

Efecto de la relación entre hongos micorrícicos arbusculares y gramíneas forrajeras bajo defoliación y distinto suministro de fósforo

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

Cavagnaro, Romina Andrea

Lic. en Biología (Orientación en Ecología) –Universidad Nacional de La Plata– 2008

IFEVA–CONICET–FAUBA



FAUBA

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



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Agustín A. Grimoldi

Ing. Agrónomo (UBA)

M. Sc. Recursos Naturales (UBA)

Dr. Cs Agrarias (Technische Universität München,
Freising-Weihenstephan, Alemania)

Co-director de tesis

Martín Oesterheld

Ing. Agrónomo (UBA)

Dr. Biología (Syracuse University, Syracuse, New York, EE.UU)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Agustín A. Grimoldi

Ing. Agrónomo (UBA)

M. Sc. Recursos Naturales (UBA)

Dr. Cs Agrarias (Technische Universität München,
Freising-Weihenstephan, Alemania)

Fernanda Covacevich

Lic. Cs Biológicas (UNMDP)

Dra. Cs Agrarias (UNMDP)

Ileana V. García

Lic. Cs Biológicas (UBA)

Dra. Cs Biológicas (UBA)

Carlos Urcelay

Biólogo (UNC)

Dr. Cs Biológicas (UNC)

Fecha de defensa de la tesis: 06 de Abril de 2015

*A los profesores que me guiaron en esta etapa,
A mi familia,
A mis amigos.*

Agradecimientos

A Agustín Grimoldi, Martín Oesterheld y Mariano Oyarzabal, por darme la oportunidad de hacer el doctorado y porque supieron guiarme en este proceso de formación académica.

A mi familia, en primer lugar, a Mimí (mi mamá) por estar a mi lado y ser partícipe directa de todas mis emociones. En segundo lugar, a mi papá y a Hernán (hermano mayor) por brindarme la fortaleza necesaria para seguir adelante en los momentos más difíciles. Y al resto que, de alguna u otra forma, también estuvieron presentes: Sara y Felipe (sobrinos), Javier y Delfina (hermanos), Tata y Nino (tíos), Germán y Fernando (primos), Valeria, Gimena y Luisina (prima política y cuñadas) y Familia Aprea (Yoyi, Jorge, Ana y Lucía).

A mi amiga Juliana Bassi por acompañarme siempre en cada decisión de mi vida.

A mi amigo Gustavo Striker por brindarme su tiempo, de manera incondicional, a lo largo de este camino.

A mis compañeros de oficina y amigos de IFEVA: Pedro Tognetti, Miriam Izaguirre, Federico Mollard, Carlos Mazza, Rolando León, Marta Telesnicki, Andrea Ueno, Melisa Leone, Renata Cantoro y Gastón Oñatibia por los hermosos años que vivimos juntos.

A Marina Omacini, María Semmartin y al resto del Grupo Simbioikos por ofrecerme un espacio de confianza para la discusión de papers, resultados y demás actividades destinadas a mejorar mi formación.

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:

Cavagnaro RA, Oyarzabal M, Oosterheld M, Grimoldi AA. 2014. Screening of biomass production of cultivated forage grasses in response to mycorrhizal symbiosis under nutritional deficit conditions. *Grassland Science* **60**: 178–184.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
Introducción general.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
1.2. OBJETIVOS.....	6
1.3. HIPÓTESIS.....	6
1.4. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	8
CAPÍTULO II.....	9
Respuesta micorrícica de gramíneas forrajeras templadas y tropicales en condiciones de déficit nutricional.....	9
2.1. INTRODUCCION.....	10
2.2. MATERIALES Y METODOS.....	12
2.3. RESULTADOS.....	14
2.3.1. Colonización micorrícica y concentración de fósforo en láminas.....	14
2.3.2. Producción de biomasa total.....	15
2.4. DISCUSION.....	17
CAPÍTULO III.....	20
Diferencias en la dinámica de crecimiento de <i>Elymus elongatus</i> y <i>Urochloa brizantha</i> en respuesta a la inoculación con HMA y al suministro de fósforo.....	20
3.1. INTRODUCCION.....	21
3.2. MATERIALES Y METODOS.....	22
3.2.1. Material vegetal y diseño experimental.....	22
3.2.2. Protocolo de cosecha, colonización micorrícica y análisis químico de fósforo.....	23
3.2.3. Análisis estadístico.....	24
3.3. RESULTADOS.....	25
3.3.1. Colonización micorrícica y concentración de fósforo en planta.....	25
3.3.2. Producción de biomasa y contenido de fósforo en planta.....	26
3.4. DISCUSION.....	30
3.4.1. Efectos de la fertilización sobre la colonización micorrícica.....	30
3.4.2. Respuestas diferenciales en producción de biomasa y absorción de fósforo.....	30

3.4.3. Diferencias específicas en la utilización del fósforo aportado por la fertilización y/o la presencia de micorrizas	32
CAPITULO IV.....	38
Recuperación post-defoliación en gramíneas forrajeras: efecto de la inoculación con HMA y del suministro de fósforo	38
4.1. INTRODUCCION.....	39
4.2. MATERIALES Y METODOS.....	40
4.2.1. Material vegetal y diseño experimental.....	40
4.2.2. Protocolo de cosecha y colonización micorrícica.....	42
4.2.3. Análisis estadístico	43
4.3. RESULTADOS	43
4.3.1. Defoliación, suministro de fósforo y colonización micorrícica.....	43
4.3.2. Respuestas compensatorias de crecimiento post-defoliación	45
4.4. DISCUSION.....	49
4.4.1. Efecto de la defoliación y el suministro de fósforo sobre la colonización micorrícica .	49
4.4.2. Efecto combinado del suministro de fósforo y micorrizas sobre el crecimiento post-defoliación de las plantas.....	50
CAPITULO V	52
Conclusiones generales.....	52
5.1. Variación interespecífica en la respuesta micorrícica en relación a cambios en el suministro de fósforo	54
5.2. Contraste en la eficiencia en el uso del fósforo de <i>E. elongatus</i> y <i>U. brizantha</i> en relación a las micorrizas y a la fertilización	56
5.3. Evidencias del compromiso defoliación vs. micorrizas moduladas por la identidad de la especie hospedadora y el suministro de fósforo	57
5.3. Aportes y proyección de los resultados derivados de la tesis	58
BIBLIOGRAFIA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Curvas hipotéticas de respuesta al fósforo para una planta con y sin micorrizas (líneas llena y punteada, respectivamente). Las líneas verticales punteadas delimitan una región “FAVORABLE” y dos regiones “DESFAVORABLES” según la micorriza resulte en un beneficio neto positivo o negativo, respectivamente. Las líneas verticales llenas representan la respuesta absoluta (R) de la planta a la micorriza para tres dosis de fósforo (baja, media y alta). El $R_{m\acute{a}x.}$ es la respuesta máxima absoluta a las micorrizas (refleja la mayor diferencia positiva entre las dos curvas). Figura extraída de Janos (2007). 4
- Figura 2.1.** Biomasa total de plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares y la respuesta micorrícica (RM) \pm ES, indicada en negrita en la parte superior de cada figura, de seis especies de gramíneas forrajeras cultivadas creciendo en condiciones de déficit nutricional. Las especies son: *Dactylis glomerata*, *Elymus elongatus*, *Schedonorus arundinaceus*, *Paspalum dilatatum*, *Panicum coloratum* y *Urochloa brizantha*. Los valores son promedios \pm error estándar (n = 5). Los asteriscos indican diferencias significativas (***, $P < 0,001$) entre tratamientos para cada especie. La respuesta micorrícica (RM) fue calculada como: $RM = [(biomasa\ total\ de\ planta\ inoculada - biomasa\ total\ de\ planta\ no-inoculada) / biomasa\ total\ de\ planta\ no-inoculada] * 100$ 16
- Figura 3.1.** Biomasa total (a) y contenido de fósforo (b) en *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares. Los valores son promedios \pm error estándar (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (LSD Fisher; $P < 0,05$) entre tratamientos para cada una de las especies. En el cuadro 3.3 se detallan los resultados de los ANOVA para cada especie y componente de la biomasa. 27
- Figura 3.2.** Eficiencia la utilización del fósforo (EUF) en relación al tamaño de planta en *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Para las dos especies, los símbolos vacíos son plantas no-inoculadas (-Inoc.) y los llenos plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares. En cada uno de los tratamientos, la recta de correlación lineal representa la tendencia de los datos de (EUF) obtenidos en un rango de tamaños de planta (*i.e.* 1-13 gramos). 34
- Figura 3.3.** Cambios relativos en biomasa y concentración de fósforo en plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Los vectores muestran la dirección y magnitud de los cambios generados por la combinación de diferentes tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos arbusculares y dosis de fósforo. Los cambios relativos se calcularon como $[(tratamiento-testigo)/testigo * 100]$. Los valores absolutos y las diferencias estadísticas se muestran en la figura 3.1 y en el cuadro 3.2. 36
- Figura 4.1.** Colonización micorrícica en plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* en función del

tiempo de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las muestras fueron tomadas en los días 0, 12 y 22 para *E. elongatus* y los días 0, 18 y 34 para *U. brizantha*. Los valores son promedios \pm 1 ES (n = 3-5). El asterisco indica diferencia significativa (LSD Fisher, *, $P < 0,05$) entre los dos niveles de defoliación. 44

Figura 4.2. Biomasa total de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* a los 22 y 34 días de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares, no-defoliadas (ND) y defoliadas (D). Las barras rayadas indican el material removido (MR), las blancas la biomasa aérea (BA) y las negras la biomasa subterránea (BS). Los valores son promedios \pm 1 ES (n = 5). Los asteriscos indican diferencias significativas (LSD Fisher, *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) entre los dos niveles de defoliación. 46

Figura 4.3. Biomasa aérea (ln BA) y subterránea (ln BS) de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* en función del tiempo de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares. Las líneas llenas representan los cambios observados en plantas no-defoliadas (ND) y las punteadas en plantas defoliadas (D). Las cosechas fueron realizadas en los días 0, 12 y 22 para *E. elongatus* y en los días 0, 18 y 34 para *U. brizantha*. La pendiente de la recta de regresión lineal representa la TCR (tasa de crecimiento relativo) aérea y subterránea. Los valores de $P < 0,05$ determinan diferencias significativas en las pendientes de los tratamientos de defoliación..... 47

Figura 4.4. Número de macollos de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* a los 22 y 34 días de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares, no-defoliadas (ND) y defoliadas (D). Los valores son promedios \pm error estándar (n = 3-5). El asterisco indica diferencia significativa (LSD Fisher, *, $P < 0,05$) entre los dos niveles de defoliación. 48

Figura 5.1. Resumen esquemático de la respuesta micorrícica de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo. La respuesta micorrícica fue calculada como: $RM (\%) = [(biomasa\ total\ de\ plantas\ inoculadas - biomasa\ total\ de\ plantas\ no-inoculadas) / biomasa\ total\ de\ plantas\ no\ inoculadas] * 100$. Las dosis de fósforo soluble se indican en la figura con colores. Los valores son promedios \pm error estándar (n= 5). 55

Figura 5.2. Biomasa total en función del logaritmo natural del contenido de fósforo en plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.; círculos vacíos) e inoculadas (+Inoc.; círculos llenos) con hongos micorrícicos arbusculares. Las dosis de fósforo soluble se indican en la figura con colores. Los valores son promedios \pm error estándar (n= 5). 56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Colonización micorrícica y concentración de fósforo en láminas, de plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de seis especies de gramíneas forrajeras creciendo en condiciones de déficit nutricional. Los valores son promedios \pm error estándar ($n = 5$). Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $P < 0,05$) entre tratamientos para cada especie... 15	15
Cuadro 2.2. Biomasa aérea y subterránea y número total de macollos de plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de seis especies de gramíneas forrajeras cultivadas creciendo en condiciones de déficit nutricional. Los valores son promedios \pm error estándar ($n = 5$). Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) entre tratamientos para cada especie y componente de la biomasa. 17	17
Cuadro 3.1. Colonización micorrícica en plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de <i>Elymus elongatus</i> y <i>Urochloa brizantha</i> creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. La colonización micorrícica se expresa en relación al total de raíces observadas (RC) y la presencia de vesículas (V) y arbusculos (A) en función de raíces colonizadas. A partir de estos valores, se calculó también la relación de arbusculos y vesículas (A/V). Los valores son promedios \pm 1 ES ($n = 5$). Letras distintas indican diferencias significativas (LSD Fisher; $P < 0,05$) entre tratamientos para cada una de las especies. 25	25
Cuadro 3.2. Concentración de fósforo en plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de <i>Elymus elongatus</i> y <i>Urochloa brizantha</i> creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Los valores son promedios \pm 1 ES ($n = 5$). Letras distintas indican diferencias significativas (LSD Fisher; $P < 0,05$) entre tratamientos. 26	26
Cuadro 3.3. Resultados de los ANOVA factorial para los tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y suministro de fósforo sobre la concentración de fósforo, producción de biomasa y contenido de fósforo en plantas de <i>Elymus elongatus</i> y <i>Urochloa brizantha</i> 29	29
Cuadro 4.1. Resultados del ANOVA factorial para los tratamientos de defoliación y tiempo de recuperación post-defoliación sobre la colonización micorrícica de plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de <i>Elymus elongatus</i> y <i>Urochloa brizantha</i> en bajo y alto suministro de fósforo. 45	45

RESUMEN

Efecto de la relación entre hongos micorrícicos arbusculares y gramíneas forrajeras bajo defoliación y distinto suministro de fósforo

La asociación entre raíces de plantas y hongos micorrícicos arbusculares (HMA) incrementa la absorción de fósforo. Sin embargo, la defoliación puede influenciar el balance de la simbiosis y la recuperación de las plantas. El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de la simbiosis micorrícica y el suministro de fósforo, sobre el crecimiento y la recuperación post-defoliación de gramíneas forrajeras cultivadas. Para esto, en primer lugar, se caracterizó la respuesta micorrícica de seis especies de gramíneas (tres templadas (C₃): i) *Dactylis glomerata*, ii) *Elymus elongatus* y iii) *Schedonorus arundinaceus*; y tres tropicales (C₄): iv) *Paspalum dilatatum*, v) *Panicum coloratum* y vi) *Urochloa brizantha*) creciendo en déficit nutricional. En estas condiciones, las gramíneas tropicales presentaron mayor respuesta micorrícica que las templadas. En segundo lugar, se estudió el rol de las micorrizas y el suministro de fósforo sobre el crecimiento y la nutrición de *E. elongatus* y *U. brizantha*, dos especies con respuestas micorrícicas contrastantes. Al aumentar el suministro de fósforo, en *E. elongatus* (especie con menor respuesta micorrícica) y *U. brizantha* (especie con mayor respuesta micorrícica) el cambio en la producción de biomasa, entre plantas inoculadas y no-inoculadas, disminuyó. Sin embargo, mostraron diferencias en la eficiencia en el uso del fósforo: *U. brizantha* hizo un mayor aprovechamiento del fósforo que *E. elongatus*. Por último, se caracterizaron respuestas de recuperación post-defoliación bajo distinto suministro de fósforo. En *E. elongatus* en alto fósforo, hubo un efecto parasítico de la micorriza sobre la recuperación post-defoliación. Por el contrario, en *U. brizantha* no se detectó un compromiso entre defoliación y micorrizas. La información generada en esta tesis servirá de base para mejorar el conocimiento de aspectos básicos de la relación entre hongos micorrícicos arbusculares y gramíneas forrajeras, como también, para establecer pautas de conservación de las relaciones simbióticas en sistemas pastoriles.

Palabras claves: *Elymus elongatus*, *Urochloa brizantha*, defoliación, fósforo, gramíneas forrajeras, micorriza, simbiosis

ABSTRACT

Effect of the relationship between arbuscular mycorrhizal fungi and forage grasses under defoliation and different phosphorus supply

The association between plant roots and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increases phosphorus uptake. However, defoliation could affect the balance of the symbiosis and plant recovery. The aim of this thesis was to study the effect of mycorrhizal symbiosis and phosphorus supply on the growth and post-defoliation recovery of forage grasses. For that, in first time, the mycorrhizal response of six grass species (three temperate (C₃): i) *Dactylis glomerata*, ii) *Elymus elongatus* and iii) *Schedonorus arundinaceus*; and three tropical (C₄): iv) *Paspalum dilatatum*, v) *Panicum coloratum* and vi) *Urochloa brizantha*) growing nutritional deficit was characterized. Under these conditions, tropical grasses showed greater mycorrhizal responsiveness than temperate grasses. In the second time, were studied the role of mycorrhizae and phosphorus supply on growth and nutrition of *E. elongatus* and *U. brizantha*, two species with mycorrhizal responses contrasting. By increasing phosphorus supply, in *E. elongatus* (species with lower mycorrhizal responsiveness) and *U. brizantha* (species with higher mycorrhizal responsiveness) the change in biomass production between inoculated and non-inoculated plants decreased. However, they showed differences in the efficiency of phosphorus: *U. brizantha* made better use of phosphorus than *E. elongatus*. Finally, post-defoliation recovery responses under different phosphorus supply were characterized. In *E. elongatus* under high phosphorus supply, there was a parasitic effect from the presence of mycorrhizae on post-defoliation recovery. On the contrary, in *U. brizantha* a trade-off between defoliation and mycorrhizae was not apparent. The information generated in this thesis will be useful as for improvement of the knowledge about basic aspects of the relationship between arbuscular mycorrhizal fungi and forage grasses, as also, to establish conservation objectives about of symbiotic relations in grassland ecosystems.

Keywords: *Elymus elongatus*, *Urochloa brizantha*, defoliation, forage grasses, mycorrhiza, phosphorus, symbiosis

CAPÍTULO I

Introducción general

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las micorrizas arbusculares son asociaciones entre un grupo específico de hongos del phylum *Glomeromycota* (Schüßler *et al.* 2001) y raíces de aproximadamente el 80% de las plantas vasculares (Harley & Harley 1987; Wang & Qiu 2006; Akhmetzhanova *et al.* 2012; van der Heijden *et al.* 2015). La denominación “arbuscular” denota especies de hongos que forman arbusculos (*i.e.* estructuras ramificadas que se generan en el interior de las células corticales) sitio donde se realiza el intercambio de fósforo y de otros nutrientes poco móviles en el suelo (*e.g.* amonio, zinc, cobre, entre otros) como resultado de la simbiosis micorrícica (*sensu* Smith & Read 2008). Además, por ensanchamiento de las hifas suelen formarse vesículas (*i.e.* estructuras circulares de paredes finas que contienen lípidos con función de reserva y núcleos) las que podrían actuar como propágulos en el suelo cuando las raíces mueren (Smith & Read 2008). Las micorrizas arbusculares favorecen la capacidad de las plantas de adquirir nutrientes a cambio de carbohidratos necesarios para el mantenimiento y crecimiento de las estructuras fúngicas. Se ha demostrado que pueden duplicar o triplicar la superficie de absorción de nutrientes y en consecuencia, el volumen de suelo explorado por las plantas (Chapin *et al.* 2002). La red externa de hifas se extiende por fuera de la zona de absorción radical y a través de transportadores específicos, permite la captura de nutrientes de la solución del suelo, su conducción hasta la interfase simbiótica localizada en la corteza radical y su ingreso a la planta (Bucher 2007). El nutriente mayormente implicado en este proceso es el fósforo, un elemento limitante de la productividad forrajera de pasturas cultivadas y pastizales naturales, por lo que los eventuales beneficios de las micorrizas son relevantes (Hartnett & Wilson 2002).

En general, la simbiosis micorrícica ha sido descrita como beneficiosa en términos de crecimiento, *i.e.* plantas micorrícicas comparadas con plantas no micorrícicas bajo las mismas condiciones (Smith & Smith 2012). Sin embargo, se ha demostrado que las micorrizas representan también un costo. Los hongos micorrícicos consumen entre el 4 y 20% de los fotoasimilados de la planta (Douds *et al.* 1988; Jakobsen & Rosendahl 1990; Johnson *et al.* 2002), y entre un 5-8% en el caso de las gramíneas forrajeras (Grimoldi *et al.* 2006). Por esto, varios autores sugieren analizar el funcionamiento de la simbiosis micorrícica en un continuo mutualismo-parasitismo de modo de evaluar los efectos positivos de los hongos provenientes del estado nutritivo y los negativos resultantes del costo extra en términos de respiración y crecimiento (Eissenstat *et al.* 1993; Johnson *et al.* 1997; Grimoldi *et al.* 2005, 2006; Smith *et al.* 2009). En general, el costo en carbono del hongo es sobrecompensado por los términos beneficiosos de la asociación (Smith & Read 2008), aunque también se han registrado relaciones parasíticas (*e.g.* Buwalda & Goh 1982; Gebbing *et al.* 2004). Algunos autores postulan que bajo la combinación de alta disponibilidad de fósforo y estrés de carbono, el costo de mantenimiento de los hongos podría exceder -al menos transitoriamente- los beneficios nutricionales de la micorriza (Koide 1991; Johnson *et al.* 1997). Por ejemplo, estudios previos con especies de comunidades de pastizal indican que el costo relativo generado por los hongos podría afectar negativamente el

crecimiento si las plantas son defoliadas intensamente o puestas en condiciones de intensidad lumínica y/o temperatura bajas (Hayman 1974; Harnett & Wilson 2002; Smith *et al.* 2011). Hasta el momento, la literatura acerca de los efectos micorrícicos, defoliación y cambios en el suministro de fósforo sobre el crecimiento de gramíneas forrajeras cultivadas es escasa, y no existe ningún antecedente en el que se evalúen los efectos interactivos de estos factores sobre el crecimiento de plantas individuales.

Dentro de las gramíneas forrajeras cultivadas, las gramíneas templadas (C_3) y tropicales (C_4) son dos grupos funcionales de plantas que además del síndrome fotosintético difieren en varios aspectos de importancia ecofisiológica, tales como su respuesta a la temperatura, eficiencia en el uso del agua y nutrientes, y en particular en su respuesta al establecimiento de la simbiosis con HMA. A nivel celular, el nitrógeno es un componente estructural de proteínas, nucleótidos y clorofilas al igual que el fósforo que participa en la formación de enlaces de fosfato de alta energía (ATP), fosfolípidos, ácidos nucleídos, en la estructura del ADN y en la señalización intracelular. Por lo tanto, la variación en la concentración de estos nutrientes puede alterar el funcionamiento del aparato fotosintético de las plantas. Estudios previos demuestran que las gramíneas tropicales (C_4) son en general más eficientes en el uso de nutrientes minerales (*e.g.* nitrógeno y fósforo) que las templadas (C_3) ya que con menor concentración de nutriente en el tejido suelen tener altas tasas fotosintéticas y mayor producción de biomasa. Esta disparidad es atribuible principalmente a diferencias anatómicas y bioquímicas (Osmond *et al.* 1982; Long 1983). Al respecto, durante la fotosíntesis las especies C_4 acumulan CO_2 cerca del sitio de concentración de la Rubisco y por esto, alcanzan bajos puntos de compensación de CO_2 . De igual manera, se sabe que en condiciones de altas temperaturas presentan una fotorrespiración despreciable que resulta en tasas de fotosíntesis neta más altas, en comparación con las especies C_3 . En particular, se ha demostrado que con menor concentración de nitrógeno (Brown 1985) y de fósforo (Morris *et al.* 1982) en tejido las especies C_4 presentan tasas de fotosíntesis neta más elevadas y eventualmente una mayor eficiencia en el uso de estos nutrientes. Asimismo, es sabido que en condiciones de baja disponibilidad de fósforo en el suelo las gramíneas templadas y tropicales responden en forma diferencial al establecimiento de la simbiosis con HMA: en general, las especies tropicales producen mayor biomasa que las templadas (Hetrick *et al.* 1988; Hetrick, Wilson & Todd 1990; Hetrick 1991; Wilson & Harnett 1998). En este contexto, cabe preguntarse si estas respuestas diferenciales entre los grupos, en el uso del fósforo y los beneficios de la simbiosis con HMA, podrían estar reguladas por las diferencias en la absorción de fósforo (*i.e.* funcionamiento del sistema radical) y/o en el uso del mismo en la producción de biomasa vegetal.

Uno de los modelos más difundidos para interpretar la respuesta de plantas sin y con micorrizas a la disponibilidad de fósforo, es el de respuesta sigmoidea propuesto por Janos (2007) (ver **Figura 1** a continuación). Según este modelo, en niveles muy bajos (*i.e.* cercanos a 5-7 ppm) como en muy altos (*i.e.* mayores a 15 ppm) de fósforo disponible, las plantas colonizadas por hongos micorrícicos pueden presentar una

disminución de su crecimiento en relación a plantas no colonizadas. Existen muchas evidencias que demuestran esta disminución de crecimiento en condiciones de alta disponibilidad de fósforo (Abbott & Robson 1984; Cooper 1984; Jakobsen 1999; entre otros). La explicación más aceptada para ésta respuesta es que en esas condiciones no existen limitaciones por fósforo y por ende, los hongos asociados representan una pérdida de carbono para la planta (Jakobsen 1999). En cambio, poco se sabe acerca del efecto negativo de las micorrizas en condiciones de bajo fósforo. Al respecto, se postula que en condiciones extremas de baja disponibilidad de fósforo, los hongos no logran compensar las demandas nutricionales de las plantas y en consecuencia, el consumo de carbono supera al beneficio de la simbiosis (Tinker 1975a; Bolan *et al.* 1984a). Sin embargo, en niveles intermedios (*i.e.* 7-15 ppm) de fósforo en el suelo estos hongos son beneficiosos (*i.e.* área comprendida entre los puntos de intersección entre las curvas), promoviendo el establecimiento de la simbiosis y consecuentemente, una mejora en el estado nutricional de la planta.

