

PORTADA

La simbiosis entre pastos y hongos endofitos: su impronta aérea y subterránea en distintos contextos agroecológicos

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

Cecilia Casas

Ingeniera Agrónoma – FAUBA - 2006

Lugar de trabajo: IFEVA-Conicet



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



COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas (CAECE)

Magister Scientiae en Recursos Naturales (EPG, FAUBA)

Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias (EPG,
FAUBA)

Consejero de Estudios

Claudio Marco Ghera

Ingeniero Agrónomo (FAUBA)

JURADO DE TESIS

JURADO

María Victoria Novas

Licenciada en Ciencias Biológicas (FCEN-Universidad de Buenos Aires)
Doctora en Ciencias Biológicas (FCEN-Universidad de Buenos Aires)

JURADO

José M. Meriles

Biólogo (Universidad Nacional de Córdoba)
Doctor en Cs. Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba)

JURADO

James Francis White, Jr.

Licenciado en Biología (Auburn University)
Doctor en Micología (University of Texas at Austin)
Post-Doctorado (Ohio State University)

Escuela Para Graduados “Alberto Soriano”
Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires
Fecha de defensa de la tesis: 02 de Octubre de 2012

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

Gracias a las interacciones múltiples y todas las personas que fueron y serán parte de ellas. Gracias al contexto por déjame crecer y cambiar, compartir y elegir.

Gracias a los amigos del colegio y a los que llegaron con la carrera de grado y el posgrado. Gracias por estar siempre ahí Euge, Ceci, Flor, Sole, Lau, Alan, Guille, Santi, Eze. Gracias Patri, Gabi, Pedro, Andrés, Lucho, Lucía, Natalia, Maxi, Lucas. Gracias a los simbiontes, Marina O., Pedro G., Andrea U., Pablo G., Seba G., Luis P. y los llegaron después, Luciana D., Lucho, Romi C.. Gracias a los que pasaron por la mitocondria y a los que aún están: Paula, Isabel, Cynthia, Coni, Marcos, Santiago, Marina, Fernanda, Gonzalo. Gracias Fernando B., Luciana C., Ade, Esteban F., Lore G., Geno, Pame G., Oggi, Gonza I., Pedro T., Grisel, Milena, Lucas G., Gustavo S. por extender sus lazos, por la voz de la experiencia, los tangos, las peñas, los mates, las cenas. A los que no nombré también. Gracias a Mirta R., Roberto T., Walter y Carlitos por toda la asistencia. Gracias María S. por el ejemplo constante, los libros, las palabras, la inspiración. Gracias a Marina por animarse y porque sus revuelos terminaron por hacerme crecer y fortalecer.

Gracias a Las Chilcas y a sus comunidades.

Gracias a CONICET y a la FAUBA. Gracias a las personas que integran las Cátedras de Microbiología y Edafología. Gracias por el apoyo, por priorizar mi formación. Gracias a la FAUBA porque sin su apoyo la posibilidad de este posgrado no hubiera existido.

Gracias a mi familia, mis tíos, mis primos, mis abuelos.

Especialmente a mis papás y a mis hermanos por acompañarme siempre siempre.

ÍNDICE GENERAL

PORTADA	<i>i</i>
COMITÉ CONSEJERO	<i>iii</i>
JURADO DE TESIS	<i>v</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>vii</i>
ÍNDICE GENERAL	<i>ix</i>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>xi</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>xiv</i>
DECLARACIÓN	<i>xix</i>
RESUMEN	<i>xxi</i>
ABSTRACT	<i>xxiii</i>
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	<i>25</i>
1.1 INTRODUCCIÓN	<i>27</i>
1.1.1 La importancia de las interacciones interespecíficas en la estructura y dinámica de la comunidad	<i>27</i>
1.1.2 Relaciones de retroalimentación entre el suelo y las especies vegetales	<i>28</i>
1.1.3 Simbiosis y mutualismo	<i>30</i>
1.1.4 Simbiosis entre pastos y hongos endofitos del género <i>Neotyphodium</i>	<i>31</i>
1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL DE ESTA TESIS	<i>34</i>
1.3 ENFOQUE DE LA TESIS	<i>34</i>
1.4 SISTEMA DE ESTUDIO	<i>34</i>
1.5 ESQUEMA DE LA TESIS	<i>36</i>
CAPÍTULO 2 VÍAS DE INFLUENCIA DE LA SIMBIOSIS AÉREA ENTRE LOLIUM MULTIFLORUM Y NEOTYPHODIUM OCCULTANS SOBRE LA DESCOMPOSICIÓN Y LOS GRUPOS TRÓFICOS DEL SUELO	<i>39</i>
2.1 INTRODUCCIÓN	<i>41</i>
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	<i>43</i>
2.2.1 Diseño experimental	<i>43</i>
2.2.2 Origen de las semillas utilizadas	<i>44</i>
2.2.3 Obtención de broza de poblaciones de <i>Lolium multiflorum</i> con alta y baja frecuencia de endofitos	<i>45</i>
2.2.4 Generación de ambientes bajo la influencia de poblaciones de <i>Lolium multiflorum</i> con alta o baja frecuencia de endofitos	<i>45</i>
2.2.5 Determinaciones	<i>45</i>
2.2.6 Análisis estadístico	<i>47</i>
2.3 RESULTADOS	<i>47</i>
2.4 DISCUSIÓN	<i>50</i>
CAPÍTULO 3 INTERACCIONES MÚLTIPLES: LA SIMBIOSIS LOLIUM MULTIFLORUM - NEOTYPHODIUM OCCULTANS Y EL PASTOREO PUEDEN MODULAR LA ACTIVIDAD Y A LOS ORGANISMOS DEL SUELO EN DISTINTOS AMBIENTES	<i>57</i>

3.1	INTRODUCCIÓN	59
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.2.1	Diseño experimental	61
3.2.2	Origen de los suelos utilizados	62
3.2.3	Tratamientos	62
3.2.4	Determinaciones	63
3.2.8	Origen de la broza de <i>Bromus unioloides</i>	64
3.2.9	Estructura de la comunidad de nematodos del suelo:	64
3.2.10	Análisis estadístico	64
3.3	RESULTADOS	65
3.4	DISCUSIÓN	70
<i>CAPÍTULO 4 NEOTYPHODIUM OCCULTANS Y EL PASTOREO INTERFIEREN EN LAS RELACIÓN DE RETROALIMENTACIÓN DE LOLIUM MULTIFLORUM CON OTRAS ESPECIES</i>		77
4.1	INTRODUCCIÓN	79
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS	81
4.2.1	Experimentos I: relaciones de retroalimentación con soja	81
4.2.2	Experimentos II: relaciones de retroalimentación con cardo	84
4.3	RESULTADOS	86
4.3.1	Relaciones de retroalimentación con soja	86
4.3.2	Relaciones de retroalimentación con cardo	87
4.4	DISCUSIÓN	90
<i>CAPÍTULO 5 LAS CONSECUENCIAS ECOLÓGICAS DE NEOTYPHODIUM OCCULTANS EN COMUNIDADES DE PASTIZAL</i>		95
5.1	INTRODUCCIÓN	97
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS	99
5.2.1	Diseño experimental	99
5.2.2	Determinaciones	100
5.2.3	Análisis estadístico	101
5.3	RESULTADOS	101
5.4	DISCUSIÓN	106
<i>CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN GENERAL</i>		111
6.1	INTRODUCCIÓN	113
6.2	APORTES DE LA TESIS A LA ECOLOGÍA DE COMUNIDADES	114
6.2.1	La impronta de las interacciones múltiples sobre la estructura de la comunidad	114
6.2.2	Las invasiones en contextos de interacciones múltiples	115
6.3	APORTES DE LA TESIS A LA SIMBIOSIS PASTO- ENDOFITO	116
6.3.1	¿Qué hay de particular entre <i>L. multiflorum</i> y <i>N. occultans</i> ?	116
6.3.2	¿Qué hay de generalidad, patrones y sesgo?	117
6.4	PERSPECTIVAS Y NUEVAS LÍNEAS	118
6.5	CONSIDERACIONES FINALES	119
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>		121
<i>ANEXO</i>		153

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1: Resultado de los modelos estadísticos para los efectos de la calidad de la broza y el ambiente del suelo sobre la biomasa remanente de tejidos aéreo o de raíces de <i>L. multiflorum</i> . La calidad de la broza en descomposición y el ambiente del suelo fueron generados por plantas de <i>L. multiflorum</i> con alto o bajo nivel de infección con el hongo endofito <i>N. occultans</i> . La broza de tejidos aéreos y radiculares fue analizada de manera independiente. El cuadro muestra el estadístico, los grados de libertad asociados (F gl) y, el valor de probabilidad (valor- <i>p</i>).	49
Cuadro 2.2: resultado de los modelos para los efectos del ambiente, la calidad de la broza y el porcentaje de broza remanente sobre la estructura de la comunidad del suelo: riqueza, diversidad y, abundancia de los grupos tróficos (fungívoros, omnívoros y depredadores). Las comunidades asociadas a la broza de tejidos aéreos (en superficie) y radiculares (en profundidad) fueron analizadas de manera independiente. El modelo incluyó a la biomasa remanente en las bolsas de descomposición con el objeto de evaluar la disponibilidad de sustrato en relación a los valores observados. El cuadro muestra los valores del estadístico F y el valor de probabilidad entre paréntesis (valor- <i>p</i>). Los grados de libertad fueron 1,12 y 1,15 para la broza aérea y radicular, respectivamente.	52
Cuadro 3.1: Características de los ambientes de pastizal natural y promoción de <i>L. multiflorum</i> utilizados en los experimentos. Las determinaciones analíticas para el suelo se realizaron sobre tres muestras al inicio de los experimentos. La cobertura de especies se estimó como porcentaje del parche de vegetación. Se consideró rara (R) a especies observadas una única vez en el parche de vegetación.....	63
Cuadro 3.2: Resultado de los modelos estadísticos para los efectos de Endofito y Pastoreo sobre la tasa potencial de mineralización ($\mu\text{g N. g suelo}^{-1}.\text{día}^{-1}$) y la biomasa remanente de <i>B. uniolooides</i> (%. bolsa ⁻¹). Los ambientes generados por historia de uso: pastizal y promoción de <i>L. multiflorum</i> fueron analizados de manera independiente. El cuadro muestra el estadístico, los grados de libertad asociados ($F_{1,15}$) y el valor de probabilidad (<i>p</i>).	66
Cuadro 3.3: valores medios (\pm error estándar) para las biomásas aérea y radicular de las plantas de <i>L. multiflorum</i> y, los valores de pH, humedad y nitrógeno mineral del suelo. Los ambientes generados por historia de uso: pastizal o promoción de <i>L. multiflorum</i> fueron analizados de manera independiente. Las letras P y E en los encabezados de las columnas indican los tratamientos de Pastoreo (P- y P+) y frecuencia de infección con Endofitos (E- y E+). Letras distintas dentro de las celdas indican diferencias significativas para las comparaciones por fila (valor $P < 0,05$ *)....	67
Cuadro 3.4: Resultado de los modelos estadísticos para los efectos de Endofito y Pastoreo sobre la abundancia de nematodos pertenecientes a los grupos tróficos: fitófagos (Fitóf), bacteriófagos (Bact), fungívoros (Fung), omnívoros (Omn) y depredadores (Depr). Los ambientes generados por historia de uso: pastizal y promoción de <i>L. multiflorum</i> fueron analizados de manera independiente. El cuadro muestra el estadístico, los grados de libertad asociados ($F_{1,15}$) y el valor de probabilidad (<i>p</i>)......	71
Cuadro 3.5: coeficientes de correlación (Pearson) entre pares de variables del suelo con historia de uso de pastizal. Biomasa aérea (B.aér) y biomasa radicular (B.rad) de las plantas de <i>L. multiflorum</i> ; pH, nitrógeno mineral (N min.) y humedad (Hum) del suelo; mineralización potencial (Miner) y biomasa remanente (B.rem); nematodos fitófagos (Fitóf), bacteriófagos (Bact), fungívoros (Fung), omnívoros (Omn) y depredadores (Depr). Coeficientes significativos a dos colas están indicadas con un punto (valor $P < 0,1$; ‘), un asterisco (valor $P < 0,05$; *), dos asteriscos (valor $P < 0,01$; **), tres asteriscos (valor $P < 0,001$; ***).	75

Cuadro 3.6: coeficientes de correlación (Pearson) entre pares de variables del suelo con historia de uso de promoción. Biomasa aérea (B.aér) y biomasa radicular (B.rad) de las plantas de <i>L. multiflorum</i> ; pH, nitrógeno mineral (N min.) y humedad (Hum) del suelo; mineralización potencial (Miner) y biomasa remanente (B.rem); nematodos fitófagos (Fitóf), bacteriófagos (Bact), fungívoros (Fung), omnívoros (Omn) y depredadores (Depr). Coeficientes significativos a dos colas están indicadas con un punto (valor $P < 0,1$; \cdot), un asterisco (valor $P < 0,05$; *), dos asteriscos (valor $P < 0,01$; **), tres asteriscos (valor $P < 0,001$; ***).	76
Cuadro 4.1: Índice de severidad utilizado para cuantificar el daño por enfermedad. Se determinó el índice expresado en porcentaje por planta. En la figura de la sección resultados se muestra el valor promedio para las plantas por maceta que es la unidad experimental.....	83
Cuadro 4.2: Resultado de los modelos estadísticos para los efectos de Endofito y Pastoreo sobre la emergencia, la severidad de daño y la biomasa de las plantas de soja. Las condiciones generadas por la historia de uso (pastizal y promoción de <i>L. multiflorum</i>) fueron analizados de manera independiente. El cuadro muestra los valores del estadístico con los grados de libertad asociados (F_{gl}) y el valor de probabilidad (p -valor).....	91
Cuadro 4.3: Coeficientes de correlación (Pearson) entre pares de variables medidas (emergencia, biomasa y severidad de las plantas de soja) y posibles vías que pudieron mediar los efectos de retroalimentación de los endofitos y el pastoreo: la biomasa radicular de las plantas de <i>L. multiflorum</i> (L_m) que crecieron durante la estación anterior, el pH, las tasas de mineralización potencial y la humedad del suelo (Ver resultados en capítulo 3). Los coeficientes de correlación fueron calculados por separado para los suelos con historia de pastizal y de promoción. Coeficientes significativos a dos colas están indicadas con un asterisco (valor $P < 0,05$; *), dos asteriscos (valor $P < 0,01$; **) o tres asteriscos (valor $P < 0,001$; ***). No los hubo. ...	91
Cuadro 4.4: Resultado de los modelos para los efectos de retroalimentación de los Endofito (E+ vs. E-) en contextos de Pastoreo (P+ vs. P-) sobre la biomasa aérea, la cantidad de capítulos abiertos y la frecuencia de abejas (<i>A. mellifera</i>) que visitaron los capítulos de <i>C. acanthoides</i> . Las condiciones generadas por historia de uso (pastizal y promoción de <i>L. multiflorum</i>) fueron analizados de manera independiente. El segundo modelo para las abejas en el suelo de promoción incluyó a los capítulos abiertos como covariable con el objeto de probar su importancia como mecanismo a través del cuál podrían propagarse los efectos (ver Figura 4.4 b). El cuadro muestra los valores del estadístico con los grados de libertad asociados (F_{gl}) y el valor de probabilidad (p -valor).....	92
Cuadro 5.1: Características de la vegetación y del suelo en los sitios con historia de pastoreo y no pastoreados utilizados en el experimento. Las parcelas fueron instaladas en un área de 200 ha y compartieron el mismo tipo de suelo y ubicación topográfica. Los datos muestran el valor medio y el error estándar al comienzo del experimento. La penetración de la luz fue incluida dentro de las características de la vegetación dado que esta determinada por la biomasa aérea (i.e.: verde, muerta en pie y broza). Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios (Tukey, $P < 0.05$).	103
Cuadro 5.2: Resultado de los modelos para los efectos de la historia (pastoreado y no pastoreado) y el agregado de semillas (Control, E+ o E-) sobre los niveles de infección con <i>Neotyphodium occultans</i> (Infección) y los valores de cobertura relativa de <i>Lolium multiflorum</i> (Cobertura). El cuadro muestra los grados de libertad (gl), el estadístico (F) y el valor de probabilidad (p -valor).....	103

Cuadro 5.3: Resultado de los modelos estadísticos para los efectos de la historia del sitio (pastoreado y no pastoreado) y el agregado de semillas (Control, E+ y E-) sobre la riqueza de especies y la cobertura relativa de pastos nativos (P. nativos), pastos exóticos (P. exóticos) y dicotiledóneas (Dicot). Los censos fueron realizados en primavera y en verano. El segundo modelo en primavera incluyó a la cobertura de *Lolium multiflorum* como covariable con el objeto de probar su importancia como mecanismo a través del cuál podrían producirse los efectos. Este modelo solo tuvo sentido cuando se encontraron efectos del factor semilla. El cuadro muestra los grados de libertad (gl), los valores del estadístico (F) y de probabilidad (*p*-valor). 105

Cuadro A.1: Clasificación trófica y taxonómica (Orden, Clase, Phylum) para la fauna encontrada en bolsas de descomposición con broza de tejido aéreo y de raíces. El nombre corresponde al máximo nivel determinado en la clasificación. Los 37 grupos identificados fueron utilizados para calcular la riqueza y la diversidad taxonómica.... 155

Cuadro A.2: grupos florísticos y los géneros o especies identificados durante los censos de vegetación. Los valores para *L. multiflorum* fueron excluidos de la lista. Las columnas "Primavera 2009" y "Verano 2010" indican los dos momentos en que se realizaron los censos. Para todos los casos se distingue entre comunidades pastoreadas (P) y no pastoreadas (No P). El grupo de los pastos incluye a gramíneas y graminoides (#). El cuadro muestra los valores de cobertura aérea (en intervalos de 5%) a lo largo de los sitios. Los valores de cobertura <0.1 se indican con R y valores <1 con +. La cobertura se evaluó utilizando la escala de abundancia de Braun-Blanquet modificada (Mueller-Dombois 1974). En el análisis presentado en la sección "Resultados" incluyó los grupos "pastos nativos", "pastos exóticos" o "dicotiledóneas". Las especies están clasificadas además, según la estación de máximo crecimiento (especies invierno-primaverales [I] o estivo-otoñales [E]) y el ciclo de vida (especies anuales [A] o perennes [P]). 157

