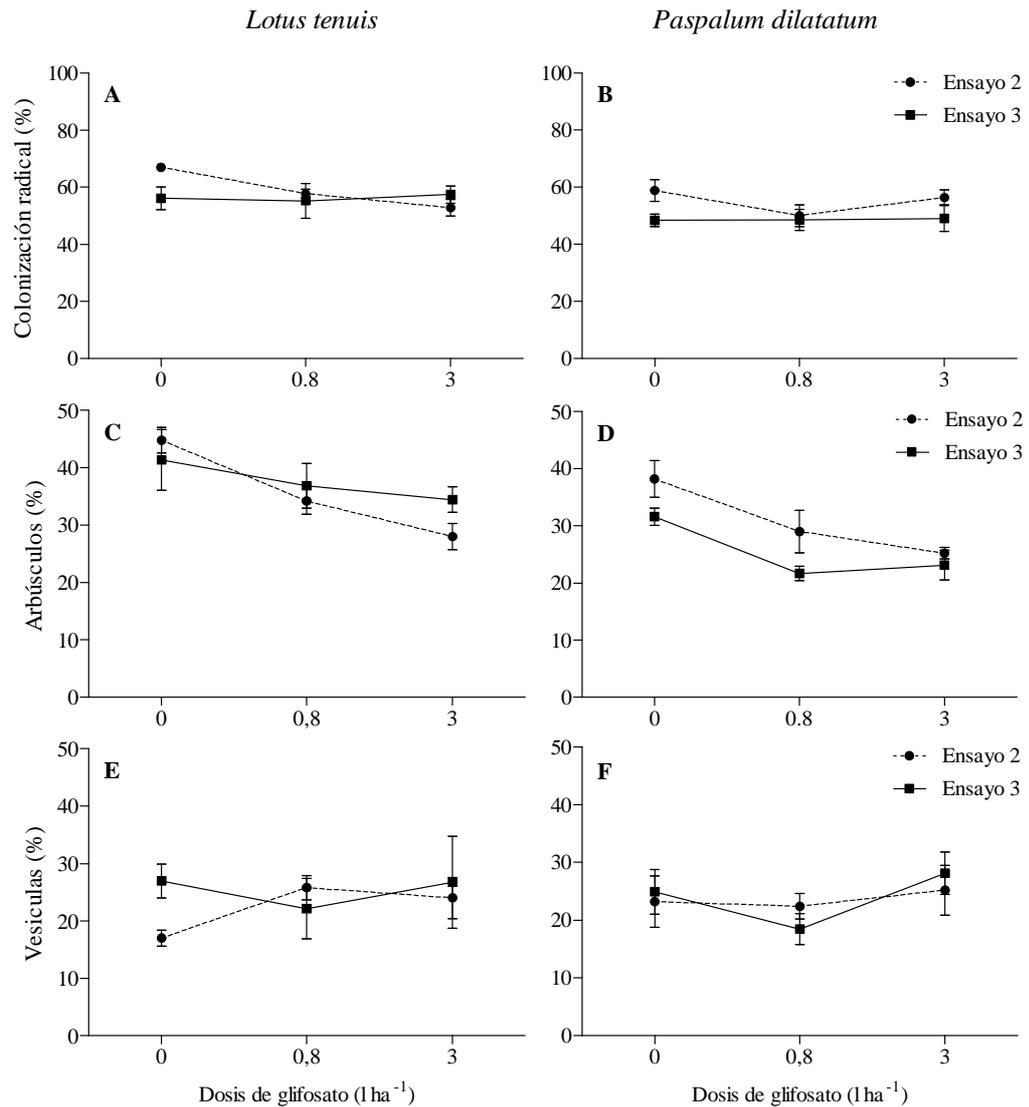
de glifosato que alcanzó el suelo y las esporas de HMA dependió de la cobertura vegetal al momento de la aplicación y de los días transcurridos entre ésta y las primeras precipitaciones. Debido a lo mencionado anteriormente, debe considerarse que las respuestas encontradas en este ensayo pueden variar entre años y entre pastizales con distinta cobertura vegetal.



**Figura 5.3.** Variación en el porcentaje de viabilidad de esporas expuestas a distintas dosis de glifosato en los tres ensayos realizados en la tesis. Ensayo 1: aplicación directa del glifosato sobre el suelo previamente tamizado, con riego post-aplicación. Ensayo 2: Aplicación del glifosato diluido en el agua de riego, en macetas con plantas trasplantadas provenientes del pastizal junto con su suelo asociado. Ensayo 3: Aplicación de glifosato a campo, sin riego alguno. Las barras representan el error estándar.

Por otro lado, los atributos de la colonización radical también dependieron del grado de disturbio y control del ambiente. La colonización radical total tanto en *L. tenuis* como en *P. dilatatum* fue afectada en el ensayo realizado en invernáculo (ensayo 2), incluso cuando se aplicó la dosis subletal. Sin embargo estas respuestas no se detectaron en el ensayo realizado a campo (Fig. 5.4 A y B). Algo similar ocurrió con el

porcentaje de arbusculos, aunque en este caso la aplicación de 3 l.ha<sup>-1</sup> de glifosato sí lo afectó en plantas de *P. dilatatum* (Fig. 5.4 C y D). Como se explicó anteriormente, esta respuesta diferencial entre plantas hospedantes puede deberse por un lado a la mayor exposición al herbicida que posee la gramínea debido a su porte erecto, en relación a la leguminosa, de porte postrado. Por otro lado, la respuesta de estos hongos a los tratamientos químicos (Jalali & Domsch, 1975) u otros estreses puede variar según la planta hospedante, dependiendo de su dependencia micorrícica. Por último, el porcentaje de vesículas no se vio afectado por el glifosato en ninguna de las plantas hospedantes y en ninguna de las dosis evaluadas, y eso coincidió en ambos ensayos (Fig. 5.4 E y F).



**Figura 5.4.** Porcentaje de colonización radical, arbúsculos y vesículas en plantas de *L. tenuis* (A, C y E) y *P. dilatatum* (B, D y F) tratadas con distintas dosis de glifosato, correspondientes al ensayo 2 (en invernáculo, líneas discontinuas) y al ensayo 3 (a campo, líneas continuas).

Es importante remarcar que si bien la colonización radical y la esporulación pueden recuperarse rápidamente luego del estrés producido por un pesticida, la tasa de recuperación dependerá de la especie de HMA (An *et al.*, 1993). Teniendo en cuenta además que el impacto del glifosato sobre la viabilidad de esporas dependió de la especie de HMA (Figura 4.2), se puede inferir que en el mediano plazo la comunidad de

HMA se verá alterada, con posibles repercusiones sobre la comunidad vegetal (van der Heijden *et al.*, 1998b; Bever, 1999).

En condiciones de campo la colonización radical no se modificó, pero sí lo hizo la viabilidad de esporas. Este efecto diferencial se podría tener en cuenta para la práctica cultural de la promoción de *L. multiflorum* en estos sistemas. Sería conveniente garantizar la mayor cobertura vegetal posible. Esto permitiría reducir la probabilidad de que el producto alcance la superficie del suelo, asegurando que el número de esporas viables no se vea comprometido. Sin embargo, la aplicación de glifosato se realiza a fines de verano, lo que genera una reducción en la cobertura no sólo de especies invernales perennes, sino también en la de especies estivales, como *L. tenuis* y *P. dilatatum*, y un aumento en el porcentaje de suelo desnudo (Rodríguez & Jacobo, 2010). En el largo plazo, esto generaría un aumento en la frecuencia de efectos negativos directos del herbicida sobre los HMA.