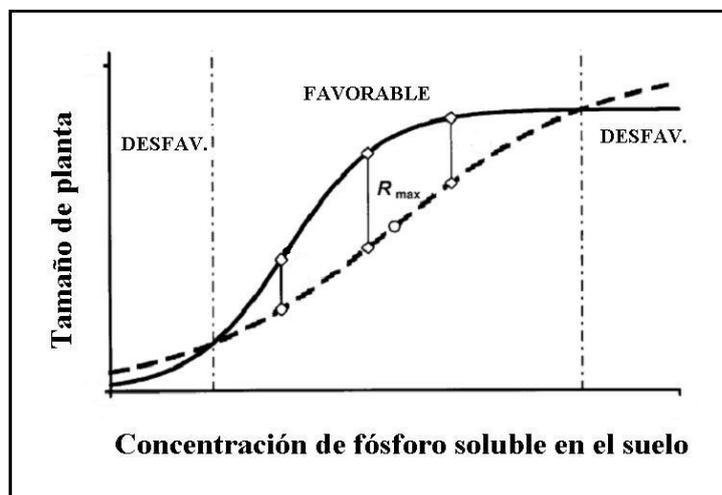


Figura 1. Curvas hipotéticas de respuesta al fósforo para una planta con y sin micorrizas (líneas llena y punteada, respectivamente). Las líneas verticales punteadas delimitan una región “FAVORABLE” y dos regiones “DESFAVORABLES” según la micorriza resulte en un beneficio neto positivo o negativo, respectivamente. Las líneas verticales llenas representan la respuesta absoluta (R) de la planta a la micorriza para tres dosis de fósforo (baja, media y alta). El R_{max} es la respuesta máxima absoluta a las micorrizas (refleja la mayor diferencia positiva entre las dos curvas). Figura extraída de Janos (2007).

Conceptualmente, la respuesta micorrícica involucra ambas curvas y es una comparación vertical en la que se analiza el efecto de las micorrizas, sobre el crecimiento de las plantas, para un nivel de fósforo determinado (Janos 2007). Numerosos estudios evidencian que la respuesta micorrícica varía entre especies y cultivares de plantas, con la arquitectura del sistema radical y la fertilidad actual del suelo (Baylis 1970; Hayman 1983; Koide 1991; Johnson *et al.* 1997; Hartnett & Wilson 2002; Klironomos 2003; Hoeksema *et al.* 2010 entre otros). Además, se sabe que las plantas difieren en su morfología radical a nivel genético y la variación en la

configuración espacial de las raíces (*i.e.* arquitectura radical) tiene un significado funcional relacionado con la exploración del suelo y absorción de nutrientes (Lynch 1995). Al respecto, se ha demostrado que en especies de gramíneas templadas los sistemas radicales son muy ramificados y la superficie de absorción es maximizada por una predominancia de raíces finas. En estas plantas el sistema radical no resulta limitante para la toma de nutrientes, en consecuencia, la simbiosis es de menor utilidad o contraproducente para el crecimiento de las mismas. Por el contrario, en especies tropicales los sistemas radicales son poco ramificados, por lo que la morfología de la raíz limita la superficie de absorción de nutrientes del suelo (Hetrick 1991). En ese sentido, la simbiosis micorrícica puede maximizar la superficie de absorción de nutrientes con una inversión relativamente menor en la producción de raíces y al mismo tiempo, compensar la baja disponibilidad de nutrientes a través de la solubilización del fósforo en el suelo (Baylis 1970; Fitter 1991; Hetrick 1991; Schellenbaum *et al.* 1991; Hetrick *et al.* 1991; Lynch 1995; Smith & Read 2008). En este contexto, es de esperar que especies con sistemas radicales poco ramificados (*e.g.* gramíneas tropicales) expresen mayor respuesta micorrícica para la toma de fósforo que especies con sistemas muy ramificados (*e.g.* gramíneas templadas) (Koide 1991; Schweiger *et al.* 1995; Hartnett & Wilson 2002). Si bien existen algunos trabajos previos en los que se estudia la dinámica de micorrización y el efecto de la inoculación con HMA ante distintas ofertas de fósforo en gramíneas forrajeras templadas (*i.e.* Covacevich *et al.* 2006; Covacevich & Echeverría 2009), es plausible remarcar que la información experimental para gramíneas forrajeras cultivadas, tanto templadas como tropicales, es aún escasa.

El efecto de la defoliación, por parte del ganado doméstico, es el principal agente de disturbio en ecosistemas naturales y pastoriles. La defoliación reduce drásticamente la actividad fotosintética (hasta 100%) y remueve hasta 2/3 del nitrógeno y el fósforo de la planta. En esas condiciones, procesos de dilución de carbono, removilización de nutrientes e incremento proporcional de la partición hacia estructuras foliares contribuyen al reestablecimiento del canopeo fotosintético después de la defoliación (Richards 1993; Schnyder & de Visser 1999). Sin embargo, existe gran variabilidad en la magnitud y el tipo de respuesta de las plantas a la defoliación reguladas principalmente por el tiempo de recuperación considerado (Ferraro & Oosterheld 2002) aunque en ciertos casos también por la intensidad de defoliación y/o la frecuencia de corte, disponibilidad de nutrientes en el suelo y la identidad de la especie vegetal, entre otros factores. Asimismo, se sabe que las micorrizas proveen diversos beneficios para las plantas (Selosse & Rousset 2011) y pueden cumplir un rol importante en las interacciones planta-herbívoro, cambiar el crecimiento post-defoliación y/o las respuestas de resistencia de las plantas a la herbivoría (*e.g.* defensas anti-herbívoros) (Goverdr *et al.* 2000; Koide 2000; Harnett & Wilson 2002). En general, los efectos encontrados en relación con la intensidad de defoliación y arquitectura radical, han sido contrastantes. Por ejemplo, en condiciones de baja disponibilidad de fósforo e intensidades moderadas de defoliación, la simbiosis micorrícica en pastos con sistemas radicales poco ramificados (*i.e.* gramíneas tropicales) incrementó la capacidad

de crecimiento compensatorio de las plantas defoliadas (Harnett & Wilson 2002). En cambio, *Lolium perenne* (gramínea templada) mostró respuestas negativas de crecimiento evidenciando un fuerte compromiso entre los simbiontes, en condiciones de alta intensidad de defoliación (Gebbing *et al.* 2004). La bibliografía existente sugiere que los pastos, en simbiosis con hongos micorrícicos, responden de manera diferente a la defoliación exhibiendo respuestas de crecimiento neutras o negativas, en aquellos con sistemas radicales muy ramificados, y generalmente positivas, en pastos con sistemas radicales poco ramificados (Allsopp 1998). Por lo expuesto, la defoliación podría influenciar el balance de la simbiosis y consecuentemente, la capacidad de recuperación de estos pastos (Allsopp 1998; Barto & Rilling 2010). Si bien existen estudios que describen efectos de las micorrizas en algunas especies de gramíneas forrajeras (Grimoldi *et al.* 2006), el análisis y la interpretación de las respuestas involucradas en la recuperación post-defoliación requieren ser estudiados con mayor profundidad.

1.2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es estudiar los efectos interactivos de la simbiosis micorrícica y los cambios en el suministro de fósforo, sobre el crecimiento de gramíneas forrajeras cultivadas y el impacto sobre la recuperación post-defoliación. Para ello, deberán alcanzarse los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Evaluar el efecto de las micorrizas sobre el crecimiento de gramíneas forrajeras cultivadas templadas (*i.e.* *Dactylis glomerata*, *Elymus elongatus* y *Schedonorus arundinaceus*) y tropicales (*i.e.* *Paspalum dilatatum*, *Panicum coloratum* y *Urochloa brizantha*), en condiciones de déficit nutricional.

Objetivo 2: Caracterizar el efecto de las micorrizas en relación al suministro de fósforo sobre el crecimiento y la nutrición de gramíneas forrajeras cultivadas con distinta respuesta micorrícica.

Objetivo 3: Describir respuestas de recuperación post-defoliación de especies de gramíneas forrajeras cultivadas, con distinta respuesta micorrícica, en condiciones de bajo y alto suministro de fósforo.

1.3. HIPÓTESIS

Para lograr cada uno de los objetivos parciales se plantearon hipótesis de trabajo, sus predicciones correspondientes y se diseñó un experimento para ponerlas a prueba.

Con relación al objetivo 1, se propuso la siguiente hipótesis que se desarrollará en el Capítulo II:

Hipótesis 1: En condiciones de déficit nutricional, la asociación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) promueve el crecimiento de gramíneas forrajeras cultivadas. El grado de beneficio de la simbiosis difiere en especies templadas y tropicales.

Predicción 1.1: En plantas inoculadas la producción de biomasa será mayor respecto a las no inoculadas. Asimismo, en especies templadas (*i.e. Dactylis glomerata, Elymus elongatus* y *Schedonorus arundinaceus*) el beneficio de la simbiosis será menor que en especies tropicales (*i.e. Paspalum dilatatum, Panicum coloratum* y *Urochloa brizantha*).

Para alcanzar el objetivo 2, se planteó esta hipótesis que se abordará en el Capítulo III:

Hipótesis 2: Las especies templadas y tropicales muestran diferencias en el uso del fósforo, provisto por la generación de estructuras micorrícicas (*i.e.* hifas y arbusculos), que son moduladas por el suministro de fósforo.

Predicción 2.1: En condiciones de bajo suministro de fósforo, la presencia de micorrizas promueve marcadamente la absorción de fósforo y el crecimiento de *Urochloa brizantha*. Por el contrario, plantas inoculadas de *Elymus elongatus* mostrarán mayor concentración de fósforo en los tejidos, en comparación con las plantas no inoculadas, sin generar marcados cambios en la producción de biomasa.

Predicción 2.2: En condiciones de alto suministro de fósforo, el incremento en producción de biomasa de plantas inoculadas, tanto de *Elymus elongatus* como de *Urochloa brizantha*, es similar y la magnitud no difiere marcadamente de las plantas no inoculadas.

Para alcanzar el objetivo 3, se propuso la siguiente hipótesis que se desarrollará en el Capítulo IV:

Hipótesis 3: En plantas defoliadas se genera un compromiso entre el proceso de rebrote y el mantenimiento de los hongos micorrícicos. La magnitud del compromiso depende de la respuesta micorrícica de la especie y del suministro de fósforo.

Predicción 3.1: En condiciones de bajo suministro de fósforo, especies con alta respuesta micorrícica (*i.e. Urochloa brizantha*) obtienen mayores beneficios de la simbiosis y exhiben mayores tasas de crecimiento relativo, en relación a especies con baja respuesta micorrícica (*i.e. Elymus elongatus*), aún en condiciones de defoliación.

1.4. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis contiene, además del presente capítulo introductorio, tres capítulos experimentales (II, III y IV) y un capítulo de discusión general (V). En el Capítulo II se muestra la respuesta micorrícica de seis especies de gramíneas forrajeras, en condiciones de déficit nutricional. Este análisis brindó información imprescindible para la selección de especies a utilizar en los experimentos sucesivos. En el Capítulo III, se evalúa el rol que juegan las micorrizas y el fósforo sobre el crecimiento y nutrición mineral de dos especies de gramíneas, con distinta respuesta micorrícica. Por último, en el Capítulo IV se estudia el compromiso entre el proceso de rebrote y el mantenimiento de los hongos micorrícicos en gramíneas forrajeras cultivadas. Para ello, se analizan respuestas de recuperación post-defoliación sobre las especies utilizadas en el Capítulo III. Finalmente, se presenta un capítulo de discusión general (Capítulo V) que versa sobre las implicancias ecológicas y agronómicas de los resultados obtenidos en un marco teórico general, y donde se comentan los aportes originales de esta tesis haciendo explícitos los avances alcanzados con respecto al conocimiento previo de estos temas.

CAPÍTULO II

Respuesta micorrícica de gramíneas forrajeras templadas y tropicales en condiciones de déficit nutricional

* Cavagnaro RA, Oyarzabal M, Oosterheld M & Grimoldi AA. 2014. “Screening of biomass production of cultivated forage grasses in response to mycorrhizal symbiosis under nutritional deficit conditions”. *Grassland Science* **60**: 178–184.

2.1. INTRODUCCION

La simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) es una relación importante en la mayoría de las especies de pasturas y pastizales naturales debido a que (i) las plantas en general muestran valores altos de colonización micorrícica en sus raíces (ii) la disponibilidad de nutrientes en el suelo es limitante y (iii) la red de micelio micorrícico no se interrumpe frecuentemente como en los cultivos anuales. La base biológica principal de esta asociación es la transferencia bidireccional de nutrientes: los hongos proveen nutrientes poco móviles a las raíces a cambio de fotoasimilados de la planta (Smith & Read 2008). Se sabe que los hongos generan un costo menor, en términos de carbono, por unidad de área de absorción de las raíces; y también permiten una mayor exploración del suelo que no podría ser logrado por las raíces (Koide 1991). Sin embargo, se conocen otros beneficios potenciales de la simbiosis micorrícica tales como, mejoras en las relaciones hídricas de las plantas, reducciones a las infecciones patogénicas, promoción de la agregación del suelo y efectos sinérgicos con otros microorganismos (Biró *et al.* 2000; Newsham *et al.* 2005; Wilson *et al.* 2009; Osorio & Habte 2013). Pero, las estructuras y propágulos micorrícicos pueden ser afectados negativamente por prácticas de labranza, sobrepastoreo y/o aplicación periódica de productos químicos, alterando los efectos principales de la simbiosis sobre los atributos de la comunidad y el funcionamiento de los ecosistemas de pastizal (Gehring & Whitham 1994, Helgason *et al.* 1998, van der Heidjen *et al.* 1998; Harnett & Wilson 2002; Fitter *et al.* 2004; Druille *et al.* 2013).

Es sabido que el éxito de esta asociación simbiótica es modulado por las condiciones ambientales (Koide 1991; Janos 2007), la identidad de la planta hospedadora (Klironomos 2003), las características de los hongos (Munkvold *et al.* 2004), como también, por la interacción entre ambos participantes de la simbiosis (Jones & Smith 1994). Las condiciones ambientales son particularmente favorables para la simbiosis micorrícica en especies forrajeras debido a la baja disponibilidad de fósforo en el suelo que limita la productividad de los pastizales (Harnett & Wilson 2002). No obstante, entre los principales grupos de especies forrajeras (*i.e.* leguminosas, gramíneas templadas y tropicales) hay diferencias importantes en la respuesta a las micorrizas. En leguminosas, la mayoría de los estudios muestran efectos benéficos de la simbiosis sobre el crecimiento de la planta y la absorción de fósforo (Chalk *et al.* 2006), como también, efectos sinérgicos en plantas inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno (Biró *et al.* 2000, Kaschuk *et al.* 2009). Para gramíneas templadas y tropicales (C₃ y C₄ respectivamente), un meta-análisis de 616 estudios mostró respuestas que van de positivas a negativas con un efecto promedio positivo de la colonización micorrícica sobre el crecimiento de las plantas (Hoeksema *et al.* 2010). Asimismo, las gramíneas tropicales mostraron en promedio respuestas positivas, a la colonización con hongos micorrícicos arbusculares (HMA), mayores que las gramíneas templadas. Este resultado confirma el patrón de respuesta a la simbiosis micorrícica, para gramíneas tropicales comparadas con gramíneas templadas, descrita en las Grandes Planicies de América del Norte (Hetrick *et al.* 1988; Wilson & Harnett 1998). No obstante, esta información

corresponde a especies de pastizal natural y es insuficiente para entender el efecto de las micorrizas sobre el crecimiento individual de especies forrajeras cultivadas. En este sentido, este capítulo evalúa la respuesta potencial de la colonización micorrícica sobre el crecimiento de las plantas en especies de gramíneas forrajeras cultivadas en condiciones de déficit nutricional.

Conceptualmente, la expresión “respuesta micorrícica” es usada para referirse a los efectos de la simbiosis con HMA, sobre el crecimiento de la planta, en un nivel dado de fósforo disponible (Janos 2007). En términos numéricos, puede medirse a partir de la diferencia entre el peso seco de plantas micorrícicas y plantas no-micorrícicas, y el peso de plantas no-micorrícicas. Este valor relativizado, por el peso de plantas no-micorrícicas, permite la comparación entre especies y refleja el incremento proporcional en el crecimiento atribuible a las micorrizas. Estos resultados son apoyados por el conocimiento de que la respuesta micorrícica difiere entre los principales grupos de gramíneas forrajeras (Wilson & Harnett 1998; Hoeksema *et al.* 2010) en parte, explicados por la filogenia y el contexto evolutivo de la población de plantas (Reinhart *et al.* 2012) siendo el beneficio micorrícico potencial modulado por la fertilidad del suelo y la morfología radical (Baylis 1972; Hetrick 1991; Newsham *et al.* 1995; Janos 2007). Por ejemplo, en condiciones de baja e intermedia disponibilidad de fósforo las plantas micorrícicas son más colonizadas y generalmente tienden a presentar mejoras en la nutrición fosforada y tasas de crecimiento más altas que las plantas no-micorrícicas (Hetrick *et al.* 1990). Asimismo, especies con sistemas radicales poco ramificados, hipotéticamente, son más dependientes de la simbiosis micorrícica para incrementar la absorción de nutrientes poco móviles; mientras que, especies con sistemas radicales muy ramificados son consideradas menos dependientes a las micorrizas para la exploración del suelo y la absorción de nutrientes (Baylis 1972; Hetrick 1991) y podrían recibir otros beneficios micorrícicos (Newsham *et al.* 1995).

Las gramíneas forrajeras cultivadas son un grupo muy importante de cultivos perennes debido a su alta producción de biomasa disponible para el consumo de ganado y su distribución en la mayoría de las regiones del mundo. Sin embargo, no existe ningún antecedente previo en el que se estudie simultáneamente la respuesta micorrícica de gramíneas forrajeras cultivadas, templadas y tropicales, en condiciones controladas. En este capítulo, se diseñó un experimento manipulativo con tres especies templadas: *Dactylis glomerata*, *Elymus elongatus* y *Schedonorus arundinaceus*; y tres especies tropicales: *Paspalum dilatatum*, *Panicum coloratum* y *Urochloa brizantha*. Las especies seleccionadas son comúnmente utilizadas en pasturas perennes cultivadas. Para cada una de ellas, algunas plántulas fueron inoculadas con una mezcla de hongos micorrícicos y otras crecieron sin inocular en un sustrato de arena estéril durante cinco meses, en condiciones de déficit nutricional. Se examinó el porcentaje de colonización micorrícica, la concentración de fósforo en láminas, el número de macollos, la producción de biomasa y la respuesta micorrícica de seis especies de gramíneas forrajeras cultivadas. Este capítulo tiene como objetivo principal destacar el beneficio

potencial de la simbiosis lo que sería un aporte importante al conocimiento del rol que cumplen los hongos micorrícicos en los ecosistemas de pastizal.

2.2. MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron seis especies de gramíneas cultivadas con alta calidad forrajera. Tres gramíneas templadas: (i) *Dactylis glomerata* L. cv. Porto; (ii) *Elymus elongatus* (Host) Runemark (= *Agropyron elongatum*); (iii) *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort. (= *Festuca arundinacea*); y tres tropicales: (iv) *Paspalum dilatatum* Poir cv. Primo; (v) *Panicum coloratum* var. *coloratum* (cv. Klein) y (vi) *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster (= *Brachiaria brizantha*), fueron utilizadas como planta hospedadora. Todas las especies son gramíneas cespitosas cultivadas en pasturas para pastoreo directo, producción de heno y ensilado. Dos de las gramíneas tropicales, *P. dilatatum* y *P. coloratum* pueden ser cultivadas en zonas templadas, mientras que *U. brizantha* sólo en latitudes más bajas. Las semillas fueron lavadas durante 20 minutos en NaCl (6% cloro activo) para la esterilización de la superficie y germinadas en cajas de plástico, con papel absorbente saturado con agua, en incubadora (20-30°C). Luego de 4-5 días, se trasplantaron 2 o 3 plántulas en macetas (26 cm de alto x 11cm de diámetro, 3kg de peso) y fueron ubicadas en un invernáculo de IFEVA (Facultad de Agronomía-UBA). El sustrato para el crecimiento de las plantas fue arena esterilizada con pequeñas cantidades de roca fosfórica, como fuente de fósforo de baja disponibilidad (171 mg P₂O₅ kg⁻¹ arena, Grimoldi *et al.* 2005). En simultáneo, a la mitad de las macetas se les agregó al sustrato una fuente de inóculo después de su propagación durante tres meses en plantas de *Zea mays*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens* como hospedadoras. A fin de aumentar las posibilidades de colonización, en esta tesis se utilizó una mezcla de tres especies exóticas de hongos micorrícicos en iguales proporciones, las cuales son del tipo ruderal –acorde a un agroecosistema pastoril con algún grado de disturbio– (sensu Chagnon *et al.* 2013), generalistas y con difusión en agroecosistemas y/o ambientes pastoriles. Las especies utilizadas fueron: *Rhizophagus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler (= *G. intrarradices* BAFC 3108 provisto por la Dra. Ana Menéndez, FCEyN-UBA), *Simiglomus hoi* (S.M. Berch & Trappe) G.A. Silva, Oehl & Sieverd (= *G. hoi* BEG 104 provisto por el Dr. A Heinemeyer, Grupo A. Fitter-University of York, UK) y *Funneliformis mosseae* (Nicol. & Gerd.) C. Walker & Schuessler (= *G. mosseae* LPS SB1 provisto por la Dra. Marta Cabello, Instituto Spegazzini-UNLP). Para cada especie de inóculo (pocos días antes del comienzo del experimento) se realizaron aislamientos de esporas por tamizado en húmedo y decantación (Gerdemann & Nicolson 1963) del sobrenadante de un gradiente de sacarosa (Walker *et al.* 1982). Luego, se cuantificó el porcentaje de esporas viables mediante tinción vital bromuro de tetrazolio (An & Hendrix 1988). El inóculo formado por raíces colonizadas, micelio externo y esporas (ca. 100 esporas viables por 100 g de inóculo seco), se aplicó a razón de 7 g por maceta y se mezcló con la arena para asegurar el contacto entre las raíces de las plantas y hongos micorrícicos arbusculares. Las macetas sin y con inóculo micorrícico fueron ubicadas en cajones plásticos y

mesadas separadas para prevenir la contaminación de las plantas no-inoculadas. Dentro de cada especie, las plantas fueron organizadas en un diseño aleatorio con cinco réplicas por tratamiento (2 HMA x 5 réplicas x 6 especies= 60 plantas). Durante el experimento, las macetas y cajones fueron rotados periódicamente, cada 7 siete días, para asegurar condiciones homogéneas de luz.

Para crear condiciones de déficit nutricional, la fórmula de la solución de Hoagland fue modificada. La solución nutritiva resultante tuvo 90% menos de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio, y 70% menos de hierro y sodio, en relación a la original. La composición de macroelementos (mM l^{-1}) fue: 0,3 KNO_3 , 0,4 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,1 MgSO_4 , 0,1 KCl y la de microelementos ($\mu\text{M l}^{-1}$): 0,04 Fe-EDTA , 2,5 H_3BO_3 , 0,2 MnCl , 0,2 ZnCl_2 , 0,05 CuCl_2 , 0,05 MoO_3 . Además, para facilitar la formación de micorrizas, a la solución resultante se le agregó nitrato de amonio (0,11 mM l^{-1}). De esta manera, la única fuente de fósforo fue la roca fosfórica. Todas las plantas fueron regadas diariamente a capacidad de campo con la solución Hoagland modificada (ca.50ml) durante todo el experimento. Para evitar la acumulación de nutrientes en el sustrato, una vez por semana, las macetas fueron lavadas con agua corriente; y *a posteriori*, debido a que el sustrato era inerte, regadas nuevamente con solución de Hoagland modificada. Pasado un mes de crecimiento, se realizó un raleo de plántulas dejando un individuo por maceta. Las plantas crecieron en invernáculo (durante 4 meses, Julio-Octubre) bajo condiciones controladas de temperatura. Durante las horas cercanas al mediodía y en días soleados, el flujo fotónico fotosintético (PPFD) fue de $1650 \pm 125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La temperatura mínima del invernáculo fue en promedio de $15,7^\circ\text{C}$, mientras que la temperatura máxima fue en aumento con la estación con un valor máximo de $27,1^\circ\text{C}$ en el mes de Julio llegando a $32,7^\circ\text{C}$ a finales del mes de Octubre. Estas condiciones resultaron adecuadas para el crecimiento de todas las especies.

Al finalizar el experimento, cada planta fue cosechada y se separó la fracción aérea de la subterránea. Las raíces se lavaron y se determinó el peso fresco de las mismas. Posteriormente, se separó una muestra de raíz de peso conocido para evaluar la colonización micorrízica. La biomasa aérea fue separada en macollos adultos (mínimo con una hoja totalmente expandida), macollos hijos (sin hojas totalmente expandidas) y macollos reproductivos, los que fueron contados. El número total de macollos fue la suma de los tres tipos mencionados, previamente. Los macollos adultos fueron disectados en láminas y vainas. El peso de macollos adultos fue estimado a partir de la suma de la biomasa de láminas y vainas dividido por el número de macollos adultos. Todas las muestras de biomasa se secaron durante 72hs a 80°C en estufa y posteriormente, fueron pesadas.