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1:** El esquema representa el marco conceptual y la escala utilizado a lo largo de la tesis. El ensamble de especie (dentro del triángulo) que conforma la comunidad esta explicado por causas generales (cajas); procesos y mecanismo (óvalos) que operan a distintas escalas (ver detalles en Pickett et al. 1987). Los lados del triángulo conectan las causas principales para indicar la interacción entre ellas y entre los mecanismos asociados. El modelo propone que los mecanismos en última instancia, generan el recambio de especies que determina la dinámica sucesional de la comunidad. Las especies establecen interacciones múltiples que incluyen relaciones tróficas y no tróficas tanto con especies aéreas como del suelo y relaciones de retroalimentación. Esta tesis incorpora a la complejidad del esquema, la presencia de hongos endofitos aéreos y estudia el impacto de su presencia sobre otras especies del ensamble de especies que conforma la comunidad..... 29
- Figura 1.2:** Interacciones entre especies ordenadas según un gradiente de proximidad: endosimbiontes, exosimbiontes y organismos de vida libre (eje horizontal). En el caso de los endosimbiontes se podría establecer una asociación entre la fuerza de la co-evolución entre las especies (eje vertical), la dependencia (facultativo-obligado), el tipo de transmisión (horizontal-vertical) y la especificidad del simbiote (generalista-especialista). En cambio, estas asociaciones se disipan a medida que las interacciones pierden proximidad (representado por el triángulo gris). Por ejemplo, en el extremo de vida libre las interacciones suelen ser facultativas y carece de sentido hablar de transmisión vertical. 31
- Figura 1.3:** El esquema representa algunas relaciones entre las comunidades aéreas y del suelo mediadas por la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans*. La comunidad vegetal es la base de las redes tróficas y medio de vinculación principal entre las comunidades aéreas y del suelo. Los círculos celestes representan componentes evaluados a lo largo de la tesis. *N. occultans*, el pastoreo y la historia de uso son manipuladas experimentalmente en relación a *L. multiflorum*. Las flechas muestran relaciones que podrían ser afectadas indirectamente como consecuencia de cambios generados experimentalmente. Los números encerrados en círculos están asociados a los capítulos particulares de la tesis e indican los componentes o procesos que serán evaluados (2 y 3: mesofauna, nematodos, tasas de descomposición y mineralización; 4: relaciones de retroalimentación con otras especies vegetales y relaciones asociadas a estas especies; 5: estructura de la comunidad vegetal)..... 36
- Figura 2.1:** el esquema representa las principales vías de influencia a través de las cuales las plantas pueden modificar la estructura de la red trófica del suelo y los procesos que dependen de su actividad. En este capítulo se evalúa cómo la presencia del hongo endofito *N. occultans* que se hospeda en tejidos aéreos de *L. multiflorum* podría influir sobre la estructura de las redes tróficas y la actividad de las comunidades del suelo a través de estas vías. 43
- Figura 2.2:** Diseño del experimento. Plantas de *Lolium multiflorum* con alta o baja frecuencia de endofitos fueron cultivadas en macetas bajo condiciones controladas de luz, agua y temperatura. La broza de dos orígenes: tejidos aéreos (1) y radiculares (2) de estas plantas fueron utilizadas para armar dos tipos de bolsas de descomposición. Las bolsas con broza proveniente de tejidos con alta (B+) y baja (B-) frecuencia de endofitos fueron colocadas en parcelas donde crecían plantas de *L. multiflorum* con alta o baja frecuencia de endofitos para generar dos ambientes del suelo contrastantes (A+ y A-, respectivamente). Las líneas curvas de color azul en el esquema simbolizan al

hongo endofito <i>Neotyphodium occultans</i> en simbiosis con plantas de <i>L. multiflorum</i> . Vale aclarar que es una representación de la relación simbiótica dado que, el hongo endofito se aloja en el interior de tejidos aéreos sin generar estructuras externas ni síntomas visibles.	44
Figura 2.3: el esquema muestra la clasificación trófica de los invertebrados extraídos de las bolsas de descomposición de broza de origen aéreo y radicular. La clasificación taxonómica en el esquema corresponde al nivel de familia o superior. La cantidad de organismos en niveles inferiores a familia se indica entre paréntesis. La clasificación exhaustiva se encuentra descripta en la sección Anexo de la tesis (Cuadro A.1). No se encontraron bacteriófagos. Las flechas indican las relaciones entre los grupos tróficos.	46
Figura 2.4: porcentaje de biomasa remanente asociada a la broza aérea (a) o radicular (b) de plantas de <i>L. multiflorum</i> provenientes de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (barras blancas: B- y negras: B+, respectivamente). Las bolsas de descomposición conteniendo ambas calidades de broza fueron colocadas en superficie o en profundidad, respectivamente en ambientes donde crecían plantas de <i>L. multiflorum</i> con baja o alta frecuencia de endofitos (A- y A+, respectivamente). Las barras muestran el promedio (\pm error estándar) de seis a ocho repeticiones. Las diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($P < 0,05$. Prueba de Tukey).	48
Figura 2.5: características de la comunidad de organismos asociada a broza aérea (a la izquierda) o radicular (a la derecha) en las bolsas de descomposición. En la figura se muestra la riqueza (a, b) y la diversidad de Shannon (c, d) de los organismos extraídos de las bolsas de descomposición conteniendo broza de <i>L. multiflorum</i> provenientes de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (barras blancas: B- y negras: B+, respectivamente) colocadas en superficie o en profundidad, respectivamente en ambientes donde crecían plantas de <i>L. multiflorum</i> con baja o alta frecuencia de endofitos (A- y A+, respectivamente). Las barras muestran el promedio (\pm error estándar) de seis a ocho repeticiones. Las diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($P < 0,05$. Prueba de Tukey).	49
Figura 2.6: abundancia de los organismos clasificados en grupos tróficos según el hábito alimenticio en los distintos tratamientos. Las barras representan la abundancia de organismos fungívoros (a, b), omnívoros (c, d) y depredadores (e, f) asociados a la broza aérea (a la derecha) o radicular (a la izquierda) de <i>L. multiflorum</i> proveniente de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (barras blancas: B- y negras: B+, respectivamente). Se colocaron bolsas de descomposición en superficie o en profundidad, respectivamente en ambientes donde crecían plantas de <i>L. multiflorum</i> provenientes de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (A- y A+). Las barras muestran el promedio (\pm error estándar) de seis a ocho repeticiones. Las diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($P < 0,05$. Prueba de Tukey). La escala en el eje de ordenadas varía con el grupo trófico y el análisis estadístico.	51
Figura 3.1: el esquema representa cómo la presencia de plantas con alta frecuencia de endofitos puede generar cambios en la estructura y el funcionamiento de las comunidades del suelo al final del ciclo de la planta y en qué medida estos cambios pueden ser modulados por el pastoreo previo de las plantas hospedantes.	60
Figura 3.2: diseño del experimento en el que plantas de <i>L. multiflorum</i> con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos fueron cultivadas en un mismo tipo de suelo con dos historias de uso: suelos provenientes de un pastizal o de una promoción de <i>L. multiflorum</i> . Las plantas de <i>L. multiflorum</i> estuvieron sometidas o no a pastoreo simulado (P+ o P-, respectivamente) mediante dos eventos de corte y pisoteo (descriptos	

en el cuerpo de texto de la sección Materiales y métodos). Al final del ciclo de vida de las plantas se determinó la biomasa aérea y radicular de las plantas; el pH, la humedad y el nitrógeno disponible en el suelo. Se realizaron mediciones de la tasa de descomposición, la tasa potencial de mineralización y, la estructura de la comunidad de nematodos. Las líneas curvas de color azul en el esquema simbolizan al hongo endofito *Neotyphodium occultans* en simbiosis con plantas de *L. multiflorum*. Vale aclarar que es una representación de la relación simbiótica dado que, el hongo endofito se aloja en el interior de tejidos aéreos sin generar estructuras externas ni síntomas visibles. Las líneas punteadas en rojo simbolizan el pastoreo simulado. 61

Figura 3.3: tasa potencial de mineralización de nitrógeno (a, b) y broza remanente de *B. unioides* (c, d) al final del ciclo de vida de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de endofitos en contextos definidos por el pastoreo (P+: pastoreo o P-: no-pastoreo). Las variables fueron medidas en ambientes generado por la historia de uso: pastizal (panel de la izquierda) o promoción de *L. multiflorum* (panel de la derecha). Las barras muestran el promedio (n=6 ± error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras (p < 0,05. Prueba de Tukey). 68

Figura 3.4: abundancia de nematodos al final del ciclo de vida de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de endofitos en contextos definidos por el pastoreo (P+: presencia o P-: ausencia). Los paneles muestran la abundancia de nematodos de fitófagos (a, b), bacteriófagos (c, d) y fungívoros (e, f). Las variables fueron medidas en ambientes generado por la historia de pastizal (a la izquierda) o de promoción de *L. multiflorum* (a la derecha). Las barras muestran el promedio (n= 6, ± error estándar). Letras distintas indican diferencias entre tratamientos (p<0,05. Prueba de Tukey). 69

Figura 3.5: abundancia de nematodos al final del ciclo de vida de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de endofitos en contextos definidos por el pastoreo (P+: presencia o P-: ausencia). Los paneles muestran la abundancia de nematodos de omnívoros (a, b) y depredadores (c, d). Las variables fueron medidas en ambientes generado por la historia de pastizal (a la izquierda) o de promoción de *L. multiflorum* (a la derecha). Las barras muestran el promedio (n= 6, ± error estándar). Letras distintas indican diferencias entre tratamientos (p<0,05. Prueba de Tukey). 70

Figura 4.1: El esquema representa como la presencia de relaciones múltiples como el pastoreo y el endofito puede modificar las relaciones de retroalimentación con otras especies y además, modular otras relaciones que establecen estas especies. Esto efectos sobre las relaciones de retroalimentación podrían estar mediados por señales que perduran en el suelo rizosférico. Este capítulo evalúa las relaciones de retroalimentación a través del crecimiento de soja y cardo. A su vez, se evalúan las relaciones que estas especies generan con otros componentes de la comunidad como la presencia de hongos patógenos y las visitas de abejas, respectivamente. 81

Figura 4.2: Diseño de los experimentos que evaluaron los efectos de retroalimentación en cuatro escenarios. En 2007 plantas de *Glycine max* fueron cultivadas en suelos rizosféricos de pastizal o promoción de *Lolium multiflorum*. En estos suelos crecieron previamente (2006) plantas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos y en presencia (P+) o no (P-) de pastoreo (ver capítulo 3). Se determinó la emergencia, la severidad del daño ocasionado por hongos patógenos del suelo y la biomasa sobre las plantas de *G. max* sometidas al tratamiento de retroalimentación asociado a la presencia del endofito y al pastoreo en la generación anterior. 82

Figura 4.3: Diseño del experimento de retroalimentación. En 2007 plantas de *C. acanthoides* fueron cultivadas en suelos rizosféricos ocupados previamente (2006) por plantas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos y presencia

(P+) o no (P-) de pastoreo (En suelos de pastizal o promoción de <i>L. multiflorum</i> , ver capítulo 3). Las plantas de <i>C. acanthoides</i> estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia del endofito y al pastoreo durante la generación anterior. Se determinó la biomasa aérea de las plantas, la cantidad de capítulos producidos y, la frecuencia de abejas melíferas que visitaron los capítulos. ...	85
Figura 4.4: Porcentaje de emergencia (a y b), severidad de daño (c y d) y biomasa de las plantas de soja (e y f). Las plantas de <i>G. max</i> (soja) crecieron en suelos provenientes de ambientes de pastizal (derecha) o de promoción de <i>L. multiflorum</i> (izquierda) y estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia de plantas de <i>L. multiflorum</i> con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de hongos endofitos y a la presencia o ausencia de pastoreo (P+ vs. P-) durante la generación anterior. La combinación de los factores endofito y pastoreo generaron cuatro condiciones previas al crecimiento de las plantas de soja. Las barras muestran el promedio (\pm error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($p < 0,05$. Prueba de Tukey).	88
Figura 4.5: Biomasa aérea (a, b), capítulos acumulados durante el período de floración (c, d) de las plantas de <i>C. acanthoides</i> . Las plantas crecieron en suelos provenientes de ambientes de pastizal (derecha) o de promoción de <i>L. multiflorum</i> (izquierda) y estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia de plantas de <i>L. multiflorum</i> con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de hongos endofitos y a la presencia o ausencia de pastoreo (P+ vs. P-) durante la generación anterior. La combinación de los factores endofito y pastoreo generaron cuatro condiciones previas al crecimiento de las plantas de <i>C. acanthoides</i> . Las barras muestran el promedio (\pm error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($p < 0,05$. Prueba de Tukey).	89
Figura 4.6: Frecuencia de abejas (<i>A. mellifera</i>) que visitaron los capítulos de <i>C. acanthoides</i> . Las plantas de <i>C. acanthoides</i> crecieron en suelos provenientes de ambientes de pastizal (derecha) o de promoción de <i>L. multiflorum</i> (izquierda) y estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia de plantas de <i>L. multiflorum</i> con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de hongos endofitos y a la presencia o ausencia de pastoreo (P+ vs. P-) durante la generación anterior. La combinación de los factores endofito y pastoreo generaron cuatro condiciones previas al crecimiento de las plantas de <i>C. acanthoides</i> . Las barras muestran el promedio (\pm error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($p < 0,05$. Prueba de Tukey).	90
Figura 5.1: cobertura relativa de las plantas de <i>L. multiflorum</i> en los sitios pastoreados (n= 12) o no pastoreados (n= 7). El factor agregado de semillas incluyó parcelas: control (C. Sin agregado de semillas), con agregado de semillas de <i>L. multiflorum</i> con baja (E-) o alta (E +) frecuencia de <i>N. occultans</i> . Las barras muestran los valores medios (\pm error estándar). Letras distintas indican diferencias significativas con una probabilidad de error menor a 0,05.	104
Figura 5.2: cobertura relativa de: a y d) pastos nativos, b y e) pastos exóticos y c y f) dicotiledóneas en los sitios pastoreados (n=12) o no pastoreados (n=7) en primavera de 2009 a la izquierda y en verano de 2010 a la derecha. El factor agregado de semillas incluyó parcelas: control (C. Sin agregado de semillas), con agregado de semillas de <i>L. multiflorum</i> con baja (E-) o alta (E +) frecuencia de <i>N. occultans</i> . Las barras muestran los valores medios (\pm error estándar). Letras distintas indican diferencias significativas con una probabilidad de error menor a 0,05.	106
Figura A.1: Fluctuaciones en la humedad (ml.ml ⁻¹ , líneas completas) y la temperatura del suelo (° C, líneas punteadas) en las comunidades pastoreadas (azul) y no pastoreadas	

(verde). Los datos representan el valor promedio diario (n= 3). Las medidas fueron tomadas con sensores de suelo (FDR, tipo ECH2O Decagon de) integrando una profundidad de 0-10 cm y con una frecuencia horaria. Las medidas se tomaron desde abril a diciembre de 2009. Las estaciones están representadas con líneas punteadas de colores en la parte superior). Los valores estimados para "punto de marchitez permanente" (0,1 ml.ml⁻¹), "capacidad de campo" (0,25 ml.ml⁻¹) y la "saturación" (0,5 ml.ml⁻¹) se indican mediante las líneas horizontales punteadas en gris. El área celeste indica el agua disponible para las plantas. 159

Figura A.2: Cobertura de pastos nativos de invierno en a) las comunidades pastoreadas (n= 12) y, b) no pastoreadas (n= 7) durante la primavera de 2009. Las barras muestran los valores medios (± error estándar) para las parcelas control (C), sembradas con semillas con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos. Las especies de izquierda a derecha son: *Bromus uniolooides*, *Danthonia montevidensis*, *Carex* spp. *Cypella herbertii*, *Eleocharis* spp. *Sysirinchium platensis* y *Trifurcia lauhe*. Las barras llenas muestran gramíneas (*B. uniolooides* y *D. montevidensis*) y las barras rayadas indican especies graminoides. 160

Figura A.3: Cobertura de pastos nativos de verano en a) las comunidades pastoreadas (n= 12) y, b) no pastoreadas (n= 7) durante la primavera de 2009. Las barras muestran los valores medios (± error estándar) para las parcelas control (C), sembradas con semillas con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos. Las especies de izquierda a derecha son: *Leersia hexandra*, *Panicum berguui*, *Panicum gouinii*, *P. milioides*, *P. sabolorum*, *Paspalum dilatatum*, *P. vaginatum*, *Paspalidium paludivagum*, *Phalaris angusta*, *Setaria geniculata*, *Sporobolus indicus*, *Distichlis scoparia*, *D. spicata* y *Stenotaphrum secundatum*. Las barras llenas muestran gramíneas cespitosas y las barras rayadas indican especies gramíneas rastreras (*D. scoparia*, *D. spicata* y *S. secundatum*). 161

Figura A.4: Cobertura de pastos exóticos en a) las comunidades pastoreadas (n= 12) y, b) no pastoreadas (n= 7) durante la primavera de 2009. Las barras muestran los valores medios (± error estándar) para las parcelas control (C), sembradas con semillas con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos. Las barras negras muestran gramíneas de invierno y las barras grises indican especies gramíneas de verano. *L. arundinaceum* y *Cynodon dactylon* son especies perennes mientras, *Hordeum* sp y *Gaudinia fragilis* son especies anual. 162

DECLARACIÓN

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.