*L. tenuis* y *P. dilatatum* aportan volumen y calidad a la dieta animal (Hidalgo & Rimoldi, 1992; Hidalgo *et al.*, 1998; Vignolio *et al.*, 2013), por ende las áreas de pastizal tratadas con glifosato podrían presentar reducciones en la capacidad de carga, por una disminución de la oferta forrajera estival. Suspender las aplicaciones de glifosato en pastizales ya deteriorados por esta práctica de manejo, podría permitir a lo largo del tiempo un aumento de la cobertura vegetal. Sin embargo debe tenerse en cuenta que, en suelos con bajo número y diversidad de propágulos de HMA, la recuperación de *L. tenuis* y *P. dilatatum* podría resultar comprometida, ya que estarían en desventaja competitiva en relación a especies de menor dependencia micorrícica (como dicotiledóneas no leguminosas y gramíneas C<sub>3</sub>).

La distinta sensibilidad al glifosato que presentan las especies de HMA, podría derivar en una disminución de la diversidad de estos simbiontes en pastizales naturales tratados anualmente con el herbicida. Esto, sumado a la disminución en la diversidad vegetal (Rodríguez & Jacobo, 2010), y a los efectos tóxicos reportados en otros componentes del ecosistema (v.g. Reddy *et al.*, 2000; Relyea, 2005; Casabé *et al.*, 2007), permite prever consecuencias negativas de esta práctica de manejo sobre aspectos que exceden al meramente productivo mencionado en el párrafo anterior. Por un lado, se ha demostrado que la pérdida de biodiversidad en las comunidades conlleva a disminuciones tanto en su estabilidad, como en las eficiencias de captura de nutrientes, descomposición y reciclado de nutrientes (Tilman & Downing, 1994; Hart & Klironomos, 2003; Tilman *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*, 2012). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que la biodiversidad y su vínculo con las propiedades ecosistémicas poseen un valor cultural, intelectual, estético y espiritual para la sociedad (Chapin *et al.*, 2000).

### **Nuevos interrogantes que surgen de la tesis**

En este trabajo no se estudiaron los posibles mecanismos a través de los cuales la aplicación de glifosato afecta las distintas estructuras de los HMA. Este herbicida fue considerado inofensivo para los organismos no-blanco debido a una supuesta rápida inactivación como consecuencia de una fuerte adsorción de su principio activo a las partículas del suelo y a una rápida degradación (Baylis, 2000; Giesy *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001; Gimsing *et al.*, 2004b; Vereecken, 2005). Sin embargo, estudios recientes han demostrado posible lixiviación, y problemas de toxicidad del glifosato (Veiga *et al.*, 2001; Strange-Hansen *et al.*, 2004; Kjaer *et al.*, 2005; Landry *et al.*, 2005; Relyea, 2005;

Borggaard & Gimsing, 2008) y debe ser considerado como un posible mecanismo involucrado en las respuestas encontradas ya que, como se mencionó anteriormente, la enzima EPSPS también se ha encontrado en bacterias y hongos (Padgett *et al.*, 1995). También podría existir un efecto tóxico generado por alguno de los productos de su degradación (como el AMPA), tal como se encontró en semillas de trigo (Barry, 2009), o por alguno de los aditivos utilizados en la formulación. Con respecto a estos últimos, se han reportado casos de toxicidad provocados por surfactantes (como POEA en Roundup<sup>®</sup>), no encontrándose los mismos efectos con glifosato solo (Howe *et al.*, 2004; Peixoto, 2005; Brausch & Smith, 2007). Por lo tanto, se requieren futuras investigaciones que consideren lo mencionado anteriormente, ya que podrían afectar a los HMA y/o a otros microorganismos edáficos relacionados con la funcionalidad de la simbiosis.

La adsorción y degradación del glifosato presenta una gran variación dependiendo de la composición del suelo y sus propiedades (de Jonge *et al.*, 2001; Gimsing *et al.*, 2004a; Sørensen *et al.*, 2006; Gimsing *et al.*, 2007). En los tres ensayos realizados en esta tesis, se utilizó suelo proveniente de un pastizal natural con la comunidad vegetal correspondiente a la pradera húmeda de mesófitas (Perelman *et al.*, 2001). Se trata de suelos Natracuales, con un horizonte superficial poco profundo y un horizonte muy rico en arcillas (más del 50%) a poca profundidad. Debería considerarse en futuras investigaciones el uso de otros tipos de suelo, con diferentes características de textura, pH y materia orgánica, ya que esto podría modificar las respuestas encontradas en esta tesis.

Por último, en esta tesis no se evaluó si los cambios generados en la comunidad de HMA están involucrados en cambios en la comunidad vegetal de estos pastizales, e incluso en las interacciones entre ésta y los microorganismos fijadores de N. Las

modificaciones en la vegetación detectadas por Rodríguez & Jacobo (2010) se han asociado a los distintos niveles de tolerancia al glifosato que poseen las especies que componen la comunidad vegetal, y a su actividad fisiológica al momento de la aplicación. Sin embargo, cambios en la comunidad de HMA podrían generar modificaciones en la capacidad de establecimiento de plántulas y en las habilidades competitivas entre las especies vegetales, que conlleven a cambios en la comunidad vegetal. En el caso de las leguminosas, la reducción en la funcionalidad de los HMA generada por el glifosato podría reducir su habilidad competitiva no sólo por la mayor dependencia micorrícica en relación con las especies no leguminosas (Cooperband *et al.*, 1994; Scheublin *et al.*, 2007), sino que también se estaría afectando la fijación de  $N_2$ . Se ha demostrado que la presencia de un simbionte afecta la actividad del otro, y la interacción de ambos puede ser detectada en la planta hospedante (Larimer *et al.*, 2010). En condiciones de laboratorio, se ha encontrado que el número y peso de los nódulos y la fijación de  $N_2$  fue mayor en plantas de soja micorrizadas que en plantas no micorrizadas (Goss & de Varennes, 2002). Esta información es necesaria para un mejor entendimiento del rol de los HMA como determinantes de la comunidad vegetal en pastizales de la Pampa Deprimida.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abba AM, Vizcaíno SF. 2011.** Distribución de los armadillos (Xenarthra: Dasypodidae) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozoología neotropical* **18**(2): 185-206.
- Abbott LK, Robson AD. 1991.** Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **35**(2-3): 121-150.
- Abbott LK, Robson AD, Gazey C 1992.** Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK eds. *Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 1-21.
- Afek U, Menge JA, Johnson ELV. 1991.** Interaction among mycorrhizae, soil solarization, metalaxyl, and plants in the field. *Plant Disease* **75**: 665–671.
- Alguacil MDM, Lozano Z, Campoy MJ, Roldán A. 2010.** Phosphorus fertilisation management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(7): 1114-1122.
- Allen MF. 1987.** Re-establishment of mycorrhizas on Mount St Helens: Migration vectors. *Transactions of the British Mycological Society* **88**(3): 413-417.
- Allen MF. 1991.** *The ecology of mycorrhizae*. New York: Cambridge University Press.
- Amrhein N, Schab J, Steinrücken HC. 1980.** The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften* **67**: 356–357.
- An ZQ, Guo BZ, Hendrix JW. 1998.** Viability of soilborne spores of glomalean mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **30**(8-9): 1133-1136.
- An ZQ, Hendrix JW. 1988.** Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* **80**(2): 259-261.
- An ZQ, Hendrix JW, Hershman DE, Ferriss RS, Henson GT. 1993.** The influence of crop rotation and soil fumigation on a mycorrhizal fungal community associated with soybean. *Mycorrhiza* **3**(4): 171-182.