La colonización micorrízica fue determinada por la identificación de estructuras micorrízicas (hifas, arbusculos y vesículas) en la raíz después de teñidas (Phillips & Hayman 1970). Brevemente, la muestra de material fresco de raíz fue clarificada en KOH (10% p/v) durante 10 minutos a 90°C , acidificadas en HCl 5 minutos y luego, teñidas con Azul de Tripán (0,05% p/v) en glicerol durante 10 minutos a 90°C . No

obstante, el protocolo de tinción (tiempo y temperatura) para cada una de las especies fue modificado adecuadamente en relación al grosor de los tejidos radicales. Para eliminar el excedente de colorante, las raíces teñidas fueron sumergidas en agua destilada; y luego, organizadas sobre un portaobjeto, separadas entre sí y en forma paralela, para crear una gradilla de identificación. Posteriormente, se agregaron gotas de gelatina-glicerol para sujetar las raíces al portaobjeto y se las cubrió con el cubreobjeto (Phillips & Hayman 1970). El porcentaje de raíz colonizada por hongos micorrícicos arbusculares (HMA) fue determinado de la observación, de cien campos oculares al azar por cada repetición, con un aumento de 200× en el ocular del microscopio óptico (McGonigle *et al.* 1990), un método adecuado para la comparación entre especies (Sun & Tang 2012).

La concentración de fósforo se determinó en muestras de 200 mg de lámina de macollos adultos. Este material fue molido e incinerado en mufla. La ceniza resultante fue digerida en HNO_3/HCl y la cantidad de fósforo medida por el método colorimétrico de Hanson (1950). Para chequear la exactitud de la digestión y el procedimiento analítico, cada 15 muestras, se incluyó material homogéneo y de concentración conocida proveniente de otras gramíneas como referencia.

Una manera sintética de evaluar la magnitud del crecimiento de la planta por la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) es calcular la respuesta micorrícica de la planta hospedadora. Para cada una de las especies, la respuesta micorrícica se calculó de la siguiente manera: Respuesta micorrícica (%) = [(biomasa total de plantas inoculadas – biomasa total de plantas no-inoculadas)/biomasa total de plantas no-inoculadas] × 100 (Baon *et al.* 1993; Cavagnaro *et al.* 2003). El error estándar de la relación fue obtenido a partir del método de propagación de errores para muestras independientes. Todas las variables fueron analizadas con ANOVA, de una sola vía, por especie con la inoculación con HMA como factor principal (Steel & Torrie 1980). Previamente, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para cumplir con los supuestos del ANOVA los datos de biomasa fueron transformados ($\log x$). Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Infostat (Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y la construcción de gráficos, con el software GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA). Todos los resultados se expresan como promedios ± error estándar (ES) (n = 5).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Colonización micorrícica y concentración de fósforo en láminas

Todas las plantas mostraron valores promedio por encima del 50% de colonización micorrícica (Cuadro 2.1) detectada por el reconocimiento de estructuras fúngicas (hifas, arbusculos y vesículas). En general, la colonización micorrícica fue mayor para las especies tropicales (*Panicum coloratum*, *Urochloa brizantha* y *Paspalum dilatatum*, valor promedio 63 a 80%) que para las especies templadas (*Schedonorus arundinaceus*,

Elymus elongatus y *Dactylis glomerata*, valor promedio 54 a 69%). En plantas no-inoculadas, no hubo registros de colonización por hongos micorrícicos.

Cuadro 2.1. Colonización micorrícica y concentración de fósforo en láminas, de plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de seis especies de gramíneas forrajeras creciendo en condiciones de déficit nutricional. Los valores son promedios \pm error estándar ($n = 5$). Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $P < 0,05$) entre tratamientos para cada especie.

Especie	Colonización micorrícica(%)		Concentración de P(mg P g ⁻¹)	
	+Inoc.	-Inoc.	-Inoc.	+Inoc.
<i>Dactylis glomerata</i>	54,8 \pm 2,4	0,63 \pm 0,02	0,70 \pm 0,03	
<i>Elymus elongatum</i>	68,8 \pm 4,7	0,71 \pm 0,12	0,73 \pm 0,06	
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	59,2 \pm 9,5	0,61 \pm 0,11	0,64 \pm 0,02	
<i>Paspalum dilatatum</i>	80,4 \pm 2,7	0,70 \pm 0,05	0,71 \pm 0,06	
<i>Panicum coloratum</i>	80,2 \pm 4,6	0,74 \pm 0,01	0,77 \pm 0,04	
<i>Urochloa brizantha</i>	63,4 \pm 3,5	0,38 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01 *	

La concentración de fósforo en láminas fue baja (*ca.* 0,7 mg P g⁻¹) para todas las especies y tratamientos de inoculación (como referencia 1,5-3 mg P g⁻¹ es la [P] mínima para el crecimiento óptimo de plantas cultivadas según Larcher 2003) (Cuadro 2.1).

La especie tropical *U. brizantha* fue la única que mostró un incremento significativo ($P < 0,05$), sobre la concentración de fósforo, en respuesta a la inoculación con HMA. Las condiciones, alto porcentaje de colonización micorrícica y bajo estado nutricional, fueron confirmadas para todas las especies estudiadas al final del período experimental (Cuadro 2.1).

2.3.2. Producción de biomasa total

La inoculación con hongos micorrícicos arbusculares estimuló significativamente la producción de biomasa en cinco de las seis especies de gramíneas cultivadas ($P < 0,001$; Figura 2.1). El peso seco de las plantas inoculadas fue mayor que en las no-inoculadas en un 202 y 206% para las especies tropicales *U. brizantha* y *P. coloratum*, respectivamente, en un 98% para *P. dilatatum* y en un 69 y 54% para las templadas *S. arundinaceus* y *E. elongatus*, respectivamente (Figura 1). Por lo tanto, las especies tropicales ($P. coloratum = U. brizantha > P. dilatatum$) fueron más sensibles a la inoculación que las especies templadas. Por el contrario, la gramínea templada *D. glomerata* fue la única especie que no respondió significativamente ($P = 0,22$) a la inoculación con hongos micorrícicos.

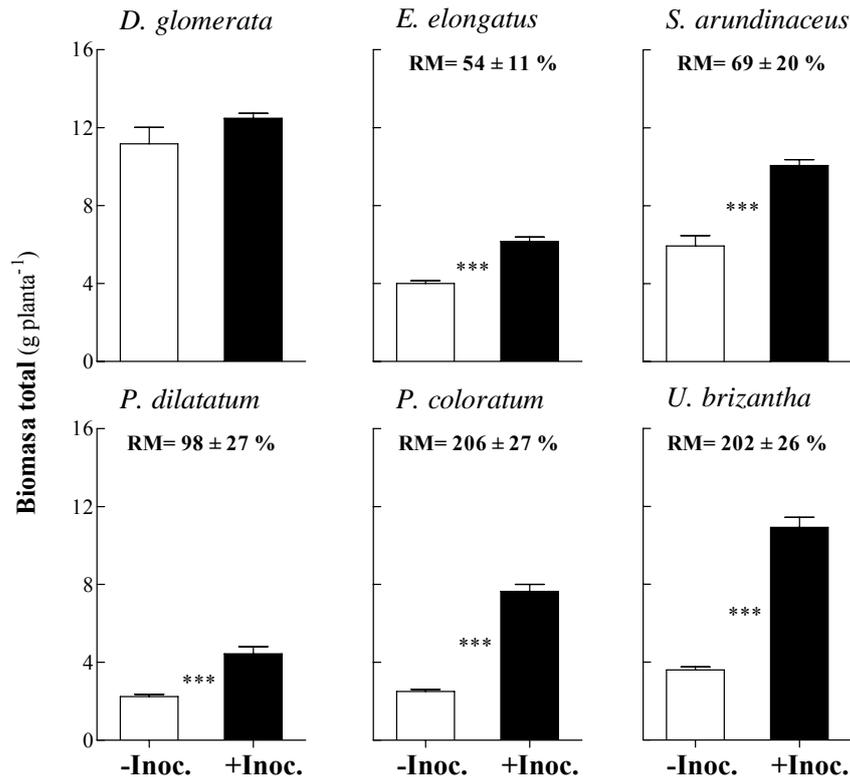


Figura 2.1. Biomasa total de plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares y la respuesta micorrícica (RM) \pm ES, indicada en negrita en la parte superior de cada figura, de seis especies de gramíneas forrajeras cultivadas creciendo en condiciones de déficit nutricional. Las especies son: *Dactylis glomerata*, *Elymus elongatus*, *Schedonorus arundinaceus*, *Paspalum dilatatum*, *Panicum coloratum* y *Urochloa brizantha*. Los valores son promedios \pm error estándar (n = 5). Los asteriscos indican diferencias significativas (***, $P < 0,001$) entre tratamientos para cada especie. La respuesta micorrícica (RM) fue calculada como: $RM = [(biomasa\ total\ de\ planta\ inoculada - biomasa\ total\ de\ planta\ no-inoculada) / biomasa\ total\ de\ planta\ no-inoculada] * 100$.

La biomasa aérea y subterránea fue mayor en plantas inoculadas que en las no-inoculadas en la mayoría de las especies estudiadas ($P < 0,01$; Cuadro 2.2). Esto significa que ambos parámetros explicaron los cambios observados en la producción de biomasa total (Cuadro 2.2). La gramínea templada *D. glomerata* fue la única especie que no mostró diferencias entre los tratamientos de inoculación ($P > 0,05$). En general, el número total de macollos por planta fue el factor principal que explicó los cambios observados en la biomasa aérea (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Biomasa aérea y subterránea y número total de macollos de plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de seis especies de gramíneas forrajeras cultivadas creciendo en condiciones de déficit nutricional. Los valores son promedios \pm error estándar ($n = 5$). Los asteriscos indican diferencias significativas (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) entre tratamientos para cada especie y componente de la biomasa.

Especie	Biomasa aérea (g)		Biomasa subterránea(g)		Núm. total de macollos	
	-Inoc.	+Inoc.	-Inoc.	+Inoc.	-Inoc.	+Inoc.
<i>Dactylis glomerata</i>	4,7 \pm 0,3	3,4 \pm 0,6	6,5 \pm 0,9	9,1 \pm 0,8	22,3 \pm 0,9	20,0 \pm 2,1
<i>Elymus elongatus</i>	1,7 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1 **	2,3 \pm 0,2	3,7 \pm 0,3 **	13,0 \pm 0,7	17,7 \pm 1,5 *
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	2,9 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1 **	3,0 \pm 0,6	6,3 \pm 0,3 **	10,8 \pm 1,1	15,3 \pm 0,7 *
<i>Paspalum dilatatum</i>	1,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2 **	1,2 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2 ***	6,2 \pm 0,5	7,0 \pm 0,5
<i>Panicum coloratum</i>	1,6 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3 ***	1,0 \pm 0,1	3,5 \pm 0,2 ***	11,0 \pm 0,4	15,5 \pm 2,9 *
<i>Urochloa brizantha</i>	1,9 \pm 0,1	4,8 \pm 0,4 ***	1,7 \pm 0,1	6,1 \pm 0,3 ***	3,8 \pm 0,5	7,4 \pm 0,2 ***

En la gramínea tropical *U. brizantha*, el número total de macollos por planta mostró el mayor incremento debido a la inoculación con HMA (100%: Cuadro 2.2). En *P. dilatatum*, no se registraron cambios en esta variable; mientras que, el peso individual de macollos adultos incrementó significativamente con la inoculación (-HMA: $0,17 \pm 0,02$ vs. +HMA: $0,25 \pm 0,02$ g macollo⁻¹; $P = 0,01$). En el resto de las especies, el peso individual de macollos adultos fue similar entre los tratamientos de inoculación ($P > 0,05$; los datos no se muestran). Cabe destacar, que las plantas inoculadas de la gramínea tropical *P. coloratum* fueron la únicas que presentaron macollos reproductivos (15% del número total de macollos; datos no mostrados).

2.4. DISCUSION

En condiciones de déficit nutricional, la simbiosis micorrícica fue beneficiosa para el crecimiento de la mayoría de las especies de gramíneas forrajeras. Sin embargo, en la literatura hay evidencias de un alto grado de variación en el efecto funcional de la simbiosis en relación a la identidad de los simbiosistas involucrados (Munkvold *et al.* 2004; Smith *et al.* 2004; Reinhart *et al.* 2012). En este sentido, además de la respuesta positiva general se observó que las especies difieren notablemente en su respuesta micorrícica (Figura 2.1). Las especies tropicales (*i.e.* *P. coloratum*, *P. dilatatum* y *U. brizantha*) fueron altamente sensibles a las micorrizas en comparación a las templadas (*i.e.* *S. arundinaceus* y *E. elongatus*) (Cuadro 2.1, Figura 2.1). No obstante, *D. glomerata* fue la única especie que no respondió significativamente a la simbiosis micorrícica. En este sentido, estos resultados para especies de gramíneas forrajeras cultivadas coinciden completamente con los obtenidos para especies de pastizal natural (Hetrick *et al.* 1988; Wilson & Harnett 1998; Hoeksema *et al.* 2010) donde las gramíneas tropicales mostraron respuestas positivas (98, 202 y 206%) a la simbiosis micorrícica de mayor magnitud que las gramíneas templadas (54 y 69%; respuesta neutra en *D. glomerata*). En particular, se vio que las gramíneas tropicales *Panicum virgatum* (Wilson & Harnett 1998) y *Urochloa brizantha* (Kanno *et al.* 2006) fueron

más sensibles a la simbiosis en comparación a la mayoría de las gramíneas templadas evaluadas (Hetrick 1988; Wilson & Harnett 1998). Para *P. dilatatum*, se ha demostrado que la especie es altamente colonizada bajo condiciones naturales en pastizales de la Pampa Deprimida (Grigera & Oesterheld 2004). Sin embargo, no hay información disponible de la respuesta de esta especie a la simbiosis micorrícica; como tampoco, para especies del mismo género. Por lo tanto, estos resultados son la primera evidencia de su respuesta micorrícica. En general, se especula que un sistema radical poco ramificado característico de las gramíneas tropicales podría estar asociado con una alta respuesta a la formación de micorrizas (Baylis 1972; Hetrick 1991; Newsham *et al.* 1995) pudiendo favorecer la absorción de nutrientes poco móviles. Sobre la base de nuestras observaciones visuales, las tres gramíneas tropicales utilizadas en este experimento presentaron sistemas de raíces profundas poco ramificadas. Sin embargo, no encontramos literatura específica del patrón de ramificación radical de estas especies. Notablemente, en nuestro estudio la inoculación con HMA tuvo un rol positivo significativo sobre el crecimiento de las gramíneas templadas (*i.e.* *E. elongatus* y *S. arundinaceus*) que coincidió con lo evidenciado previamente por Covacevich & Echeverría 2009 a pesar de utilizar distintas especies de hongos. De igual manera, esta respuesta también se observó en algunos cultivos de cereales (Smith & Smith 2011) y en diferentes géneros de gramíneas templadas cultivadas (Powell & Daniel 1978; Hall *et al.* 1984; Grimoldi *et al.* 2005) creciendo en condiciones variables de estrés en el suelo.

Se ha demostrado que la mayoría de las especies de pastizal que forman simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares muestran efectos positivos sobre componentes de la biomasa de la planta (Harnett & Wilson 2002; Hoeksema *et al.* 2010). Generalmente, el efecto en la absorción de fósforo sobre el éxito de la planta hospedadora es considerado el beneficio más importante de la simbiosis micorrícica (Koide 1991; Smith & Read 2008). Asimismo, se ha demostrado que las plantas inoculadas tuvieron mayores concentraciones internas de fósforo en la parte aérea (Stribley *et al.* 1980) (en este trabajo, la gramínea *U. brizantha*) y/o incrementaron la producción de biomasa; en consecuencia, el contenido de fósforo aumentó a nivel de planta entera (todas las especies analizadas, excepto la gramínea templada *D. glomerata*). Para gramíneas cespitosas, el incremento en la producción de biomasa de las plantas debido a cambios nutricionales es principalmente explicado por variaciones en la iniciación de yemas y por lo tanto, al número de macollos maduros por planta (Chapman & Lemaire 1993). Esta relación es particularmente fuerte para gramíneas templadas pero puede diferir en gramíneas tropicales (Williamson *et al.* 2012). En este trabajo, para la mayoría de las especies el aumento en la biomasa aérea de plantas inoculadas fue explicado por incrementos en el número total de macollos (Cuadro 2.2) mientras que *P. dilatatum* incrementó notablemente el peso seco individual de macollos adultos. Asimismo, plantas inoculadas de *P. coloratum*, la especie con la mayor respuesta micorrícica, alcanzaron el tamaño suficiente para generar macollos reproductivos. Por el contrario, plantas no-inoculadas de la gramínea templada *D. glomerata* tuvieron mayor producción de biomasa en relación a plantas no-inoculadas

de las demás especies analizadas. Es decir, que en condiciones de déficit nutricional, mostró un mejor comportamiento independientemente del tratamiento de inoculación. Por lo tanto, el alto grado de colonización registrado en esta especie podría ser explicado por otros efectos benéficos sobre el crecimiento de la planta, tales como la protección contra patógenos (Newsham *et al.* 1995) o que la relación costo-beneficio podría ser evidente en niveles más altos de fósforo disponible (Janos 2007). En consecuencia, para dilucidar el rol de la simbiosis micorrícica en esta última especie se necesita trabajo de investigación adicional, en diferentes condiciones de estrés y/o mayores dosis de fertilización fosforada.

Para resumir, en primer lugar los resultados de este trabajo muestran que la simbiosis micorrícica fue beneficiosa para cinco de las seis especies analizadas. En mi conocimiento, este es el primer estudio descriptivo de la respuesta individual de gramíneas forrajeras cultivadas a la simbiosis micorrícica, bajo condiciones de déficit nutricional. En segundo lugar, se encontró que las especies respondieron diferencialmente a la simbiosis micorrícica: las especies tropicales (*P. coloratum* = *U. brizantha* > *P. dilatatum*) mostraron mayor sensibilidad que las especies templadas (*S. arundinaceus*, *E. elongatus* y *D. glomerata*). Estas respuestas podrían tener implicancias importantes para el crecimiento individual de las especies; como así también, para su incorporación en suelos con diferentes condiciones nutricionales. Por lo tanto, se especula que la mayor respuesta micorrícica, registrada en gramíneas forrajeras tropicales, podría ser un posible mecanismo que explica su habilidad para crecer en suelos deficitarios en nutrientes. En conclusión, este trabajo es particularmente relevante ya que provee información novedosa y útil que podría ser usada en la selección de especies modelo, con distinta respuesta micorrícica, para estudiar la simbiosis; como también, para optimizar la producción de forraje en pastizales y pasturas sujetas a condiciones de déficit nutricional.

CAPÍTULO III

Diferencias en la dinámica de crecimiento de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* en respuesta a la inoculación con HMA y al suministro de fósforo

3.1. INTRODUCCION

El fósforo es un nutriente esencial para todos los organismos, incluyendo plantas y hongos, pero difícil de obtener debido a su poca movilidad en el suelo (Nye & Tinker 1977; Schachtman *et al.* 1998; Smith & Smith 2011a). Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre raíces de plantas y hongos del suelo, a partir de las cuales las plantas incrementan la absorción del fósforo. Se sabe que entre especies vegetales existe un amplio rango de concentraciones internas de fósforo que resultan suficientes para promover el crecimiento de las plantas (Fitter & Hay 1987; Fohse *et al.* 1988). En un sentido general, la demanda de fósforo por las plantas se relaciona con las tasas actuales de crecimiento y la concentración mínima de fósforo en tejido requerida para sostener dicho crecimiento (Koide 1991). En condiciones óptimas, las especies pueden presentar diferencias en sus tasas potenciales de crecimiento y conforme a estas, son sus demandas de fósforo (*i.e.* tasas de absorción). A su vez, especies con altos requerimientos internos de fósforo tienen demandas más altas que especies con baja concentración de este nutriente en los tejidos (Koide 1991). Al respecto, se especula que las diferencias en la relación entre demanda de fósforo y el crecimiento de las plantas entre especies podrían estar reguladas por parámetros fisiológicos y/o por la dependencia de las plantas a las micorrizas.

Dentro de las gramíneas forrajeras cultivadas, las gramíneas tropicales (C₄) son en general más eficientes en el uso del fósforo que las templadas ya que con menor concentración de nutriente en el tejido suelen tener altas tasas fotosintéticas y mayor producción de biomasa (Halsted & Lynch 1996; Nanamori *et al.* 2004; Rao 1996b). Además, se sabe que durante el proceso de fotosíntesis las especies C₄ acumulan CO₂ cerca del sitio de concentración de la Rubisco y por esto, alcanzan bajos puntos de compensación de CO₂ y una fotorrespiración despreciable que -en condiciones de alta temperatura- resulta en tasas fotosintéticas más altas que en las especies C₃. Asimismo, se sabe que las micorrizas a través de incrementos en la absorción de fósforo pueden aumentar el crecimiento de las plantas. Se ha demostrado que en gramíneas tropicales la respuesta micorrícica es mayor que en las templadas (Hetrick *et al.* 1988, Wilson & Hartnett 1998, Hoeksema *et al.* 2010). Coincidentemente, en el Capítulo II de esta tesis (*i.e.* Cavagnaro *et al.* 2014) encontré que las gramíneas forrajeras tropicales (*P. coloratum* = *U. brizantha* > *P. dilatatum*) tuvieron mayor respuesta al establecimiento de la simbiosis con HMA que las templadas (*S. arundinaceus*, *E. elongatus* y *D. glomerata*). Estas diferencias en parte, pueden ser explicadas por la morfología radical y la habilidad de las especies para adquirir el fósforo (Hetrick *et al.* 1988). También, se sabe que la respuesta micorrícica de las plantas puede variar con la disponibilidad de fósforo en el suelo (Janos 2007). En condiciones de baja (menores a 10 ppm) e intermedia (10-15 ppm) disponibilidad de fósforo, las plantas son más colonizadas por hongos micorrícicos y generalmente, tienden a aumentar la tasa de absorción de fósforo y muestran tasas de crecimiento más altas que las no colonizadas (Hetrick *et al.* 1990, Hoeksema *et al.* 2010). Estos resultados coinciden con los reportados para gramíneas forrajeras tropicales (Mosse 1972; Siqueira *et al.* 1990; Souza 1999; Kanno *et al.*

2006); como también, para algunas gramíneas templadas (Grimoldi *et al.* 2005). Sin embargo, no existe ningún antecedente en el que se evalúen en forma comparativa los efectos del suministro de fósforo (*i.e.* por micorrizas y/o fertilización) sobre la dinámica de crecimiento de gramíneas forrajeras, con distinta respuesta micorrícica.

En este contexto, el objetivo principal de este capítulo fue estudiar el rol de las micorrizas y el suministro de fósforo sobre la dinámica de crecimiento de gramíneas forrajeras, con distintos requerimientos internos de fósforo y respuestas micorrícicas contrastantes. Se llevó a cabo un experimento manipulativo con dos especies: una gramínea templada (C₃) (*i.e.* *Elymus elongatus*) y una tropical (C₄) (*i.e.* *Urochloa brizantha*) con baja y alta respuesta micorrícica, respectivamente. Las especies fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos en el Capítulo II de esta tesis. Para cada especie, la mitad de las plántulas fueron inoculadas con una mezcla de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y el resto crecieron sin inocular, en un sustrato de arena estéril con distintas dosis de fósforo durante tres meses. Al finalizar el experimento, se examinó el porcentaje de colonización micorrícica, la concentración de fósforo, la producción de biomasa, el contenido de fósforo y la eficiencia en la utilización del fósforo en relación al tamaño de planta.

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Material vegetal y diseño experimental

En base a los resultados descriptos en el Capítulo II, se seleccionaron dos especies de gramíneas forrajeras cultivadas: *i)* *Elymus elongatus* (Host) Runemark y *ii)* *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, con baja y alta respuesta micorrícica, respectivamente. Para cada una de ellas, se empleó un diseño factorial completamente aleatorizado con dos factores principales: **1)** inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (-Inoc. y +Inoc.) y **2)** suministro de fósforo soluble (tres niveles: bajo, intermedio y alto). El experimento se realizó en un invernáculo de IFEVA (Facultad de Agronomía-UBA). Brevemente, las plantas fueron producidas a partir de semillas germinadas en incubadora (20-30°C) y trasplantadas en macetas (20 cm de alto x 10 cm de diámetro, 1 kg de peso). El sustrato para el crecimiento de las plantas fue arena esterilizada con pequeñas cantidades de roca fosfórica, como fuente de fósforo de baja disponibilidad (171 mg P₂O₅ kg⁻¹ arena; según Grimoldi *et al.* 2005). La inoculación se realizó con una mezcla de tres especies exóticas de hongos micorrícicos: *Rhizophagus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schübler (= *G. intrarradices* BAFC 3108), *Simiglomus hoi* (S.M. Berch & Trappe) G.A. Silva, Oehl & Sieverd (= *G. hoi* BEG 104) y *Funneliformis mosseae* (Nicol. & Gerd.) C. Walker & Schuessler (= *G. mosseae* LPS SB1). Dichas especies fueron seleccionadas teniendo en cuenta que son especies comunes en agroecosistemas y que se ha demostrado su capacidad de colonizar especies herbáceas, en particular gramíneas forrajeras cultivadas (ver más detalle, en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo II de esta tesis). El inóculo formado por raíces colonizadas, micelio externo y esporas (*ca.* 100 esporas viables por 100 g de inóculo seco), se aplicó en el momento del trasplante a razón de

4,29 g por maceta y se mezcló con la arena para asegurar el contacto entre las raíces de las plantas y los hongos micorrícicos arbusculares. Las macetas sin y con inóculo micorrícico fueron ubicadas en cajones plásticos y mesadas separadas para prevenir la contaminación de plantas no-inoculadas. Dentro de cada especie, las plantas fueron organizadas en un diseño aleatorio con cinco réplicas por tratamiento (2 HMA x 3 P x 5 réplicas = 30 plantas por especie). Durante el experimento, las macetas y cajones fueron rotados periódicamente, cada 7 siete días, para asegurar condiciones homogéneas de luz.