RESUMEN

Las plantas integran interacciones con múltiples especies mutualistas y antagonistas. Recientemente, se ha comenzado a considerar a los microorganismos simbioses y en particular a hongos endofitos como moduladores de otras interacciones y, en consecuencia, de la estructura y el funcionamiento de las comunidades. El objetivo de esta tesis fue evaluar los efectos de la simbiosis entre pastos y hongos endofitos asexuales (*Neotyphodium* spp., Clavicipitaceae) sobre las comunidades del suelo y las relaciones de retroalimentación planta-suelo. Se postuló que la simbiosis *Lolium multiflorum*-*N. occultans* modifica la estructura de las comunidades aéreas a través de cambios en el suelo, y que estos efectos pueden variar con el contexto ecológico. Se realizaron ocho experimentos (en mesocosmos y a campo) en los que se manipuló la proporción de plantas con endofitos bajo distintas condiciones ambientales generadas por el pastoreo o la historia de uso. La presencia de la simbiosis redujo las tasas de descomposición y modificó la estructura de las redes tróficas del suelo, probablemente a través de la actividad radicular de la planta hospedante. La simbiosis generó respuestas de retroalimentación negativa sobre otras especies herbáceas, mejoró la capacidad invasora de *L. multiflorum*, aumentó la riqueza de especies vegetales y redujo la cobertura de pastos nativos y exóticos. Sin embargo, estos efectos sobre las comunidades aéreas y subterráneas fueron evidentes solo bajo ciertas condiciones dadas por el pastoreo y la historia de uso del suelo. Las interacciones múltiples que establecen las plantas y la historia del ambiente deberían ser consideradas en los modelos que describen los mecanismos que determinan la estructura y el funcionamiento de las comunidades. Esta tesis sostiene que la simbiosis pasto-endofito es más que un mutualismo defensivo ya que modula interacciones múltiples entre componentes aéreos y subterráneos e influye sobre la invasión y el ensamble de las comunidades.

Palabras clave: simbiosis pasto-endofito, interacciones múltiples, interacciones aéreas y subterráneas, grupos tróficos del suelo, respuestas de retroalimentación, estructura y funcionamiento de la comunidad, interacciones indirectas, *Lolium multiflorum*, *Neotyphodium occultans*

The symbiosis between grasses and endophytic fungi: the legacy above and belowground in different agro-ecological contexts

ABSTRACT

Plants integrate interactions with multiple mutualistic and antagonistic species. Symbiotic microorganisms have recently started to be considered as modulators of other interactions and, thus, the structure and functioning of communities. The aim of this thesis was to evaluate the effects of the symbiosis between grasses and asexual endophytes (*Neotyphodium* spp., Clavicipitaceae) on soil communities and plant-soil feedbacks. It was postulated that the symbiosis *Lolium multiflorum*- *N. occultans* modifies aboveground community structure through changes in the soil, and that these effects may vary with the ecological context. Eight experiments were run (in mesocosms and field); in each, the proportion of plants with endophytes was manipulated. Different environmental conditions were generated by grazing or land use history. The presence of symbiosis reduced the decomposition rates and modified the structure of soil food webs, probably through the radicular activity of the host plant. The symbiosis generated negative feedback on other herbaceous species, improved the invasiveness of *L. multiflorum*, increased plant species richness and reduced the cover of native and exotic grasses. However, these effects on above and belowground communities were evident under certain conditions given by grazing and land use history. The multiple interactions established by plants and land use history should be considered in the models that describe the mechanisms determining the structure and functioning of communities. This thesis maintains that grass-endophyte symbiosis is more than a defensive mutualism for it modulates multiple interactions between components above and belowground communities and also influences community invasibility and assembly.

Keywords: grass-endophyte symbiosis, multiple interactions, above-belowground interactions, soil food web, plant-soil feedbacks, structure and functioning of the community, indirect interactions, *Lolium multiflorum*, *Neotyphodium occultans*.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 La importancia de las interacciones interespecíficas en la estructura y dinámica de la comunidad

Una comunidad ecológica es un ensamble de individuos de numerosas especies que coexisten e interactúan en un sitio o hábitat. Los miembros de la comunidad de manera frecuente están determinados por las interacciones entre las especies y las propiedades que emergen de dichas interacciones. La presencia de herbívoros ya sean insectos o mamíferos, altera la estructura y dinámica de la comunidad vegetal durante la sucesión (Connell y Slatyer 1977, Grubb y Hopkins 1986, Cadenasso et al. 2002). Además, ciertos patrones de herbivoría influyen en la vulnerabilidad de una comunidad a la invasión y en la forma de vida de las especies presentes, así como en la proporción de especies exóticas (Callaway y Aschehoug 2000, Callaway y Ridenour 2004, Levine et al. 2004). Si bien el ensamble de especies y la dinámica de la comunidad resultan de la combinación de mecanismos, diversos factores bióticos y abióticos determinan la identidad e importancia de éstos mecanismos (Tansley 1935, Pickett et al. 1987, Levine et al. 2004, Schmitz et al. 2006, Tognetti 2010).

Pickett et al. (1987) generaron un modelo de jerarquías para el estudio de los cambios que ocurren en la estructura y el funcionamiento de las comunidades luego de un disturbio, es decir durante la sucesión ecológica. En un nivel jerárquico superior se encuentran las tres causas de la sucesión: la disponibilidad de un sitio, la disponibilidad diferencial de especies y el comportamiento diferencial de las mismas (Pickett et al. 1987, Hubbell 2001). Cada una de las causas opera a escala regional como resultado de mecanismos a escala local. Los mecanismos incluyen a procesos, relaciones o condiciones que se encuentran en un nivel jerárquico inferior y que, a su vez son regulados por diversos factores (Foster y Gaines 1991, Tilman 1997, Foster y Gross 1998, Symstad y Tilman 2001, Tilman y Lehman 2001, Foster et al. 2002, Wootton 2002, Foster y Tilman 2003, Davis et al. 2005a, Davis et al. 2005b, Schmitz et al. 2006). Este marco conceptual se puede utilizar para identificar procesos como los disturbios generados por la historia de uso, la disponibilidad de recursos y/o el tipo de interacciones que se dan entre las especies presentes que pueden definir el ensamble de especies (**Figura 1.1**) (Pickett et al. 1987, Lonsdale 1999).

Las interacciones entre individuos de la misma o de distintas especies son los principales mecanismos responsables de la dinámica de la sucesión en una escala local y en el plazo de tiempo que media entre dos disturbios (Connell y Slatyer 1977, Peet y Christensen 1980, Grubb y Hopkins 1986, Omacini et al. 2005). Muchas especies vegetales modifican el ambiente e influyen sobre otras especies de la comunidad de un modo que alteran las condiciones de crecimiento para ellas mismas y sus vecinas (Wilson y Agnew 1992). Como resultado de su impronta y de la competencia se establecen interacciones de facilitación, de inhibición o de tolerancia entre las especies vegetales (Connell y Slatyer 1977). Tradicionalmente se han considerado la competencia y la herbivoría como las fuerzas que estructuran las comunidades sin embargo, no son las únicas interacciones posibles en la comunidad vegetal donde convive una compleja red de interacciones entre organismos que habitan la parte aérea o subterránea (McCook 1994, Mitchell et al. 2006). Por otro lado, las características de las redes tróficas del suelo (Gange y Brown 2002, Gange et al. 2003) o del material muerto que se deposita (broza) pueden modificar el comportamiento de los depredadores de semillas y, estos a su vez, la dirección y tasa de la sucesión (Reynolds et al. 2003,

Kardol et al. 2006, van der Putten et al. 2007a, van der Putten et al. 2007b, Harvey et al. 2010).

Durante las últimas décadas ha crecido el interés por el papel de las interacciones simbióticas entre plantas y microorganismos en el ensamble de especies de la comunidad y en la sucesión (van der Heijden et al. 1998, Clay y Holah 1999, Gange y Brown 2002, Hartnett y Wilson 2002, Kiers et al. 2003, Rudgers y Clay 2007, Larimer et al. 2010, Kiers et al. 2011). Considerar el impacto de microorganismos no perjudiciales, algunos de ellos prácticamente ignorados, podría contribuir a mejorar la capacidad predictiva de los modelos actuales. Esta tesis pone especial atención a la influencia de las interacciones simbióticas entre plantas y hongos endofitos asexuales sobre las comunidades del suelo y la vegetación, la capacidad invasora de la planta hospedante y, la estructura de la comunidad vegetal invadida. Se reconoce además que el contexto dado por la presencia de otras interacciones biológicas como el pastoreo y las características iniciales del ambiente pueden modificar los efectos de la simbiosis y determinar la estructura y dinámica de las comunidades (**Figura 1.1**).

1.1.2 Relaciones de retroalimentación entre el suelo y las especies vegetales

Las especies vegetales son la principal fuente de recursos para las comunidades del suelo. Además, son la base de la red trófica y el principal componente en términos de biomasa para las comunidades aéreas. El aporte de las plantas tanto de detritos aéreos y radiculares (Ej.: broza) como de exudados radiculares puede controlar a las comunidades del suelo (Hooper et al. 2000, Scheu 2001, van der Putten et al. 2001, Wardle et al. 2002, Wardle et al. 2004a). A su vez, la composición de las comunidades del suelo o la presencia de cierto grupo de especies (Ej.: patógenos) pueden determinar el crecimiento de las especies vegetales durante la siguiente estación de crecimiento y el ensamble de especies de la comunidad vegetal (Bever et al. 1997, Klironomos 2002, De Deyn et al. 2003, Bezemer et al. 2005, Ehrenfeld et al. 2005, Kardol et al. 2006). Estas relaciones conocidas como relaciones de retroalimentación (*sensu* Bever et al. 1997) adquirieron mayor relevancia cuando se las consideró como un mecanismo regulador importante del recambio sucesional en la comunidad (Kardol et al. 2007) (**Figura 1.1**) y, en los procesos de invasión de especies (Klironomos 2002, Levine et al. 2004, van der Putten et al. 2007a).

Por otro lado, las interacciones entre las plantas y otros organismos modifican indirectamente las relaciones de retroalimentación. Por ejemplo, además de reducir los tejidos fotosintéticos por remoción directa, los herbívoros inducen respuestas fisiológicas en las plantas consumidas, modifican la calidad y la cantidad de exudados y, los detritos aéreos y subterráneos que llegan al suelo (Findlay et al. 1996, Bardgett et al. 1998, Bardgett y Wardle 2003). A través de estos mecanismos indirectos los herbívoros modifican la estructura de las comunidades microbianas del suelo aumentando su actividad y tamaño, lo que a su vez altera el aporte de nutrientes para las plantas (Bardgett et al. 1998, Kardol et al. 2007, van der Heijden et al. 2008).

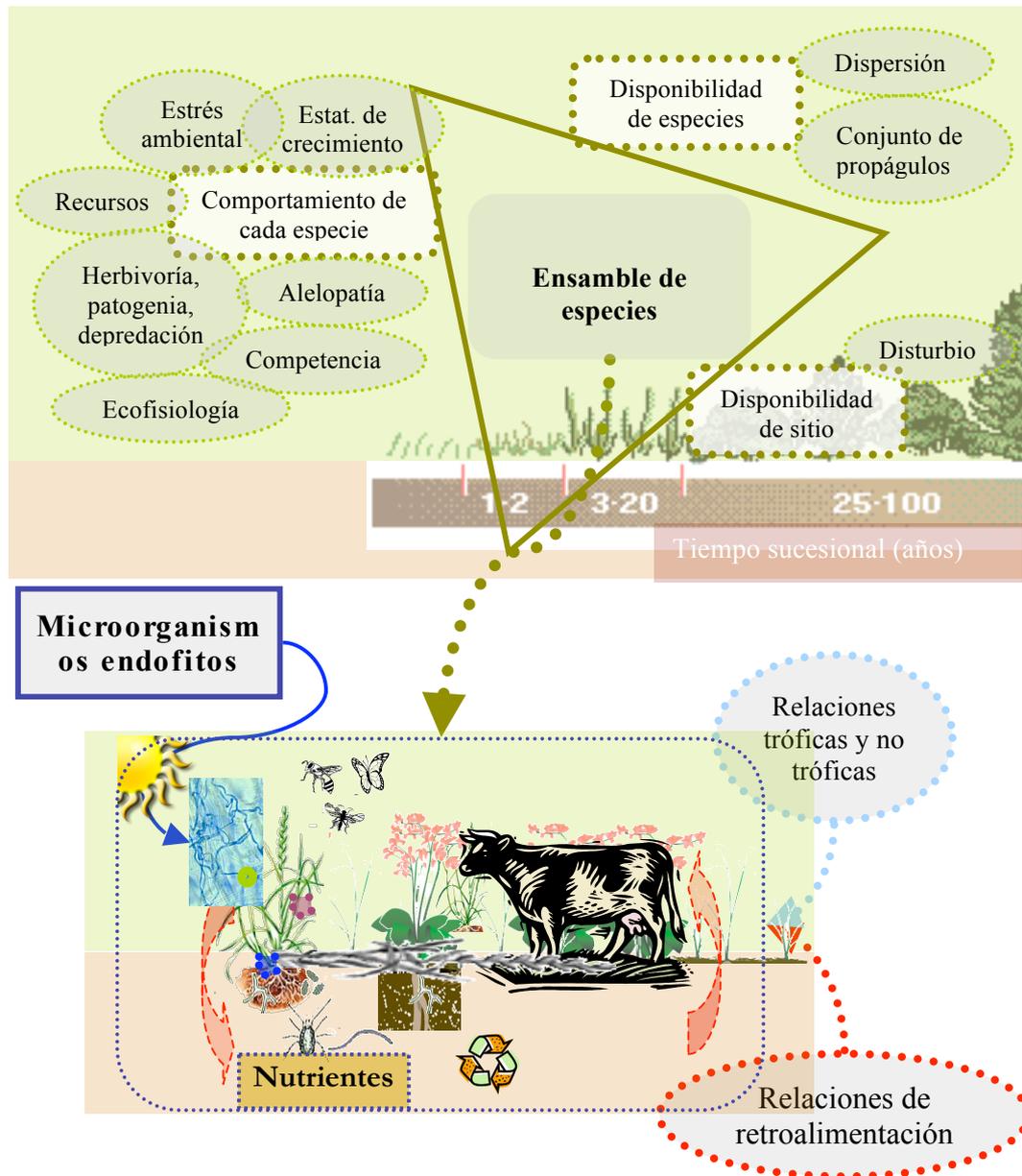


Figura 1.1: el esquema representa el marco conceptual y la escala utilizado a lo largo de la tesis. El ensamble de especies (dentro del triángulo) que conforma la comunidad esta explicado por causas generales (cajas); procesos y mecanismo (óvalos) que operan a distintas escalas (ver detalles en Pickett et al. 1987). Los lados del triángulo conectan las causas principales para indicar la interacción entre ellas y entre los mecanismos asociados. El modelo propone que los mecanismos en última instancia, generan el recambio de especies que determina la dinámica sucesional de la comunidad. Las especies establecen interacciones múltiples que incluyen relaciones tróficas y no tróficas tanto con especies aéreas como del suelo y relaciones de retroalimentación. Esta tesis incorpora a la complejidad del esquema, la presencia de hongos endofitos aéreos y estudia el impacto de su presencia sobre otras especies del ensamble de especies que conforma la comunidad.

1.1.3 Simbiosis y mutualismo

El término simbiosis (del griego *simbios* que significa “viviendo juntos”) define a la relación entre dos o más especies que se caracteriza por ser una relación estrecha, por ser de largo plazo y porque una especie hospeda a otra (Anton de Bary, 1879 citado en Sapp 2004). Una consecuencia evidente de la simbiosis (pero no exclusiva de esta relación), es la co-evolución entre las especies involucradas (Thompson 2001). De hecho, en algunos casos estas relaciones son consideradas como una unidad genómica y evolutiva llamada holobionte (*sensu* Zilber-Rosenberg y Rosenberg 2008). Así, las relaciones simbióticas son muy diversas e incluyen interacciones con distinto grado de especificidad, dependencia (obligada, facultativa), ubicación del hospedado (exo y endosimbiosis) y transmisión (horizontal, vertical, ambas. **Figura 1.2**) (Douglas 1996, Johnson et al. 1997, Paracer y Ahmadjian 2000, Denison y Kiers 2004, Schardl et al. 2004, Lekberg y Koide 2005). Estas características determinan cómo se perpetúa la relación y cuál es su impacto sobre otras especies de la comunidad (Larimer et al. 2010).

Las relaciones simbióticas son muy comunes en la naturaleza. En particular, estas relaciones influyen sobre la especiación de numerosas especies, así como sobre el ensamble de las comunidades a través de varios niveles tróficos (Thompson 2001, Mueller et al. 2011). Se cree que estas relaciones fueron particularmente importantes durante las primeras etapas de evolución de la vida en la tierra [Ej.: la teoría endosimbionte que explica el origen de los organelas en la célula eucariota (Margulis y Fester 1991)]. Además, se cree que complejas relaciones simbióticas entre las plantas y los microorganismos de la rizosfera incluyendo a las micorrizas y a los rizobios fueron responsables de la colonización terrestre de algunas plantas vasculares y briofitas (Smith y Read 1997, Thompson 2001).

Las plantas hospedan microorganismos simbiotes (i.e.: endosimbiontes) de manera habitual (Saikkonen et al. 1998, Roberts et al. 2005). Fitter y Moyerson (1997) estimaron que más del 90 % de las plantas que producen flores tienen bacterias u hongos simbiotes en sus raíces. A pesar de su relativamente pequeña biomasa, estos microorganismos simbiotes en ocasiones generan cambios fenotípicos en el hospedante que repercuten en toda la comunidad. Por ejemplo, Cahill et al. (2008) mostró que la supresión de micorrizas arbusculares en pastizales nativos modifica el comportamiento, la abundancia y la estructura de la comunidad de especies de abejas polinizadoras. Además, muchas especies dependen de la colonización de las micorrizas arbusculares y en consecuencia, su presencia determina la estructura de la comunidad vegetal y la resistencia a la invasión de especies exóticas (Ej.: Yao et al. 2008).

La utilización de los términos simbiosis como sinónimo de mutualismo es decir, aquellas interacciones en las que ambos miembros se benefician, ha prestado a confusión (Saffo 1992, Paracer y Ahmadjian 2000). Por un lado, la simbiosis puede tener como resultado tres tipos de interacciones en función del efecto sobre cada integrante: mutualismo, comensalismo o parasitismo (Moon et al. 2010). Además, mientras el resultado de la interacción entre carnívoros y sus presas es fácil de determinar, el resultado de una simbiosis no es estático dado que, podría cambiar a lo largo del tiempo dependiendo de la presencia de otras relaciones o factores bióticos y abióticos que afectan a los individuos involucrados (Müller y Krauss 2005, Moon et al. 2010). Por otro lado, el mutualismo puede darse entre especies que no se asocian de manera simbiótica. Por ejemplo, la relación que se establece entre hormigas y plantas se considera mutualista (revisado en Heil y McKey 2003). Esto se debe a que las plantas

proveen néctar a las hormigas y reciben protección contra insectos herbívoros. Sin embargo, las hormigas también podrían castrar flores y frutos de la planta. Las hormigas modificarían así la partición de recursos de las plantas hacia crecimiento en detrimento de la reproducción (Yu y Pierce 1998). Por lo tanto, si este comportamiento se vuelve agresivo para la planta, esta interacción también podría tornar de mutualismo a parasitismo (Yu y Pierce 1998, Izzo y Vasconcelos 2002, Moon et al. 2010).