- Anderson RC, Liberta AE, Dickman LA. 1984.** Interaction of vascular plants and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture-nutrient gradient. *Oecologia* **64**(1): 111-117.
- Aubin AJ, Smith AE. 1992.** Extraction of [<sup>14</sup>C]glyphosate from Saskatchewan soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**(7): 1163-1165.
- Bardgett RD, Wardle DA, Yeates GW. 1998.** Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. *Soil Biology and Biochemistry* **30**(14): 1867-1878.
- Barea JM, Werner D, Azcón-Guilar C, Azcón R 2005.** Interactions of Arbuscular Mycorrhiza and Nitrogen-Fixing Symbiosis in Sustainable Agriculture. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*: Springer Netherlands, 199-222.
- Barnes TG. 2007.** Using Herbicides to Rehabilitate Native Grasslands. *Natural Areas Journal* **27**(1): 56-65.
- Barry GF 2009.** Plants and plant cells exhibiting resistance to AMPA, and methods for making the same. United States Patent 7554012.
- Baumgartner K, Fujiyoshi P, Smith R, Bettiga L. 2010.** Weed flora and dormant-season cover crops have no effects on arbuscular mycorrhizae of grapevine. *Weed Research* **50**(5): 456-466.
- Baylis AD. 2000.** Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* **56**(4): 299-308.
- Baylis GTS. 1970.** Root hairs and phycomycetous mycorrhizas in phosphorus-deficient soil. *Plant and Soil* **33**(1-3): 713-716.
- Berg G. 2009.** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**(1): 11-18.
- Bethlenfalvay GJ, Dakessian S. 1984.** Grazing Effects on Mycorrhizal Colonization and Floristic Composition of the Vegetation on a Semiarid Range in Northern Nevada. *Journal of Range Management* **37**(4): 312-316.

- Bethlenfalvay GJ, Dakessian S, Pacovsky RS. 1984.** Mycorrhizae in a southern California desert: ecological implications. *Canadian Journal of Botany* **62**(3): 519-524.
- Bethlenfalvay GJ, Evans RA, Lesperance AL. 1985.** Mycorrhizal Colonization of Crested Wheatgrass as Influenced by Grazing. *Agron. J.* **77**(2): 233-236.
- Bever JD. 1999.** Dynamics within mutualism and the maintenance of diversity: inference from a model of interguild frequency dependence. *Ecology Letters* **2**(1): 52-61.
- Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA. 1996.** Host-Dependent Sporulation and Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in a Mown Grassland. *Journal of Ecology* **84**(1): 71-82.
- Bonfante P, Perotto S. 1995.** Tansley Review No. 82 Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi when Infecting Host Plants. *New Phytologist* **130**(1): 3-21.
- Borggaard OK, Gimsing AL. 2008.** Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* **64**(4): 441-456.
- Bott S, Tesfamariam T, Kania A, Eman B, Aslan N, Römheld V, Neumann G. 2011.** Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation. *Plant and Soil* **342**(1): 249-263.
- Braunberger PG, Miller MH, Peterson RL. 1991.** Effect of phosphorus nutrition on morphological characteristics of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytologist* **119**(1): 107-113.
- Brausch J, Smith P. 2007.** Toxicity of Three Polyethoxylated Tallowamine Surfactant Formulations to Laboratory and Field Collected Fairy Shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**(2): 217-221.
- Brundrett MC. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**(2): 275-304.
- Brundrett MC. 2009.** Mycorrhizas in Natural Ecosystems. *Advances in Ecological Research* **21**: 171-313.

- Burkart SE, León RJC, Movia CP. 1990.** Inventario fitosociológico del pastizal de la depresión del Salado (Prov. Bs. As.) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana* **30**: 27-69.
- Burrows RL, Pflieger FL. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Canadian Journal of Botany* **80**(2): 120-130.
- Busse MD, Ratcliff AW, Shestak CJ, Powers RF. 2001.** Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **33**(12-13): 1777-1789.
- Cabello MN, Gaspar L, Pollero RJ. 1994.** *Glomus antarcticum* sp. nov., a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus from Antarctica. *Mycotaxon* **51**(4): 123-128.
- Cahuepe MA, Hidalgo MG, Galatoire A. 1985.** Aplicación de índice de valoración zootécnica en pastizales de la Depresión del Salado. *Revista Argentina de Producción Animal* **5**: 681-690.
- Camargo-Ricalde SL. 2002.** Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Boletín de la Sociedad botánica de México* **71**: 33-44.
- Canfield RH. 1941.** Application of the Line Interception Method in Sampling Range Vegetation. *Journal of Forestry* **39**(4): 388-394.
- Cardinale BJ, Duffy JD, Gonzalez A, Hooper DU, Perrings C, Venail P, Narwani A, Mace GM, Tilman D, Wardle DA, Kinzig AP, Daily GC, Loreau M, Grace JB, Larigauderie A, Srivastava DS, Naeem S. 2012.** Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* **486**: 59-67.
- Carr GR, Hinkley MA. 1985.** Germination and hyphal growth of *Glomus caledonium* on water agar containing benomyl. *Soil Biology and Biochemistry* **17**(3): 313-316.
- Caruso T, Rillig MC, Garlaschelli D. 2012.** On the application of network theory to arbuscular mycorrhizal fungi–plant interactions: the importance of basic assumptions. *New Phytologist* **194**(4): 891-894.
- Casabé N, Piola L, Fuchs J, Oneto M, Pamparato L, Basack S, Giménez R, Massaro R, Papa J, Kesten E. 2007.** Ecotoxicological assessment of the effects

of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments* **7**(4): 232-239.

**Cooperband L, Boerner RJ, Logan T. 1994.** Humid tropical leguminous tree and pasture grass responsiveness to vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. *Mycorrhiza* **4**(5): 233-239.

**Crawley MJ 2009.** Plant–Herbivore Dynamics. *Plant Ecology*: Blackwell Publishing Ltd., 401-474.

**Chambers CA, Smith SE, Smith FA. 1980.** Effects of Ammonium and Nitrate Ions on Mycorrhizal Infection, Nodulation and Growth of *Trifolium subterraneum*. *New Phytologist* **85**(1): 47-62.

**Chapin FSI, Zavaleta ES, V.T. E, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper DU, Lavorel S, Sala OE, Hobbie SE, Mack MC, Díaz S. 2000.** Consequences of changing biodiversity. *Nature* **405**: 234-242

**Daget P, Poissonnet P. 1971.** Une méthode d'analyse phytosociologique des prairies. Critères d'application. *Annales Agronomiques* **22**: 5-41.

**Daniels Hetrick BA 1984.** The ecology of VA mycorrhizal fungi. In: Powell CL, Bagyaraj DJ eds. *VA Mycorrhiza*. Florida: CRC Press, Boca Raton, 35-36.

**Davies FT, Potter JR, Linuerman RG. 1993.** Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration - response in gas exchange and water relations. *Physiologia Plantarum* **87**(1): 45-53.

**de Jonge H, de Jonge LW, Jacobsen OH, Yamaguchi T, Moldrup P. 2001.** Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science* **166**(4): 230-238.

**Deregibus VA, Jacobo E, Rodriguez A. 1995.** Perspective: Improvement in rangeland condition of the Flooding Pampa of Argentina through controlled grazing. *African Journal of Range & Forage Science* **12**(2): 92-96.

**Douglas AE. 2010.** *The symbiotic habit*. Princeton: Princeton University Press.

**Druille M, Cabello MN, Omacini M, Golluscio RA. 2013a.** Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* **64**(0): 99-103.