Los niveles de fósforo soluble fueron aplicados mediante el riego con soluciones de Hoagland modificadas, variando la concentración de KH_2PO_4 : nivel bajo (0,02 mM), intermedio (0,1 mM) y alto (1 mM). En todos los tratamientos la composición de macroelementos (mM l^{-1}) fue: 1,5 KNO_3 , 2,0 $\text{Ca} (\text{NO}_3)_2$, 0,5 MgSO_4 y la de microelementos ($\mu\text{M l}^{-1}$) fue: 0,125 Fe-EDTA, 0,0125 H_3BO_3 , 0,001 MnCl_2 , 0,001 ZnCl_2 , 0,00025 CuCl_2 , 0,00025 MoO_3 . El suministro de potasio se mantuvo constante modificando la concentración de KCl , proporcionalmente. Además, se agregó nitrato de amonio ($2,5 \text{ mM l}^{-1}$) para facilitar la generación de micorrizas. Mediante la realización de un ensayo preliminar, se verificó que las soluciones y condiciones ambientales fueran adecuadas para el crecimiento de las plantas. Al inicio del experimento, todas las plantas fueron regadas diariamente a capacidad de campo con la solución de bajo fósforo (ca. 25ml), durante 5 semanas. Luego de este período, los tratamientos de suministro de fósforo fueron asignados al azar y hasta finalizar el experimento (11 semanas más) las plantas fueron regadas con soluciones de tres niveles de fósforo soluble: bajo (0,02 mM), intermedio (0,1 mM) o alto (1mM), según la metodología antes implementada. Las plantas crecieron en invernáculo (durante 4 meses, Marzo-Junio) bajo condiciones controladas de temperatura. En horas cercanas al mediodía y días soleados el flujo fotónico fotosintético (PPFD) fue mayor a $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La temperatura mínima del invernáculo fue en promedio de 17°C , mientras que la temperatura máxima fue disminuyendo levemente con la estación con un valor máximo de 28°C para el mes de Marzo oscilando en valores máximos cercanos a los $25\text{-}27^\circ\text{C}$ en los meses siguientes. Estas condiciones resultaron adecuadas para el crecimiento de las dos especies analizadas.

3.2.2. Protocolo de cosecha, colonización micorrícica y análisis químico de fósforo

Al finalizar el experimento, cada planta fue cosechada y se separó la fracción aérea de la subterránea. Las raíces se lavaron y se determinó el peso fresco de las mismas. Posteriormente, se separó una muestra de raíz de peso conocido para evaluar la colonización micorrícica. Todas las muestras de biomasa se secaron durante 72hs a 80°C en estufa y posteriormente, fueron pesadas.

La colonización micorrícica total se calculó mediante la observación con microscopio óptico de estructuras micorrícicas (hifas, arbusculos y vesículas) en raíces previamente teñidas, según la metodología propuesta por Phillips & Hayman (1970). Para cada especie, se cuantificó el porcentaje de raíz colonizada en función del total de raíces observadas y el porcentaje de vesículas y arbusculos en relación al número de raíces

efectivamente colonizadas. A partir de estos valores, se calculó también la relación A/V como un parámetro general que denota el estado funcional de la simbiosis (*i.e.* altos valores en A/V indicaría una relación simbiótica activa mientras que, bajos valores en A/V representarían una simbiosis pasiva destinada al almacenamiento). Para esto, se observaron cien campos oculares por cada repetición con un aumento de 200× en el ocular (McGonigle *et al.* 1990)

La concentración de fósforo en parte aérea y subterránea se determinó a partir de la digestión con HNO_3/HCl y la cantidad de fósforo fue medida por el método colorimétrico de Hanson (1950). La concentración de fósforo total se obtuvo a partir de la concentración del nutriente relativizado por la biomasa de cada uno de los compartimentos vegetales. Para chequear la exactitud de la digestión y el procedimiento analítico del fósforo, cada 15 muestras, se incluyó material homogéneo y de concentración conocida proveniente de otra especie de gramínea como referencia. El contenido de fósforo para cada especie y tratamiento se calculó a partir de la biomasa cosechada, tanto en parte aérea como subterránea, y de la concentración del nutriente en cada compartimento. A partir de dichos valores, se obtuvo el contenido total del nutriente acumulado por planta. Para evaluar el rol de las micorrizas sobre la dinámica del fósforo absorbido se analizó la relación entre eficiencia en la utilización del fósforo (EUF) y tamaño de planta, como indicadores de crecimiento. La eficiencia en la utilización del fósforo (EUF) se calculó a partir del cociente entre el peso seco de las plantas y el contenido de fósforo en el tejido vegetal (Koide 1991). A su vez, para discutir el uso y grado de limitación de fósforo en las dos especies evaluadas se aplicó el modelo conceptual de James *et al.* 2005 para cada una de las dosis de fósforo planteadas en el experimento. Este modelo se basa en relacionar los cambios relativos que se producen en la concentración de fósforo total y producción de biomasa de las plantas, como resultado de la adición de nutrientes al sistema (en este caso, fósforo vía micorrizas y/o fertilización), tomando las variaciones porcentuales de las variables en relación con el tratamiento testigo (plantas no-inoculadas) para cada nivel de suministro de fósforo.

3.2.3. Análisis estadístico

Para cada especie, se evaluaron diferencias en el porcentaje de colonización micorrícica, estructuras fúngicas (hifas, vesículas y arbusculos) y en la relación arbusculos/vesículas de plantas inoculadas entre los diferentes tratamientos de suministro de fósforo, mediante ANOVA de una sola vía. El resto de las variables (producción de biomasa, concentración y contenido de fósforo en parte aérea, subterránea y total) se analizaron a través de ANOVA factorial (Steel & Torrie, 1980). Los factores principales fueron inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (-Inoc. y +Inoc.) y suministro de fósforo soluble (tres niveles: 0,02mM; 0,1mM y 1mM). En todos los casos, las diferencias entre medias se analizaron mediante el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$) y previamente, se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Para cumplir con los supuestos del ANOVA los datos de biomasa fueron

transformados ($\log x$). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa INFOSTAT (Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Todas las variables se expresan como promedios \pm 1 error estándar (ES).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Colonización micorrícica y concentración de fósforo en planta

Todas las plantas mostraron valores promedio por encima del 40% de colonización micorrícica (Cuadro 3.1). Sin embargo, la colonización disminuyó significativamente con el aumento en el suministro de fósforo ($P \leq 0,05$). En los niveles de bajo e intermedio suministro de fósforo, para las dos especies se registraron valores entre 71 y 77% de colonización micorrícica; mientras que en alto fósforo la colonización fue menor (Cuadro 3.1). De igual manera, en *E. elongatus* en condiciones de alto fósforo se detectó una disminución en el porcentaje de vesículas, y la relación arbusculos/vesículas aumentó en comparación con los demás tratamientos. En esta especie, el suministro de fósforo no tuvo efectos significativos sobre el porcentaje de arbusculos ($P = 0,173$); como tampoco, en *U. brizantha* para ninguna de estas variables ($P \geq 0,05$). En plantas no-inoculadas, no hubo registros de colonización por hongos micorrícicos.

Cuadro 3.1. Colonización micorrícica en plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. La colonización micorrícica se expresa en relación al total de raíces observadas (RC) y la presencia de vesículas (V) y arbusculos (A) en función de raíces colonizadas. A partir de estos valores, se calculó también la relación de arbusculos y vesículas (A/V). Los valores son promedios \pm 1 ES ($n = 5$). Letras distintas indican diferencias significativas (LSD Fisher; $P < 0,05$) entre tratamientos para cada una de las especies.

Especie	Nivel P (mM)	Colonización micorrícica			
		RC (%)	A (%)	V (%)	A/V
<i>E. elongatus</i>	0,02	77 \pm 5 a	49 \pm 5 a	42 \pm 4 a	1,2 \pm 0,2 b
	0,1	71 \pm 3 ab	35 \pm 7 a	37 \pm 5 a	1,0 \pm 0,2 b
	1	55 \pm 6 b	31 \pm 7 a	10 \pm 1 b	3,1 \pm 0,9 a
<i>U. brizantha</i>	0,02	73 \pm 3 a	24 \pm 4 a	25 \pm 1 a	1,0 \pm 0,2 a
	0,1	77 \pm 3 a	30 \pm 11 a	24 \pm 5 a	1,1 \pm 0,3 a
	1	45 \pm 11 b	8 \pm 1 a	17 \pm 8 a	0,6 \pm 0,4 a

En las dos especies, la concentración de fósforo de plantas no-inoculadas e inoculadas incrementó con el suministro de fósforo en todos los compartimientos analizados (Cuadro 3.2). En *E. elongatus* hubo interacción entre factores sobre la concentración de fósforo en parte aérea, subterránea y total ($P \leq 0,05$; Cuadros 3.2 y 3.3). En los niveles de bajo e intermedio suministro de fósforo, la presencia de hongos micorrícicos (+Inoc.) no modificó la concentración de fósforo en parte aérea; mientras que en la parte subterránea se incrementó en relación a plantas no-inoculadas (-Inoc.). Como resultado

de ello, la concentración de fósforo total de plantas inoculadas fue mayor que en las no-inoculadas (Cuadro 3.2). Contrariamente, en alto fósforo la inoculación con HMA disminuyó un 14% la concentración de fósforo en parte aérea y un 18% en subterránea, que se tradujo en una menor concentración de fósforo total.

Cuadro 3.2. Concentración de fósforo en plantas no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Los valores son promedios \pm 1 ES (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas (LSD Fisher; $P < 0,05$) entre tratamientos.

Especie	Nivel P (mM)	Concentración de P (mg P g ⁻¹)					
		Aérea		Subterránea		Total	
		-Inoc.	+Inoc.	-Inoc.	+Inoc.	-Inoc.	+Inoc.
<i>E. elongatus</i>	0,02	0,65 \pm 0,05 e	0,77 \pm 0,07 de	0,56 \pm 0,06 d	0,80 \pm 0,05 de	0,61 \pm 0,06 e	0,78 \pm 0,02 d
	0,1	0,96 \pm 0,04 cd	1,17 \pm 0,07 c	0,68 \pm 0,04 de	0,98 \pm 0,10 c	0,85 \pm 0,04 d	1,09 \pm 0,04 c
	1	5,73 \pm 0,30 a	4,95 \pm 0,31 b	3,57 \pm 0,07 a	2,91 \pm 0,02 b	5,18 \pm 0,26 a	4,36 \pm 0,24 b
<i>U. brizantha</i>	0,02	0,84 \pm 0,09 c	0,56 \pm 0,08 d	0,45 \pm 0,05 bc	0,45 \pm 0,05 bc	0,67 \pm 0,04 bc	0,52 \pm 0,05 c
	0,1	0,95 \pm 0,08 c	0,70 \pm 0,05 cd	0,42 \pm 0,05 c	0,55 \pm 0,04 b	0,76 \pm 0,06 b	0,65 \pm 0,05 bc
	1	3,86 \pm 0,17 a	3,52 \pm 0,07 b	0,84 \pm 0,02 a	0,88 \pm 0,04 a	2,69 \pm 0,06 a	2,59 \pm 0,13 a

En cambio, en la especie *U. brizantha*, no hubo interacción entre los factores sobre la concentración de fósforo en parte aérea, subterránea y total ($P \geq 0,05$; Cuadro 3.3). En general, la concentración de fósforo aumentó como resultado de la adición de este nutriente ($P \leq 0,001$) y disminuyó en presencia de micorrizas ($P \leq 0,05$). Plantas en condiciones de alto suministro de fósforo, registraron en promedio mayor concentración de fósforo en parte aérea y subterránea en comparación con los demás tratamientos. Esto coincidió con un aumento del 320% en la concentración de fósforo total. La inoculación con HMA, en cambio disminuyó significativamente la concentración de fósforo en parte aérea ($P \leq 0,001$) y se tradujo en una menor concentración de fósforo total ($P \leq 0,05$).

3.3.2. Producción de biomasa y contenido de fósforo en planta

En las dos especies, el aumento en el suministro de fósforo incrementó la producción de biomasa total de las plantas (Figura 3.1). Sin embargo, la respuesta de las plantas a la inoculación con HMA fue distinta entre las especies y tratamientos de suministro de fósforo. En *E. elongatus* hubo interacción entre factores sobre la producción de biomasa total ($P \leq 0,05$; Cuadro 3.3). En bajo fósforo, la inoculación con HMA incrementó significativamente la biomasa total de plantas inoculadas respecto a las no-inoculadas (Figura 3.1).

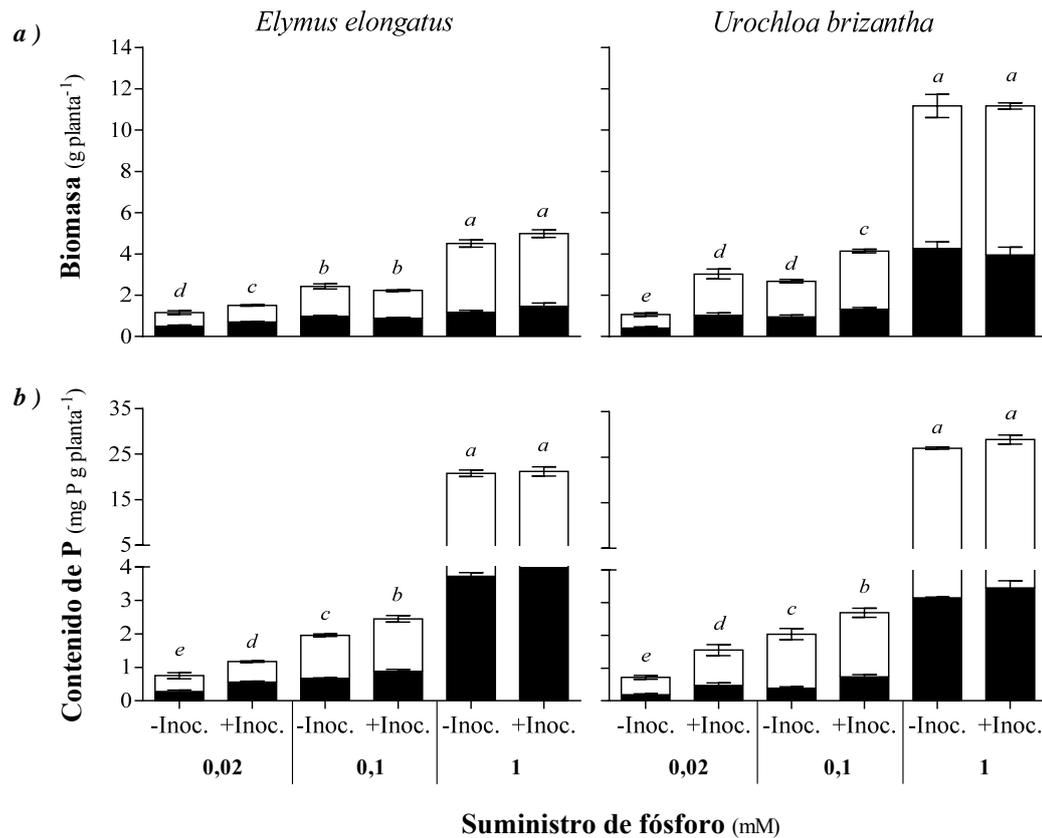


Figura 3.1. Biomasa total (a) y contenido de fósforo (b) en *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares. Los valores son promedios \pm error estándar (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (LSD Fisher; $P < 0,05$) entre tratamientos para cada una de las especies. En el cuadro 3.3 se detallan los resultados de los ANOVA para cada especie y componente de la biomasa.

La biomasa aérea mostró una tendencia a aumentar (las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas); por lo tanto, los cambios observados en la biomasa total de plantas inoculadas fueron mayormente explicados por incrementos en la biomasa subterránea. Para esta especie, en los demás tratamientos de fósforo la inoculación no tuvo efectos sobre ningún componente de la biomasa. En la especie *U. brizantha* también hubo interacción entre factores ($P \leq 0,05$; Cuadro 3.3). La biomasa total de plantas inoculadas incrementó significativamente según el suministro de fósforo (Figura 3.1). En bajo fósforo, las plantas inoculadas tuvieron mayor producción de biomasa aérea y subterránea en relación a las no-inoculadas, en el nivel intermedio de suministro de fósforo se detectaron incrementos en la biomasa aérea, y alto fósforo no se evidenciaron cambios (Figura 3.1). Es importante destacar que la producción de biomasa total alcanzada por *U. brizantha* fue superior a la de *E. elongatus*.

En la especie *E. elongatus*, el contenido de fósforo total en plantas inoculadas incrementó según el nivel de fósforo ($P \leq 0,05$; Cuadro 3.3). En bajo fósforo, las plantas

inoculadas acumularon más fósforo que las no-inoculadas, producto de la combinación de una mayor producción de biomasa subterránea con alta concentración de fósforo en los tejidos (Figura 3.1; Cuadro 3.1). En el nivel intermedio de fósforo, en cambio, las plantas inoculadas también acumularon más fósforo en la parte subterránea pero sin generar cambios en biomasa. A diferencia de *E. elongatus*, en *U. brizantha* no hubo interacción entre factores ($P \geq 0,05$; Cuadro 3.3). Sin embargo, los tratamientos de inoculación con HMA y de mayor suministro de fósforo incrementaron significativamente el contenido de fósforo en parte aérea, subterránea y total. Las plantas con mayor suministro de fósforo mostraron un aumento en la acumulación de fósforo resultado de una mayor producción de biomasa con alta concentración de fósforo en los tejidos. La inoculación con HMA en cambio, solo incrementó la biomasa aérea. Por lo tanto, el aumento en la acumulación de fósforo en plantas inoculadas fue resultado de una mayor producción de biomasa aérea con baja concentración de fósforo (Figura 3.1; Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Resultados de los ANOVA factorial para los tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y suministro de fósforo sobre la concentración de fósforo, producción de biomasa y contenido de fósforo en plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha*.

Especie		Concentración de P (mg P g ⁻¹)			Producción de biomasa (g planta ⁻¹)			Contenido de P (mg P planta ⁻¹)		
		Aérea	Subterránea	Total	Aérea	Subterránea	Total	Aérea	Subterránea	Total
<i>E. elongatus</i>	Nivel de P	516,05***	1019,3***	750,31***	225,15***	35,58***	300,92***	1295,33***	776,77***	1917,33***
	HMA	0,0012 ^{ns}	0,51 ^{ns}	6,20 ^{ns}	0,42 ^{ns}	4,86*	5,24*	0,86 ^{ns}	33,30***	29,80***
	P x HMA	4,36*	36,01***	10,85**	0,77 ^{ns}	3,27 ^{ns}	5,47*	1,12 ^{ns}	1,12 ^{ns}	8,79**
	CM error	0,17	0,28	0,19	1,29	0,59	0,19	0,38	0,11	0,20
<i>U. brizantha</i>	Nivel de P	564,05***	47,92***	613,63***	244,13***	183,72***	345,76***	9324,28***	409,16***	2357,56***
	HMA	13,54**	2,71 ^{ns}	5,15*	36,03***	2,05 ^{ns}	15,04**	11,25**	24,21***	24,39***
	P x HMA	0,08 ^{ns}	1,18 ^{ns}	0,08 ^{ns}	7,01**	3,15*	3,77*	0,37 ^{ns}	1,77 ^{ns}	1,60 ^{ns}
	CM error	0,04	0,01	0,02	0,02	0,14	0,52	0,11	0,01	0,02

En el cuadro se presentan valores de *F* y de los cuadrados medios del error (CM error). Las diferencias significativas se indican como (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ y ns, $P > 0,05$) para cada una de las especies. Los grados de libertad para P, HMA, P × HMA y error experimental son 2, 1, 2 y 19 respectivamente.

3.4. DISCUSION

3.4.1. Efectos de la fertilización sobre la colonización micorrícica

En las dos especies, el grado de colonización micorrícica fue menor en condiciones de alto suministro de fósforo (Cuadro 3.1). Esta respuesta es muy frecuente en suelos con alta fertilidad y también ha sido documentado en experimentos manipulativos de fertilización fosforada (Peng *et al.* 1993; Covacevich *et al.* 1995; Bi *et al.* 2003; Grimoldi *et al.* 2005; Raiesi & Ghollarata 2006; Okon *et al.* 2007). Para algunos autores, el estatus de fósforo en la planta es el parámetro indicador que controla el establecimiento y funcionamiento de las micorrizas; así, como consecuencia de la fertilización, las plantas mejoran su nutrición por lo que generan un mecanismo de represión de la colonización micorrícica (Abbott & Robson 1982; Barea 1991; Covacevich *et al.* 1995). Los resultados obtenidos por Covacevich *et al.* 2007 apoyan esta idea. En ese trabajo los autores han demostrado que la colonización micorrícica de una gramínea templada como es el trigo (*Triticum aestivum*) disminuyó notablemente debido a altos niveles de fósforo en el suelo. Sin embargo, el efecto nutricional de las micorrizas no se relaciona en forma lineal con el grado de colonización de las raíces, ya que también depende de la especie de planta hospedante, del hongo presente y de la actividad relativa de las estructuras fúngicas (Monzón & Azcón 1996). Se ha postulado que valores altos en la proporción de arbusculos se correlacionan positivamente con los beneficios proporcionados a las plantas, mientras que la proporción de vesículas indica almacenamiento y por lo tanto, un mayor beneficio relativo para los hongos (Johnson 1993; Kiers & Denison 2008). Nuestros resultados muestran que al aumentar el suministro de fósforo, los parámetros de colonización micorrícica de las especies estudiadas responden en forma contrastante: en *E. elongatus* disminuyó el porcentaje de vesículas y la relación arbusculos/vesículas; mientras que en *U. brizantha* no hubo efectos significativos para ninguna de estas variables. Para *E. elongatus*, los resultados podrían indicar que en estas condiciones, los hongos micorrícicos reciben relativamente menor proporción de carbono proveniente de las plantas y por ende, su crecimiento está limitado viéndose reflejado a través de la caída en la presencia de vesículas. No obstante, valores altos en la relación arbusculos/vesículas denotan que la simbiosis micorrícica está activa. En cambio, se sabe que la especie *U. brizantha* tiene mayor sensibilidad para la formación de micorrizas que *E. elongatus* razón por la cual se mantiene la estructura de los hongos micorrícicos aún en condiciones de alto suministro de fósforo.

3.4.2. Respuestas diferenciales en producción de biomasa y absorción de fósforo

En ambas especies, la fertilización promovió el crecimiento de las plantas, sin embargo, el cambio en la producción de biomasa entre plantas inoculadas y no-inoculadas disminuyó ante el aumento en el suministro de fósforo (Cuadro 3.1; Figura 3.1). Por lo tanto, los resultados coinciden plenamente con el modelo de respuesta sigmoidea propuesto por Janos

(2007) (ver Capítulo I, Figura 1.1), pero el patrón de respuesta en función del fósforo disponible fue distinto para cada una de las especies evaluadas. Según este modelo, a medida que aumenta el nivel de fósforo disponible en el suelo, las plantas micorrícicas pueden presentar una disminución paulatina de su crecimiento en relación a las plantas no micorrícicas. Incluso, se ha demostrado que en condiciones extremas de alto fósforo los hongos asociados pueden representar un efecto de parasitismo para la planta (Johnson *et al.* 1997). Pero, en condiciones de baja e intermedia disponibilidad de fósforo las plantas micorrícicas son más colonizadas y generalmente, incrementan la concentración de fósforo interna y tienen tasas de crecimiento más altas que las plantas no micorrícicas (Hetrick *et al.* 1990). En mi trabajo de tesis, cuando el suministro de fósforo fue bajo, en *E. elongatus* las micorrizas aumentaron la concentración de fósforo total y la producción de biomasa (*i.e.* un 29% más de biomasa total) que se tradujo a un mayor contenido de fósforo en planta (Figura 3.1). Este resultado coincide con trabajos previos en los que se reportan incrementos significativos simultáneos en la concentración y contenido de fósforo total por acción de las micorrizas en gramíneas forrajeras cultivadas (Crush 1995; Grimoldi *et al.* 2005). En *U. brizantha* la respuesta fue distinta, ya que tanto en el nivel de bajo e intermedio suministro de fósforo, las plantas inoculadas presentaron una menor concentración interna de fósforo pero notables incrementos en biomasa (183% en bajo fósforo y 54% en el nivel intermedio de fósforo) y contenido de fósforo total (Figura 3.1). Se sabe que *U. brizantha* es una especie muy sensible a la formación de micorrizas, que en parte podría ser explicado por la presencia de un sistema radical poco ramificado (Baylis 1972; Hetrick 1991). Por lo tanto, en dichas condiciones, esta especie obtuvo mayores beneficios relativos (*i.e.* en términos de producción de biomasa) de la simbiosis micorrícica que *E. elongatus*. A su vez, es importante destacar que en alto fósforo no se encontraron cambios en la producción de biomasa en ninguna de las dos especies, por lo tanto, no hubo efectos parasíticos de los hongos micorrícicos sobre el crecimiento de las plantas en el rango de fósforo explorado. Para esta última condición, se podría especular que el costo en carbono sea relativamente bajo en estas especies (como en *Ryegrass perenne*, Grimoldi *et al.* 2006) y/o que las plantas podrían estar recibiendo otros beneficios micorrícicos aparte de la provisión de fósforo (Newsham *et al.* 1995). A partir de este análisis, se observa que las micorrizas en *U. brizantha* promovieron primordialmente la producción de biomasa, mientras que en *E. elongatus* estimularon la concentración del fósforo en tejido. Este contraste en las respuestas observadas entre especies, con respuestas micorrícicas y requerimientos internos de fósforo diferentes, indujeron a la exploración (sección 3.4.3) de divergencias específicas en la eficiencia de utilización del fósforo tanto si es provisto por fertilización como por la asociación con hongos micorrícicos arbusculares.