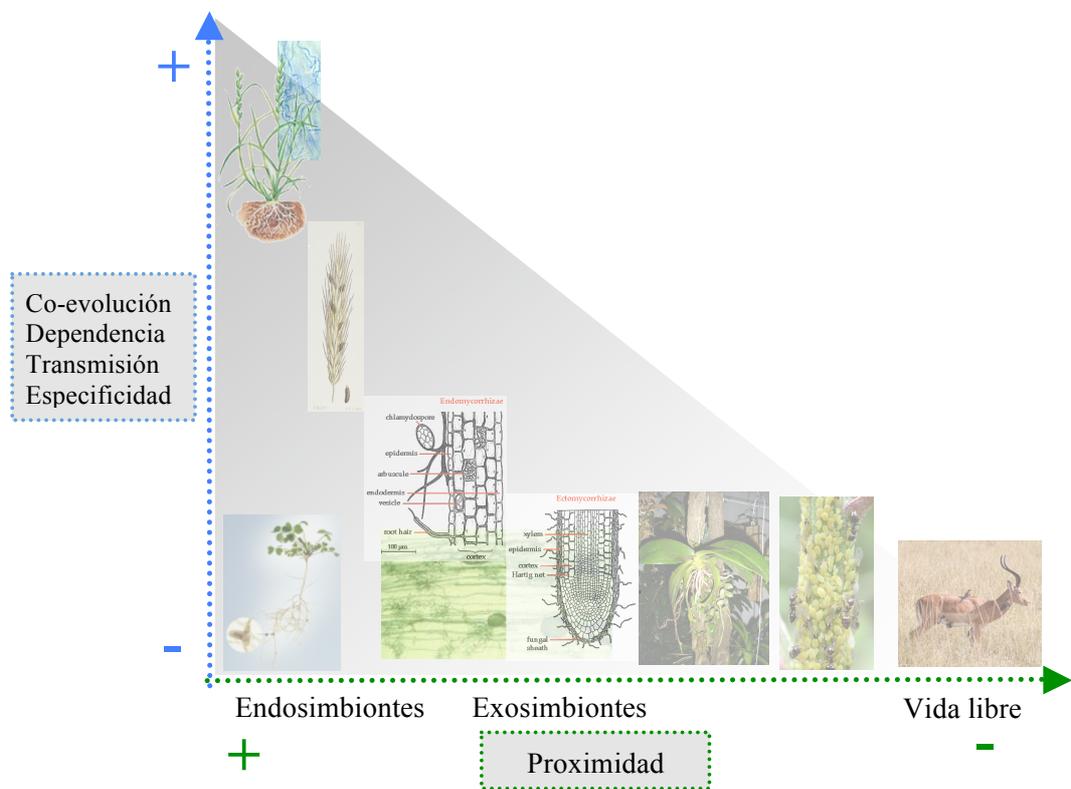


Figura 1.2: interacciones entre especies ordenadas según un gradiente de proximidad: endosimbiontes, exosimbiontes y organismos de vida libre (eje horizontal). En el caso de los endosimbiontes se podría establecer una asociación entre la fuerza de la co-evolución entre las especies (eje vertical), la dependencia (facultativo-obligado), el tipo de transmisión (horizontal-vertical) y la especificidad del simbiote (generalista-especialista). En cambio, estas asociaciones se disipan a medida que las interacciones pierden proximidad (representado por el triángulo gris). Por ejemplo, en el extremo de vida libre las interacciones suelen ser facultativas y carece de sentido hablar de transmisión vertical.

1.1.4 Simbiosis entre pastos y hongos endofitos del género *Neotyphodium*

Los hongos endofitos están presentes en prácticamente todas las especies de plantas (Saikkonen et al. 1998, Roberts et al. 2005). En particular, las gramíneas (llamadas comúnmente pastos) hospedan hongos endofitos que se restringen a la familia Clavicipitaceae [miembros de la tribu Balansiae (Ascomycotina)] (Leuchtman 1993). Estos hongos están presentes en al menos 80 géneros y 300 especies gramíneas (Leuchtman 1993, Gentile et al. 2005). Dentro de este grupo, los hongos endofitos del género *Neotyphodium* (y su estado sexual *Epichlōe*) se encuentran exclusivamente en

gramíneas de la subfamilia Poaceae (Clay y Schardl 2002, Schardl et al. 2004). Dada la amplia distribución de la simbiosis pasto-*Neotyphodium* sp. tanto en ambientes naturales como agropecuarios (Roberts et al. 2005, Iannone et al. 2011, Kane 2011), se cree que el éxito ecológico de las gramíneas hospedantes podría deberse en parte, a la presencia del endofito (Saikkonen et al. 1998, Clay y Schardl 2002).

Los hongos endofitos del género *Neotyphodium* han establecido una relación ancestral (Schardl et al. 2004, Schardl et al. 2008) que se perpetúa en la población hospedante mediante una transmisión vertical muy eficiente (cercana a 100%) (Gundel et al. 2009). El hongo crece en forma sistémica en los tejidos aéreos de gramíneas y permanece durante todo el ciclo de vida de la planta hospedante sin generar síntomas visibles (Clay y Schardl 2002). Las hifas se encuentran en la base de la lámina y crecen en los espacios intercelulares, desde donde se nutren de azúcares y aminoácidos liberados al apoplasto (Christensen et al. 2008). Durante la floración del hospedante, las hifas se alojan en los óvulos y las semillas, por lo que se transmiten de forma exclusiva a través del tejido materno. La población hospedante está en general infectada por un solo genotipo del hongo que persiste de generación en generación. Esta forma de transmisión favorece una co-evolución particularmente estrecha entre ambos organismos y da un carácter distintivo a la relación (**Figura 1.2**) (Clay y Schardl 2002, Zilber-Rosenberg y Rosenberg 2008).

Algunas relaciones simbióticas pasto-endofito se hicieron conocidas cuando se descubrió que causaban efectos tóxicos sobre mamíferos e insectos herbívoros. Los alcaloides producidos por *N. coenophialum* en *Lolium arundinaceum* y por *N. lolii* en *L. perenne* han ocasionado pérdidas económicas importantes debido a sus efectos tóxicos sobre el ganado vacuno y ovino en praderas de Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia (Malinowski y Belesky 2006, Roberts et al. 2008). Estos hechos han incentivado investigaciones que demostraron, entre otras cosas, que los endofitos *Neotyphodium spp.* confieren a su pasto hospedante efectos protectores ante situaciones de estrés biótico (Ej.: herbivoría; Clay et al. 2005, Popay y Bonos 2005) y abiótico (Ej.: sequía, deficiencias de fósforo, presencia de aluminio en el suelo Malinowski y Belesky 2000, Malinowski et al. 2005).

Los beneficios para los hospedantes implican necesariamente cambios en las relaciones que establecen con otros componentes de la comunidad y que, a su vez, podrían favorecer la persistencia y dominancia de la simbiosis en las comunidades (Clay y Holah 1999, Clay 2001, pero ver Jani et al. 2010). Aunque se desconocen los mecanismos, algunos trabajos sugieren que la presencia de la simbiosis pasto-endofito puede influir sobre el sistema subterráneo, principalmente, a través de cambios en la cantidad y calidad de exudados radiculares y/o de detritos que llegan al suelo (Bush et al. 1997, Malinowski y Belesky 2000, Van Hecke et al. 2005). Por cualquiera de estas vías, la simbiosis podría influir sobre distintos componentes de las comunidades del suelo (Lemons et al. 2005, Van Hecke et al. 2005, Jenkins et al. 2006, Uchitel 2008, Buyer et al. 2011, Casas et al. 2011) o sobre procesos clave que dependen de la actividad de estos componentes (Ej.: descomposición y mineralización de nutrientes) (Omacini et al. 2004, Lemons et al. 2005, Franzluebbers 2006, Omacini et al. 2011, Iqbal et al. 2012). Por ejemplo, Omacini et al. (2004) detectaron una reducción en las tasas de descomposición a través de un efecto negativo de la simbiosis sobre la calidad de la broza de *Lolium multiflorum* y del microambiente creado por la asociación simbiótica para la descomposición de otros detritos (Ej.: los de *Bromus unioloides* no hospedantes de endofitos).

A pesar de ser menos evidentes que otras relaciones aéreas como la herbivoría, estas relaciones también podrían interferir en los mecanismos de retroalimentación a través de su impacto sobre distintos componentes de la comunidad del suelo. Sin embargo, existen pocos trabajos y aún no hay consenso respecto del sentido de los efectos de la simbiosis sobre el sistema subterráneo (ver Omacini et al. 2011). Por ejemplo, se ha observado que la presencia de plantas hospedantes de endofitos redujo la colonización de hongos micorrícicos en las plantas hospedantes (Müller 2003, Antunes et al. 2008, Mack y Rudgers 2008), en plantas vecinas no infectadas (Omacini et al. 2006) o en la siguiente generación de plantas no infectadas en el mismo micrositio (Antunes et al. 2008). Por el contrario, Novas *et al.* (2005) y Novas *et al.* (2009) encontraron que los endofitos favorecieron la colonización micorrícica de *Bromus setifolius* y *Poa bonariensis*, respectivamente. Varios trabajos han observado una mayor biomasa microbiana, un aumento en el carbono orgánico y en el nitrógeno total del suelo asociados a las plantas de festuca (*L. arundinaceum*) hospedantes de *N. coenophialum* (Franzluebbbers et al. 1999, Franzluebbbers y Stuedemann 2005, Iqbal et al. 2012). Estos resultados, consistentes a lo largo de varios sitios en praderas de los Estados Unidos, sugieren una menor actividad de la biota del suelo (o un mayor secuestro del carbono) asociada a la presencia del hongo simbiote. Franzluebbbers *et al.* (1999) observaron que plantas de festuca (*L. arundinaceum*) hospedantes de *N. coenophialum* redujeron la actividad microbiana potencial del suelo respecto de las plantas de festuca no hospedante. Mientras tanto, otros autores han observado un efecto opuesto al considerar la simbiosis entre *L. multiflorum* y *N. occultans* (Casas et al. 2011) o, entre otras especies pasto-endofito (Novas et al. 2005, Van Hecke et al. 2005, Novas et al. 2009). En particular, Casas *et al.* (2011) detectaron, a través de un perfil de 11 fuentes carbonadas, que las comunidades del suelo tenían mayor actividad metabólica y un aumento en actividad de los hongos después de la presencia de la simbiosis. Los resultados de este trabajo coinciden con los obtenidos por Uchitel *et al.* (2008) al sugerir que la simbiosis entre *L. multiflorum* y *N. occultans* puede tener un efecto positivo sobre las redes tróficas basadas en los hongos del suelo.

El impacto de la simbiosis pasto-endofito sobre distintos componentes de las comunidades depende de las características de la planta hospedante y del hongo endofito (Ej.: variabilidad genética) y, del contexto ecológico que exploran (Ej.: contenido hídrico del suelo, fertilidad, presencia de otras relaciones) (Müller y Krauss 2005, Saikkonen et al. 2006, Cheplick y Faeth 2009). Estas evidencias podrían explicar los resultados contrapuestos observados sobre distintos componentes del sistema subterráneo. Algunos trabajos recientes corroboran esta idea (Ej.: Faeth et al. 2004, Cheplick 2007), y predicen que el hongo podría ser un costo para la planta en la medida en que el contexto ecológico sea favorable para el crecimiento del pasto hospedante ó, bajo contextos de estrés extremos cuando el déficit de carbono no permita sustentar el endofito. Es decir, que bajo situaciones de estrés intermedio o en contextos desfavorables, cuando los beneficios del hongo superasen los costos que éste le genera al hospedante, la relación se tornaría mutualista. Esta idea podría explicar por qué Rasmussen *et al.* (2007) encontraron una reducción de hasta 50% en la biomasa del hongo y concentración de alcaloides en la planta hospedante al aumentar la concentración de azúcares (a través de manipular el genotipo del hospedante) o el nivel de nutrientes en el suelo (nitrógeno). En este mismo sentido, el contexto agroecológico (Ej.: la historia de uso del suelo, la presencia del pastoreo o las micorrizas), al modificar el balance hídrico o nutricional de la planta hospedante, podrían interferir en el impacto de la simbiosis sobre otros componentes del sistema (Clay et al. 2005, Omacini et al. 2005).

Los efectos del endofito sobre el suelo pueden perdurar en el sistema, modular el crecimiento de las plantas y las relaciones de retroalimentación (Omacini et al. 2009, Rudgers y Orr 2009). Unos pocos trabajos sugieren que las “señales” generadas por la presencia de plantas hospedantes de endofitos en el suelo pueden afectar la próxima generación de plantas de la misma especie hospedante o no del hongo endofito (Uchitel 2008, Omacini et al. 2009, Uchitel et al. 2011); y de otras especies arbóreas (Rudgers y Orr 2009). Por ejemplo, Rudgers y Orr (2009) encontraron que la simbiosis entre *L. arundinaceum* (especie exótica) hospedante de *N. coenophialum* puede tener consecuencias negativas sobre el crecimiento de algunas especies arbóreas nativas. El trabajo concluye que la invasión de esta gramínea en relación simbiótica con *N. coenophialum* puede potencialmente alterar la sucesión y la composición de especies modificando la estructura de la comunidad del bosque donde habitan las especies estudiadas.

1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL DE ESTA TESIS

En esta tesis se postula que la presencia de la simbiosis pasto-endofito modifica la estructura, el funcionamiento y la dinámica de las comunidades aéreas a través de cambios en las comunidades del suelo. A su vez, estos efectos de retroalimentación están modulados por la presencia de otras interacciones que establece la planta hospedante con miembros aéreos y subterráneos del ecosistema y por las características del ambiente.

El **objetivo general** es evaluar los efectos de la simbiosis entre *Lolium multiflorum* y *Neotyphodium occultans* sobre las comunidades del suelo y las relaciones de retroalimentación con otras especies al final de la estación de crecimiento de la planta hospedante. Los efectos de la simbiosis son evaluados en diversos contextos agroecológicos dados por la presencia de pastoreo y por las características ambientales generadas por la historia de uso.

1.3 ENFOQUE DE LA TESIS

La presencia del hongo endofito ha estado asociada a múltiples beneficios para la planta hospedante que incluyen mayor tolerancia a situaciones de estrés biótico y abiótico (Clay 1990, Clay y Schardl 2002, Schardl et al. 2004, Malinowski y Belesky 2006, Belesky et al. 2008, Kuldau y Bacon 2008, Kane 2011). El enfoque de esta tesis está puesto en el impacto de la simbiosis sobre otros componentes del sistema más que sobre los integrantes de la simbiosis. La tesis se centra en evaluaciones a escala del vecindario aéreo y subterráneo de la planta hospedante en distintos contextos. Las aproximaciones experimentales incluyen la utilización de microcosmos ubicados en sus ambientes naturales o transportados a un jardín común. Para poner a prueba las hipótesis particulares de cada capítulo se manipula la proporción de plantas hospedantes de endofitos en poblaciones de *L. multiflorum* bajo distintas condiciones ambientales generadas por el pastoreo o por la historia de uso.

1.4 SISTEMA DE ESTUDIO

En las comunidades naturales, la distribución de los hongos simbioses de los tejidos vegetales radicales (Ej.: Smith y Read 1997) y aéreos (Ej.: Arnold 2007) es espacial y temporalmente heterogénea dado que, puede variar, por ejemplo, con el estado ontogénico de la planta hospedante, con las condiciones ambientales y con la composición de la comunidad. En consecuencia, seguir los efectos de uno o más simbioses en pastos perennes es en ocasiones muy difícil o imposible. En este sentido,

los hongos endofitos del género *Neotyphodium* tienen ciertas ventajas al ser de transmisión estrictamente vertical a través de las semillas de la planta hospedante y por lo tanto mantenerse junto a su hospedante a lo largo de todo el ciclo de vida.

Durante el desarrollo de esta tesis se utiliza como modelo de estudio la asociación simbiótica entre el pasto anual *Lolium multiflorum* y el endofito *N. occultans* ampliamente naturalizada en la Pampa argentina (De Battista 2005, Gundel et al. 2008). La especie *L. multiflorum* tiene un ciclo de vida anual, es cosmopolita, de rápido crecimiento y con síndrome fotosintético C3. Tiene una estrategia de vida ruderal a la competencia, lo que favorece su regeneración continua y la persistencia desde estadíos iniciales de la sucesión (Grime 2001, Chaneton et al. 2002, Tognetti 2010, Uchitel et al. 2011). La especie fue introducida en la región pampeana desde Europa más de un siglo atrás, como forraje de alta calidad para mejorar la producción de invierno (Söyrinki 2001), y es probable que haya ampliado su rango de distribución a toda la región con la expansión de la agricultura de mano de los cultivos y la cría de ganado durante los años 1800 (Parodi 1930). En la actualidad, se aplican algunas técnicas de manejo que favorecen su resiembra natural formando un verdeo de invierno (Jacobo et al. 2000) que compensa la baja productividad natural de los sistemas ganaderos. A estos manejos se los conoce de manera común como promociones de ryegrass. Por su capacidad invasora, esta especie llega a ser dominante en distintos ecosistemas de pastizal (D'Angela et al. 1986, Omacini et al. 1995, Trebino et al. 1996, Chaneton et al. 2002, Tognetti 2010, Uchitel et al. 2011).