- Druille M, Omacini M, Golluscio RA, Cabello MN. 2013b.** Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology* **72**: 143-149.
- Duke SO 1988.** Glyphosate. In: Kearney PC, D.D. K eds. *Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action*. New York: Marcel Dekker, 1-70.
- Eom AH, Hartnett DC, Wilson GWT. 2000.** Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* **122**(3): 435-444.
- Escudero V, Mendoza R. 2005.** Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. *Mycorrhiza* **15**(4): 291-299.
- Etchevehere P. 1961.** Bosquejo de regiones geomorfológicas y de drenaje de la República Argentina. *IDIA* **162**: 7-25.
- Feng JC, Thompson DG. 1990.** Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2. Persistence in foliage and soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**(4): 1118-1125.
- Fernandez Grecco R. 2000.** Promoción de raigrás anual en un pastizal natural de la Pampa Deprimida bonaerense. *Revista Argentina de Producción Animal* **20**(1): 165-166.
- Fernández ON, Pereira M, Agnusdei M, Colabelli M, Vignolio OR 2008.** Degradación de pastizales asociada a la promoción de raigrás en la Pampa Deprimida. *31 Congreso Argentino de Producción Animal*. Potrero de Los Funes, San Luis. 395-396.
- Ferraro DO, Oosterheld Mn. 2002.** Effect of Defoliation on Grass Growth. A Quantitative Review. *Oikos* **98**(1): 125-133.
- Fleischer WE. 1935.** The relation between chlorophyll content and rate of photosynthesis. *The Journal of General Physiology* **18**(4): 573-597.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA 1997.** Glyphosate: A Unique Global Herbicide. *American Chemical Society Monograph*. Washington, DC: American Chemical Society.

- Gange AC, Brown VK, Farmer LM. 1990.** A test of mycorrhizal benefit in an early successional plant community. *New Phytologist* **115**(1): 85-91.
- Gange AC, Brown VK, Sinclair GS. 1993.** Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Determinant of Plant Community Structure in Early Succession. *Functional Ecology* **7**(5): 616-622.
- Gange AC, Lindsay DE, Ellis LS. 1999.** Can arbuscular mycorrhizal fungi be used to control the undesirable grass *Poa annua* on golf courses? *Journal of Applied Ecology* **36**(6): 909-919.
- Garbaye J. 1994.** Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **128**(2): 197-210.
- García F, Micucci F, Rubio G, Rufo M, Daverede I. 2002.** *Fertilización de forrajes en la Región Pampeana: Una revisión de los avances en el manejo de la fertilización de pasturas, pastizales y verdeos.* Acassuso, Buenos Aires: INPOFOS Cono Sur.
- García I, Mendoza R. 2012.** Impact of defoliation intensities on plant biomass, nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus tenuis* growing in a saline-sodic soil. *Plant Biology* **14**(6): 964-971.
- García IV, Mendoza R. 2007.** Arbuscular mycorrhizal fungi and plant symbiosis in a saline-sodic soil. *Mycorrhiza* **17**(3): 167-174.
- Gehring C, Bennett A. 2009.** Mycorrhizal Fungal-Plant-Insect Interactions: The Importance of a Community Approach \*. *Environmental Entomology* **38**(1): 93-102.
- Gehring CA, Whitham TG 2002.** Mycorrhiza–herbivore interactions: population and community consequences. In: van der Heijden MGA, Sanders IR eds. *Mycorrhizal ecology. Ecological studies.* Berlin, Germany: Springer-Verlag, 295–320.
- Gerdemann JW 1975.** Vesicular–arbuscular mycorrhizae. In: Torrey JGaC, D. T. ed. *The development and function of roots.* New York, USA: Academic Press, 575–591

- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963.** Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* **46**(2): 235-244.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. 2000.** Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **167**: 35–120.
- Gimsing AL, Borggaard OK, Bang M. 2004a.** Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. *European Journal of Soil Science* **55**(1): 183-191.
- Gimsing AL, Borggaard OK, Jacobsen OS, Aamand J, Sørensen J. 2004b.** Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology* **27**(3): 233-242.
- Gimsing AL, Szilas C, Borggaard OK. 2007.** Sorption of glyphosate and phosphate by variable-charge tropical soils from Tanzania. *Geoderma* **138**(1&2): 127-132.
- Giovannetti M, Gianinazzi-Pearson V. 1994.** Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **98**(7): 705-715.
- Giovannetti M, Schubert A, Cravero MC, Salutini L. 1988.** Spore production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus monosporum* as related to host species, root colonization and plant growth enhancement. *Biology and Fertility of Soils* **6**(2): 120-124.
- Giovannetti M, Turrini A, Strani P, Sbrana C, Avio L, Pietrangeli B. 2006.** Mycorrhizal fungi in ecotoxicological studies: soil impact of fungicides, insecticides and herbicides. *Prevention Today* **2**(1-2): 47-62.
- Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD. 2006.** Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **113**(1&4): 17-35.
- Goss MJ, de Varennes A. 2002.** Soil disturbance reduces the efficacy of mycorrhizal associations for early soybean growth and N<sub>2</sub> fixation. *Soil Biology and Biochemistry* **34**(8): 1167-1173.

- Grigera G, Oesterheld Mn. 2004.** Mycorrhizal Colonization Patterns under Contrasting Grazing and Topographic Conditions in the Flooding Pampa (Argentina). *Journal of Range Management* **57**(6): 601-605.
- Grime JP, Mackey JML, Hillier SH, Read DJ. 1987.** Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature* **328**(6129): 420-422.
- Grossbard E, Atkinson D. 1985.** *The Herbicide Glyphosate*. London: Butterworth Ltd.
- Gryndler M, Larsen J, Hršelová H, Řezáčová V, Gryndlerová H, Kubát J. 2006.** Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* **16**(3): 159-166.
- Habte M, Manjunath A. 1991.** Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza* **1**(1): 3-12.
- Hampp R, Schaeffer C 1999.** Mycorrhiza – carbohydrate and energy metabolism. In: Varma AH, B. ed. *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Berlin, Heideberg: Springer-Verlag, 273–303.
- Haney RL, Senseman SA, Hons FM, Zuberer DA. 2000.** Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* **48**(1): 89-93.
- Harrison GW, List JA. 2004.** Field Experiments. *Journal of Economic Literature* **42**(4): 1009-1055.
- Hart MM, Klironomos JN. 2003.** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning. *Mycorrhizal Ecology* **157**: 225-242.
- Hartnett DC, Wilson GWT. 1999.** Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology* **80**(4): 1187-1195.
- Hawkins H-J, George E. 2001.** Reduced<sup>15</sup>N-nitrogen Transport Through Arbuscular Mycorrhizal Hyphae to *Triticum aestivum* L. Supplied with Ammonium vs. Nitrate Nutrition. *Annals of Botany* **87**(3): 303-311.
- He X, Mouratov S, Steinberger Y. 2002.** Spatial Distribution and Colonization of Arbuscular Mycorrhizal Fungi under the Canopies of Desert Halophytes. *Arid Land Research and Management* **16**(2): 149-160.

- Heinonen-Tanski H. 1989.** The effect of temperature and liming on the degradation of glyphosate in two arctic forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **21**(2): 313-317.
- Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K. 2012.** Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science* **17**(10): 569-574.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 1998.** Ploughing up the wood-wide web? *Nature*: 394-431.
- Hendrix J, Guo BZ, An ZQ. 1995.** Divergence of mycorrhizal fungal communities in crop production systems. *Plant and Soil* **170**(1): 131-140.
- Hetrick BAD, Bloom J. 1986.** The influence of host plant production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia* **78**: 32-36.
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Todd TC. 1990.** Differential responses of C3 and C4 grasses to mycorrhizal symbiosis, phosphorus fertilization, and soil microorganisms. *Canadian Journal of Botany* **68**(3): 461-467.
- Hidalgo LG, Rimoldi PO 1992.** *Lotus tenuis* en pastizales templado sub húmedos: su efecto en el valor nutritivo de la vegetación. *Congreso Latinoamericano de Ecología*. 2. Carambú, Mina Gerais, Brasil: SEB. 540-542.
- Hidalgo MG, Cahuepe MA, Erni AN. 1998.** Digestibilidad de materia seca y contenido de proteína bruta en especies de pastizal de la Pampa Deprimida, Argentina. *Investigación agropecuaria: Producción y sanidad animal*. **13**: 165-177.
- Hindumathi A, Reddy BN. 2011.** Occurrence and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi and microbial flora in the rhizosphere soils of mungbean [*vigna radiata* (L.) wilczek] and soybean [*glycine max* (L.) Merr.] from Adilabad, Nizamabad and Karimnagar districts of Andhra Pradesh state, India. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **02**(04): 275-286.
- Hooper DU, Solan M, Symstad A, Díaz S, Gessner MO, Buchmann N, Degrange V, Grime P, Hulot F, Mermillot-Blondin F, Roy J, Spehn E, van Peer L 2002.** Species diversity, functional diversity, and ecosystem functioning. In: Loreau M, Naeem S, Inchausti P eds. *Biodiversity and ecosystem functioning. Synthesis and perspectives*. Oxford: Oxford University Press.

- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N. 2004.** Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(8): 1928-1938.
- Huante P, Rincon E, Allen E. 1993.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on seedling growth of four tree species from the tropical deciduous forest in Mexico. *Mycorrhiza* **2**(3): 141-145.
- Hurlbert SH. 1984.** Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* **51**: 187–211.
- Husband R, Herre EA, Turner SL, Gallery R, Young JPW. 2002.** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology* **11**(12): 2669-2678.
- Hwang SF, Chakravarty P, Prevost D. 1993.** Effects of rhizobia, metalaxyl, and VA mycorrhizal fungi on growth, nitrogen-fixation, and development of pythium root-rot of sainfoin. *Plant Disease* **77**: 1093–1098.
- Ijdo M, Schtickzelle N, Cranenbrouck S, Declerck S. 2010.** Do arbuscular mycorrhizal fungi with contrasting life-history strategies differ in their responses to repeated defoliation? *FEMS Microbiology Ecology* **72**(1): 114-122.
- Isbell FI, Polley HW, Wilsey BJ. 2009.** Biodiversity, productivity and the temporal stability of productivity: patterns and processes. *Ecology Letters* **12**(5): 443-451.
- Isobe K, Aizawa E, Iguchi Y, Ishii R. 2007.** Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in upland field soils of Japan. 1. Relationship between spore density and the soil environmental factor. *Plant Production Science* **10**: 122-128.
- Jacobo E, Rodriguez A, Vilarino J, Zanduetta J 2007.** El rejuvenecimiento con glifosato deteriora la vegetación del pastizal natural de la Pampa Deprimida. El caso de la comunidad B3. *IV Congreso Nacional I Congreso MERCOSUR sobre Manejo de Pastizales Naturales*. Villa Mercedes, San Luis, Argentina. .
- Jalali B, Domsch K 1975.** Effect of systemic fungi-toxicants on the development of endotrophic mycorrhiza. In: Sanders FE MB, Tinker PB ed. *Endomycorrhizas*. New York: Academic press, 619-626.
- Janos D. 2007.** Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* **17**(2): 75-91.

- Jansa J, Wiemken A, Frossard E. 2006.** The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Geological Society, London, Special Publications* **266**(1): 89-115.
- Jeffries P, Dodd JC 1991.** The use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. In: Arora DK, Rai B, Mukerji KG, Knudsen GR eds. *Handbook of applied Mycology, vol.1 Soil and Plants*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 155-185.
- Johnson CN, Pfleger FL 1992.** Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae and cultural stresses. In: Bethlenfalvay GJ, Linderman RG eds. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison, Wisconsin: ASA Special Publications 71–99.
- Johnson N, Zak D, Tilman D, Pfleger FL. 1991.** Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia* **86**(3): 349-358.
- Johnson NC. 1993.** Can Fertilization of Soil Select Less Mutualistic Mycorrhizae? *Ecological Applications* **3**(4): 749-757.
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997.** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum\*. *New Phytologist* **135**(4): 575-585.
- Jumpponen A, Trowbridge J, Mandyam K, Johnson L. 2005.** Nitrogen enrichment causes minimal changes in arbuscular mycorrhizal colonization but shifts community composition—evidence from rDNA data. *Biology and Fertility of Soils* **41**(4): 217-224.
- Kahiluoto H, Ketoja E, Vestberg M, Saarela I. 2001.** Promotion of AM utilization through reduced P fertilization 2. Field studies. *Plant and Soil* **231**(1): 65-79.
- Kernaghan G. 2005.** Mycorrhizal diversity: Cause and effect? *Pedobiologia* **49**(6): 511-520.
- Kjaer GA, Olsen P, Ullum M, Grant R. 2005.** Leaching of glyphosate and aminophosphonic acid from Danish agricultural field sites. *Journal of environmental quality* **34**: 608-620.
- Klironomos JN. 2002.** Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* **417**(6884): 67-70.

- Kremer R, Means N, Kim S. 2005.** Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **85**(15): 1165-1174.
- Lamsal K, Paudyal GN, Saeed M. 1999.** Model for assessing impact of salinity on soil water availability and crop yield. *Agricultural Water Management* **41**(1): 57-70.
- Landry D, Dousset S, Fournier J-C, Andreux F. 2005.** Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne-RomanÃ©e, 21-France). *Environmental Pollution* **138**(2): 191-200.
- Larimer A, Bever J, Clay K. 2010.** The interactive effects of plant microbial symbionts: a review and meta-analysis. *Symbiosis* **51**(2): 139-148.
- Lavado RS 1992.** R o de la Plata Grasslands. Soils. . In: Coupland RT ed. *Ecosystems of the World 8A: Natural Grasslands*. Amsterdam: Elsevier, 377-380.
- Lavado RS, Taboada MA. 1987.** Soil salinization as an effect of grazing in a native grassland soil in the Flooding Pampa of Argentina. *Soil Use and Management* **3**(4): 143-148.
- Lavorel S, McIntyre S, Landsberg J, Forbes TDA. 1997.** Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. *Trends in Ecology & Evolution* **12**(12): 474-478.
- Lugo MA, Cabello MN. 2002.** Native arbuscular mycorrhizal (AMF) from mountain grassland (C rdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* **94**: 579–586.
- Malty JdS, Siqueira JO, Moreira FMdS. 2006.** Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotr ficos de soja, em meio de cultura e casa de vegeta o. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **41**: 285-291.
- Malloch DW, Pirozynski KA, Raven PH. 1980.** Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**(4): 2113-2118.
- Mathimaran N, Ruh R, Jama B, Verchot L, Frossard E, Jansa J. 2007.** Impact of agricultural management on arbuscular mycorrhizal fungal communities in Kenyan ferralsol. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **119**(1&2): 22-32.

- McAllister RS, Haderlie LC. 1985.** Translocation of <sup>14</sup>C-Glyphosate and <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-labeled photoassimilates in Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Weed Science* **33**(2): 153-159.
- McCune B, Mefford MJ. 2011.** *PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 6.0.* Glenden Beach, Oregon, U.S.A.: MjM Software.
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. 1990.** A New Method which Gives an Objective Measure of Colonization of Roots by Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *New Phytologist* **115**(3): 495-501.
- McGraw A, Hendrix J. 1986.** Influence of soil fumigation and source of strawberry plants on population densities of spores and infective propagules of endogonaceous mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **94**(3): 425-434.
- McIlveen WD, Cole Jr H. 1976.** Spore dispersal of Endogonaceae by worms, ants, wasps, and birds. *Canadian Journal of Botany* **54**(13): 1486-1489.
- McNaughton SJ. 1977.** Diversity and Stability of Ecological Communities: A Comment on the Role of Empiricism in Ecology. *The American Naturalist* **111**(979): 515-525.
- McNaughton SJ 1993.** Biodiversity and function of grazing ecosystems. In: Schultze ED, Mooney HA eds. *Biodiversity and Ecosystem Function*. Heidelberg: Springer, 361-383.
- Mendoza R. 2001.** Phosphorus nutrition and mycorrhizal growth response of Broadleaf and Narrowleaf Birdsfoot Trefoils. *Journal of Plant Nutrition* **24**(1): 203-214.
- Menendez A, Martinez A, Chiochio V, N. V, Ocampo JA, Godeas A. 1999.** Influence of insecticide dimethoate on arbuscular mycorrhizal colonization and growth in soybean plants. *International Microbiology* **2**: 43-45.
- Menéndez AB, Scervino JM, Godeas AM. 2001.** Arbuscular mycorrhizal populations associated with natural and cultivated vegetation on a site of Buenos Aires province, Argentina. *Biology and Fertility of Soils* **33**: 373–381.
- Milchunas DG, Sala OE, Lauenroth WK. 1988.** A Generalized Model of the Effects of Grazing by Large Herbivores on Grassland Community Structure. *The American Naturalist* **132**(1): 87-106.