3.4.3. Diferencias específicas en la utilización del fósforo aportado por la fertilización y/o la presencia de micorrizas

Es sabido que entre especies vegetales existe un rango amplio de concentraciones internas de fósforo necesarias para promover el crecimiento de las plantas. Asimismo, se ha demostrado que a medida que la planta aumenta en tamaño (*i.e.* crece) se produce un aumento en la proporción de tejidos estructurales y en consecuencia, la concentración de nitrógeno y/o fósforo por unidad de biomasa disminuyen, aún cuando la disponibilidad de nutrientes en el suelo se mantiene constante (Caloin & Yu 1982; Hocking & Steer 1983; Greenwood 1983; Koide 1991; Lemaire & Gastal 1997; Bélanger & Gastal 2000). En esta sección se postula una interpretación de los cambios generados en la concentración de fósforo y producción de biomasa de las plantas, como resultado de la adición de nutrientes al sistema por fertilización y/o por vía micorrícica. En primer lugar, se analiza la variación en la eficiencia de utilización del fósforo (EUF) en relación al tamaño de las plantas tanto no-inoculadas como inoculadas. En segundo lugar, como una aproximación más general, se aplica el modelo conceptual propuesto por James *et al.* 2005 para interpretar las diferencias en el uso y grado de limitación de fósforo en el crecimiento de las plantas en las dos especies evaluadas.

El concepto de eficiencia en la utilización del fósforo (EUF) se refiere a la cantidad de crecimiento obtenido (*i.e.* expresado como peso seco) por unidad de fósforo adquirido. En términos numéricos, la EUF se calcula a partir del cociente entre el peso seco de las plantas y el contenido de fósforo en el tejido vegetal (Koide 1991). Como mencioné anteriormente, la concentración de nutrientes puede variar en relación a al grado de crecimiento de las plantas, y por lo tanto esta variación debe ser tomada en cuenta al analizar la eficiencia en el uso de los nutrientes de forma tal de no confundir efectos meramente asociados al tamaño de las plantas con diferencias inducidas por cambios/ajustes a las condiciones ambientales (*i.e.* factores abióticos y bióticos que modulan el crecimiento de las plantas). Para el nitrógeno y el fósforo, esta disminución en la concentración con el tamaño de planta es un proceso que se atribuye al aumento en la proporción entre componentes primarios estructurales (*e.g.* tallos, pecíolos, etc.) y metabólicamente activos (*e.g.* finas raíces, hojas activas) (Greenwood 1983; Hocking & Steer 1983; Lemaire & Gastal 1997). En ambos casos, se sabe que al aumentar la proporción de tejidos estructurales se produce simultáneamente una disminución en el contenido de nutriente por unidad de biomasa (Bélanger & Gastal 2000). Por ende, estas plantas producen más biomasa por unidad de nutriente absorbido y en consecuencia, son consideradas más eficientes en el uso del nutriente. Esta respuesta ha sido documentada en distintas especies de plantas (*i.e.* cultivos y gramíneas forrajeras) a nivel de planta individual y en experimentos de campo, como así también en experimentos bajo condiciones controladas (Caloin & Yu 1982; Lemaire & Chartier 1992).

En mis resultados, como era de esperarse, se observa que la EUF disminuyó a medida que aumenta el suministro de fósforo (comparar los valores del eje Y de la Figura 3.2). Además, se puede observar en la mayoría de las situaciones una relación positiva entre eficiencia en la utilización del fósforo (EUF) y tamaño de planta; con excepción de *E. elongatus* en bajo fósforo que mostró una tendencia negativa (Figura 3.2). Por último, es de destacar que los puntos correspondientes a las plantas no-inoculadas e inoculadas están en todos los casos sobre una misma línea de respuesta, lo que indicaría que la asociación con hongos micorrícicos no está afectando la relación entre EUF y tamaño de las plantas (Figura 3.2). Es decir, la concentración de fósforo en tejido relacionada al crecimiento de las plantas es independiente a la presencia de micorrizas. Esto coincide con lo evidenciado por Covacevich *et al.* 2007. En ese trabajo los autores demuestran que las variaciones en la concentración de fósforo de las plantas son moduladas por la fertilización fosforada. De igual manera, un estudio previo de Covacevich *et al.* 2006 apoya esta idea y a su vez, analiza el efecto de distintos tipos de fertilizantes fosforados (*i.e.* roca fosfórica y superfosfato) sobre la colonización micorrícica, el contenido fósforo disponible en el suelo y el crecimiento de las plantas. Los resultados obtenidos demuestran que estas dos fuentes de fertilización generan incrementos similares sobre el nivel de fósforo disponible para la planta y que prevalecen sobre el efecto directo de las micorrizas. Por ende, las variaciones observadas en este capítulo de la tesis se explican por los cambios en la provisión de fósforo en las plantas (*i.e.* debido a la fertilización y/o micorrizas) y la capacidad intrínseca de cada especie en el uso del fósforo absorbido. En relación a este aspecto, es importante resaltar que en todos los tratamientos de fósforo, la especie *U. brizantha* fue más eficiente en la utilización del fósforo absorbido que *E. elongatus*, y que estas diferencias en la EUF de *U. brizantha* fueron más marcadas en condiciones de alto fósforo (Figura 3.2).

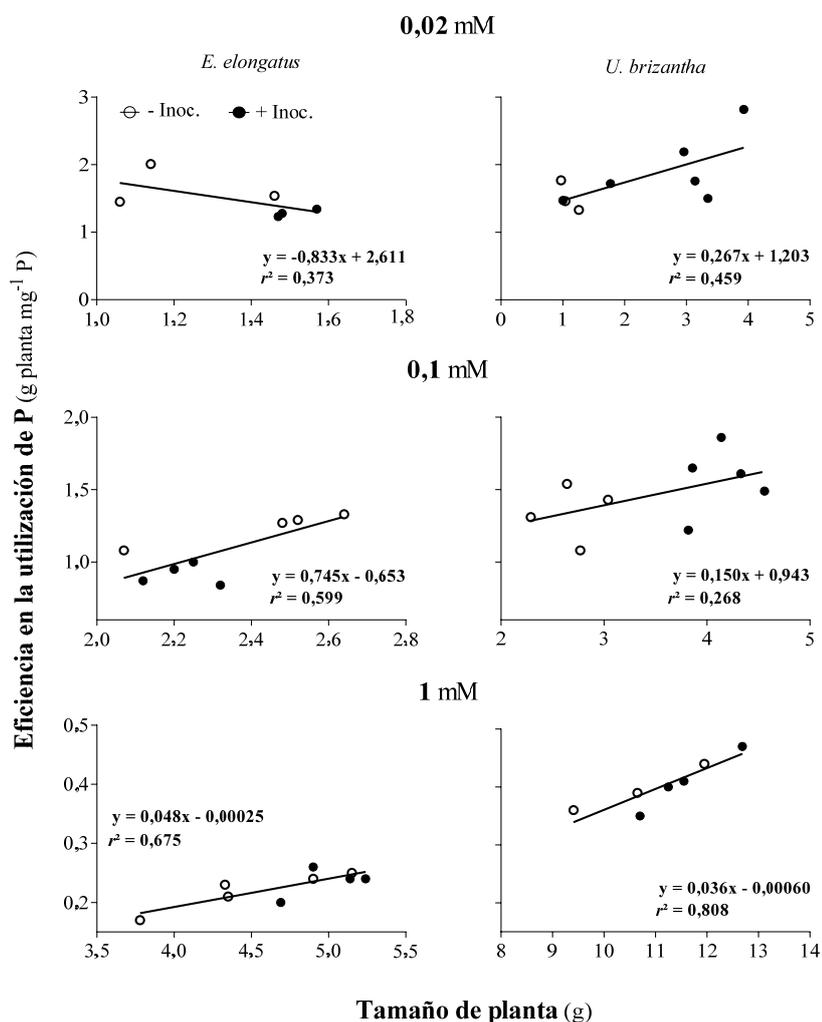


Figura 3.2. Eficiencia la utilización del fósforo (EUF) en relación al tamaño de planta en *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Para las dos especies, los símbolos vacíos son plantas no-inoculadas (-Inoc.) y los llenos plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares. En cada uno de los tratamientos, la recta de correlación lineal representa la tendencia de los datos de (EUF) obtenidos en un rango de tamaños de planta (*i.e.* 1-13 gramos).

Es sabido que el aumento en la absorción de fósforo sobre el éxito de la planta hospedadora es el beneficio más importante de la simbiosis micorrícica (Koide 1991; Smith & Read 2008). En este trabajo, en la mayoría de los casos las plantas inoculadas produjeron más biomasa que las no-inoculadas (Figura 3.2), coincidiendo con el saber general de que la asociación con hongos micorrícicos aumenta la absorción de fósforo y por ende, el crecimiento de las plantas. Es de destacar que nuestros resultados coinciden con los obtenidos en un trabajo previo de Covacevich & Echeverría 2009 en el que los autores muestran incrementos en el crecimiento de dos gramíneas forrajeras templadas (*i.e.* *Elymus*

elongatus y *Schedonorus arundinaceus*) a la inoculación con especies de hongos micorrícicos exóticos. Sin embargo, en nuestro trabajo el patrón de respuesta en el uso del fósforo provisto por las micorrizas fue muy distinto entre las dos especies analizadas. En la especie tropical *U. brizantha*, las plantas inoculadas tuvieron menor concentración de fósforo total que las no-inoculadas en todas las situaciones del gradiente de fósforo planteado. Sin embargo, en contraste a esta respuesta, en los niveles de bajo e intermedio suministro de fósforo las plantas inoculadas de la especie templada *E. elongatus* mostraron un aumento en la concentración interna de fósforo (Cuadro 3.2 y Figura 3.2). Evidentemente, en *E. elongatus* dichas condiciones de suministro de fósforo resultan ser fuertemente limitantes para satisfacer sus requerimientos nutricionales y por lo tanto, la provisión adicional de fósforo aportada por las micorrizas no se tradujo en un aumento proporcional en el crecimiento de las plantas. En ese sentido, es importante resaltar que este resultado se produce aún siendo las condiciones de temperatura del experimento (valores máximos en el rango de 25-27°C) relativamente más favorables para el crecimiento de especies templadas. Las plantas inoculadas de esta especie fueron más grandes pero a la vez concentraron más fósforo en el tejido que las plantas no-inoculadas y por ende, fueron menos eficientes en la utilización del nutriente. Por lo tanto, en dichas condiciones de limitación de fósforo, la especie *U. brizantha* resultó ser más eficiente en su asociación con hongos micorrícicos, ya que los incrementos en absorción de fósforo se traducen en una considerablemente mayor producción de biomasa. A partir de este análisis, se sostiene que las especies analizadas difieren en el uso del fósforo absorbido (*i.e.* proveniente de la fertilización y/o micorrizas), siendo *U. brizantha* la especie que lo transforma en forma más eficiente en biomasa en todas las situaciones del gradiente de suministro de fósforo planteado.

Adicionalmente, para evaluar en forma más general el uso y grado de limitación de fósforo en las especies y condiciones ambientales analizadas se aplicó un modelo (propuesto por James *et al.* 2005), considerando las variaciones porcentuales de la concentración de fósforo total y la biomasa de plantas inoculadas en relación a plantas no-inoculadas para cada nivel de suministro de fósforo (Figura 3.3).

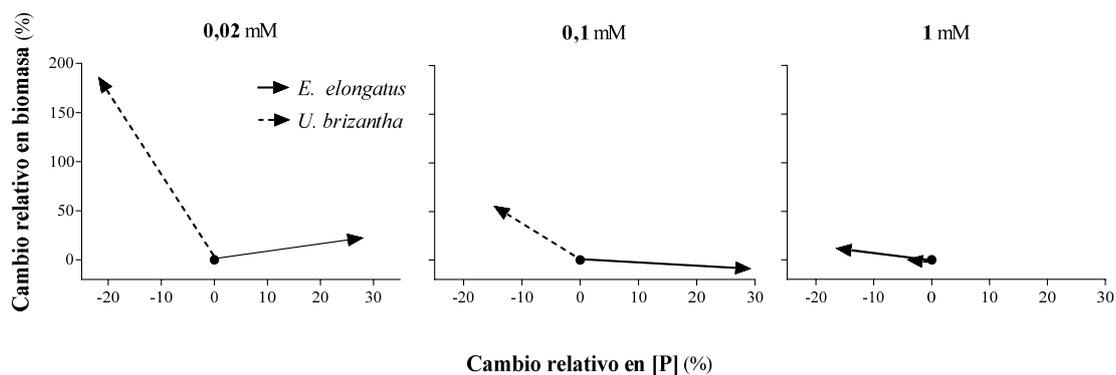


Figura 3.3. Cambios relativos en biomasa y concentración de fósforo en plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Los vectores muestran la dirección y magnitud de los cambios generados por la combinación de diferentes tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos arbusculares y dosis de fósforo. Los cambios relativos se calcularon como $[(\text{tratamiento-testigo})/\text{testigo} * 100]$. Los valores absolutos y las diferencias estadísticas se muestran en la figura 3.1 y en el cuadro 3.2.

La aplicación del modelo de James *et al.* (2005) muestra en forma gráfica que en presencia de hongos micorrícicos, las especies *E. elongatus* y *U. brizantha*, responden de manera diferente al suministro de fósforo (Figura 3.3). En *E. elongatus* en los niveles de bajo e intermedio suministro de fósforo, las micorrizas incrementaron la concentración de fósforo total en los tejidos y en una muy menor/nula proporción la producción de biomasa. Este resultado denota que la provisión de fósforo adicional aportado por las micorrizas, favorece en mayor medida el restablecimiento de una concentración mínima de fósforo en simultáneo con una moderada promoción del crecimiento de las plantas. A diferencia del caso anterior, en *U. brizantha* la asociación con hongos micorrícicos incrementa la provisión de fósforo que se traduce inequívocamente en una fuerte promoción del crecimiento de las plantas, siendo el efecto de mayor relevancia en los niveles más bajos de suministro de fósforo.

En este sentido, se ha reportado que especies gramíneas tropicales (C_4) requieren menor concentración interna de fósforo para mantener su crecimiento máximo y son más eficientes en la utilización de los nutrientes en comparación con gramíneas templadas (C_3) (Chapin 1980; Morris *et al.* 1982; Jovic & Saric 1983; Koide 1991; Halsted & Lynch 1996; Rao 1996b). Dichos autores sostienen que esto se debería a diferencias en las respuestas fotosintéticas de los grupos funcionales. La fotosíntesis en especies C_4 involucra una serie de modificaciones bioquímicas y anatómicas que permiten acumular CO_2 cerca del sitio de concentración de la Rubisco (*i.e.* una enzima que cataliza la fijación del CO_2 en moléculas orgánicas). Este es el mecanismo por el cual estas especies son más eficientes en el uso del agua: al concentrar CO_2 alrededor de la Rubisco, el cierre parcial de los estomas bajo restricciones hídricas no afecta la carboxilación (al tener menor dependencia de la difusión

de CO₂ desde la atmósfera). Las especies C₄ presentan entonces bajos puntos de compensación de CO₂, fotorrespiración despreciable y una mayor eficiencia en el uso del agua, lo cual resulta en tasas de fotosíntesis neta más altas, en comparación con las especies C₃, bajo condiciones de alta temperatura, estrés hídrico y/o alta irradiancia (Hatch 1987; Ehleringer & Monson 1993; Ehleringer *et al.* 1997; Li *et al.* 1999). Asimismo, el nitrógeno y el fósforo son elementos fundamentales que participan en la fotosíntesis: el nitrógeno, como componente estructural de proteínas, nucleótidos y clorofilas, y el fósforo, en la formación de enlaces de fosfato de alta energía (ATP) y en la señalización intracelular. En relación con mis resultados, la especie tropical *U. brizantha* presentó valores más altos de EUF en relación a la especie templada *E. elongatus*, por lo tanto es de esperar que el aumento en la absorción de fósforo (*i.e.* debido a la fertilización y/o micorrizas) pueda tener un beneficio relativo de mayor magnitud en el funcionamiento del aparato fotosintético de las plantas y/o en la generación de biomasa de estas especies. Este fundamento podría explicar en parte, el motivo por cual las gramíneas tropicales obtienen un mayor beneficio de la simbiosis micorrícica, en relación a las templadas, tal como fue evidenciado en varios estudios los cuales en su mayoría incluyen reportes para el género *Urochloa* (Mosse 1972, Siqueira *et al.* 1990, Rao *et al.* 1996b, 1999b, Souza *et al.* 1999, Nanamori *et al.* 2004, Kanno *et al.* 2006, Louw-Gaume *et al.* 2010). En base a mi conocimiento, la descripción completa del mecanismo por el cual las especies C₄ presentan mayor EUF es un tema de gran relevancia actual, que requiere aún mayor trabajo de investigación experimental.

En conclusión, este trabajo es particularmente relevante ya que muestra una respuesta contrastante de gramíneas forrajeras cultivadas a las variaciones en la provisión de fósforo vía fertilización y/o micorrizas. En base a mi conocimiento, este trabajo es un primer antecedente acerca del funcionamiento diferencial de gramíneas forrajeras cultivadas templadas y tropicales, con respuestas micorrícicas contrastantes, que provee información útil y nuevas preguntas en relación con la dinámica de utilización del fósforo absorbido durante crecimiento de las plantas.

CAPITULO IV

Recuperación post-defoliación en gramíneas forrajeras: efecto de la inoculación con HMA y del suministro de fósforo

4.1. INTRODUCCION

El efecto de la defoliación, por parte del ganado doméstico, es el principal agente de disturbio en ecosistemas pastoriles. A nivel de planta individual, se ha demostrado que la defoliación tiene numerosas consecuencias sobre la asignación de biomasa y el crecimiento de las gramíneas (McNaughton 1986; Evans 1991; Holland *et al.* 1996). La remoción de biomasa aérea reduce drásticamente la actividad fotosintética traduciéndose en pérdidas de carbono y nutrientes. De igual manera, la biomasa radical (Holland *et al.* 1996; Thornton & Millard 1996; Morón Rios *et al.* 1997) y la tasa de crecimiento subterránea (Oosterheld 1992) disminuyen con la defoliación debido a la ausencia de reservas necesarias en la planta para mantener la respiración y las estructuras radicales (Davidson & Milthorpe 1966). Se sabe que los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) favorecen la capacidad de las plantas de adquirir nutrientes a cambio de carbohidratos indispensables para el crecimiento de las estructuras fúngicas. Por lo tanto, se especula que en condiciones de limitación de fósforo en el suelo, a través de mejoras en el estado nutricional de las plantas, las micorrizas podrían promover el re-establecimiento del tejido fotosintético y en consecuencia, facilitar el crecimiento post-defoliación de las plantas (Harley & Smith 1983; Goverdr *et al.* 2000; Koide 2000; Harnett & Wilson 2002).

Es sabido que la remoción de pequeñas cantidades de tejido fotosintético puede inducir en las plantas respuestas compensatorias de crecimiento. Una planta defoliada muestra compensación completa cuando su biomasa al final del período de recuperación más la biomasa removida inicialmente igualan la biomasa final de las plantas no defoliadas (Ferraro & Oosterheld 2002). El crecimiento compensatorio también puede ser inferido a partir de la comparación de las tasas de crecimiento relativo (TCR) de plantas defoliadas y no defoliadas: cualquier aumento en la TCR, como resultado de la defoliación, indica una respuesta compensatoria. Sin embargo, se sabe que existe una gran variabilidad en la magnitud y el tipo de respuesta de las plantas a la defoliación reguladas principalmente por el tiempo de recuperación considerado, aunque en ciertos casos también por la intensidad de defoliación, la disponibilidad de nutrientes en el suelo, la identidad de la especie vegetal y de los hongos micorrícicos, entre otros factores (Oosterheld & McNaughton 1988; Ferraro & Oosterheld 2002; Gehring & Whitham 2002; Gehring & Bennett 2009). Basado en los patrones observados en varias gramíneas de pastizal, Harnett & Wilson (2002) demuestran que en condiciones de intensidad leve a moderada defoliación, cuando la disponibilidad de nutrientes en el suelo limita la tasa de crecimiento de la planta, la simbiosis micorrícica promueve el crecimiento compensatorio. Sin embargo, se sabe que los hongos micorrícicos también pueden representar un costo debido a que en ciertos casos pueden llegar a consumir hasta un 20-30% de los fotoasimilados de la planta (Douds *et al.* 1988; Jakobsen & Rosendahl 1990). Bajo un escenario de intensas o repetidas defoliaciones, los fotoasimilados de la planta pueden llegar a ser limitantes razón por la cual el proceso de rebrote de la biomasa aérea y el mantenimiento de la micorriza compiten

por dichos recursos. Dicho cambio de una limitación de nutrientes a una de carbono, debido al aumento en la intensidad de defoliación, puede modificar el balance costo-beneficio de la simbiosis y en consecuencia, los hongos micorrícicos podrían reducir la capacidad de las plantas para tolerar la defoliación. Esta respuesta negativa de crecimiento se observó en *Lolium perenne* (i.e. especie de gramínea forrajera cultivada) evidenciando un fuerte compromiso entre los simbioses, en condiciones de alta intensidad y frecuencia de defoliación (Gebbing *et al.* 2004). La bibliografía existente sugiere que las gramíneas, en simbiosis con hongos micorrícicos, podrían responder de manera diferente a la defoliación exhibiendo respuestas de crecimiento neutras o negativas, en aquellas especies con sistemas radicales muy ramificados y generalmente positivas, en gramíneas con sistemas radicales poco ramificados (Allsopp 1998). Al respecto, se especula que la variación interespecífica en la respuesta micorrícica de las plantas a la suministro de fósforo podría influenciar su capacidad de recuperación post-defoliación. No obstante, son muy pocas las evidencias acerca de los efectos interactivos de las micorrizas, la defoliación y el suministro de fósforo sobre el crecimiento de gramíneas forrajeras cultivadas. En base a mi conocimiento, no existe ningún antecedente en el que se evalúen los efectos interactivos de estos tres factores a nivel de planta individual.

El objetivo principal de este capítulo fue describir respuestas compensatorias de crecimiento a la defoliación en especies de gramíneas forrajeras cultivadas, con distinta afinidad a las micorrizas y en diferentes niveles de suministro de fósforo. Para ello, se llevó a cabo un experimento manipulativo con dos especies: una gramínea templada (C₃) (i.e. *Elymus elongatus*) y una tropical (C₄) (i.e. *Urochloa brizantha*) con baja y alta respuesta micorrícica, respectivamente. Para cada especie, la mitad de las plántulas fueron inoculadas con una mezcla de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y el resto crecieron sin inocular, en un sustrato de arena estéril con distintos niveles de fósforo soluble. Pasadas 13 semanas de crecimiento, se aplicó un único evento de defoliación, para luego evaluar la producción de biomasa, el número de macollos por planta y el grado de colonización micorrícica durante el período de recuperación. Adicionalmente, a partir de los valores de biomasa se estimó la tasa de crecimiento relativo (TCR) para cada uno de sus componentes.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Material vegetal y diseño experimental

Sobre las mismas especies seleccionadas para el experimento 2: i) *Elymus elongatus* (Host) Runemark y ii) *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, se evaluó el compromiso entre el proceso de rebrote y mantenimiento de hongos micorrícicos arbusculares en especies de gramíneas forrajeras. Para cada una de las especies, se empleó un diseño factorial completamente aleatorizado con tres factores principales: **1)** inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (-Inoc. y +Inoc.), **2)** suministro de fósforo soluble (dos niveles: bajo y alto) y **3)** defoliación (control no-defoliado y defoliación). El

experimento se realizó en un invernáculo de IFEVA (Facultad de Agronomía-UBA). Las plantas fueron producidas a partir de semillas germinadas en incubadora (20-30°C) y trasplantadas en macetas (20 cm de alto x 10 cm de diámetro, 1kg de peso). El sustrato para el crecimiento de las plantas fue arena esterilizada con pequeñas cantidades de roca fosfórica, como fuente de fósforo de baja disponibilidad (171 mg P₂O₅ kg⁻¹ arena; según Grimoldi *et al.* 2005). La inoculación se realizó con una mezcla de tres especies exóticas de hongos micorrícicos: *Rhizophagus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler (= *G. intrarradices* BAFC 3108), *Simiglomus hoi* (S.M. Berch & Trappe) G.A. Silva, Oehl & Sieverd (= *G. hoi* BEG 104) y *Funneliformis mosseae* (Nicol. & Gerd.) C. Walker & Schuessler (= *G. mosseae* LPS SB1). Al igual que en los capítulos anteriores, estas especies fueron seleccionadas teniendo en cuenta que son especies comunes en agroecosistemas y que se ha demostrado su capacidad de colonizar especies herbáceas, en particular gramíneas forrajeras cultivadas (ver más detalle, en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo II de esta tesis). El inóculo formado por raíces colonizadas, micelio externo y esporas (*ca.* 100 esporas viables por 100 g de inóculo seco), se aplicó al momento del trasplante a razón de 4,29 g por maceta y fue mezclado con la arena para asegurar el contacto entre las raíces de las plantas y los hongos micorrícicos arbusculares. Las macetas sin y con inóculo micorrícico fueron ubicadas en cajones plásticos en mesadas separadas para prevenir la contaminación de plantas no-inoculadas. A su vez, dentro de cada especie, las plantas fueron organizadas en un diseño aleatorio con cinco réplicas por tratamiento (2 HMA x 2 P x 2 DEF x 5 réplicas = 40 plantas en cada fecha de cosecha). Durante el experimento, las macetas y cajones fueron rotados periódicamente, cada siete días, para asegurar condiciones ambientales homogéneas.