Aproximadamente el 90% de las plantas de *L. multiflorum* hospedan a *N. occultans* en poblaciones naturalizadas de la región pampeana sujetos a diferentes regímenes de pastoreo vacuno (Gundel et al. 2009). En *L. multiflorum*, las hifas fúngicas están confinados a la base de las vainas durante la mayor parte del ciclo de vida y sólo colonizan los tallos y las semillas en floración cuando la planta entra en la fase reproductiva. Por lo tanto, la presencia de los endofitos es detectable de manera fácil en las semillas (Moon et al. 2000). Las plantas de *L. multiflorum* que hospedan endofitos producen alcaloides tipo lolinas (TePaske et al. 1993), lo que podría explicar una disminución en el consumo de las plantas infectadas por algunos insectos herbívoros (Omacini et al. 2001, Sugawara et al. 2006) o, en la granivoría por roedores (Uchitel et al. 2011). No hay evidencias de que estos compuestos tengan efectos tóxicos evidentes en grandes rumiantes (De Battista 2005, Sugawara et al. 2006).

La simbiosis entre *L. multiflorum*- *N. occultans* ha demostrado ser un modelo de estudio adecuado para entender los mecanismos a través de los cuales el endofito puede afectar la estructura y dinámica de las comunidades vegetales y animales (Omacini et al. 2005, Chaneton y Omacini 2007). El hongo endofito provee defensas a *L. multiflorum* ante algunas especies de áfidos y estos efectos pueden propagarse hacia enemigos naturales de los áfidos, modificando la estructura trófica en el sistema aéreo (Omacini et al. 2001). Además, algunas evidencias sugieren que la presencia de esta simbiosis modifica la actividad de los organismos del suelo (Omacini et al. 2004, Omacini et al. 2006, Casas et al. 2011) y que sus efectos sobre la dinámica de la broza pueden modificar la regeneración de *L. multiflorum* (Omacini et al. 2009, Uchitel et al. 2011). Por último, dado que *L. multiflorum* es una especie anual, el estudio de esta simbiosis en particular permite evaluar en qué medida la impronta dejada por la especie hospedante al final de la estación de crecimiento puede afectar las relaciones de retroalimentación con otras especies vegetales y la relación de estas especies con otros componentes de la comunidad (**Figura 1.3**).

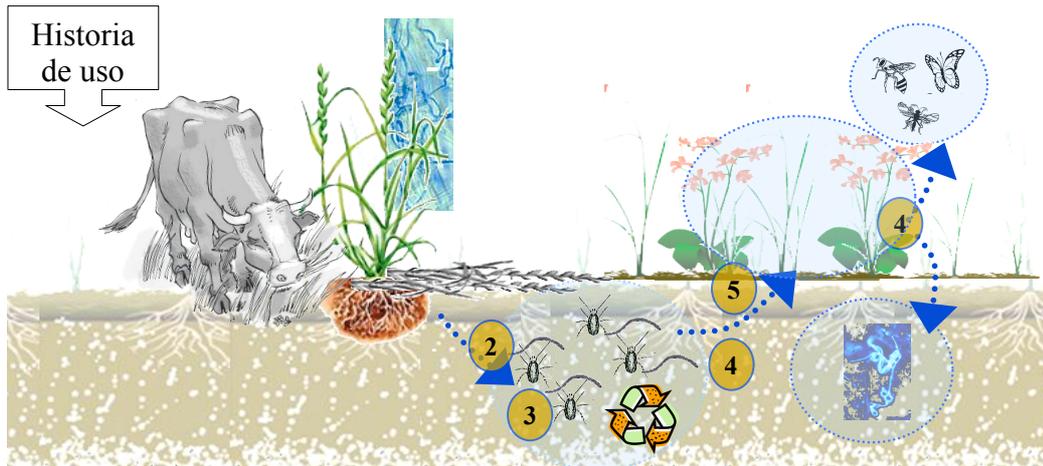


Figura 1.3: el esquema representa algunas relaciones entre las comunidades aéreas y del suelo mediadas por la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans*. La comunidad vegetal es la base de las redes tróficas y medio de vinculación principal entre las comunidades aéreas y del suelo. Los círculos celestes representan componentes evaluados a lo largo de la tesis. El endofito *N. occultans*, el pastoreo y la historia de uso son manipuladas experimentalmente en relación a *L. multiflorum*. Las flechas muestran relaciones que podrían ser afectadas indirectamente como consecuencia de cambios generados experimentalmente. Los números encerrados en círculos están asociados a los capítulos particulares de la tesis e indican los componentes o procesos que serán evaluados (2 y 3: mesofauna, nematodos, tasas de descomposición y mineralización; 4: relaciones de retroalimentación con otras especies vegetales y relaciones asociadas a estas especies; 5: estructura de la comunidad vegetal).

1.5 ESQUEMA DE LA TESIS

En primer lugar, se evalúan los efectos de la simbiosis al final de la estación de crecimiento de *L. multiflorum* sobre las comunidades del suelo (Capítulos 2 y 3). El capítulo 2 determina la importancia relativa de la broza y el ambiente del suelo como vías mediadoras de la influencia de la simbiosis pasto- endofito sobre la comunidad de organismos (mesofauna) del suelo y la descomposición de la broza de tejidos aéreos y de raíces. El capítulo 3 evalúa la estructura de la comunidad de nematodos del suelo y las funciones de mineralización y descomposición en el contexto de relaciones múltiples dado por la presencia de pastoreo y en ambientes con distinta historia de uso. El capítulo 4 está centrado en las relaciones de retroalimentación; es decir, la capacidad de la simbiosis de dejar señales que persisten modulando el crecimiento de plantas de soja (*Glycine max*) y el daño ocasionado por enfermedades ó; el crecimiento de plantas de cardo (*Carduus acanthoides*) y la relación con insectos visitantes como las abejas (*Apis mellifera*). Finalmente, se evalúa *in situ*, el efecto de la simbiosis sobre la capacidad invasora de la planta hospedante y el impacto de su colonización sobre la estructura de la comunidad vegetal (Capítulo 5). En ese capítulo la estructura de la comunidad es examinada durante y una vez finalizada la estación de crecimiento de *L. multiflorum*, la planta hospedante. Finalmente, el capítulo 6 desarrolla una discusión general de la tesis en la que se propone una síntesis de los resultados más importantes y,

se destacan los aportes más novedosos integrándolos al marco conceptual de la teoría de comunidades.

**CAPÍTULO 2 VÍAS DE INFLUENCIA DE LA SIMBIOSIS AÉREA
ENTRE *LOLIUM MULTIFLORUM* Y *NEOTYPHODIUM OCCULTANS*
SOBRE LA DESCOMPOSICIÓN Y LOS GRUPOS TRÓFICOS DEL
SUELO**

2.1 INTRODUCCIÓN

La vegetación constituye el principal vínculo entre las comunidades aéreas y las del suelo (van Breemen y Finzi 1998, Wardle et al. 2004a, De Deyn y van der Putten 2005). La mayor parte de la productividad primaria de los ecosistemas llega al suelo como materia orgánica no viva que llamamos detritos (Chapin III et al. 2002). Los detritos incluyen compuestos muy variables en origen, calidad, cantidad y su distribución es variable en el espacio y el tiempo (Moore y Hunt 1988, Polis y Strong 1996, Polis y Winemiller 1996, Callaway y Hastings 2002, Moore et al. 2004, Hättenschwiler et al. 2005). La deposición de detritos modifica, la estructura física, la humedad, la luz, la temperatura, los flujos de aire y agua en el suelo (Hudson 1994, Ahuja et al. 2006, Wright y Jones 2006). Además, los detritos son el sustrato principal de los organismos del suelo y, por lo tanto, determinan la estructura de las redes tróficas y regulan procesos clave como la descomposición (Chapin III et al. 2002, Moore et al. 2004, Ehrenfeld et al. 2005).

Es posible identificar en el suelo redes tróficas basadas en distintos detritos que presentan distinta complejidad en términos de estructura y funcionamiento (Brussaard 1998, Wardle et al. 2002). La actividad de los sistemas radiculares y los compuestos exudados son el sustento de organismos que viven total o parcialmente asociados a la rizosfera. En la base de esta red trófica se encuentran hongos y bacterias mutualistas (Ej.: micorrizas y rizobios), herbívoros de raíces (Ej.: nematodos fitoparásitos y fitófagos) y, microorganismos patogénicos (de la Peña 2009). Estos organismos consumen de manera directa parte de los compuestos producidos por las raíces de las plantas y en consecuencia, influyen sobre su crecimiento. Los detritos que provienen de tejidos aéreos y radiculares envejecidos dan sustento a otras redes tróficas. En la base de estas redes se encuentran los microorganismos descomponedores y la micro, la meso y la macrofauna del suelo asociados a los descomponedores. En conjunto, estos organismos movilizan, fijan y transforman la materia orgánica que entra en el suelo. En el caso de los exudados radiculares, las diferencias en el origen y la calidad determinan que las interacciones ocurran a una escala de tiempo mucho más corta que las respuestas a través de la broza. A su vez, los organismos descomponedores que utilizan exudados radiculares como recurso, son más especialistas que los descomponedores de broza. Entonces, los efectos de las plantas deberían ser más fuertes sobre los organismos asociados a la rizosfera.

Las plantas también pueden influir sobre las comunidades del suelo a través de vías más complejas que involucran cambios en las condiciones físicas. Por ejemplo, las plantas modifican las condiciones de humedad del suelo y, a través de la humedad afectan a los organismos fitófagos que consumen tejidos radiculares (Duncan y McCoy 2001, pero ver Ludwig et al. 2004). A diferencia de los efectos directos sobre las comunidades o las condiciones físicas del suelo, los efectos a través de las condiciones químicas y biogeoquímicas (como el pH o los nutrientes) suelen implicar complejas vías en interacción con la humedad, la temperatura y la composición de especies de las comunidades del suelo (Ehrenfeld et al. 2005).

Por otro lado, las relaciones que las plantas establecen en la parte aérea modifican los detritos que llegan al suelo y en consecuencia, a las redes tróficas asociadas (van der Putten et al. 2007a). Una relación aérea menos estudiada que la herbivoría, es la que establecen los hongos endofitos del género *Neotyphodium* con numerosas especies de gramíneas de clima templado. A pesar que estos hongos endofitos colonizan exclusivamente órganos aéreos del pasto hospedante, pueden modificar la biomasa

radicular, la producción y actividad de exudados radiculares y, la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera (Malinowski et al. 1998a, Franzluebbers y Hill 2005, Van Hecke et al. 2005, Franzluebbers 2006, Omacini et al. 2011). Aunque desconocemos los mecanismos específicos, es probable que los cambios en el ambiente químico del suelo (Malinowski et al. 1998a, Malinowski et al. 2004, Antunes et al. 2008) contribuyan a los efectos observados sobre distintos grupos de organismos del suelo (Ej.: Franzluebbers et al. 1999, Omacini et al. 2004, Lemons et al. 2005, Van Hecke et al. 2005, Jenkins et al. 2006, Buyer et al. 2011, Casas et al. 2011, Omacini et al. 2011).

Se ha observado que los hongos endofitos influyen sobre los microorganismos asociados a la rizosfera (Van Hecke et al. 2005, Jenkins et al. 2006, Iqbal et al. 2012), y reducen la colonización micorrícica (Chu-Chou et al. 1992, Guo et al. 1992, Müller 2003, pero ver Novas et al. 2005, Omacini et al. 2006, Antunes et al. 2008, Mack y Rudgers 2008, Novas et al. 2009). Además, modifican la capacidad metabólica de la comunidad del suelo (Casas et al. 2011) y la tasas de descomposición de la broza (Omacini et al. 2004, Lemons et al. 2005, Siegrist et al. 2010). Algunos experimentos sugieren que el impacto negativo sobre la descomposición esta dado por cambios en el microambiente del suelo más que por la presencia del endofito en la broza en descomposición (Omacini et al. 2004, Lemons et al. 2005, Siegrist et al. 2010). Sin embargo, los resultados podrían ser opuestos en condiciones de campo como consecuencia de un proceso de aclimatación de las redes tróficas del suelo (Lemons et al. 2005).

El objetivo de este capítulo es evaluar bajo condiciones ambientales naturales la importancia relativa de distintas vías a través de las cuales de la simbiosis *L. multiflorum* -*N. occultans* puede modificar la descomposición y a los grupos tróficos del suelo en el corto plazo (i.e. una estación de crecimiento de un hospedante anual). Se considerarán tres vías de influencia: i) la calidad de los tejidos aéreos muertos (Ba), ii) la calidad de los tejidos radiculares muertos (Br) y, iii) el ambiente del suelo generado por la actividad de *L. multiflorum* (A) (**Figura 2.1**). En particular se pone a prueba la hipótesis que *N. occultans* en *L. multiflorum* reduce la riqueza, la diversidad y abundancia de los grupos tróficos del suelo a través de los cambios que genera principalmente, en la calidad de los detritos aéreos que llegan al suelo. Además, se evalúa a los grupos tróficos del suelo reconociendo grupos funcionales como posibles determinantes de los cambios en la tasa de descomposición (Nahmani y Rossi 2003, Bardgett et al. 2005).

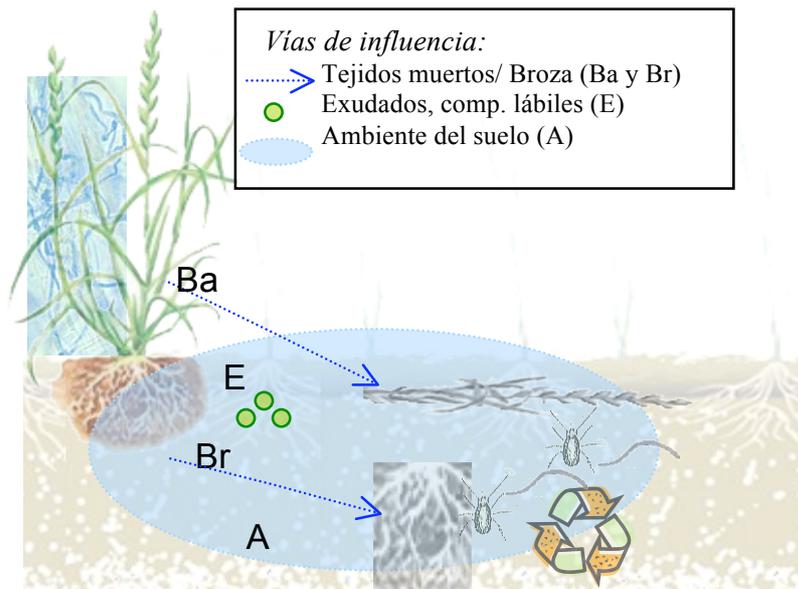


Figura 2.1: el esquema representa las principales vías de influencia a través de las cuales las plantas pueden modificar la estructura de la red trófica del suelo y los procesos que dependen de su actividad. En este capítulo se evalúa cómo la presencia del hongo endofito *N. occultans* que se hospeda en tejidos aéreos de *L. multiflorum* podría influir sobre los grupos tróficos y la actividad de las comunidades del suelo a través de estas vías.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Diseño experimental

Se realizó un experimento factorial bajo condiciones ambientales naturales [campo experimental del Jardín Botánico de la Universidad de Osnabrück en Alemania (52°16' N, 8°3' E)]. El suelo del campo experimental está compuesto por una mezcla artificial de arena y arcillas de 40 cm de profundidad sobre areniscas calcáreas. Se manipuló de manera experimental la calidad de la broza (Detritos; tejidos muertos aéreos y radiculares) y el ambiente del suelo donde estos detritos se descomponen. La broza proviene de tejidos muertos de individuos de *Lolium multiflorum* de poblaciones con alta (B+) o baja (B-) frecuencia de hongos endofitos. Los ambientes del suelo fueron generados por el crecimiento de poblaciones de *L. multiflorum* con alta (A+) o baja (A-) frecuencia de hongos endofitos (**Figura 2.2**).

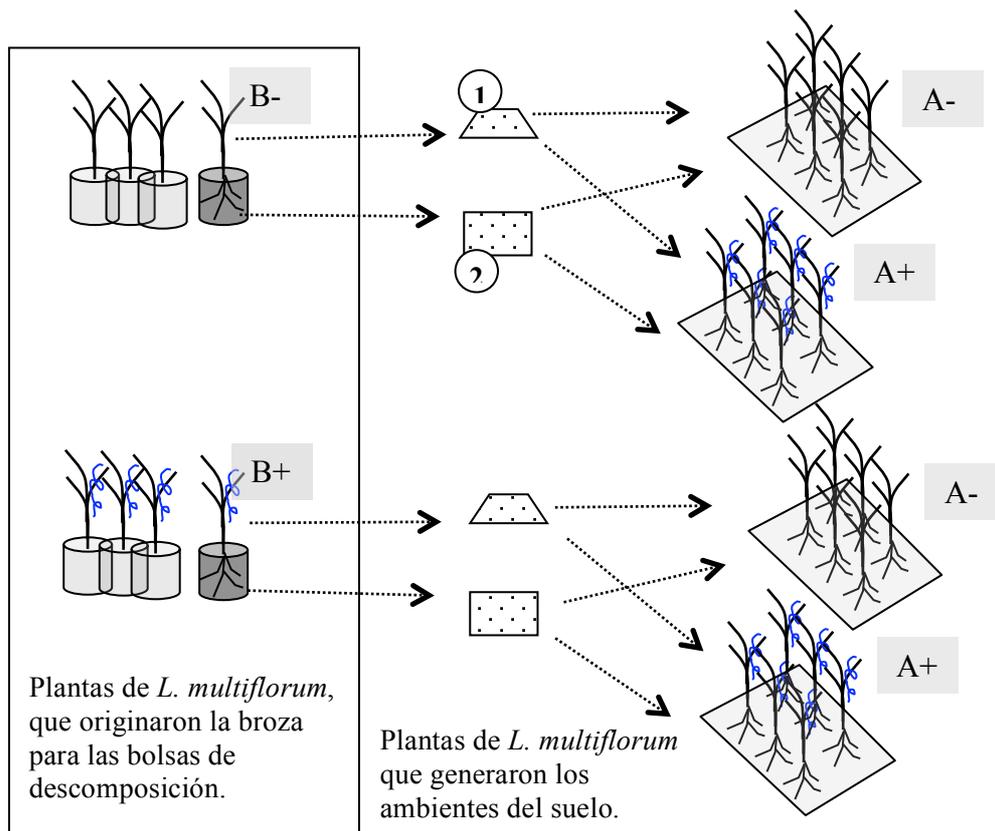


Figura 2.2: diseño del experimento. Plantas de *Lolium multiflorum* con alta o baja frecuencia de endofitos fueron cultivadas en macetas bajo condiciones controladas de luz, agua y temperatura. La broza de dos orígenes: tejidos aéreos (1) y radiculares (2) de estas plantas fueron utilizadas para armar dos tipos de bolsas de descomposición. Las bolsas con broza proveniente de tejidos con alta (B+) y baja (B-) frecuencia de endofitos fueron colocadas en parcelas donde crecían plantas de *L. multiflorum* con alta o baja frecuencia de endofitos para generar dos ambientes del suelo contrastantes (A+ y A-, respectivamente). Las líneas curvas de color azul en el esquema simbolizan al hongo endofito *Neotyphodium occultans* en simbiosis con plantas de *L. multiflorum*. Vale aclarar que es una representación de la relación simbiótica dado que, el hongo endofito se aloja en el interior de tejidos aéreos sin generar estructuras externas ni síntomas visibles.