- Morandi D. 1989.** Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **27**: 697–701.
- Mujica MT, Fracchia S, Ocampo JA, Godeas A. 1999.** Influence of the herbicides chlorsulfuron and glyphosate on mycorrhizal soybean intercropped with the weeds *Brassica campestris* or *Sorghum halepensis*. *Symbiosis* **27**: 73-81.
- Neumann G, Kohls S, Landsberg E, Stock-Oliveira Souza K, Yamada T, Römheld V. 2006.** Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *Journal of Plant Diseases and Protection* **20**: 963–969.
- Newsham KK, Fitter AH, Watkinson AR. 1995.** Arbuscular Mycorrhiza Protect an Annual Grass from Root Pathogenic Fungi in the Field. *Journal of Ecology* **83**(6): 991-1000.
- Newsham KK, Upson R, Read DJ. 2009.** Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology* **2**(1): 10-20.
- Nielsen KB, Kjäller R, Olsson PIA, Schweiger PF, Andersen FÅ, Rosendahl Sr. 2004.** Colonisation and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in southern Sweden. *Mycological Research* **108**(6): 616-625.
- Nordby ALF, Skuterud R. 1974.** The effects of boom height, working pressure and wind speed on spray drift. *Weed Research* **14**(6): 385-395.
- O'Connor PJ, Smith SE, Smith FA. 2001.** Arbuscular mycorrhizal associations in the southern Simpson Desert. *Australian Journal of Botany* **49**(4): 493-499.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A. 2003.** Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(5): 2816-2824.
- Oehl F, Sieverding E, Mäder P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A. 2004.** Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* **138**(4): 574-583.
- Omacini M, Eggers T, Bonkowski M, Gange AC, Jones TH. 2006.** Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology* **20**(2): 226-232.

- Osem Y, Perevolotsky A, Kigel J. 2002.** Grazing effect on diversity of annual plant communities in a semi-arid rangeland: interactions with small-scale spatial and temporal variation in primary productivity. *Journal of Ecology* **90**(6): 936-946.
- Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, LaVallee BJ, Tinus CN, Rhodes WK. 1995.** Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* **35**: 1451–1461.
- Pasaribu A, Mohamad RB, Awang Y, Othman R, Puteh A. 2011.** Growth and development of symbiotic Arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mossea* (Nicol. And Gerd.), in alachlor and glyphosate treated soils. *African Journal of Biotechnology* **10**(55): 11520-11526.
- Pawlowska TE, Bańaszowski J, Rąbhiński A. 1997.** The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza* **6**(6): 499-505.
- Peixoto F. 2005.** Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* **61**(8): 1115-1122.
- Perelman SB, León RJC, Oesterheld M. 2001.** Cross-scale vegetation patterns of Flooding Pampa grasslands. *Journal of Ecology* **89**(4): 562-577.
- Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH. 2004.** *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Wallingford, Oxon Ottawa: NRC Research Press.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158-161.
- Pirozynski KA, Malloch DW. 1975.** The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**(3): 153-164.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougél C, Lemanceau P, Berta G. 2009.** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* **19**(2): 81-90.
- Plenchette C, Fortin J, Furlan V. 1983.** Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* **70**(2): 199-209.

- Porter WM, Robson AD, Abbott LK. 1987.** Factors Controlling the Distribution of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Relation to Soil pH. *Journal of Applied Ecology* **24**(2): 663-672.
- Powell JR, Campbell RG, Dunfield KE, Gulden RH, Hart MM, Levy-Booth DJ, Klironomos JN, Pauls KP, Swanton CJ, Trevors JT, Antunes PM. 2009.** Effect of glyphosate on the tripartite symbiosis formed by *Glomus intraradices*, *Bradyrhizobium japonicum*, and genetically modified soybean. *Applied Soil Ecology* **41**(1): 128-136.
- Rabatin SC, Stinner BR. 1988.** Indirect effects of interactions between VAM fungi and soil-inhabiting invertebrates on plant processes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **24**(1&2): 135-146.
- Read DJ 1991.** Mycorrhizas in ecosystems – Nature’s response to the ‘Law of the minimum’. In: Hawksworth DL ed. *Frontiers in mycology*. Regensburg, Germany: CAB International, 101–130.
- Reddy KN, Hoagland RE, Zablotowicz RM. 2000.** Effect of Glyphosate on Growth, Chlorophyll, and Nodulation in Glyphosate-Resistant and Susceptible Soybean (*Glycine max*) Varieties. *Journal of New Seeds* **2**(3): 37-52.
- Relyea RA. 2005.** The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* **15**(4): 1118-1124.
- Reynolds HL, Packer A, Bever JD, Clay K. 2003.** Grassroots Ecology: Plant-Microbe-Soil Interactions as Drivers of Plant Community Structure and Dynamics. *Ecology* **84**(9): 2281-2291.
- Rodriguez A, Jacobo E, Vilarino J, Zanduetta J 2007.** El rejuvenecimiento con glifosato deteriora la vegetación del pastizal natural de la Pampa Deprimida. El caso de la comunidad B1. *IV Congreso Nacional I Congreso MERCOSUR sobre Manejo de Pastizales Naturales*. Villa Mercedes, San Luis, Argentina. .
- Rodriguez AM, Jacobo EJ. 2010.** Glyphosate effects on floristic composition and species diversity in the Flooding Pampa grassland (Argentina). *Agriculture, Ecosystems & Environment* **138**(3-4): 222-231.
- Ronco MG, Ruscitti MF, Arango MC, Beltrano J. 2008.** Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and

architecture in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **83**: 497-505.

**Sabbioni Pérez ME. 2006.** *Cambios florísticos de los pastizales naturales de la Pampa Deprimida sometidos a la práctica de “rejuvenecimiento” mediante la aplicación de glifosato.* Universidad de Buenos Aires.

**Sala O, Deregibus VA, Schlichter T, Alippe H. 1981.** Productivity Dynamics of a Native Temperate Grassland in Argentina. *Journal of Range Management* **34**(1): 48-51.

**Sala OE, Oesterheld M, Leñn RJC, Soriano A. 1986.** Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. *Vegetatio* **67**(1): 27-32.

**Salazar Lea Plaza JC, Moscatelli G. 1989.** *Mapa de suelos de la Pcia. de Buenos Aires.* Buenos Aires: SAGyP - INTA.

**Sanders IR, Fitter AH. 1992.** Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. *Mycological Research* **96**(6): 415-419.

**Sanders IR, Koide RT. 1994.** Nutrient acquisition and community structure in co-occurring mycotrophic and non-mycotrophic old-field annuals. *Functional Ecology* **8**: 77-84.