Los niveles de fósforo soluble fueron aplicados mediante el riego con soluciones de Hoagland modificadas, variando la concentración de KH₂PO₄: nivel bajo (0,02 mM) y alto (1 mM). En todos los tratamientos la composición de macroelementos (mM l⁻¹) fue: 1,5 KNO₃, 2,0 Ca (NO₃)₂, 0,5 MgSO₄ y la de microelementos (μM l⁻¹) fue: 0,125 Fe-EDTA, 0,0125 H₃BO₃, 0,001 MnCl₂, 0,001 ZnCl₂, 0,00025 CuCl₂, 0,00025 MoO₃. El suministro de potasio se mantuvo constante modificando la concentración de KCl, proporcionalmente. Además, se agregó nitrato de amonio (2,5 mM l⁻¹) para facilitar la formación de micorrizas. Desde la siembra del experimento, todas las plantas fueron regadas diariamente a capacidad de campo con la solución de bajo fósforo (*ca.* 25ml) durante 6 semanas. Luego de este período, los tratamientos de suministro de fósforo fueron asignados al azar y hasta finalizar el experimento las plantas fueron regadas con soluciones de bajo (0,02 mM) o alto (1mM) nivel de fósforo, según la metodología antes implementada. Para chequear la efectividad de los tratamientos de suministro de fósforo, en las dos especies se determinó la concentración de fósforo total de plantas no-inoculadas e inoculadas. En todos los casos, la concentración de fósforo total se incrementó con la fertilización (0,61 ± 0,06 y 0,67 ± 0,04 en bajo fósforo y 5,18 ± 0,26 y 2,69 ± 0,06 en alto fósforo para *E. elongatus* y *U. brizantha*,

respectivamente). Luego de 14 semanas desde la siembra, se aplicó el tratamiento de defoliación que consistió en el corte de la biomasa aérea con tijera aproximadamente a 5-10 cm desde suelo. Para definir "*a priori*" la intensidad de defoliación, que fue equivalente a una remoción del 60% de la biomasa aérea, se realizó una cosecha piloto en numerosos estratos (a intervalos de 5 cm de altura) utilizando 3 plantas de cada especie y tratamiento. Para cada planta y estrato, se calculó el peso fresco total y a partir del valor promedio, se determinó la cantidad de biomasa aérea fresca (en términos de altura) que debía ser defoliada en cada una de las especies y tratamientos. Como resultado de ello, para cada especie y tratamiento se obtuvieron las distintas alturas de corte necesarias para una remoción del 60% de la biomasa aérea. En todos los casos, la biomasa aérea removida consistió solamente en láminas (aprox. el 85% de la biomasa de láminas en *E. elongatus* y el 90% en *U. brizantha*). Dicho material se secó en estufa y posteriormente, se pesó. Estos datos fueron considerados como la cosecha inicial en este experimento de defoliación y utilizados en el cálculo de la tasa de crecimiento relativo (TCR) de las especies analizadas. En total, las plantas crecieron en invernáculo durante 17 semanas para *E. elongatus* y durante 19 semanas para *U. brizantha* (desde Marzo hasta Julio) bajo condiciones controladas de temperatura. La temperatura mínima del invernáculo fue en promedio de 17°C, mientras que la temperatura máxima fue de 28°C para el mes de Marzo. En los meses siguientes, la temperatura máxima fue disminuyendo con la estación hasta registrar valores máximos cercanos a los 25-27°C. Durante las horas cercanas al mediodía y en días soleados, el flujo fotónico fotosintético (PPFD) fue mayor a 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estas condiciones resultaron adecuadas para el crecimiento de las dos especies. Luego del único evento de defoliación, se evaluó la recuperación de las plantas a los 12 y 22 días para *E. elongatus* y 18 y 34 días para *U. brizantha*.

4.2.2. Protocolo de cosecha y colonización micorrícica

Cada planta fue cosechada y se separó la fracción aérea de la subterránea. De igual manera, la biomasa aérea se separó en macollos adultos (mínimo con una hoja totalmente expandida) y macollos hijos (sin hojas totalmente expandidas), los que fueron contados. El número total de macollos por planta fue la suma de los dos tipos mencionados, previamente. Se determinó la producción de biomasa aérea, subterránea y total. También, como parte de la biomasa final total, se incluyó el material removido en cada una de las plantas defoliadas. Las raíces se lavaron cuidadosamente y se determinó el peso fresco de las mismas. Posteriormente, se separó una muestra de raíz de peso conocido para evaluar la colonización micorrícica. Luego, todas las muestras de biomasa se secaron durante 72hs a 80°C en estufa y posteriormente, fueron pesadas.

La colonización micorrícica total se calculó mediante la observación con microscopio óptico de estructuras micorrícicas (hifas, arbuscúlos y vesículas) en raíces previamente teñidas, según la metodología propuesta por Phillips & Hayman (1970). Para

cada especie, se cuantificó el porcentaje de raíz colonizada en función del total de raíces observadas y el porcentaje de vesículas y arbuscúlos en relación al número de raíces efectivamente colonizadas. Para esto, se observaron cien campos oculares por cada repetición con un aumento de 200× en el ocular (McGonigle *et al.* 1990).

4.2.3. Análisis estadístico

El porcentaje de colonización micorrícica y estructuras fúngicas (hifas, vesículas y arbuscúlos) se comparó entre plantas inoculadas para cada tratamiento de suministro de fósforo a través de ANOVAs factorial (Steel & Torrie, 1980). Los factores principales fueron defoliación (No-def y Def) y tiempo de recuperación post-defoliación (12 y 22 días en *E. elongatus* y 18 y 34 días en *U. brizantha*). La producción de biomasa (en parte aérea, subterránea y total) y el número total de macollos por planta fueron analizados mediante ANOVAs de una vía con defoliación como factor principal; ya que posteriormente se evaluaron las diferencias entre las TCR ($\ln x$) aéreas y subterráneas mediante test de pendientes entre niveles de defoliación para cada uno de los tratamientos (Oosterheld & McNaughton, 1988). Asimismo, en todos los casos, se comprobó previamente la normalidad y homogeneidad de las varianzas. Para cumplir con los supuestos del ANOVA los datos de biomasa total fueron transformados ($\log x$). Las diferencias entre medias se analizaron mediante el test LSD Fisher ($P < 0,05$). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa INFOSTAT (Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Todas las variables se expresan como promedios \pm 1 error estándar (ES).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Defoliación, suministro de fósforo y colonización micorrícica

Antes del evento de defoliación, todas las plantas mostraron valores cercanos al 60% de colonización micorrícica (Figura 4.1). En las dos especies y niveles de fósforo, la defoliación y el tiempo de recuperación determinaron respuestas distintas en el porcentaje de raíz colonizada, arbuscúlos y vesículas. Previo al evento de defoliación en bajo fósforo, las plantas inoculadas de *E. elongatus* presentaron mayor colonización que en alto fósforo (Figura 4.1). No obstante, el porcentaje de raíz colonizada y vesículas en bajo fósforo disminuyó marcadamente con la defoliación en relación a las plantas no-defoliadas ($P \leq 0,001$; Cuadro 4.1). En condiciones de alto suministro de fósforo, la defoliación provocó una disminución en el porcentaje de raíz colonizada ($P \leq 0,05$), al igual que la interacción entre defoliación y tiempo de recuperación en el porcentaje de arbuscúlos ($P = 0,010$; Cuadro 4.1). En el día 12, las plantas defoliadas presentaron menos arbuscúlos en relación con las plantas no-defoliadas; sin embargo, al final del tiempo de recuperación (día 22) estas diferencias no fueron evidentes (Figura 4.1).

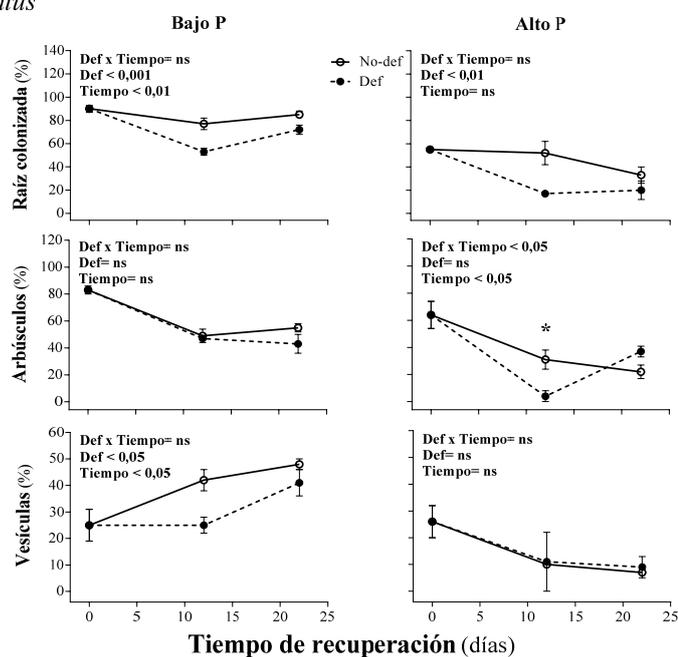
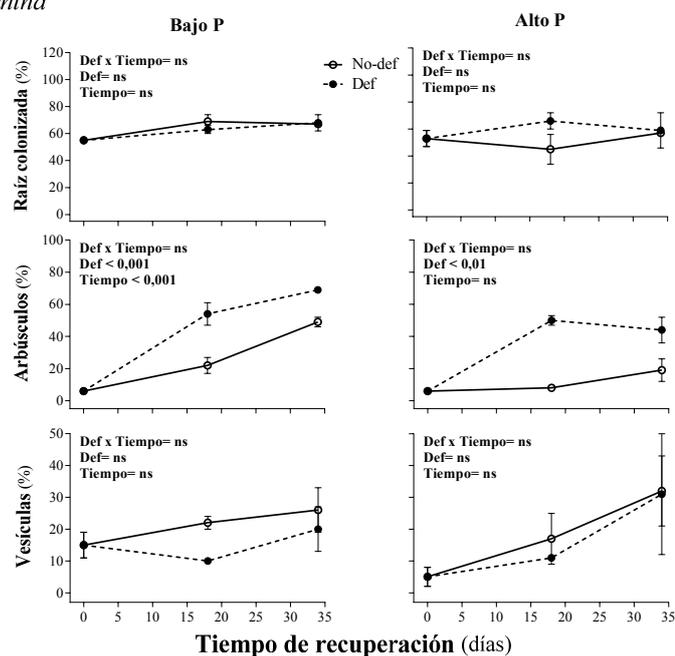
Elymus elongatus*Urochloa brizantha*

Figura 4.1. Colonización micorrícica en plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* en función del tiempo de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las muestras fueron tomadas en los días 0, 12 y 22 para *E. elongatus* y los días 0, 18 y 34 para *U. brizantha*. Los valores son promedios \pm 1 ES (n = 3-5). El asterisco indica diferencia significativa (LSD Fisher, *, $P < 0,05$) entre los dos niveles de defoliación.

En la especie *U. brizantha*, previo al evento de defoliación la colonización micorrícica fue igual en ambos niveles de fósforo (Figura 4.1). En contraste a la otra especie evaluada, en *U. brizantha* el porcentaje de arbusculos en bajo fósforo aumentó marcadamente en respuesta a la defoliación ($P \leq 0,001$) y el tiempo de recuperación ($P \leq 0,001$; Cuadro 4.1). En plantas defoliadas el porcentaje de arbusculos fue casi tres veces mayor que comparación a las plantas no-defoliadas. Asimismo, la proporción de arbusculos aumenta en relación al tiempo transcurrido en ambos tratamientos (Figura 4.1; Cuadro 4.1). En alto fósforo, en cambio, el porcentaje de arbusculos solamente aumenta en las plantas que fueron defoliadas ($P \leq 0,001$; Figura 4.1; Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Resultados del ANOVA factorial para los tratamientos de defoliación y tiempo de recuperación post-defoliación sobre la colonización micorrícica de plantas inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* en bajo y alto suministro de fósforo.

Especie		Colonización micorrícica (%)					
		Bajo P			Alto P		
		RC	A	V	RC	A	V
<i>E. elongatus</i>	Defoliación	20,87 ***	1,57 ^{ns}	9,06 *	12,48 **	1,15 ^{ns}	0,23 ^{ns}
	Tiempo	10,14 **	0,06 ^{ns}	6,82 *	1,39 ^{ns}	4,85 *	0,06 ^{ns}
	Def x Tiempo	1,51 ^{ns}	0,68 ^{ns}	1,43 ^{ns}	2,78 ^{ns}	11,97 *	0,25 ^{ns}
	CM error	65,60	113,70	66,23	123,05	90,57	166,64
<i>U. brizantha</i>	Defoliación	0,24 ^{ns}	44,61 ***	1,90 ^{ns}	2,27 ^{ns}	25,65 **	0,14 ^{ns}
	Tiempo	0,16 ^{ns}	25,37 ***	1,40 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,16 ^{ns}	1,37 ^{ns}
	Def x Tiempo	0,54 ^{ns}	1,92 ^{ns}	0,27 ^{ns}	1,41 ^{ns}	1,60 ^{ns}	0,03 ^{ns}
	CM error	85,65	60,99	151,50	174,52	122,33	0,66

En el cuadro se presentan valores de F y cuadrados medios del error (CM error). Las diferencias significativas se indican como (LSD Fisher, *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ y ns, $P > 0,05$) para cada una de las especies. Los grados de libertad para Defoliación, Tiempo, Def x tiempo y error experimental son 1, 1, 1 y 8 respectivamente.

4.3.2. Respuestas compensatorias de crecimiento post-defoliación

En las dos especies, la defoliación generó respuestas contrastantes en la producción de biomasa total y en la tasa de crecimiento relativo (TCR) de las plantas, moduladas por la presencia de hongos micorrícicos y el suministro de fósforo (Figuras 4.2 y 4.3). En *E. elongatus*, la TCR subterránea de las plantas defoliadas fue menor ($P < 0,05$) a las plantas no-defoliadas en todos los tratamientos analizados. En particular, en bajo fósforo/-Inoc., las plantas defoliadas registraron menores valores de biomasa aérea, subterránea y total; siendo la TCR aérea de igual magnitud que en las plantas no-defoliadas ($P = 0,004$; Figura 4.2 y 4.3), razón por la cual, no logran compensar la pérdida de biomasa inicial. En presencia de hongos micorrícicos, las plantas defoliadas tuvieron menor biomasa aérea y subterránea que

las no-defoliadas (Figura 4.2), sin embargo, no hubo diferencias significativas en biomasa total al adicionar la biomasa aérea removida por la defoliación. Justamente en este tratamiento, la TCR aérea de plantas defoliadas fue superior a las plantas no-defoliadas ($P = 0,003$) y en consecuencia, compensaron la biomasa removida (Figura 4.3).

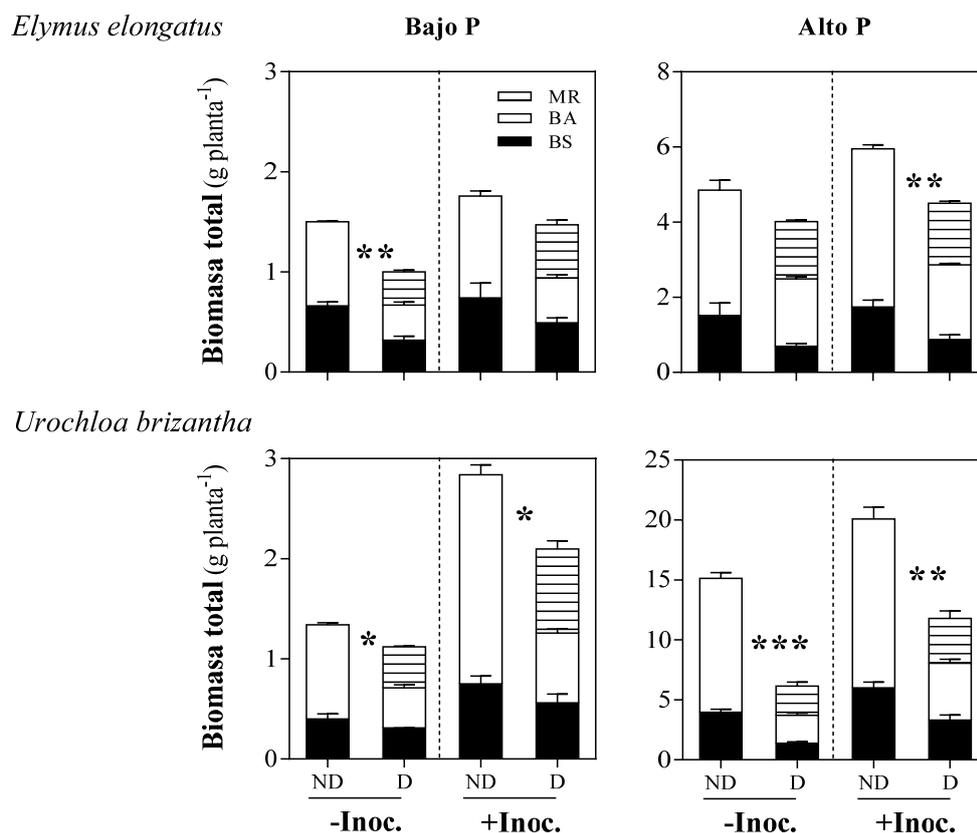


Figura 4.2. Biomasa total de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* a los 22 y 34 días de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares, no-defoliadas (ND) y defoliadas (D). Las barras rayadas indican el material removido (MR), las blancas la biomasa aérea (BA) y las negras la biomasa subterránea (BS). Los valores son promedios \pm 1 ES ($n = 5$). Los asteriscos indican diferencias significativas (LSD Fisher, *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) entre los dos niveles de defoliación.

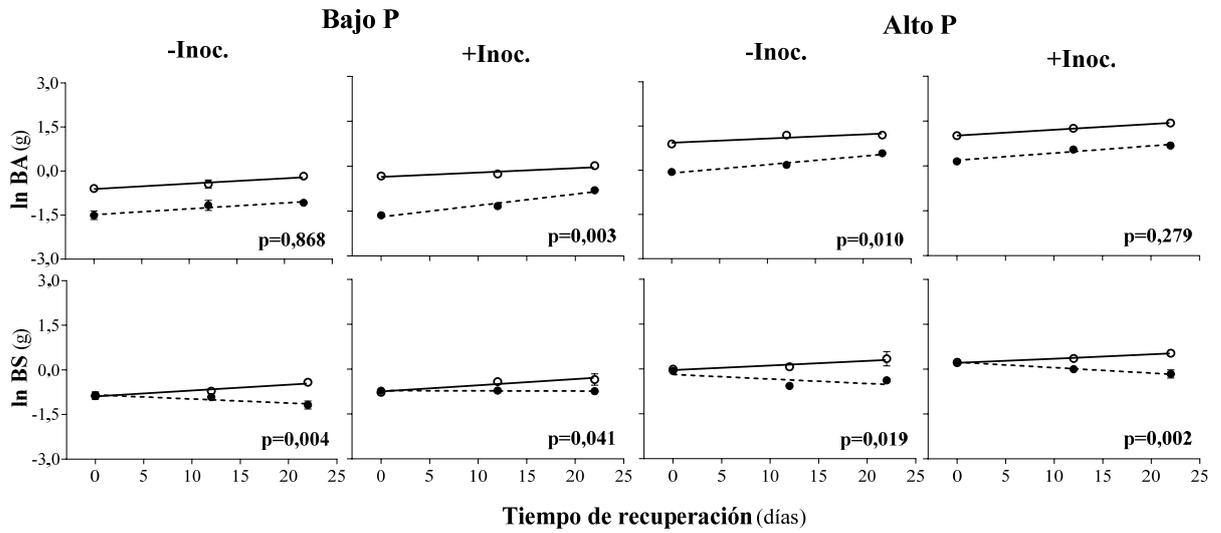
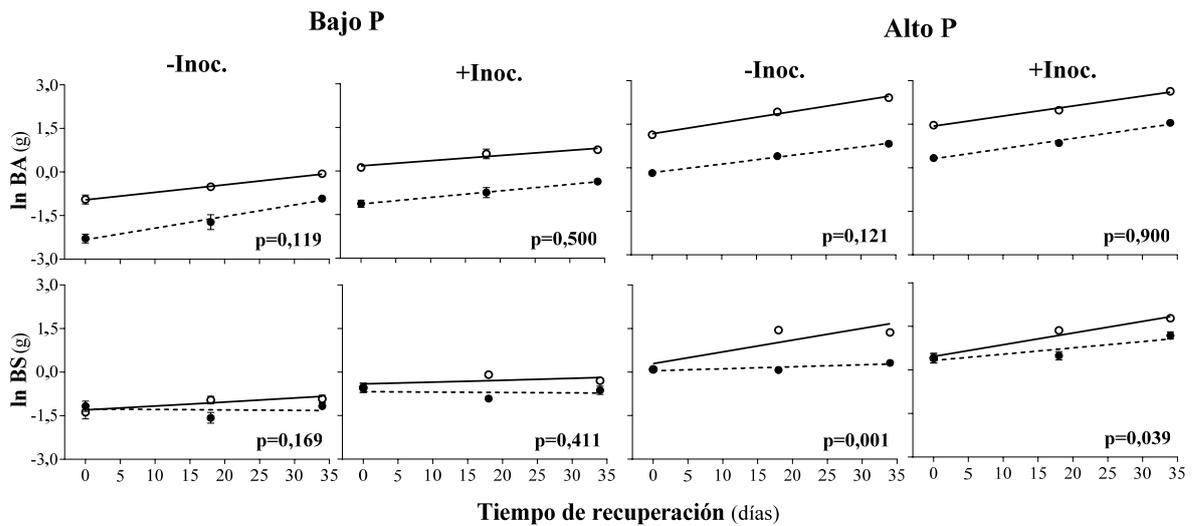
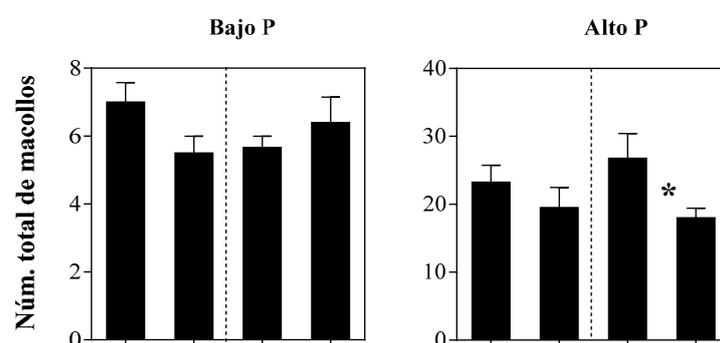
Elymus elongatus*Urochloa brizantha*

Figura 4.3. Biomasa aérea (ln BA) y subterránea (ln BS) de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* en función del tiempo de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares. Las líneas llenas representan los cambios observados en plantas no-defoliadas (ND) y las punteadas en plantas defoliadas (D). Las cosechas fueron realizadas en los días 0, 12 y 22 para *E. elongatus* y en los días 0, 18 y 34 para *U. brizantha*. La pendiente de la recta de regresión lineal representa la TCR (tasa de crecimiento relativo) aérea y subterránea. Los valores de $P < 0,05$ determinan diferencias significativas en las pendientes de los tratamientos de defoliación.

En alto fósforo/-Inoc., la defoliación no generó diferencias significativas en biomasa total, ya que la TCR aérea aumentó ($P = 0,01$) y por lo tanto las plantas defoliadas compensaron la biomasa removida (Figura 4.2 y 4.3). En presencia de hongos micorrícicos, en cambio, las plantas defoliadas registraron menor biomasa aérea, subterránea y total (Figura 4.2); como también, es el único tratamiento donde se registra una notable disminución en el número de macollos (Figura 4.4). La TCR aérea fue similar entre plantas no-defoliadas y defoliadas ($P = 0,279$; Figura 4.3), y las plantas defoliadas no logran compensar la remoción de biomasa (Figura 4.2).

Elymus elongatus



Urochloa brizantha

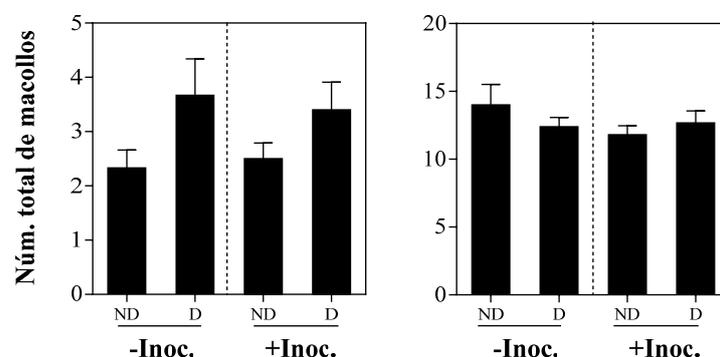


Figura 4.4. Número de macollos de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* a los 22 y 34 días de recuperación post-defoliación en bajo y alto suministro de fósforo. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.) e inoculadas (+Inoc.) con hongos micorrícicos arbusculares, no-defoliadas (ND) y defoliadas (D). Los valores son promedios \pm error estándar ($n = 3-5$). El asterisco indica diferencia significativa (LSD Fisher, *, $P < 0,05$) entre los dos niveles de defoliación.

En la especie *U. brizantha* en bajo fósforo, las plantas no-inoculadas e inoculadas defoliadas registraron menor biomasa aérea y total que las no-defoliadas (Figura 4.2). En estas condiciones, las TCR aérea y subterránea no mostraron cambios significativos a la

defoliación ($P > 0,05$) y por ende, no hubo compensación de la biomasa removida al inicio en ninguno de los tratamientos (Figura 4.3). En condiciones de alto fósforo, plantas no-inoculadas e inoculadas defoliadas tuvieron menor biomasa aérea, subterránea y total. Las TCR aéreas fueron similares y las TCR subterráneas fueron más bajas que las plantas no-defoliadas (Figura 4.3 y 4.4). Es de destacar que en esta especie la presencia de hongos micorrícicos no afectó en ningún caso la respuesta de las plantas a la defoliación (Figuras 4.2, 4.3 y 4.4).