2.2.2 Origen de las semillas utilizadas

Las semillas que se utilizaron para generar las brozas aéreas y radiculares así como, los ambientes del suelo provenientes de la misma población original con alta frecuencia de infección con endofitos. Las semillas originales fueron recolectadas de un pastizal dominado por *L. multiflorum* al Este de la Pampa Interior (Ea. "San Claudio", Carlos Casares, Pcia. de Bs. As.). Estas semillas presentan naturalmente niveles altos de frecuencia de *N. occultans* (Vila-Aiub et al. 1997). La mitad de las semillas fueron tratadas con el fungicida sistémico triadimenol (0,5 g principio activo/100 g de semilla) para obtener semillas libres del hongo endofito (ver metodología utilizada por Omacini et al. 2004). Ambos grupos de semillas (no tratadas y tratadas con el fungicida) fueron

sembradas a igual densidad bajo las mismas condiciones ambientales (jardín experimental de la Cátedra de Ecología de la FAUBA). Las semillas producidas por estas plantas corresponden a la F1 y fueron utilizadas en el experimento (de ahora en adelante E+ y E-). La frecuencia de hongos endofitos en estas semillas fue evaluada mediante tinción con Rosa de Bengala y observación microscópica (presencia/ausencia del hongo; n= 30) (Bacon y White 1994). El hongo endofito fue encontrado en el 76 % y el 3 % de las semillas de las plantas E+ y E-, respectivamente.

2.2.3 Obtención de broza de poblaciones de *Lolium multiflorum* con alta y baja frecuencia de endofitos

Para generar las brozas B+ y B- se cultivaron plantas de *L. multiflorum* E+ y E-, respectivamente, en macetas de 3 litros bajo condiciones controladas de luz (12 h), temperatura (22 °C) y de riego en mayo de 2008 (**Figura 2.2**). Los tejidos aéreos fueron cosechados a medida que envejecieron mientras que los tejidos radiculares fueron cosechados al final del ciclo de vida de las plantas. El material cosechado se conservó para armar bolsas de descomposición (i.e. bolsas cribadas de 10 cm x 5 cm y poro de 2 mm). En cada una de las bolsas se colocó 500 mg de broza aérea ó 250 mg de broza de raíces (la cantidad de broza por bolsa estuvo limitada por la disponibilidad del material). En todos los casos la broza fue cortada en fragmentos de 2 cm para homogeneizar el tamaño y la accesibilidad de los organismos. Además, se controló la relación entre varas y láminas (1:1) para todas las bolsas con broza aérea con el objetivo de minimizar diferencias debidas a la calidad del material.

2.2.4 Generación de ambientes bajo la influencia de poblaciones de *Lolium multiflorum* con alta o baja frecuencia de endofitos

Para generar los ambientes A+ y A- semillas de *L. multiflorum* E+ y E- respectivamente fueron germinadas en bandejas bajo condiciones controladas de luz (12 h) y temperatura (25 °C) en junio de 2008 (**Figura 2.2**). Las plántulas fueron transplantadas a los 30 días a las parcelas experimentales (0,5 m x 0,5 m) a una densidad de 2000 plántulas.m⁻². El experimento se mantuvo bajo riego y en condiciones ambientales naturales de luz y temperatura [Jardín Botánico de la Universidad de Osnabrück. Alemania (52°16' N, 8°3' E)]. El diseño contempló ocho bloques completos donde se asignaron al azar los cuatro tratamientos que resultan de la combinación de los factores calidad de la broza y ambiente del suelo (B-A-, B-A+, B+A- y B+A+. Un total de 32 unidades experimentales). A principios de octubre de 2008 en cada parcela se colocó una bolsa de descomposición con broza aérea (Ba) sobre la superficie del suelo y otra con broza de raíces (Br) enterrada de forma vertical quedando el extremo superior a 2 cm de la superficie. Las bolsas fueron retiradas seis meses después (a principios de abril de 2009, al final del ciclo de vida de las plantas de *L. multiflorum*). El período junio-abril respetó la estacionalidad natural de la especie en la región donde se realizó el experimento.

2.2.5 Determinaciones

Las bolsas con broza aérea y radicular fueron recolectadas y llevadas de inmediato a un extractor tipo Kempson (Southwood (Sir.) y Henderson 2000). Los organismos invertebrados extraídos fueron conservados en etanol (70 %) para el posterior examen y clasificación. Se identificaron los siguientes grupos taxonómicos: Annelida, Mollusca, Tardigrada, Arachnida, Myriapoda, Crustacea, Insecta y Collembola (Schaefer 2002). Sólo los organismos pertenecientes al grupo de los Collembola fueron determinados a

nivel de especie usando la clave de clasificación de Hopkin (2007) y de Bellinger *et al.* (1996-2011). En el apéndice se muestran todos los individuos encontrados y clasificados (**Cuadro A.1**). Se identificaron 37 grupos taxonómicos que fueron utilizados para calcular la riqueza y la diversidad de Shannon (Nahmani y Rossi 2003). Luego, estos grupos taxonómicos fueron clasificados en grupos tróficos según el tipo de alimentación más frecuente: detritívoros, fitófagos, fungívoros, bacteriófagos, omnívoros y depredadores (**Figura 2.3**). Los resultados se expresan por bolsa de descomposición. Después de la extracción de los organismos, las bolsas fueron secadas a 40 °C durante 72 h y pesadas (con una precisión de 0,01 g). La descomposición se estimó a partir de los valores de broza remanente expresados como porcentaje del peso seco inicial.

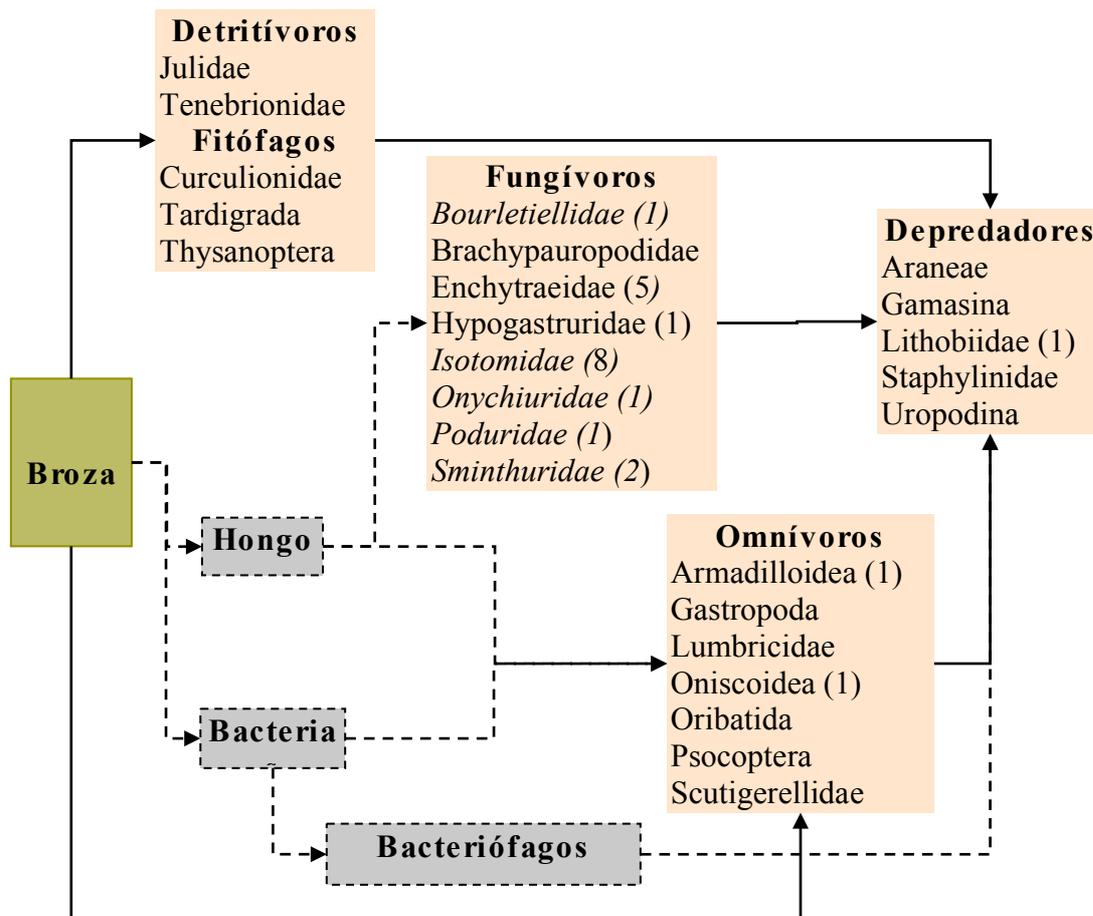


Figura 2.3: el esquema muestra la clasificación trófica de los invertebrados extraídos de las bolsas de descomposición de broza de origen aéreo y radicular. La clasificación taxonómica en el esquema corresponde al nivel de familia o superior. La cantidad de organismos en niveles inferiores a familia se indica entre paréntesis. La clasificación exhaustiva se encuentra descrita en la sección Anexo de la tesis (**Cuadro A.1**). No se encontraron bacteriófagos. Las flechas indican las relaciones entre los grupos tróficos.

2.2.6 Análisis estadístico

Las bolsas de descomposición colocadas en superficie y en profundidad fueron confeccionadas con detritos de distinto origen (Ej.: broza de tejidos aéreos y radiculares, respectivamente) (**Figura 2.2**). Para evitar la confusión de efectos, las bolsas en superficie y en profundidad fueron analizadas de manera independiente. Los datos fueron analizados mediante modelos lineales de efectos mixtos. Se utilizó la función `lme` [incluida en el paquete `nlme` (Pinheiro y Bates 2000, Pinheiro et al. 2009)]. Los valores de porcentaje de broza remanente fueron comparados mediante un modelo que consideró a la calidad de la broza (B- ó B+) y al ambiente del suelo (A- ó A+) como factores fijos y a los bloques como factor aleatorio.

La riqueza y la diversidad (según el índice de Shannon o Shannon–Weaver [o Shannon–Wiener]) se determinaron mediante las funciones `specnumber(datos)` y `diversity(datos)` del paquete `vegan`, respectivamente (Oksanen et al. 2010). La función `specnumber` determina el número de grupos taxonómicos, en este caso, y es equivalente a la función básica `rowSums(datos > 0)`. El índice de Shannon define la diversidad de grupos taxonómicos como $H' = -\sum p_i \times \log_b(p_i)$ donde p_i es la abundancia proporcional de las especies y b es la base del logaritmo.

El modelo utilizado para los valores de riqueza, diversidad y abundancia de cada uno de los grupos tróficos incluyó a la calidad de la broza (B- ó B+), al ambiente del suelo (A- ó A+) y a la biomasa remanente en las bolsas de descomposición (y las interacciones con los factores fijos incluidos en el primer modelo) como factores fijos. Los bloques fueron el factor aleatorio. Incluir a la biomasa remanente en el análisis permitió evaluar en qué medida los cambios en las variables analizadas estuvieron mediados por un efecto cuantitativo de la cantidad de sustrato disponible para los organismos del suelo. El supuesto de normalidad fue evaluado con los residuos de los modelos mediante la función `shapiro.test(residuals(modelo))` del paquete “basic”. El supuesto de homogeneidad de varianzas fue evaluado mediante la prueba de Levene con la función `leveneTest` [del paquete `car` (Fox 2009)]. Cuando fue necesario los valores fueron transformados por el logaritmo $(x+1)$. Esta transformación fue realizada para la abundancia de: fungívoros en superficie y en profundidad y, omnívoros y depredadores en profundidad. Los datos correspondientes a los fitófagos no fueron analizados debido a la falta de datos. Cuando hubo interacción entre los factores fijos, las comparaciones a posteriori se realizaron mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) con la función `glht` (paquete `multcomp` (Hothorn et al. 2008)).

Todos los resultados se presentan como los promedios no transformados de las repeticiones \pm error estándar. Las repeticiones no fueron iguales para todos los tratamientos debido a la pérdida de bolsas durante el experimento. Todos los análisis fueron realizados con el programa R-cran, versión 2.10 (R Development Core Team 2007).

2.3 RESULTADOS

El ambiente del suelo y la calidad de la broza modificaron la tasa de descomposición de la broza de tejidos aéreos (**Cuadro 2.1**). A pesar que la prueba de comparaciones múltiples no detectó diferencias entre tratamientos, la broza remanente tendió a ser menor en los ambientes con baja frecuencia de endofitos (A-B-) respecto de los demás tratamientos. En consecuencia, la tasa de descomposición de la broza aérea tendió a ser mayor con baja frecuencia de endofitos (**Figura 2.4 a**).

Solo el ambiente modificó las tasas de descomposición de la broza de raíces (**Cuadro 2.1**). El porcentaje de biomasa radicular remanente en los ambientes con baja frecuencia de endofitos (A-) representó las dos terceras partes del porcentaje de biomasa remanente en los ambientes con alta frecuencia de endofitos (A+) independientemente de la presencia del endofito en la broza. Es decir, la tasa de descomposición fue menor en los ambientes donde crecieron plantas de *Lolium multiflorum* con alta frecuencia de endofitos (**Figura 2.4 b**).

La presencia del endofito en el ambiente del suelo y en la broza modificó la riqueza y diversidad de grupos tróficos asociados a la broza de tejidos aéreos (**Cuadro 2.2**). La cantidad de broza remanente no influyó sobre estas variables. A pesar que la prueba de comparaciones múltiples no detectó diferencias entre tratamientos, las tendencias sugieren que, tanto la riqueza como la diversidad fueron mayores en los ambientes y en la broza con baja frecuencia de endofitos (A-B-) respecto de los demás tratamientos (**Figura 2.5 a y c**).

Solo el ambiente del suelo generó cambios en la estructura de la comunidad edáfica asociada a la broza de tejidos radiculares (**Cuadro 2.2**). La riqueza y la diversidad de grupos tróficos fueron mayores en los ambientes con alta frecuencia de endofitos (A+) respecto de los ambientes con baja frecuencia de endofitos (A-) (**Figura 2.5 b y d**).

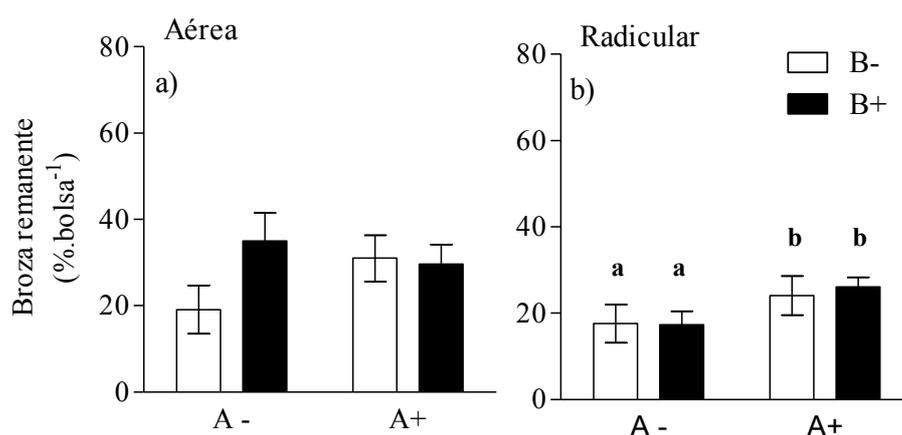


Figura 2.4: porcentaje de biomasa remanente asociada a la broza aérea (a) o radicular (b) de plantas de *L. multiflorum* provenientes de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (barras blancas: B- y negras: B+, respectivamente). Las bolsas de descomposición conteniendo ambas calidades de broza fueron colocadas en superficie o en profundidad, respectivamente en ambientes donde crecían plantas de *L. multiflorum* con baja o alta frecuencia de endofitos (A- y A+, respectivamente). Las barras muestran el promedio (\pm error estándar) de seis a ocho repeticiones. Las diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($P < 0,05$. Prueba de Tukey).

Cuadro 2.1: resultado de los modelos estadísticos para los efectos de la calidad de la broza y el ambiente del suelo sobre la broza aérea y radicular remanente de *L. multiflorum*. La calidad de la broza en descomposición y el ambiente del suelo fueron generados por plantas de *L. multiflorum* con alto o bajo nivel de infección con el hongo endofito *N. occultans*. La broza de tejidos aéreos y radiculares fue analizada de manera independiente. El cuadro muestra el estadístico, los grados de libertad asociados [F (gl)] y, el valor de probabilidad (valor-*p*).