**Savin M, Purcell L, Daigh A, Manfredini A. 2009.** Response of Mycorrhizal Infection to Glyphosate Applications and P Fertilization in Glyphosate-Tolerant Soybean, Maize, and Cotton. *Journal of Plant Nutrition* **32**(10): 1702-1717.

**Schalamuk S, Cabello M. 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia* **102**(2): 261-268.

**Schalamuk S, Cabello MN, Chidichimo H, Golik S. 2011.** Effects of Inoculation with *Glomus mosseae* in Conventionally Tilled and Nontilled Soils with Different Levels of Nitrogen Fertilization on Wheat Growth, Arbuscular Mycorrhizal Colonization, and Nitrogen Nutrition. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **42**(5): 586-598.

- Schalamuk S, Druille M, Cabello M 2013a.** Hongos formadores de micorrizas arbusculares: Influencia de las prácticas agronómicas sobre su diversidad y dinámica de colonización. In: García de Salamone IE, Vasquez S, Penna C, Cassán FD eds. *Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable* Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 340.
- Schalamuk S, Velázquez S, Cabello M. 2013b.** Dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi spore populations and their viability under contrasting tillage systems in wheat at different phenological stages. *Biological Agriculture & Horticulture* **29**(1): 38-45.
- Schalamuk S, Velazquez S, Chidichimo H, Cabello M. 2006.** Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* **98**(1): 16-22.
- Scheiner S 2001.** MANOVA: multiple response variables and multispecies interactions. In: Scheiner SM, Gurevitch J eds. *MANOVA: multiple response variables and multispecies interactions*. New York: Oxford University Press, 99–115.
- Schenck NC, Pérez Y. 1990.** *Manual for identification of the VA mycorrhizal fungi*. Gainesville, FL: Synergistic Publications.
- Scheublin TR, Van Logtestijn RSP, Van Der Heijden MGA. 2007.** Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *Journal of Ecology* **95**(4): 631-638.
- Schreiner RP, Bethlenfalvay GJ. 1996.** Mycorrhizae, biocides, and biocontrol 3. Effects of three different fungicides on developmental stages of three AM fungi. *Biology and Fertility of Soils* **24**(1): 18-26.
- Schreiner RP, Bethlenfalvay GJ. 1997.** Mycorrhizae, biocides, and biocontrol 3. Effects of three different fungicides on developmental stages of three AM fungi. *Biology and Fertility of Soils* **24**(1): 18-26.
- Semmartin M, Bella C, Salamone Is. 2010.** Grazing-induced changes in plant species composition affect plant and soil properties of grassland mesocosms. *Plant and Soil* **328**(1-2): 471-481.

- Sevilla GH, Fernandez ON, Miñón DP, Montes L. 1996.** Emergence and Seedling Survival of Lotus Tenuis in Festuca Arundinacea Pastures. *Journal of Range Management* **49**(6): 509-511.
- Sheng M, Hamel C, Fernandez MR. 2012.** Cropping practices modulate the impact of glyphosate on arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria in agroecosystems of the semiarid prairie. *Canadian Journal of Microbiology* **58**(8): 990-1001.
- Shukla A, Kumar A, Jha A, Salunkhe O, Vyas D. 2012.** Soil moisture levels affect mycorrhization during early stages of development of agroforestry plants. *Biology and Fertility of Soils*: 1-10.
- Siddiqui ZA, Akhtar MS. 2008.** Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Science and Technology* **18**(3): 279-290.
- Sieverding E. 1991.** *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza management in Tropical Agrosystems*. Eschborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit.
- Simard SW, Beiler KJ, Bingham MA, Deslippe JR, Philip LJ, Teste FoP. 2012.** Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* **26**(1): 39-60.
- Sjoberg J, Persson P, Martensson A, Mattsson L, Adholeya A, Alstrom S. 2004.** Occurrence of Glomeromycota spores and some arbuscular mycorrhiza fungal species in arable fields in Sweden. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* **54**(4): 202-212.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V. 1988.** Physiological Interactions Between Symbionts in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**(1): 221-244.
- Smith SE, Read DJ. 1997.** *Mycorrhizal Symbiosis*. San Diego, CA.: Academic Press.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press.
- Smith SE, Smith FA. 2012.** Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* **104**(1): 1-13.

- Sørensen SR, Schultz A, Jacobsen OS, Aamand J. 2006.** Sorption, desorption and mineralisation of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. *Environmental Pollution* **141**(1): 184-194.
- Sørensen T. 1948.** A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content. *Biologiske Skrifter* **5**: 1-34.
- Sreenivasa MN, Bagyaraj DJ. 1989.** Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant and Soil* **119**(1): 127-132.
- Sternberg M, Gutman M, Perevolotsky A, Ungar ED, Kigel J. 2000.** Vegetation response to grazing management in a Mediterranean herbaceous community: a functional group approach. *Journal of Applied Ecology* **37**(2): 224-237.
- Strange-Hansen R, Holm PE, Jacobsen OS, Jacobsen CS. 2004.** Sorption, mineralization and mobility of N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate) in five different types of gravel. *Pest Management Science* **60**(6): 570-578.
- Taboada MA, Rubio G, Chaneton EJ. 2011.** Grazing Impacts on Soil Physical, Chemical, and Ecological Properties in Forage Production Systems. *Soil Management: Building a Stable Base for Agriculture* **acesspublicati(soilmanagementb)**: 301-320.
- Tawaraya K. 2003.** Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**(5): 655-668.
- Tilman D, Downing JA. 1994.** Biodiversity and stability in grasslands. *Nature* **367**(6461): 363-365.
- Tilman D, Reich PB, Knops JMH. 2006.** Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature* **441**(7093): 629-632.
- Tilman D, Wedin D, Knops J. 1996.** Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* **379**(6567): 718-720.
- Tommerup IC. 1984.** Persistence of infectivity by germinated spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society* **82**(2): 275-282.
- Tommerup IC 1987.** Physiology and ecology of VAM spore germination and dormancy in soil. In: Sylvia DM, Hung LL, Graham JH eds. *Mycorrhizae in the*

*Next Decade, Practical Applications and Research Priorities.* University of Florida, Gainesville.: Institute of Food and Agricultural Sciences.

- Trent JD, Wallace LL, Svejcar TJ, Christiansen S. 1988.** Effect of grazing on growth, carbohydrate pools, and mycorrhizae in winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science* **68**(1): 115-120.
- Treseder KK. 2004.** A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO<sub>2</sub> in field studies. *New Phytologist* **164**(2): 347-355.
- Troeh ZI, Loynachan TE. 2003.** Endomycorrhizal Fungal Survival in Continuous Corn, Soybean, and Fallow. *Agron. J.* **95**(1): 224-230.
- Udaiyan K, Karthikeyan A, Muthukumar T. 1996.** Influence of edaphic and climatic factors on dynamics of root colonization and spore density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in *Acacia farnesiana* Willd. and *A. planifrons* W.et.A. *Trees* **11**(2): 65-71.
- Urcelay C, R. B. 2007.** Colonización micorrícica en distintos tipos funcionales de plantas herbáceas del centro de Argentina. *Ecología Austral* **17**: 179-188.
- van der Heijden MGA, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998a.** Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* **79**(6): 2082-2091.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998b.** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**(6706): 69-72.
- Varma A, Hock B, Khan AG, Belik M 1995.** Occurrence and Ecological Significance of Mycorrhizal Symbiosis in Aquatic Plants. *Mycorrhiza*: Springer Berlin Heidelberg, 627-666.
- Veiga F, Zapata JM, Fernandez Marcos ML, Alvarez E. 2001.** Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Science of The Total Environment* **271**(1-3): 135-144.
- Venuto BC, Burson BL, Hussey MA, Redfearn DD, Wyatt WE, Brown LP. 2003.** Forage Yield, Nutritive Value, and Grazing Tolerance of Dallisgrass Biotypes

Approved for publication by the Director of the Louisiana Agric. Exp. Stn. as manuscript no. 02-88-0034. *Crop Sci.* **43**(1): 295-301.