4.4. DISCUSION

4.4.1. Efecto de la defoliación y el suministro de fósforo sobre la colonización micorrícica

En las dos especies y niveles de suministro de fósforo, la defoliación y el tiempo de recuperación determinaron respuestas contrastantes en la colonización micorrícica de las plantas, evidenciándose a través de cambios en el porcentaje de estructuras fúngicas (Figura 4.1). Debido a que la defoliación y los hongos micorrícicos remueven carbono fijado por la planta es posible que entre la parte aérea y subterránea se establezca un compromiso. En este sentido, a menudo la literatura reporta que la defoliación reduce el porcentaje de raíz colonizada en las plantas (Harley & Smith 1983; Gehring & Whitman 1994; Wardle 2002; Wardle *et al.* 2004). De igual manera, los cambios en la disponibilidad de fósforo pueden regular las interacciones micorrícicas. Se ha demostrado que al aumentar el fósforo disponible en el suelo las plantas mejoran su nutrición por lo que generan un mecanismo de represión de la colonización micorrícica (Abbott & Robson 1982; Barea 1991; Covacevich *et al.* 1995). Sin embargo, es sabido que el efecto funcional de la simbiosis depende de la especie de planta hospedante, del hongo presente y de la actividad relativa de las estructuras fúngicas (Monzón & Azcón 1996). En este trabajo, al combinar una defoliación intensa con tratamientos de bajo y alto suministro de fósforo, las especies analizadas mostraron respuestas contrastantes en el porcentaje de raíz colonizada, arbusculos y vesículas (Figura 4.1). En *E. elongatus* en los dos niveles de suministro de fósforo, la defoliación disminuyó el porcentaje de raíz colonizada, como también, el porcentaje de arbusculos en alto fósforo. Mientras que en la especie *U. brizantha*, en ambos niveles de fósforo el porcentaje de arbusculos aumentó y más aún en respuesta a la defoliación. Dichos resultados en *U. brizantha* (*i.e.* especie con alta respuesta micorrícica) representan una función micorrícica activa que se correlaciona positivamente con los beneficios proporcionados a las plantas. Por el contrario, en *E. elongatus* (*i.e.* especie con baja respuesta micorrícica) sugieren que los hongos micorrícicos reciben relativamente menor proporción de carbono proveniente de las plantas, razón por la cual, la estructura micorrícica se reduce. Las diferencias observadas en colonización micorrícica coinciden con la afinidad de las especies a formar micorrizas y por lo tanto, se especula que podrían influenciar la capacidad de recuperación de las plantas post-defoliación.

4.4.2. Efecto combinado del suministro de fósforo y micorrizas sobre el crecimiento post-defoliación de las plantas

Entre las especies analizadas, las respuestas compensatorias de crecimiento de las plantas a la defoliación fueron distintas y estuvieron reguladas por la presencia de hongos micorrícicos y el suministro de fósforo (Figura 4.2). A nivel de planta individual, la remoción de la biomasa aérea debido a la defoliación reduce la cantidad de tejido fotosintético traduciéndose en pérdidas de carbono y nutrientes (Ferraro & Oosterheld 2002). De igual manera, se sabe que la defoliación a través de una menor asignación de carbono a las raíces puede afectar negativamente la biomasa y la tasa de crecimiento radical. En este sentido, el balance de la simbiosis micorrícica podría verse afectado debido a que los hongos micorrícicos dependen del carbono acumulado en las raíces (Harley & Smith 1983). Nuestros resultados en *E. elongatus* muestran que, en bajo fósforo/+Inoc. las plantas defoliadas tuvieron menor biomasa aérea y subterránea que las no-defoliadas pero sin generar cambios significativos en biomasa total (Figura 4.2). Por lo tanto, esto indica que las plantas defoliadas compensaron las pérdidas en biomasa originadas por la defoliación. Coincidentemente, esta respuesta también se observó en alto fósforo/-Inoc. Al respecto, se intuye que el fósforo aportado por las micorrizas y la fertilización fue adecuado para permitir la regeneración de tejido fotosintético y en consecuencia, la tasa de rebrote de plantas defoliadas. Por el contrario, en alto fósforo/+Inoc. las plantas defoliadas registraron menor biomasa aérea, subterránea, total y un 32% menos de macollos que las no-defoliadas (Figura 4.2). Es probable que la demanda de carbono de los hongos micorrícicos a la planta hospedante haya superado el beneficio de la simbiosis razón por la cual el crecimiento de plantas defoliadas disminuyó. En consecuencia, estos resultados denotan una relación parasítica entre los simbiosites en condiciones de alto suministro de fósforo, que coincide con lo evidenciado para otras especies de gramíneas templadas (Buwalda & Goh 1982; Gebbing *et al.* 2004). Por el contrario, en *U. brizantha*, el patrón de respuesta en términos de biomasa fue similar en todos los tratamientos analizados, en forma independiente a la ocurrencia de inoculación con HMA y/o a los cambios en el suministro de fósforo (Figura 4.2). A partir de este resultado, se especula que los hongos micorrícicos no generan efectos deletéreos en el crecimiento de plantas defoliadas de esta especie.

La compensación del crecimiento también puede ser inferida a partir de comparar las tasas de crecimiento relativo (TCR) de plantas no-defoliadas y defoliadas (Ferraro & Oosterheld 2002). Se ha demostrado que el aumento en la TCR de las plantas, como resultado de la defoliación, induce respuestas compensatorias. Asimismo, es sabido que para compensar las pérdidas en biomasa una planta defoliada debe tener una TCR más alta que la de una planta no-defoliada (*i.e.* una tasa de crecimiento más alta por unidad de biomasa). En este trabajo, el análisis de pendientes de la Figura 4.3 demuestra que las respuestas compensatorias de crecimiento observadas en plantas defoliadas de *E. elongatus*, en bajo fósforo/+Inoc. y alto fósforo/-Inoc., fueron determinadas por el aumento de la TCR

aérea a lo largo del tiempo de recuperación. No obstante, es de destacar que en todos los tratamientos de HMA y suministro de fósforo, la TCR subterránea de plantas defoliadas fue menor que en las no-defoliadas (Figura 4.3). Este resultado coincide con la bibliografía existente en la que se reporta que el crecimiento de la raíz es extremadamente sensible y disminuye con la defoliación (Richards 1993). En la especie *U. brizantha* en cambio, la TCR subterránea disminuyó, en condiciones de alto fósforo y la TCR aérea no fue afectada por la defoliación. Por lo tanto, este resultado explica en parte la ausencia de respuestas compensatorias en plantas defoliadas observadas en la Figura 4.2. Es de destacar que en esta especie, en todos los tratamientos de inoculación con HMA y suministro de fósforo, las micorrizas hacen uso de carbono extra; sin embargo, a diferencia de *E. elongatus*, esto no se tradujo en un efecto negativo sobre el crecimiento de plantas defoliadas.

A modo de conclusión, en este trabajo las especies mostraron respuestas compensatorias de crecimiento contrastantes reguladas por las micorrizas y el suministro de fósforo. En *E. elongatus* (*i.e.* especie con baja respuesta micorrícica) en bajo fósforo el porcentaje de raíz colonizada y vesículas disminuyó con la defoliación, sin embargo, las micorrizas promovieron el crecimiento de plantas defoliadas evidenciando una relación mutualista. En alto fósforo en cambio, hubo un compromiso entre los simbiontes: la defoliación disminuyó el porcentaje de arbuscúlos en las raíces, la producción de biomasa total y número de macollos por planta, razón por la cual, la relación fue parasítica. Contrariamente, en *U. brizantha* (*i.e.* especie con alta respuesta micorrícica) en ambos niveles de suministro de fósforo la defoliación incrementó el porcentaje de arbuscúlos. No obstante, a diferencia de la otra especie analizada, la presencia de micorrizas no tuvo efectos deletéreos sobre el crecimiento de plantas defoliadas tanto en condiciones de bajo como de alto suministro de fósforo. A nivel de planta individual, estos resultados son una primera evidencia que provee información novedosa acerca del efecto combinado de las micorrizas y el suministro de fósforo sobre la recuperación de gramíneas forrajeras cultivadas a la defoliación. Resultaría interesante ampliar este estudio con un análisis más exhaustivo de los componentes morfológicos y fisiológicos de la TCR (*i.e.* área foliar relativa, proporción de láminas, aérea foliar específica y tasa de asimilación neta) con el fin de analizar con mayor profundidad los mecanismos a través de los cuales dichos factores influyen la respuesta compensatoria de crecimiento en gramíneas templadas y tropicales.

CAPITULO V

Conclusiones generales

Esta tesis tuvo tres objetivos particulares que sirvieron de guía a cada uno de los capítulos experimentales. El **primer objetivo** fue evaluar el efecto de las micorrizas sobre el crecimiento de seis especies de gramíneas forrajeras cultivadas, en condiciones de déficit nutricional. En la hipótesis planteada para este objetivo se propuso que en condiciones de déficit nutricional, la asociación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) promueve el crecimiento de gramíneas forrajeras cultivadas y que el grado de beneficio de la simbiosis es distinto en especies templadas y tropicales. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis debido a que las gramíneas forrajeras tropicales (*P. coloratum* = *U. brizantha* > *P. dilatatum*) mostraron mayor respuesta micorrícica que las templadas (*S. arundinaceus*, *E. elongatus* y *D. glomerata*) (**Hipótesis 1**, Capítulo II). El **segundo objetivo** de esta tesis fue analizar el efecto de las micorrizas en relación al suministro de fósforo sobre el crecimiento y la nutrición de dos gramíneas forrajeras cultivadas, con respuestas micorrícicas contrastantes. En base a los resultados del Capítulo II, se seleccionaron las especies *E. elongatus* y *U. brizantha*. Los resultados encontrados apoyan la hipótesis planteada ya que la especie templada y la tropical mostraron marcadas diferencias en sus parámetros de crecimiento, que fueron moduladas por el suministro de fósforo. En bajo fósforo, en *E. elongatus* (*i.e.* especie con baja respuesta micorrícica) la provisión de fósforo aportado por las micorrizas permitió restablecer la concentración mínima de fósforo necesaria para promover el crecimiento de las plantas. Por el contrario, en *U. brizantha* (*i.e.* especie con alta respuesta micorrícica) el aumento en el suministro de fósforo por efecto de las micorrizas se tradujo en un crecimiento inmediato de las plantas. A partir de este resultado se pudo concluir que la especie *U. brizantha* requiere menor concentración interna de fósforo para mantener su crecimiento máximo y por lo tanto, es más eficiente en el uso del fósforo disponible (**Hipótesis 2**, Capítulo III). Por último, sobre las mismas especies seleccionadas para el Capítulo III, el **tercer objetivo** de esta tesis fue caracterizar respuestas de recuperación post-defoliación en condiciones de bajo y alto suministro de fósforo. En la hipótesis planteada para este objetivo se propuso que en plantas defoliadas se genera un compromiso entre el proceso de rebrote y el mantenimiento de los hongos micorrícicos; y que la magnitud del mismo, depende de la respuesta micorrícica de la especie y del suministro de fósforo. Mis resultados apoyan la hipótesis debido a que en plantas inoculadas de *E. elongatus* en alto fósforo se registró un claro compromiso entre los simbiontes, no ocurriendo lo mismo en *U. brizantha* para ninguna de las dosis de fósforo planteadas. Por lo tanto, esto demuestra la posibilidad de un compromiso entre recuperación post-defoliación y presencia de micorrizas, que depende de la identidad de la especie hospedadora y del suministro fósforo (**Hipótesis 3**, Capítulo IV).

A continuación, a partir de figuras y esquemas que ilustran las principales respuestas encontradas en los experimentos realizados, comentaré de forma conjunta y en el marco de los objetivos propuestos los resultados más importantes del presente trabajo de

tesis. Finalizaré este capítulo describiendo cuáles fueron los aportes originales derivados de la tesis con relación al nuevo conocimiento generado.

5.1. Variación interespecífica en la respuesta micorrícica en relación a cambios en el suministro de fósforo

Es sabido que el efecto funcional la asociación simbiótica entre raíces de plantas y hongos micorrícicos es modulado por las condiciones ambientales, la identidad genética y funcional de la planta hospedadora y de los hongos, como también, por la interacción entre ambos participantes de la simbiosis. En el Capítulo II de esta tesis se observó que, en condiciones de déficit nutricional, las especies analizadas respondieron de manera diferente a la simbiosis: las especies tropicales tuvieron mayor respuesta micorrícica que las especies templadas. Sobre la base de nuestras observaciones visuales se sugiere que estas diferencias en el grado de beneficio micorrícico, entre los principales grupos de gramíneas forrajeras cultivadas, estarían en parte relacionadas con el patrón de ramificación radical de las especies. A partir estos resultados, *Elymus elongatus* (*i.e.* gramínea templada con baja respuesta micorrícica) y *Urochloa brizantha* (*i.e.* gramínea tropical con alta respuesta micorrícica) fueron seleccionadas y utilizadas como especies modelo a estudiar en los capítulos sucesivos de esta tesis.

La Figura 5.1 resume esquemáticamente los principales resultados obtenidos en el Capítulo II y III que integran la respuesta micorrícica de *E. elongatus* y *U. brizantha*, en condiciones variables de suministro de fósforo.

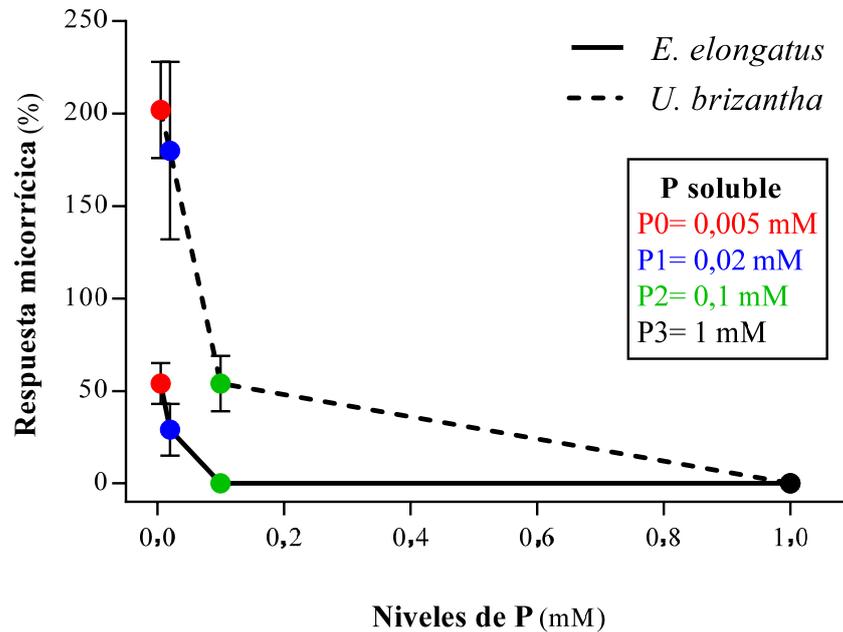


Figura 5.1. Resumen esquemático de la respuesta micorrícica de plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo. La respuesta micorrícica fue calculada como: $RM (\%) = [(biomasa\ total\ de\ plantas\ inoculadas - biomasa\ total\ de\ plantas\ no-inoculadas) / biomasa\ total\ de\ plantas\ no-inoculadas] * 100$. Las dosis de fósforo soluble se indican en la figura con colores. Los valores son promedios \pm error estándar ($n=5$).

Es de destacar que, la dosis P0 fue la utilizada en el Capítulo II y las dosis P1, P2 y P3 las utilizadas en el Capítulo III de esta tesis a partir de las cuales se logró un amplio gradiente de fósforo soluble para las plantas. En las dos especies analizadas, se observó una respuesta micorrícica decreciente a medida que aumenta el suministro de fósforo. Esto se debe a que en bajo e intermedio nivel de fósforo (*i.e.* círculos rojos y azules) los hongos micorrícicos mejoran el estado nutricional y crecimiento de las plantas. Sin embargo, al aumentar aún más el nivel de fósforo disponible las plantas inoculadas, en relación a las no-inoculadas, presentan una disminución paulatina de su crecimiento (*i.e.* círculos verdes) hasta volverse nulo (*i.e.* círculos negros). Al comparar las respuestas observadas, es de destacar que el aérea bajo la línea de respuesta de *U. brizantha* (*i.e.* la especie tropical) fue notablemente mayor que la registrada en *E. elongatus* (*i.e.* la especie templada). Esto demuestra que *U. brizantha* es una especie muy sensible a la formación de micorrizas razón por la cual obtuvo mayores beneficios relativos (*i.e.* en términos de producción de biomasa) de la simbiosis que *E. elongatus*. Es importante destacar que en alto fósforo (*i.e.* círculos negros) no se observaron cambios en la producción de biomasa y por lo tanto, en plantas que no fueron sujetas a defoliación no se detectaron efectos parasíticos de la presencia de

micorrizas sobre el crecimiento de las plantas en el rango de suministro de fósforo analizado. Los resultados obtenidos permiten validar en plantas gramíneas forrajeras el modelo propuesto por Janos (2007) y al mismo tiempo, confirmar las diferencias específicas en el patrón de respuesta micorrícica observado en el Capítulo II aún en condiciones variables de suministro de fósforo.

5.2. Contraste en la eficiencia en el uso del fósforo de *E. elongatus* y *U. brizantha* en relación a las micorrizas y a la fertilización

En un sentido general, la demanda de fósforo por las plantas se relaciona con las tasas actuales de crecimiento y la concentración mínima de fósforo en tejido requerida para sostener dicho crecimiento (Koide 1991). La Figura 5.2 muestra los cambios en la producción de biomasa y contenido de fósforo en plantas de *E. elongatus* y *U. brizantha* debidos a la fertilización y/o a las micorrizas; y a partir de ello, en el Capítulo III de esta tesis se analiza la eficiencia de las especies en la utilización del fósforo disponible (EUF).

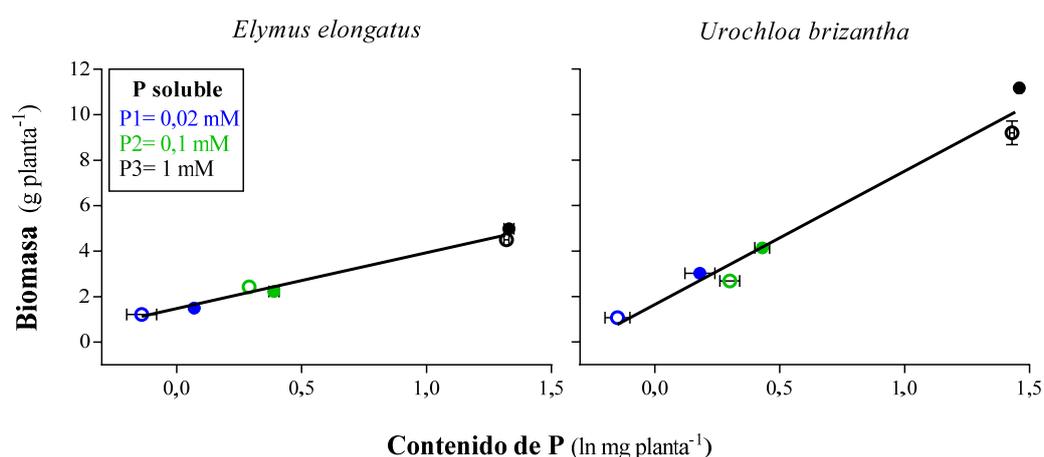


Figura 5.2. Biomasa total en función del logaritmo natural del contenido de fósforo en plantas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* creciendo bajo distinto suministro de fósforo durante 4 meses. Las plantas son no-inoculadas (-Inoc.; círculos vacíos) e inoculadas (+Inoc.; círculos llenos) con hongos micorrícicos arbusculares. Las dosis de fósforo soluble se indican en la figura con colores. Los valores son promedios \pm error estándar (n= 5).

La figura muestra que en *E. elongatus* en bajo fósforo, las micorrizas aumentaron la concentración de fósforo total traduciéndose en un mayor contenido de fósforo en planta. Mientras que *U. brizantha*, en los niveles de bajo e intermedio suministro de fósforo, las plantas inoculadas tuvieron menor concentración interna pero notables incrementos en biomasa y contenido de fósforo total. Este contraste entre especies, con distinta sensibilidad a las micorrizas y requerimientos internos de fósforo diferentes, puso en evidencia las divergencias en la eficiencia de utilización del fósforo (EUF) entre ambas especies: en *U.*

brizantha (i.e. especie con alta respuesta micorrícica) el fósforo aportado por las micorrizas se tradujo en un crecimiento inmediato de las plantas; mientras que, en *E. elongatus* permitió restablecer la concentración mínima de fósforo necesaria para promover el crecimiento de las plantas. Estas diferencias en la eficiencia en el uso del fósforo también fueron evidentes al comparar las líneas de respuesta de las especies (Figura 5.2). En este sentido, se observó que en *U. brizantha* la pendiente de la línea es notablemente más pronunciada que en *E. elongatus*. Esto denota para *U. brizantha* una mayor eficiencia (intrínseca) en el uso del fósforo disponible proveniente de la fertilización y/o micorrizas; como también, una mayor potencialidad de crecimiento debido a que el fósforo absorbido se tradujo en una mayor producción de biomasa. A partir de estos resultados se concluye que *U. brizantha* fue más eficiente en el uso del fósforo disponible; mientras que en *E. elongatus* el crecimiento estuvo controlado por el estado nutricional de las plantas. Sabiendo que *U. brizantha* fue la especie con mayor sensibilidad a las micorrizas (Capítulo II y III) y eficiencia en la utilización del fósforo disponible que *E. elongatus* (Capítulo III), resultó interesante también conocer cómo estas especies en presencia de micorrizas responden a la defoliación (situación recurrente en plantas forrajeras perennes), creciendo tanto en condiciones de bajo y alto suministro de fósforo.

5.3. Evidencias del compromiso defoliación vs. micorrizas moduladas por la identidad de la especie hospedadora y el suministro de fósforo

Algunos autores han postulado que la combinación de alta disponibilidad de fósforo y estrés de carbono (e.g. por ocurrencia de una defoliación intensa) podría exceder -al menos transitoriamente- los beneficios nutricionales de las micorrizas (Koide 1991; Johnson *et al.* 1997), en el caso de que desde la planta hospedadora continúe fluyendo carbono para el mantenimiento de las estructuras micorrícicas. Al respecto, se podría deducir que la relación costo-beneficio entre ambos simbioses puede estar modulada por el suministro de fósforo. El cuadro 5.3 resume esquemáticamente los principales resultados obtenidos en el Capítulo IV sobre el efecto combinado de las micorrizas y el suministro de fósforo sobre el crecimiento post-defoliación de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha*.

Cuadro 5.3. Efecto de las micorrizas y el suministro de fósforo en plantas defoliadas de *Elymus elongatus* y *Urochloa brizantha* a los 22 y 34 días de recuperación post-defoliación.

Especie	Bajo P		Alto P	
	-Inoc.	+Inoc.	-Inoc.	+Inoc.
<i>E. elongatus</i>	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
<i>U. brizantha</i>	NEUTRO			

Los resultados de este capítulo muestran respuestas compensatorias de crecimiento distintas entre las especies analizadas que estuvieron reguladas por las micorrizas y el suministro de fósforo. En *E. elongatus* en bajo fósforo, las micorrizas promovieron el crecimiento de plantas defoliadas evidenciando una relación mutualista. A diferencia de lo evidenciado en el Capítulo III, que en alto fósforo los hongos micorrícicos no generaron cambios en la producción de biomasa cuando las plantas no fueron defoliadas, en el Capítulo IV de la tesis se registró un claro compromiso entre ambos simbioses: la defoliación en plantas inoculadas disminuyó considerablemente la capacidad de rebrote y el número de macollos por planta razón por la cual la relación termina siendo parasítica en el tiempo de recuperación considerado. Al no haber limitaciones por fósforo, se presume que la demanda de carbono de los hongos micorrícicos a la planta hospedante superó el posible beneficio aportado por la presencia de los hongos (Grimoldi *et al.* 2006). Por lo tanto, en este caso se observó que el suministro de fósforo determina el resultado de la relación costo-beneficio de la simbiosis en condiciones de defoliación. Por el contrario, en *U. brizantha*, que fue la especie con mayor beneficio micorrícico en condiciones de no-defoliación (*i.e.* mayor producción de biomasa y absorción del fósforo disponible; Capítulos II y III de esta tesis), la presencia de micorrizas no tuvo efectos negativos sobre el crecimiento de plantas defoliadas en ninguna de los niveles de fósforo considerados. Los resultados obtenidos en esta sección revelan por primera vez en la especie templada *E. elongatus* en alto fósforo, un efecto parasítico de los hongos micorrícicos sobre el crecimiento post-defoliación de las plantas y por el contrario, un efecto neutro en la especie tropical *U. brizantha* independientemente del suministro de fósforo aplicado.

5.3. Aportes y proyección de los resultados derivados de la tesis

En el primer experimento de esta tesis (**Capítulo II**) se caracterizó la respuesta micorrícica, a nivel de planta individual, de seis especies de gramíneas forrajeras cultivadas creciendo en condiciones de déficit nutricional. En términos generales, las gramíneas tropicales tuvieron mayor respuesta micorrícica que las templadas. Varios estudios han abordado el tema caracterizando la respuesta de las plantas a la simbiosis en especies de pastizal natural (Hetrick *et al.* 1988; Wilson & Hartnett 1998). Sin embargo, existen pocas evidencias de experimentos manipulativos en los que se estudie en forma comparativa el efecto de la simbiosis micorrícica en gramíneas forrajeras cultivadas templadas y tropicales. Por lo tanto, nuestros resultados proveen información útil que podría ser usada en la selección de especies modelo para estudiar la simbiosis micorrícica y a partir de ello, plantear objetivos relacionados con la producción de forraje en pastizales y pasturas sujetas a condiciones de déficit nutricional.