	Broza aérea		Broza radicular	
	F _{1,16}	<i>p</i> -valor	F _{1,19}	<i>p</i> -valor
Broza (B)	0,24	0,632	3,14	0,093
Ambiente (A)	0,32	0,578	4,67	0,044
B x A	7,53	0,014	0,06	0,808

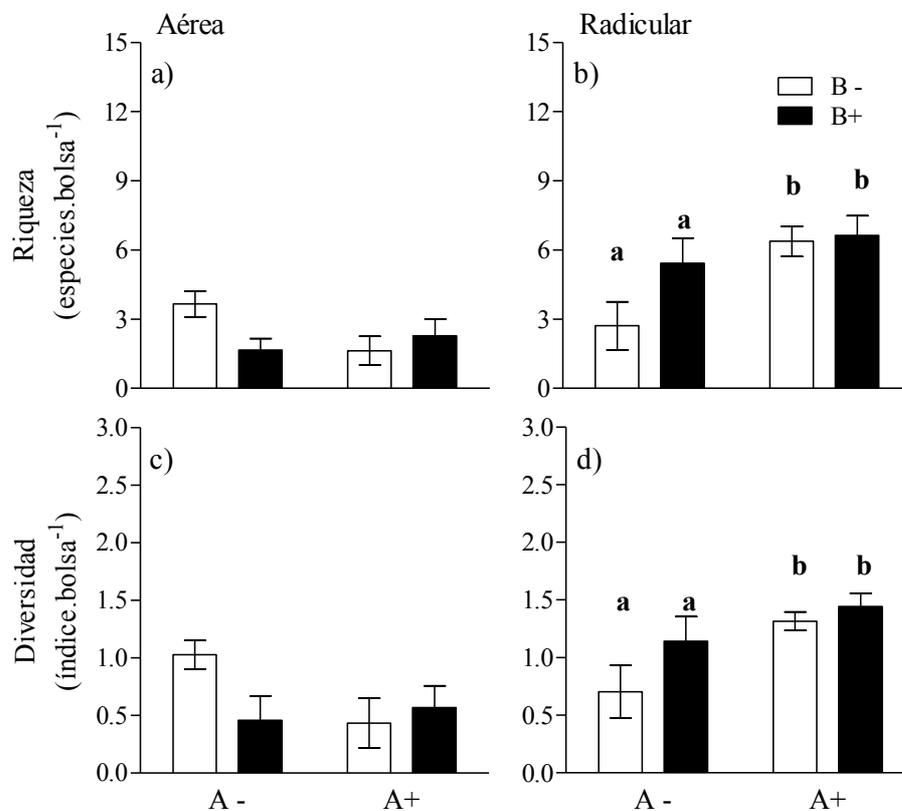


Figura 2.5: características de la comunidad de organismos asociada a broza aérea (a la izquierda) o radicular (a la derecha) en las bolsas de descomposición. La figura se muestra la riqueza (a, b) y la diversidad de Shannon (c, d) de los grupos taxonómicos extraídos de las bolsas de descomposición conteniendo broza de *L. multiflorum* provenientes de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (barras blancas: B- y negras: B+) colocadas en superficie o en profundidad, respectivamente en ambientes donde crecían plantas de *L. multiflorum* con baja o alta frecuencia de endofitos (A- y A+, respectivamente). Las barras muestran el promedio (\pm error estándar) de seis a ocho repeticiones. Las diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($P < 0,05$. Prueba de Tukey).

La presencia del endofito tanto en el ambiente del suelo como en la broza aérea influyeron sobre la abundancia de organismos fungívoros y depredadores (**Cuadro 2.2**). La abundancia de los fungívoros asociados a la broza aérea con baja frecuencia de endofitos en los ambientes con baja frecuencia de endofitos (A-B-) fue más del doble que la abundancia de fungívoros asociados a los otros tratamientos (**Figura 2.6 a**). Mientras tanto, la prueba de comparaciones múltiples no detectó diferencias entre tratamientos para el grupo de los depredadores y, no hubo evidencias de cambios en la abundancia de omnívoros debido a los tratamientos (**Figura 2.6 c y e**). La cantidad de broza remanente no estuvo asociada a los valores de abundancia en ninguno de los grupos tróficos (**Cuadro 2.2**).

El ambiente del suelo modificó la abundancia de organismos fungívoros y omnívoros asociados a la broza de tejido radicular (**Cuadro 2.2**). La abundancia de organismos fungívoros asociados a la broza radicular en el ambiente con baja frecuencia de endofitos (A-) fue en promedio 40 % menor que en el ambiente con alta frecuencia de endofitos (A+) (**Figura 2.6 b**). La abundancia de omnívoros estuvo influida por el ambiente del suelo pero además, hubo interacción entre la presencia del endofito en la broza y la cantidad de broza remanente en las bolsas de descomposición (**Cuadro 2.2**). En promedio, en los ambientes con baja frecuencia de endofitos la abundancia de este grupo trófico fue 30 % menor que en los ambientes con alta frecuencia de endofitos (**Figura 2.6 d**). No hubo evidencia de cambios en la abundancia de depredadores debido a los tratamientos (**Cuadro 2.2 y Figura 2.6 f**).

2.4 DISCUSIÓN

Existe poca información de cómo la variación fenotípica generada por los hongos endofitos aéreos influyen sobre las comunidades del suelo (Omacini et al. 2011). Este capítulo constituye uno de los primeros trabajos que evalúa el impacto de la simbiosis *Lolium multiflorum*- *Neotyphodium occultans* sobre la descomposición de tejidos aéreos y subterráneos y la estructura de la comunidad de organismos del suelo considerando varios grupos tróficos. Además, se consideran distintas vías de influencia de las plantas sobre el suelo. Los resultados no confirmaron las hipótesis. En cambio, sugieren fuertemente que los endofitos aéreos influyen en el proceso de descomposición y en la estructura de la comunidad de descomponedores a través de cambios en el ambiente del suelo y, en menor medida, de la broza aérea. La ubicación de *N. occultans* en los tejidos aéreos de *L. multiflorum* no estaría necesariamente asociada a las vías de influencia sobre las comunidades del suelo como podría especularse *a priori*.

Los resultados de este capítulo concuerdan con trabajos previos donde la presencia de los hongos endofitos aéreos tanto en *L. multiflorum* (Omacini et al. 2004) como en *L. arundinaceum* (Lemons et al. 2005, Siegrist et al. 2010) disminuye la tasa de descomposición y modifica la estructura de la comunidad del suelo principalmente, a través de cambios en el ambiente. La actividad del sistema radicular durante del ciclo de vida de *L. arundinaceum* hospedante de *N. arundinaceum* modificó el ambiente del suelo (Malinowski et al. 1998a, Malinowski et al. 1998b, Malinowski y Belesky 2000, Malinowski et al. 2004, Franzluebbers y Hill 2005). Se ha sugerido que algunos compuestos recalcitrantes aun no identificados (Rasmussen et al. 2008) podrían ser exudados y tener un impacto negativo sobre los organismos fungívoros y la tasa de descomposición (Moore et al. 2004, Omacini et al. 2004, Antunes et al. 2008, Siegrist et al. 2010). Sin embargo, estos compuestos podrían degradarse y desaparecer

relativamente rápido cuando los tejidos envejecen como en el caso de este experimento (Garner et al. 1993, pero ver Antunes et al. 2008, Siegrist et al. 2010).

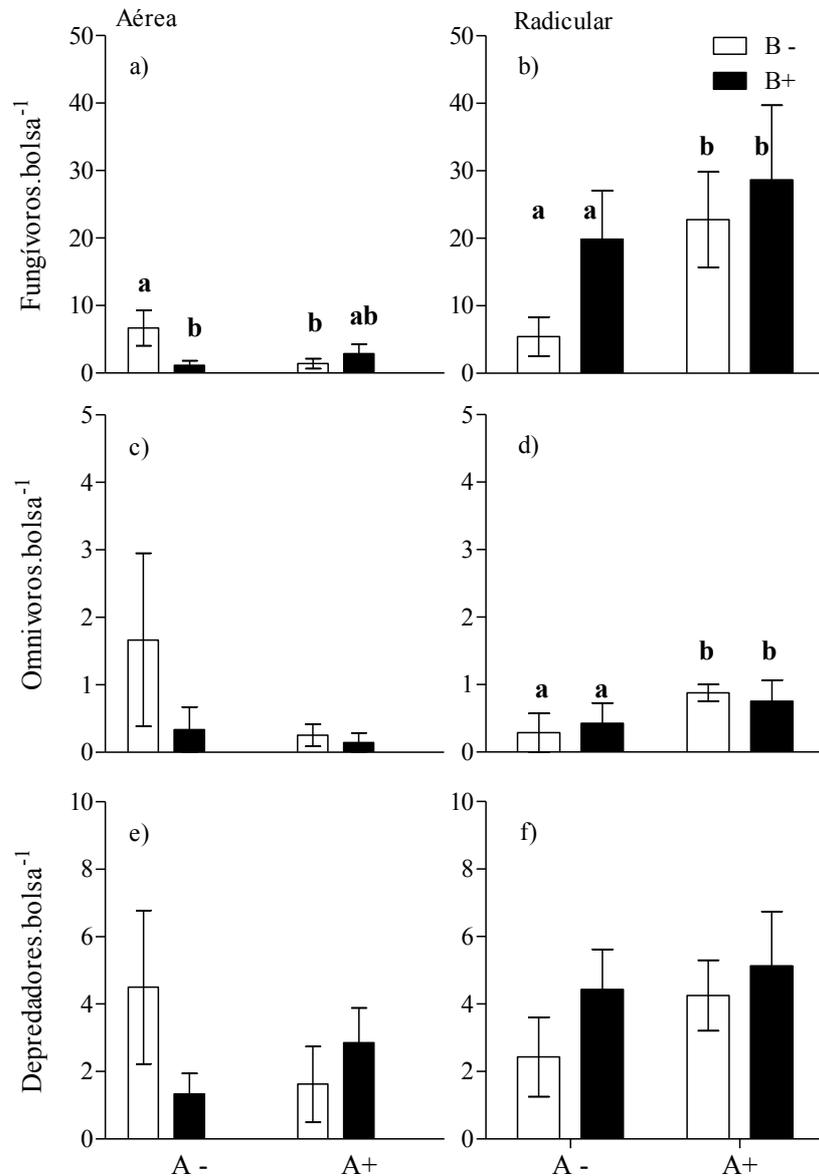


Figura 2.6: abundancia de los organismos clasificados en grupos tróficos según el hábito alimenticio en los distintos tratamientos. Las barras representan la abundancia de organismos fungívoros (a, b), omnívoros (c, d) y depredadores (e, f) asociados a la broza aérea (a la derecha) o radicular (a la izquierda) de *L. multiflorum* proveniente de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (barras blancas: B- y negras: B+, respectivamente). Se colocaron bolsas de descomposición en superficie (broza aérea) o en profundidad (broza radicular) en ambientes donde crecían plantas de *L. multiflorum* provenientes de poblaciones con baja o alta frecuencia de endofitos (A- y A+). Las barras muestran el promedio (\pm error estándar) de seis a ocho repeticiones. Las diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($P < 0,05$. Prueba de Tukey). La escala en el eje de ordenadas varía con el grupo trófico y el análisis estadístico.

Cuadro 2.2: resultado de los modelos para los efectos del ambiente, la calidad de la broza y el porcentaje de broza remanente sobre la estructura de la comunidad del suelo: riqueza, diversidad y, abundancia de los grupos tróficos (fungívoros, omnívoros y depredadores). Las comunidades asociadas a la broza de tejidos aéreos (en superficie) y radiculares (en profundidad) fueron analizadas de manera independiente. El modelo incluyó a la biomasa remanente en las bolsas de descomposición con el objeto de evaluar la disponibilidad de sustrato en relación a los valores observados. El cuadro muestra los valores del estadístico F y el valor de probabilidad entre paréntesis (valor-*p*). Los grados de libertad fueron 1,12 y 1,15 para la broza aérea y radicular, respectivamente.

Broza aérea					
	Riqueza	Diversidad	Fungívoros	Omnívoros	Depredadores
Ambiente (A)	1,28 (0,280)	1,25 (0,286)	1,88 (0,195)	0,83 (0,379)	0,31 (0,590)
Broza (B)	0,70 (0,419)	0,79 (0,391)	1,47 (0,248)	1,19 (0,2797)	0,32 (0,583)
A x B	8,10 (0,015)	5,71 (0,034)	10,85 (0,006)	1,52 (0,241)	4,90 (0,047)
Remanente (R)	0,28 (0,608)	0,01 (0,929)	0,35 (0,566)	0,93 (0,354)	0,23 (0,639)
A x R	0,03 (0,857)	0,27 (0,613)	0,84 (0,376)	0,16 (0,692)	1,84 (0,200)
B x R	0,04 (0,835)	0,03 (0,868)	0,34 (0,570)	0,14 (0,719)	0,07 (0,797)
A x B x R	0,11 (0,742)	0,00 (0,985)	2,79 (0,121)	0,01 (0,909)	2,00 (0,183)
Broza radicular					
	Riqueza	Diversidad	Fungívoros	Omnívoros	Depredadores
Ambiente (A)	6,27 (0,024)	7,29 (0,017)	5,86 (0,029)	7,61 (0,015)	1,12 (0,307)
Broza (B)	2,09 (0,169)	2,55 (0,131)	2,12 (0,166)	0,13 (0,723)	1,30 (0,272)
A x B	1,53 (0,235)	0,75 (0,401)	2,15 (0,163)	1,46 (0,246)	0,20 (0,661)
Remanente (R)	0,52 (0,483)	0,77 (0,395)	0,48 (0,501)	2,73 (0,119)	0,04 (0,848)
A x R	0,23 (0,636)	0,47 (0,502)	1,73 (0,208)	1,79 (0,200)	3,58 (0,078)
B x R	0,07 (0,789)	0,02 (0,898)	0,00 (0,973)	5,04 (0,040)	0,19 (0,671)
A x B x R	0,17 (0,682)	0,01 (0,921)	0,00 (0,948)	2,20 (0,159)	0,21 (0,653)

La concentración de los compuestos producidos por los hongos endofitos ha sido propuesta como uno de los mecanismos principales capaces de explicar sus efectos tóxicos sobre herbívoros y sus parasitoides (Omacini et al. 2001, Rudgers y Clay 2008, Cheplick y Faeth 2009, Faeth y Shochat 2010, Jani et al. 2010, Bultman et al. 2011, Vesterlund et al. 2011). Sin embargo, estas respuestas no son universales. El tipo de compuesto (Ej.: peraminas, ergovalina, lolitrem B) y su concentración varían de manera importante según la simbiosis, el tejido y la edad del tejido de la planta hospedante. Mientras la concentración de lolitrem B es mayor en tejidos más viejos, lo opuesto sucede con la concentración de peraminas (Keogh et al. 1996). Alcaloides como ergovalina y en menor medida lolitrem B presentes *L. perenne*- *N. lolii*, permanecen en las hojas senescentes y también en las hojas muertas por defoliación (Clark et al. 1996). En este caso las hojas muertas en pasturas podrían ser una fuente importante de ambas toxinas para los organismos del suelo y también, en forrajes conservados como fardos o silaje (Clark et al. 1996). Por otro lado, aunque en bajas concentraciones, alcaloides como las peraminas, ergovalina y lolitrem B fueron detectados en raíces de *L. perenne* hospedante de *N. Lolii* (Ball et al. 1997).

En pocos trabajos se han identificado y cuantificado los alcaloides presentes en la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans*. Sugawara et al. (2006) y TePaske et al. (1993) encontraron N-formyl lolinas (toxina para insectos) y peraminas (disuasivo para insectos herbívoros) en semillas de *L. multiflorum* hospedantes de endofitos. En cambio, no detectaron ergovalina o lolitrem B, causantes de toxicidad en ganado (Sugawara et al. 2006). La presencia de lolinas en las hojas (Omacini et al. 2009) podría explicar el efecto negativo sobre insectos aéreos (Omacini et al. 2001). En cambio, es probable que un mecanismo alternativo este asociado a la broza dado que, la concentración de peraminas declina en la hoja senescente (Keogh et al. 1996). Ponce et al. (2009) encontraron que la presencia de *N. occultans* aumentó el contenido y la variedad de compuestos flavonoides y fenoles (incluyendo fitoalexinas) en tejidos aéreos y radiculares de *L. multiflorum* sugiriendo que los hongos endofitos tienen un efecto sistémico en la planta hospedante. Sin embargo, aun no sabemos en que medida estos compuestos pueden afectar la descomposición, ser exudados o permanecer en el ambiente del suelo después del ciclo de vida de la planta hospedante (Ej.: *L. multiflorum*). En este capítulo, el efecto del ambiente fue más importante en profundidad que en superficie apoyando a la actividad radicular como un mecanismo a través del cual *N. occultans* modifica las tasas de descomposición y a los organismos del suelo. Por otro lado, la cantidad de broza remanente prácticamente no influyó sobre la actividad o la estructura de la comunidad del suelo. Esto sugiere que, si existe un mecanismo asociado a la liberación de compuestos desde la broza, estos no persistieron en los tejidos radiculares muertos o; al menos, no en concentraciones suficientes.

Los efectos del endofito en el ambiente del suelo y en la broza aérea redujeron la abundancia de organismos fungívoros (colémbolos) lo que podría estar relacionado con las menores tasas de descomposición. Lemons et al. (2005) observaron que la presencia de *N. coenophialum* en *L. arundinaceum* favoreció la abundancia de ciertas especies de colémbolos del suelo que se alimentan de compuestos más recalcitrantes sin modificar la abundancia total de este grupo de organismos. Otros trabajos encontraron un impacto negativo del endofito en *L. arundinaceum* sobre la biomasa fúngica del suelo (Franzluebbers y Hill 2005, Iqbal et al. 2012) [(pero ver Casas et al. 2011)- *L. multiflorum*] y la tasa de descomposición (Este capítulo) (Lemons et al. 2005, Siegrist et al. 2010) [(Omacini et al. 2004)- *L. multiflorum*]. Aunque no podemos descartar la presencia de otros mecanismos, estos resultados en conjunto apoyan la idea de que el

impacto de la simbiosis se transmite a través de la vía de los hongos del suelo (Uchitel 2008). Por otro lado, el endofito pudo tener efectos sobre desarrollo o la tasa de reproducción de especies particulares del suelo como se ha demostrado para algunos artrópodos aéreos (Ej.: Williamson y Potier 1997, Bultman et al. 2004, Kunkel et al. 2004, Potter et al. 2008). Este tipo de efectos no han sido considerados hasta el momento para organismos del suelo.