- Vereecken H. 2005.** Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* **61**(12): 1139-1151.
- Vervoorst FB. 1967.** *Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado. La Vegetación de la República Argentina, Serie Fitogeográfica N° 7.* Buenos Aires: INTA.
- Vignolio OR, Cambareri GS, Maceira NO. 2013.** Lotus tenuis (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. *Revista Argentina de Producción Animal* **30**: En prensa.
- Walker C, Mize CW, McNabb Jr HS. 1982.** Populations of endogonaceous fungi at two locations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* **60**(12): 2518-2529.
- Wallace LL. 1981.** Growth, morphology and gas exchange of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Panicum coloratum* L., a C4 grass species, under different clipping and fertilization regimes. *Oecologia* **49**(2): 272-278.
- Warner NJ, Allen MF, MacMahon JA. 1987.** Dispersal agents of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a disturbed arid ecosystem. *Mycologia* **79**: 721-730.
- Weber JB 1994.** Properties and behavior of pesticides in soil. In: Honeycutt RC, Schabacker DJ eds. *Mechanisms of pesticide movement into ground water.* London: Lewis, 15-41.
- Westover KM, Kennedy AC, Kelly SE. 1997.** Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with cooccurring plant species. *Journal of Ecology* **85**: 863–873.
- Wilson GWT, Hartnett DC. 1998.** Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany* **85**(12): 1732-1738.
- Williams PG, Roser DJ, Seppelt RD. 1994.** Mycorrhizas of hepatics in continental Antarctica. *Mycological Research* **98**(1): 34-36.

**Wu B, Hogetsu T, Isobe K, Ishii R. 2007.** Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza* **17**(6): 495-506.

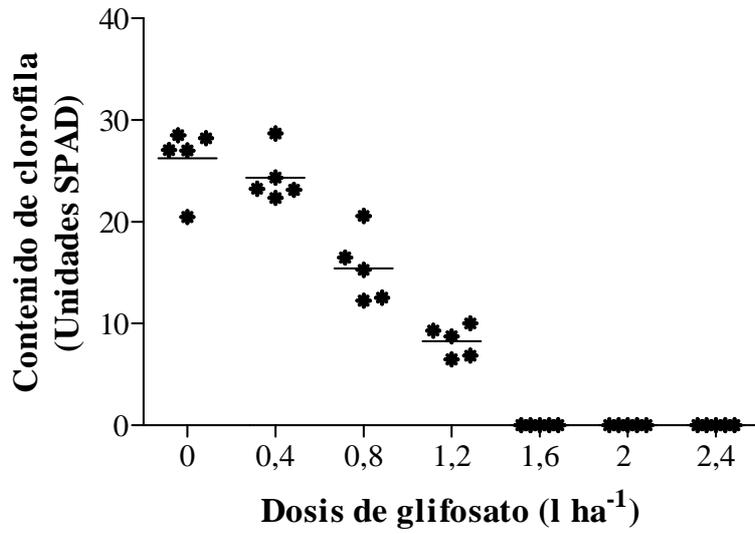
## **ANEXO**

### **Elección de la dosis subletal de glifosato para las plantas**

Para poder evaluar los efectos indirectos de la aplicación de glifosato sobre los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), es necesario que la planta hospedante se encuentre viva al momento de tomar las muestras de raíces y medir colonización radical. Esto se debe a que como se mencionó en el Capítulo 1, los HMA son simbioses obligados, necesitando del C provisto por la planta hospedante para poder mantener y generar estructuras fúngicas (Smith & Read, 2008). Por lo tanto, se realizó un ensayo preliminar con el objetivo de encontrar una dosis de glifosato que genere estrés en las plantas tratadas pero que no sea mortal.

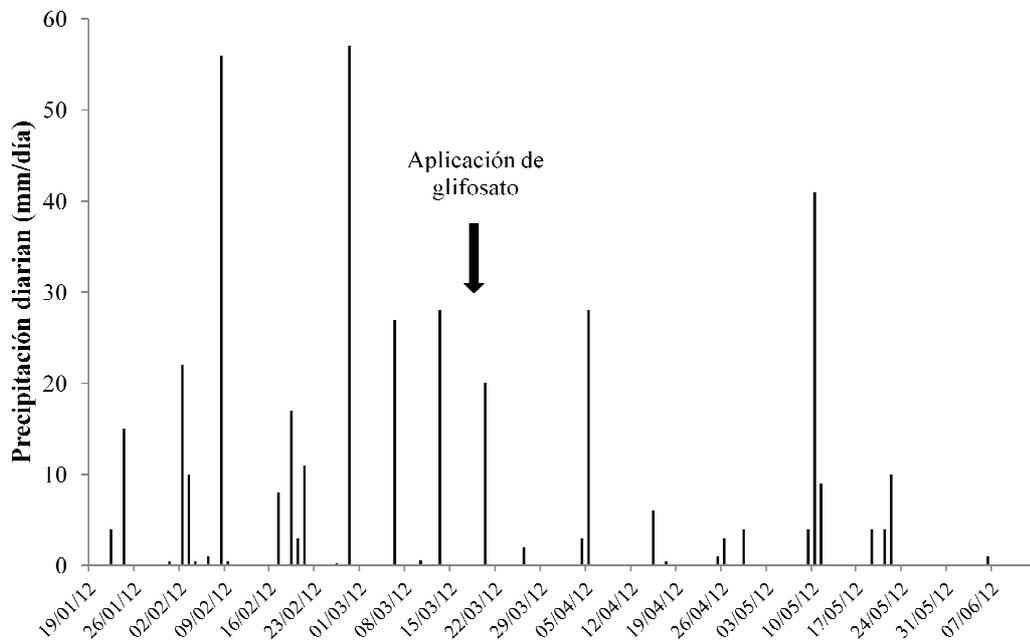
Para lograr ese objetivo, se utilizaron siete dosis de glifosato: 0, 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 y 2,4 l.ha<sup>-1</sup> (equivalentes a 0, 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 g de principio activo.ha<sup>-1</sup>, respectivamente). Como planta objetivo se utilizaron plantas de *Lolium multiflorum*, de 45 días de edad. El herbicida fue aplicado utilizando una pulverizadora estacionaria con una boquilla de abanico plano (Bertolotti 110SF04), que entrega un volumen de 120 l.ha<sup>-1</sup> a una velocidad de 4,6 Km.h<sup>-1</sup> y una presión de 3 bar. Como indicador del grado de estrés generado en las plantas se realizaron mediciones de clorofila 15 días post-aplicación del herbicida, utilizando un medidor de clorofila (SPAD-502, Minolta). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones, y de cada repetición se realizaron 10 lecturas, cinco de cada lado de la nervadura central.

Como se observa en la Figura 6.1, la aplicación generó una reducción del 7, 41 y 69% en el contenido de clorofila en plantas tratadas con 0,4; 0,8 y 1,2 l.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Cuando se aplicaron dosis mayores las plantas no presentaron biomasa viva al momento de la aplicación. A partir de estos resultados, se decidió utilizar la dosis de 0,8 l.ha<sup>-1</sup> para evaluar los efectos indirectos del glifosato sobre los HMA.



**Figura 6.1.** Contenido de clorofila en plantas de *L. multiflorum* 15 días post-aplicación de glifosato a 0, 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 y 2,4 l.ha<sup>-1</sup>. Se presentan los valores de cada repetición y el promedio.

**Precipitaciones registradas en el Establecimiento “San Rafael”**



**Figura 6.2.** Precipitaciones registradas en el Establecimiento “San Rafael” durante las semanas previas y posteriores a la aplicación de glifosato.