En el segundo experimento (**Capítulo III**) se estudió el rol de las micorrizas y el suministro de fósforo sobre el crecimiento y la nutrición de las gramíneas forrajeras cultivadas *E. elongatus* y *U. brizantha*, con respuestas micorrícicas contrastantes. En las dos especies

analizadas, se observó que el cambio en la producción de biomasa entre plantas inoculadas y no-inoculadas disminuyó ante el aumento en el suministro de fósforo. Sin embargo, a lo largo del gradiente de fósforo disponible planteado, el patrón de respuesta micorrícica fue distinto entre las especies y coincidió con divergencias en la eficiencia de utilización del fósforo (EUF): en *U. brizantha* el aumento en el suministro de fósforo por efecto de las micorrizas se tradujo en un crecimiento inmediato de las plantas; mientras que en *E. elongatus* tiende a lograr de una concentración mínima de fósforo interna que resultaría necesaria para promover el crecimiento de las plantas. Por lo expuesto, *U. brizantha* fue más eficiente en el uso del fósforo disponible que *E. elongatus*. En base a mi conocimiento, este trabajo es el primer reporte acerca del funcionamiento diferencial de la simbiosis micorrícica en gramíneas forrajeras cultivadas templadas y tropicales, en relación a la eficiencia de uso del fósforo y a la descripción de diferentes estrategias de crecimiento de las plantas creciendo en distintos niveles de fósforo disponible.

En el tercer experimento de esta tesis (**Capítulo IV**) sobre las mismas especies analizadas en los Capítulos II y III se caracterizaron respuestas de recuperación post-defoliación de las plantas creciendo en condiciones de bajo y alto suministro de fósforo. Las especies mostraron respuestas contrastantes a la defoliación reguladas por la presencia de micorrizas y el suministro de fósforo. En *E. elongatus* en bajo fósforo, las micorrizas en plantas defoliadas establecieron una relación mutualista entre ambos simbioses; mientras que, en alto fósforo la relación fue parasítica. Contrariamente, en la especie *U. brizantha* en ningún caso la presencia de micorrizas generó efectos negativos sobre el rebrote de las plantas defoliadas. En la bibliografía pocos estudios describen los efectos de las micorrizas en gramíneas forrajeras (Grimoldi *et al.* 2005), y hasta el momento, no existe ningún antecedente que haya abordado el estudio del efecto combinado de las micorrizas y el suministro de fósforo sobre el crecimiento de gramíneas forrajeras cultivadas sujetas a defoliación. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este capítulo de la tesis son un claro avance en la comprensión de las respuestas involucradas en la recuperación post-defoliación de gramíneas forrajeras cultivadas con distinta respuesta micorrícica.

De manera integradora de los Capítulos II y III de esta tesis, encontré que la gramínea tropical *U. brizantha* es la especie más afín a las micorrizas debido a que obtiene mayores beneficios relativos (*i.e.* en producción de biomasa) de la simbiosis que *E. elongatus*. Adicionalmente, se observaron distintas estrategias de las especies relacionadas con la eficiencia en el uso del fósforo, siendo *U. brizantha* la especie que hizo un mejor aprovechamiento de los aportes de fósforo provenientes de las micorrizas y/o fertilización. Luego, pude comprobar que en plantas defoliadas de *U. brizantha* (la especie con mayor respuesta micorrícica, Capítulos II y III), nunca se evidencia el compromiso defoliación vs. micorrizas (Capítulo IV). En esta especie, la complementariedad entre los simbioses es evolutivamente más alta y efectiva que ni siquiera en condiciones de estrés de carbono (*i.e.* defoliación intensa) se encuentran efectos negativos de los hongos micorrícicos sobre el

crecimiento de las plantas. En cambio para *E. elongatus*, en bajo fósforo las micorrizas son beneficiosas y no se presenta un compromiso; sin embargo, en condiciones de alto fósforo los hongos micorrícicos generan un efecto parasítico sobre el rebrote de las plantas defoliadas (Capítulo IV). Dicha respuesta coincide con la menor sensibilidad que tiene *E. elongatus* a formar micorrizas caracterizada previamente en los Capítulos II y III. Por lo tanto, el Capítulo IV de esta tesis constituye la primer evidencia experimental de que el grado de compromiso entre defoliación intensa y micorrizas se relaciona con el grado de respuesta micorrícica de la especie hospedadora y el suministro de fósforo. Los resultados obtenidos a partir de esta tesis (y los interrogantes que surgen a partir de la misma), aportan nuevos conocimientos sobre estas especies en relación a las micorrizas, a la eficiencia en el uso del fósforo y a su capacidad de recuperación post-defoliación en presencia de hongos micorrícicos bajo diferentes situaciones de suministro de fósforo. La información generada en esta tesis servirá de base para mejorar el conocimiento de aspectos básicos de la relación de las plantas con hongos formadores de micorrizas arbusculares en gramíneas forrajeras templadas y tropicales. No obstante, es importante destacar que a efectos de extender o extrapolar los resultados obtenidos a condiciones naturales, las respuestas observadas deberían ser previamente validadas en experimentos a campo lo que permitirá plantear objetivos de producción y conservación de la funcionalidad de las relaciones simbióticas en sistemas pastoriles.

BIBLIOGRAFIA

- Abbot LK, Robson AD. 1982.** Infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizas in agricultural soil. *Australian Journal of Agricultural Research* **33**: 1049–1059.
- Abbott LK, Robson AD. 1984.** The effect of VA mycorrhizae on plant growth. In: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) VA mycorrhiza. CRC, pp: 113–130.
- Akhmetzhanova AA, Soudzilovskaia NA. et al. 2012.** A rediscovered treasure: mycorrhizal intensity database for 3000 vascular plant species across the former Soviet Union. *Ecology* **93**: 689–690.
- Allsopp N. 1998.** Effect of defoliation on the arbuscular mycorrhizas of three perennial pasture and rangeland grasses. *Plant and Soil* **202**: 117–124.
- An ZQ, Hendrix JW. 1988.** Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* **80**: 259–261.
- Baon JB, Smith SE, Alston AM. 1993.** Mycorrhizal responses of barley cultivars differing in P efficiency. *Plant and Soil* **157**: 97–105.
- Barea JM. 1991.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In: B.A. Stewart (Editor), *Advances in Soil Science*. Springer-Verlag, New York, pp. 1–40.
- Barto EK, Rilling MC. 2010.** Does herbivory really suppress mycorrhiza? A meta-analysis. *Journal of Ecology* **98**: 745–753.
- Baylis GTS. 1970.** Root hairs and phycomycetous mycorrhizas in phosphorus deficient soil. *Plant and Soil* **33**: 713–716.
- Baylis GT. 1972.** Fungi, phosphorus and the evolution of root systems. *Search* **3**: 257–258.
- Bélangier G, Gastal F. 2000.** Nitrogen utilization by forage grasses. *Canadian Journal of Plant Science* **80**: 11–20.
- Bi YL, Li XL, Christie P. 2003.** Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. *Chemosphere* **50**: 831–837.
- Biró B, Köves-Péchy K, Vörös I, Takács T, Eggenberger P, Strasser RJ. 2000.** Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Applied Soil Ecology* **15**: 159–168.
- Bolan NS, Robson AD, Barrow NJ. 1984a.** Increasing phosphorus supply can increase the infection of plant roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **16**: 299–304.
- Bucher M. 2007.** Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* **173**: 11–26.
- Buwalda JG, Goh KM. 1982.** Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depressions in vesicular arbuscular mycorrhizal ryegrass. *Soil Biology & Biochemistry* **14**: 103–106.
- Brown RH. 1985.** Growth of C3 and C4 grasses under low N levels. *Crop Science* **25**: 954–957.

- Caloin M, Yu O. 1982.** An extension of the logistic model of plant growth. *Annals of Botany* **49**: 599–607.
- Cavagnaro TR, Smith FA, Ayling SM, Smith SE. 2003.** Growth and phosphorous nutrition of a Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **157**: 127–134.
- Cavagnaro RA, Oyarzabal M, Oesterheld M, Grimoldi AA. 2014.** Screening of biomass production of cultivated forage grasses in response to mycorrhizal symbiosis under nutritional deficit conditions. *Grassland Science* **60**: 178–184.
- Cooper KM. 1984.** Physiology of VA mycorrhizal associations. In: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) VA mycorrhiza. CRC, pp: 155–186.
- Covacevich F, Echeverría HE, Andreoli E. 1995.** Micorrización vesículo-arbuscular espontánea en trigo en función de la suministro de fósforo. *Ciencia del Suelo* **13**: 47–51.
- Covacevich F, Marino MA, Echeverría HE. 2006.** The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass in a moderately acidic Argentinean soil. *European Journal of Soil Biology* **42**: 127–138.
- Covacevich F, Echeverría HE, Aguirrezabal LAN. 2007.** Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization into field and glasshouse-grown spring wheat in Argentina. *Applied Soil Ecology* **35**: 1–9.
- Covacevich F & Echeverría H. 2009.** Mycorrhizal occurrence and responsiveness of tall fescue and wheatgrass are affected by the source of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *Journal of Plant Interactions* **4**: 101–112.
- Crush JR. 1995.** Effect of VA micorrizas on phosphorus uptake and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) growing in association with ryegrass (*Lolium perenne* L.). *New Zealand Journal of Agricultural Research* **38**: 303–307.
- Chalk PM, Souza R. de F., Urquiaga S, Alves BJR, Boddey RM. 2006.** The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. *Soil Biology Biochemistry* **38**: 2944–2951.
- Chagnon PL, Bradley RL, Maherali H, Klironomos JN. 2013.** A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Sciences* **18**: 484–491.
- Chapin FS III. 1980.** The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**: 233–260.
- Chapin FS III, Matson PA, Mooney HA. 2002.** Principles of terrestrial ecosystem ecology. New York: Springer-Verlag, pp. 1–17.
- Chapman DF, Lemaire G. 1993.** Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. In: Grasslands of Our World (Ed Baker MJ), SIR Publishing. Wellington, pp. 55–64.
- Davidson JL, Milthorpe FL. 1966.** The Effect of Defoliation on the Carbon Balance in *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany* **30**: 185–198.
- Douds JC, Johnson CR, Koch KE. 1988.** Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf P accumulation in a split root VA mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **80**: 491–496.

- Druille M, Cabello MN, Omacini M, Golluscio RA. 2013.** Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* **64**: 99–103.
- Ehleringer JR, Monson RK. 1993.** Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 411–439.
- Ehleringer JR, Cerling TE, Helliker BR. 1997.** C4 photosynthesis, atmospheric CO₂ and climate. *Oecologia* **112**: 285–299.
- Eissenstat DM, Graham JH, Syvertsen JP, Drouillard DL. 1993.** Carbon economy of sour orange in relation to mycorrhizal colonization and phosphorus status. *Annals of Botany* **71**: 1–10.
- Evans AS. 1991.** Whole-plant responses of *Brassicca campestris* to altered sink-source relations. *The American Naturalist* **78**: 394–400.
- Ferraro DO, Oosterheld M. 2002.** Effect of defoliation on grass growth. A quantitative review. *Oikos* **98**: 125–133.
- Fitter AH, Hay RKM. 1987.** *Environmental Physiology of Plants, 2nd edn.* Academic Press, London.
- Fitter A. 1991.** Characteristics and functions of root systems. En: Waisel T, Eshel A, Kafkafi U (eds). *Plant roots: the hidden half.* New York, pp: 3–25.
- Fitter AH, Heinemeyer A, Husband R, Olsen E, Ridgway KP, Staddon PL. 2004.** Global environment change and the biology of arbuscular mycorrhizas: gaps and challenges. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1133–1139.
- Fohse D, Claaseen N, Jungk A. 1988.** Phosphorus efficiency of plants. I: external and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant and Soil* **110**: 101–109.
- Gebbing T, Lux-Endrich A, Grimoldi AA. 2004.** Responses of ryegrass (*Lolium perenne* L.) seedlings to mycorrhiza development and leaf removal leaf morphology and carbohydrate contents. *Grassland Science in Europe* **9**: 805–807.
- Ghering CA, Whitham TG. 1994.** Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Trends in Ecology and Evolution* **9**: 251–255.
- Gehring CA, Whitham TG. 2002.** Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences. *Mycorrhizal Ecology* (eds van der Heijden MGA & Sanders IR), pp. 295–320. Springer, Berlin, Germany.
- Gehring C, Bennett A. 2009.** Mycorrhizal Fungal-Plant-Insect Interactions: the importance of a community approach. *Environmental Entomology* **38**: 93–102.
- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963.** Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* **42**: 235–244.
- Goverdr M, van der Heijden MGA, Weimken A, Sanders IR, Erhardt A. 2000.** Arbuscular mycorrhizal fungi influence life history traits of a lepidopteran herbivore. *Oecologia* **125**: 362–369.

- Greenwood DJ. 1983.** Quantitative theory and the control of soil fertility. *New Phytologist* **94**: 1–18.
- Grigera G, Oesterheld M. 2004.** Mycorrhizal colonization patterns under contrasting grazing and topographic conditions in flooding Pampa (Argentina). *Rangeland Ecology & Management* **57**: 601–605.
- Grimoldi AA, Kavanová M, Lattanzi FA, Schnyder H. 2005.** Phosphorus nutrition mediated effects of arbuscular mycorrhiza on leaf morphology and carbon allocation in perennial ryegrass. *New Phytologist* **168**: 435–444.
- Grimoldi AA, Kavanová M, Lattanzi FA, Schäufele R, Schnyder H. 2006.** Effects of arbuscular mycorrhiza on carbon economy in perennial ryegrass: quantification by $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ steady-state labelling and gas exchange. *New Phytologist* **172**: 533–544.
- Hall IR, Johnstone PD, Dolby R. 1984.** Interactions between endomycorrhizas and soil nitrogen and phosphorus on the growth of ryegrass. *New Phytologist* **97**: 447–453.
- Halsted M, Lynch J. 1996.** Phosphorus responses of C3 and C4 species. *Journal of Experimental Botany* **47**: 497–505.
- Hanson WC. 1950.** The photometric determination of phosphorus in fertilizers using the phosphovanado-molybdate complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1**: 172–173.
- Harley JL, Smith SE. 1983.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. London, pp: 483.
- Harley JL, Harley EL. 1987.** A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* **105**: 1–102.
- Hartnett DC, Wilson GWT. 2002.** The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and Soil* **244**: 319–331.
- Hatch MD. 1987.** C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Reviews on Bioenergetics* **895**: 81–106.
- Hayman DS. 1974.** Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. *New Phytologist* **73**: 71–80.
- Hayman DS. 1983.** The physiology of vesicular arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany* **61**: 944–963.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M. et al. 1998.** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69–72.
- van der Heijden MGA, Martin FM. et al. 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 1998.** Ploughing up the wood wide web?. *Nature* **394**: 431.
- Hetrick BAD, Kitt DG, Wilson GWT. 1988.** Mycorrhizal dependence and growth habit of warm-season and cold-season tallgrasses prairie plants. *Canadian Journal of Botany* **66**: 1376–1380.

- 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**: 461–467.
- Hetrick BAD. 1991.** Mycorrhiza and root architecture. *Experientia* **47**: 355–362.
- Hocking PJ, Steer BT. 1983.** Uptake and partitioning of selected mineral elements in sunflower (*Helianthus annuus* L.) during growth. *Field Crops Research* **6**: 93–107.
- Hoeksema JD, Bala Chaudhary V, Gehring CA. et al. 2010.** A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* **13**: 394–407.
- Holland JN, Cheng WX, Crossley CA. 1996.** Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of belowground C fluxes using carbon-14. *Oecologia* **107**: 87–94.
- Jakobsen I, Rosendahl L. 1990.** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115**: 77–83.
- Jakobsen I. 1999.** Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. In: Varma AK, Hock B (eds) *Mycorrhiza*. Springer, pp: 305–332.
- James JJ, Tiller RL, Richards JH. 2005.** Multiple resources limit plant growth and function in a saline–alkaline desert community. *Journal of Ecology* **93**:113–126.
- Janos DP. 2007.** Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* **17**: 75–91.
- Jocic B, Saric MR. 1983.** Efficiency of nitrogen, phosphorus and potassium use by corn, sunflower and sugarbeet for the synthesis of organic matter. *Plant and Soil* **72**: 219–223.
- Johnson NC. 1993.** Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* **3**:749–757.
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997.** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**: 575–585.
- Johnson D, Leake JR, Ostle N, Ineson P, Read DJ. 2002.** *In situ* CO₂-¹³C pulse-labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil. *New Phytologist* **153**: 327–334.
- Jones MD, Smith SE. 1994.** Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms?. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1089–1109.
- Kanno T, Saito M, Ando Y, Macedo MCM, Nakamura T, Miranda CHB. 2006.** Importance of indigenous arbuscularmycorrhiza for growth and phosphorus uptake in tropical forage grasses growing on an acid, infertile soil from the Brazilian savannas. *Tropical Grasslands* **40**: 94–101.
- Kaschuk G, Kuyper TW, Leffelaar PA, Hungria M, Giller KE. 2009.** Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbiosis?. *Soil Biology Biochemistry* **41**: 1233–1244.

- Kiers TE, Denison RF. 2008.** Sanctions, cooperation and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **39**: 215–36.
- Koide RT. 1991.** Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist* **117**: 365–386.
- Koide RT. 2000.** Mycorrhizal symbiosis and plant reproduction. In: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. Y Kapulnik and D Douds (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp: 19–46.
- Klironomos JN. 2003.** Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* **84**: 2292–2301.
- Larcher W. 2003.** Physiological Plant Ecology, 4th edn. Springer 1–515.
- Lemaire G, Chartier M. 1992.** Relationship between growth dynamics and nitrogen uptake for individual sorghum plants growing at different plant densities. Pages 98–99 In: Proceedings 2nd Congress of European Society of Agronomy, Warwick, UK.
- Lemaire G, Gastal F. 1997.** N uptake and distribution in plant canopies. Pages 3–43 In: G. Lemaire ed. Diagnosis of the nitrogen status in crops. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, Germany.
- Li M, Wedin DA, Tieszen LL. 1999.** C3 and C4 photosynthesis in *Cyperus* (Cyperaceae) in temperate eastern North America. *Canadian Journal of Botany* **77**: 209–218.
- Lynch JP. 1995.** Root architecture and nutrient acquisition. In: Ecological Studies, Vol. 181. H. BassiriRad (Ed) Nutrient acquisition by plants. An Ecological Perspective.
- Long SP. 1983.** C4 photosynthesis at low temperatures. *Plant, Cell & Environment* **6**: 345–363.
- Louw-Gaume AE, Rao IM, Gaume AJ, Frossard E. 2010.** A comparative study on plant growth and root plasticity responses of two *Brachiaria* forage grasses grown in nutrient solution at low and high phosphorus supply. *Plant and Soil* **328**: 155–164.
- Monzon A, Azcón R. 1996.** Relevance of mycorrhizal fungal origin and host plant genotype to inducing growth and nutrient uptake in *Medicago* species. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **60**: 9–15.
- Morón Ríos A, Dirzo R, Jaramillo VJ. 1997.** Defoliation and belowground herbivory in the grass *Muhlenbergia quadridentata*: effects a plant performance and on the root-feeder *Phyllophaga* (Coleoptera, Melolonthidae). *Oecologia* **110**: 237–242.
- Morris RJ, Fox RH, Jung GA. 1982.** Growth, P uptake and quality of warm and cool season grasses on a low available P soil. *Agronomy Journal* **74**: 125–129.
- Mosse B. 1972.** Effects of different *Endogone* strains on the growth of *Paspalum notatum*. *Nature* **239**: 221–223.
- Munkvold L, Kjoller R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I. 2004.** High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **164**: 357–364.
- 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**: 495–501.

- McNaughton SJ. 1986.** On plant and herbivores. *The American Naturalist* **128**: 765–770.
- Nanamori M, Shinano T, Wasaki J, Yamamura T. et al. 2004.** Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in the tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. *Plant & Cell Physiology* **45**: 460–469.
- Newsham KK, Fitter AH, Watkinson AR. 1995.** Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 407–411.
- Nye P, Tinker PB. 1977.** *Solute Movement in the Soil-Root System*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Oosterheld M, McNaughton SJ. 1988.** Interspecific variation in the response of *Themeda triandra* to defoliation: the effect of time of recovery and growth rates on compensatory growth. *Oecologia* **77**: 181–186.
- Oosterheld M. 1992.** Effect of defoliation intensity on aboveground and belowground relative growth rates. *Oecologia* **92**: 313–316.
- Okon IE, Osonubi O, Solomon MG. 2007.** Response of *Gliricidia sepium* to arbuscular mycorrhizal fungus inoculation and P fertilization in sterile and non sterile soils. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **5**: 430–433.
- Osorio NW, Habte M. 2013.** Synergistic effect of a phosphate solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* **91**: 274–281.
- Osmond CB, Winter K, Ziegler H. 1982.** Functional significance of different pathways of CO₂ fixation in photosynthesis. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds. *Encyclopedia of plant physiology, new series, Vol. 12B physiological plant ecology II. water relations and carbon assimilation*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 479–547.
- Peng S, Eissenstat DM, Graham JH, Williams K, Hodge NC. 1993.** Growth depression in mycorrhizal citrus at high phosphorus supply. *Plant Physiology* **101**: 1063–1071.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970.** Improved procedure for clearing root and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158–161.
- Powell CLI, Daniel J. 1978.** Mycorrhizal fungi stimulate uptake of soluble and insoluble phosphate fertilizer from a phosphate deficient soil. *New Phytologist* **80**: 351–358.
- Raiesi F, Ghollarata M. 2006.** Interactions between phosphorus availability and an AM fungus (*Glomus intraradices*) and their effects on soil microbial respiration, biomass and enzyme activities in a calcareous soil. *Pedobiologia* **50**: 413–425.
- Rao IM, Kerridge PC, Macedo MCM. 1996b.** Nutritional requirements of *Brachiaria* and adaptation to acid soils. In *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. Edited by Miles, J.W., Maass, B.L. and Valle, C.B. pp. 53–71. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

- Rao IM, Friesen DK, Osaki M. 1999b.** Plant adaptation to phosphorus-limited tropical soils. In: Pessarkli M (ed) Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, New York, pp. 61–96.
- Reinhart KO, Wilson GWT, Rinella MJ. 2012.** Predicting plant responses to mycorrhizae: integrating evolutionary history and plant traits. *Ecology Letters* **15**: 689–695.
- Richards JH. 1993.** Physiology of plants recovering from defoliation. In: MJ Baker (Hrsg) Grasslands of our world. SIR Publishing, Wellington. New Zealand, pp. 46–54.
- Selosse MA, Rousset F. 2011.** The plant–fungal marketplace. *Science* **333**: 828–829.
- Siqueira JO, Rocha WF, Oliveira E, Colozzi-Filho A. 1990.** The relationship between vesicular arbuscular mycorrhiza and lime: associated effects on the growth and nutrition of *Brachiaria* grass (*Brachiaria decumbens*). *Biology and Fertility of Soils* **10**: 65–71.
- Souza RF de, Pinto JC, Siqueira JO, Rezende VF. 1999.** Effects of mycorrhizae and phosphorus fertilizer on growth of *Urochloa brizantha* and *Stylosanthes guiansensis* on soil of low fertility. I. Dry matter and crude protein yields. *Pasturas Tropicales* **21**: 19–23.
- Sun XG, Tang M. 2012.** Comparison of four routinely used methods for assessing root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany* **90**: 1073–1083.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998.** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* **116**: 447–453.
- Schellenbaum L, Berta G, Ravolanirina F, Tisserant B, Gianinazzi S, Fitter A. 1991.** Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Annals of Botany* **68**: 135–141.
- Schnyder H, de Visser R. 1999.** Fluxes of reserve-derived and currently assimilated carbon and nitrogen in perennial ryegrass recovering from defoliation. The regrowing tiller and its component functionally distinct zones. *Plant Physiology* **119**: 1423–1435.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413–1421.
- Schweiger PF, Robson AD, Barrow NJ. 1995.** Root hair length determines beneficial effect of a *Glomus* species on shoot growth of some pasture species. *New Phytologist* **131**: 247–254.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2004.** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* **162**: 511–524.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. Academic Press. London, 1–787.
- Smith FA, Grace EJ, Smith SE. 2009.** More than a carbon economy: Nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **182**: 347–358.
- Smith SE, Smith FA. 2011.** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 227–250.

- Smith FA, Smith SE. 2011a.** What is the significance of the arbuscular mycorrhizal colonization of many economically important crop plants? *Plant and Soil* **348**: 63–79.
- Smith SE, Smith FA. 2012.** Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* **104**: 1–13.
- Steel RGD, Torrie JH. 1980.** *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*, 2nd edn. McGraw-Hill. New York, 1–633.
- Stribley DP, Tinker PB, Rayner JH. 1980.** Relation of internal phosphorus concentration and plant weight in plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **86**: 261–266.
- Tinker PB. 1975a.** Effects of vesicular arbuscular mycorrhizas on higher plants. *Symposium of the Society for Experimental Biology* **29**: 325–329.
- Thornton B, Millard P. 1996.** Effects of severity of defoliation on root functioning in grasses. *Journal of Range Management* **49**: 443–447.
- Walker C, Mize CW, McNabb HS Jr. 1982.** Populations of endogonaceous fungi at two locations of central Iowa. *Canadian Journal of Botany* **60**: 2518–2529.
- Wang B, Qiu YL. 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299–363.
- Wardle DA. 2002.** *Communities and Ecosystems: linking the aboveground and belowground components*. Princeton, NJ: Princeton, University Press.
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN et al. 2004.** Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**: 1629–1633.
- Wilson GWT, Harnett DC. 1998.** Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany* **85**: 1732–1738.
- Wilson GWT, Rice CW, Rillig MC, Springer A, Harnett DC. 2009.** Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecology Letters* **12**: 452–461.
- Williamson MM, Wilson GWT, Harnett DC. 2012.** Controls on bud activation and tiller initiation in C3 and C4 tallgrass prairie grasses: the role of light and nitrogen. *Botany* **90**: 1221–1228.