Muy pocos trabajos han estudiado el impacto de *Neotyphodium* sp. sobre las relaciones entre grupos tróficos y ninguno los ha relacionado con procesos del suelo como la descomposición o la mineralización. A pesar que los endofitos generan efectos tanto sobre las redes tróficas aéreas como del suelo, las redes tróficas de artrópodos aéreos han sido estudiadas con mayor detalle que las del suelo (Omacini et al. 2001, Bultman et al. 2004, Finkes et al. 2006, Rudgers y Clay 2008, Faeth 2009, Faeth y Shochat 2010, Jani et al. 2010, Bultman et al. 2011, Vesterlund et al. 2011). Cuando el lepidóptero *Agrotis ipsilon* se alimentó de *L. arundinaceum* hospedante de *N. coenophialum* fue menos susceptible a un nematodo entomopatógeno (*Steinernema carpocapsae*). Este efecto se produjo debido a que los alcaloides producidos por el endofito fueron tóxicos para una bacteria simbiote de los nematodes (Kunkel et al. 2004, Richmond y Bigelow 2009). Se ha observado que la presencia de endofitos modifica la abundancia de especies y grupos de organismos particulares del suelo (Ej.: Franzluebbbers y Hill 2005, Lemons et al. 2005, Van Hecke et al. 2005, Jenkins et al. 2006, Buyer et al. 2011, Casas et al. 2011). El trabajo de Grewal et al. (1995) sugiere que las larvas de escarabidos son más susceptibles a nematodes cuando se alimentan de raíces de *L. arundinaceum* hospedantes de *N. coenophialum*. En un experimento similar, Koppenhöfer y Fuzy (2003) no encontraron efectos. Si bien es especulativo, las tendencias observadas y los resultados de otros experimentos sugieren que los efectos podrían transmitirse entre niveles tróficos. Mientras los resultados de este capítulo no dan cuenta de una asociación clara entre los grupos, aun hacen falta trabajos que ayuden a dilucidar el impacto de esta simbiosis sobre las relaciones tróficas del suelo y las tasas de descomposición y mineralización.

La presencia de la simbiosis a través de cambios en la condiciones del ambiente aumentó la riqueza y la diversidad de grupos taxonómicos de las comunidades del suelo asociadas a la broza radicular. La producción de alcaloides explicó una mayor abundancia, riqueza y diversidad de artrópodos aéreos asociadas a *Achnatherum robustum* hospedantes de endofitos (Jani et al. 2010). Faeth et al. (2010) encontraron mayor riqueza de artrópodos descomponedores en plantas de *Festuca arizonica* hospedantes endofitos. En este capítulo, la riqueza y la diversidad también fueron mayores en profundidad en los ambientes donde crecieron plantas de *L. multiflorum* hospedantes del endofito *N. occultans*. Aunque la concentración de alcaloides no fue determinada, los mecanismos a través de los cuales los endofitos afectan a las comunidades aéreas y del suelo podrían ser similares. Como se discutió antes, algunos compuestos secundarios podrían ser transportados y exudados a través del sistema radicular (Ponce et al. 2009)[(Koulman et al. 2007)-peraminas en tejidos aéreas].

Algunos trabajos critican fuertemente el sesgo en el estudio de unas pocas simbiosis y limitan las posibilidad de arribar a generalizaciones al sostener que el resultado de la relación depende fuertemente de la genética de los simbiontes y del ambiente que exploran (Faeth y Fagan 2002, Saikkonen et al. 2004, Müller y Krauss 2005, Faeth y Hamilton 2006, Saikkonen et al. 2006, Cheplick 2007, Rasmussen et al. 2007, Cheplick y Faeth 2009, Rudgers y Orr 2009). Los estudios en general se han centrado en la relación entre *L. arundinaceum* y *N. coenophialum*. En conjunto, estos trabajos sugieren

que la presencia de *N. coenophialum* modifica el ambiente del suelo, reduce las tasas de descomposición, aumenta la biomasa microbiana, reduce las tasas de mineralización y favorece el secuestro de carbono (Franzluebbers et al. 1999, Franzluebbers y Stuedemann 2005, Van Hecke et al. 2005, Jenkins et al. 2006, Buyer et al. 2011, Handayani et al. 2011, ver revisión de Omacini et al. 2011, Iqbal et al. 2012). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan en gran medida con las evidencias sobre *L. arundinaceum* mencionadas anteriormente a pesar que los efectos de la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans* fueron sutiles al igual que en trabajos previos del mismo grupo de trabajo con esta simbiosis (Omacini et al. 2004, Uchitel 2008, Casas et al. 2011). Además, el efecto de *N. occultans* sobre la riqueza fue consistente con los efectos sobre la riqueza de artrópodos para otras relaciones pasto-endofito menos estudiadas (Faeth y Shochat 2010, Jani et al. 2010). La riqueza aumentó en el ambiente aéreo con la presencia de *Neotyphodium* sp. en *Achnatherum robustum* (Jani et al. 2010) y, en el ambiente del suelo con la presencia de *Neotyphodium* sp. en *Festuca arizonica* (Faeth y Shochat 2010) y *L. multiflorum* (este capítulo). Por otro lado, estos resultados fueron consistentes para relaciones pasto-endofitos con perfiles de compuestos secundarios disímiles (Rasmussen et al. 2008, Jani et al. 2010). Estas consistencias contradicen las críticas anteriores y contribuyen a entender el significado ecológico de estas simbiosis dentro de un marco más amplio en el que se consideran otros pastos hospedantes.

Este capítulo es un avance en entender cómo organismos aéreos en apariencia no relacionados con los organismos del suelo pueden en realidad, tener un impacto importante en la organización y funcionamiento de sus comunidades. *Lolium multiflorum*, posee un amplio rango de distribución e importancia en pastizales naturalizados y pasturas (D'Angela et al. 1986, Omacini et al. 1995, Trebino et al. 1996, Chaneton et al. 2002, Tognetti 2010) y en consecuencia, el aporte de broza y detritos de esta especie puede ser importante en estas comunidades. En este sentido, es importante entender cómo y en qué medida la presencia del endofito puede modular el funcionamiento y, los grupos tróficos del suelo. Los resultados presentados sugieren que la simbiosis *L. multiflorum* - *N. occultans* influye sobre los grupos tróficos del suelo al menos a través de dos vías: el ambiente del suelo y la broza aérea (desestimando a la broza radicular). Además, los efectos podrían propagarse a través de relaciones tróficas aun en el corto tiempo dado por una estación de crecimiento (Buyer et al. 2011). Es necesario integrar aspectos bioquímicos para comprender mejor los mecanismos específicos y su relación con los impactos ecológicos de estas simbiosis y sus posibles consecuencias sobre los flujos de materia y energía en el ecosistema.

**CAPÍTULO 3 INTERACCIONES MÚLTIPLES: LA SIMBIOSIS
LOLIUM MULTIFLORUM - *NEOTYPHODIUM OCCULTANS* Y EL
PASTOREO PUEDEN MODULAR LA ACTIVIDAD Y A LOS
ORGANISMOS DEL SUELO EN DISTINTOS AMBIENTES**

3.1 INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones entre especies es central para comprender la complejidad de los ecosistemas (Paine 1980, Hunter y Price 1992, Polis y Winemiller 1996, Berlow et al. 2004, Hooper et al. 2005, Wardle 2006). Mientras en el pasado se consideraban sólo las interacciones que involucran a pares de especies dentro de uno o dos niveles tróficos, principalmente la competencia y la herbivoría, en los últimos años ha crecido el interés por otras interacciones y por incorporar los efectos indirectos sobre otras especies presentes en la comunidad (Ej.: Mueller et al. 2001, van der Putten et al. 2001, Gange y Brown 2002, Stanton 2003, Strauss y Irwin 2004, Strauss et al. 2004, Mack y Rudgers 2008, Hartley y Gange 2009, Larimer et al. 2010).

Las plantas responden al daño por herbívoros mediante cambios en la producción de compuestos aleloquímicos, la concentración de nutrientes, el crecimiento, la morfología y la fenología (Wardle et al. 2004b, Bardgett et al. 2005, Bazot et al. 2005, Bezemer y van Dam 2005, ver revisión en Ohgushi 2005, Belesky et al. 2010). A través de cualquiera de estos efectos, la herbivoría puede influir de manera indirecta sobre el suelo. Por ejemplo, se ha observado que, de manera inmediata, el pastoreo aumenta la deposición de compuestos radiculares (Holland et al. 1996, Paterson et al. 2005), la biomasa microbiana (Bardgett et al. 1998, Bardgett y Chan 1999, Guitian y Bardgett 2000, Hamilton y Frank 2001, Mikola et al. 2001a); la abundancia de organismos consumidores (Mikola et al. 2001a, Mikola et al. 2001b, Hokka et al. 2004, Ilmarinen et al. 2005) y la colonización micorrícica (Hokka et al. 2004). En consecuencia, la relación planta-herbívoro en la parte aérea tiene un impacto importante sobre la estructura y la dinámica de las redes tróficas de la rizosfera (Bardgett et al. 1998, Frank et al. 2000, Guitian y Bardgett 2000, Hamilton y Frank 2001, Mikola et al. 2001b, Bardgett y Wardle 2003, Wardle et al. 2004a, Wardle et al. 2004b, Ilmarinen et al. 2005, Hamilton III et al. 2008). Estos mecanismos podrían asegurar la disponibilidad de nutrientes que la planta defoliada necesita para recuperar rápidamente los tejidos (Bardgett et al. 1998) y eventualmente alcanzar el crecimiento compensatorio (Hamilton y Frank 2001, Mikola et al. 2001b, Hamilton III et al. 2008).

Una relación aérea menos estudiada que la herbivoría, es la que se establecen los hongos endofitos del género *Neotyphodium* con numerosos pastos de clima templado. Estos simbioses también generan múltiples cambios en el hospedante y su rizosfera afectando la actividad y estructura de la comunidad del suelo (ver Capítulo 2)(Omacini et al. 2011). La simbiosis *L. multiflorum* - *N. occultans* es muy frecuente en pastizales y pasturas de la región Pampeana en Argentina (De Battista 2005, Gundel et al. 2009) (Casas, observación personal). Dado que *L. multiflorum* es una especie palatable de alta calidad y, que el endofito que hospeda no genera toxicidad para el ganado (Sugawara et al. 2006), es muy común encontrar esta simbiosis naturalizada o sembrada en el contexto de diferentes niveles de pastoreo.

La estructura de la red trófica del suelo y los procesos regulados por ésta afectan el crecimiento de las plantas lo que a su vez altera la calidad, la cantidad y la disponibilidad de recursos, que dan sustento a los organismos del suelo (Wardle et al. 1997, de Ruiter et al. 1998, Scheu et al. 1999, Bardgett et al. 2001, Moore et al. 2004, Poveda et al. 2007). En la última década se ha empezado a reconocer la importancia de grupos tróficos particulares del suelo como determinantes de la descomposición, el ciclado de nutrientes y el crecimiento de las plantas (Mikola y Setälä 1998, Laakso y Setälä 1999, Bardgett et al. 2005). Los nematodos constituyen el grupo más abundante dentro de la mesofauna del suelo y ocupan diversas posiciones en la red trófica del suelo

(Yeates et al. 1993, Bongers y Ferris 1999, Ferris et al. 2001). A una escala local, los nematodos son útiles indicadores de las condiciones biológicas y físico-químicas del suelo (Yeates et al. 1993, Yeates y Bongers 1999, Yeates et al. 1999, Ferris et al. 2001). Además, se ha mostrado que la historia de uso del suelo asociada a la prácticas de manejo tienen una influencia mayor que los cambios actuales sobre las comunidades de nematodos en el corto plazo (Korthals et al. 2001).

El sesgo hacia el estudio de relaciones aisladas ha descuidado cuestiones como si la presencia del pastoreo potencia o debilita los efectos de la simbiosis *L. multiflorum* - *N. occultans* sobre la red trófica del suelo. Estudios recientes revelan que el pastoreo podría reducir la eficiencia de transmisión de *N. occultans* de planta a semilla en *L. multiflorum* (García Parisi et al. 2011) lo que podría modificar drásticamente los resultados de las relaciones consideradas de forma aislada. Este proceso no explicaría la persistencia de la simbiosis en pastizales o incluso el aumento en la frecuencia de plantas de *L. arundinaceum* hospedantes de *N. coenophialum* bajo pastoreo descrito por varios autores (Clay et al. 2005, Koh y Hik 2007). Sin embargo, el pastoreo, al reducir la capacidad fotosintética de la planta (Holland y Detling 1990), podría generar condiciones de estrés de carbono que a su vez, limitarían el metabolismo y/o el crecimiento de los endofitos y podrían debilitar los efectos de la simbiosis sobre otros organismos de la comunidad.

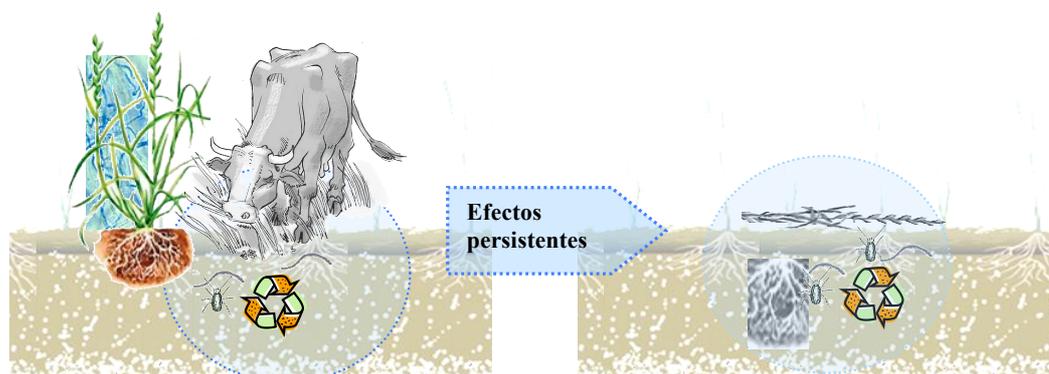


Figura 3.1: el esquema representa cómo la presencia de plantas con alta frecuencia de endofitos puede generar cambios en la estructura y el funcionamiento de las comunidades del suelo al final del ciclo de la planta y en qué medida estos cambios pueden ser modulados por el pastoreo previo de las plantas hospedantes.

Este capítulo tiene por objetivo evaluar los efectos de la interacción entre el pasto, el endofito y el pastoreo sobre los grupos tróficos y procesos clave del suelo. De un modo específico, se evaluará en qué medida el impacto de la relación entre *L. multiflorum*, *N. occultans* y los herbívoros puede persistir en el ambiente edáfico después del ciclo de vida de la planta modulando la abundancia de nematodos clasificados en distintos grupos tróficos y, los procesos de descomposición de broza y de mineralización de nitrógeno (**Figura 3.1**). En particular se puso a prueba la hipótesis que la presencia de *N. occultans* en *L. multiflorum* reduce la tasa de descomposición y de mineralización así como la abundancia de los grupos tróficos de nematodos relacionados con los hongos del suelo (Capítulo 2 de esta tesis). Además, se postula que el pastoreo reduce el

impacto de la simbiosis sobre la actividad y los grupos tróficos del suelo considerando que el pastoreo remueve tejidos aéreos y al hongo endofito alojado en ellos (Philipson y Christey 1986). En este capítulo, las hipótesis serán evaluadas en contextos generados por distintas historias de uso sobre un mismo ambiente original teniendo en cuenta que el contexto puede modificar los efectos de los endofitos (Vicari et al. 2002, Jenkins et al. 2006, Culman et al. 2010, Buyer et al. 2011).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Diseño experimental

Se realizó un experimento bajo condiciones ambientales naturales de luz, temperatura y riego en el jardín experimental de la Cátedra de Ecología de la FAUBA. El diseño experimental fue en bloques completos aleatorizados. En un arreglo factorial se manipuló la frecuencia de endofitos en la población de *Lolium multiflorum* (alta: E+ ó baja: E- frecuencia) y, el pastoreo (presencia: P+ ó ausencia: P-. **Figura 3.2**). Las unidades experimentales consistieron en microcosmos de 0,25 m x 0,25 m x 0,20 m de profundidad rellenos con suelo traído previamente del campo (Un total de 24 unidades experimentales para cada historia de uso. Ver más adelante).

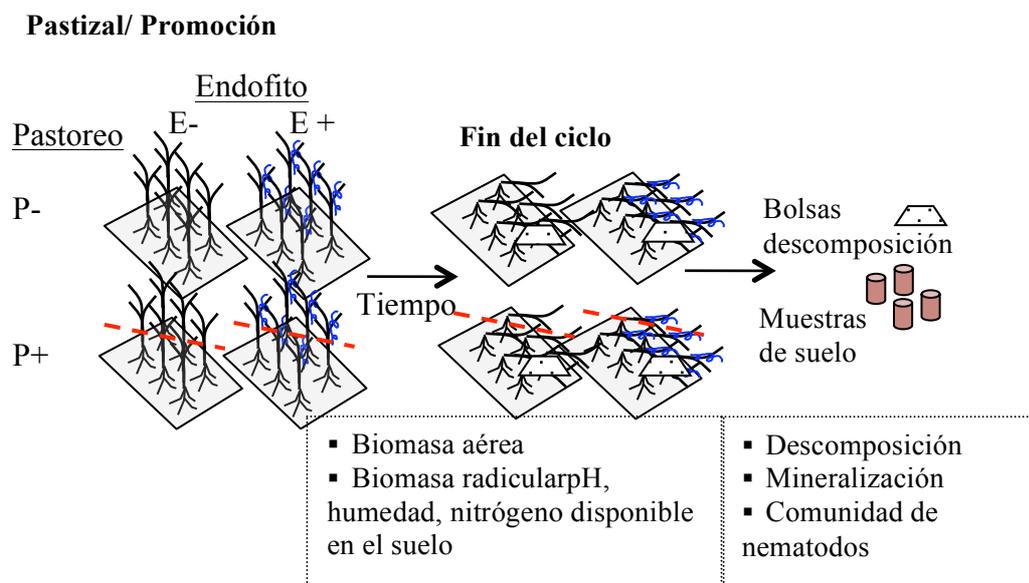


Figura 3.2: diseño de los experimentos en el que plantas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos fueron cultivadas en un mismo tipo de suelo con dos historias de uso: suelos provenientes de un pastizal o de una promoción de *L. multiflorum*. Las plantas de *L. multiflorum* estuvieron sometidas o no a pastoreo simulado (P+ o P-, respectivamente) mediante dos eventos de corte y pisoteo (descritos en el cuerpo de texto de la sección “Materiales y métodos”). Al final del ciclo de vida de las plantas se determinó la biomasa aérea y radicular; el pH, la humedad y el nitrógeno disponible en el suelo. Se realizaron mediciones de la tasa de descomposición, la tasa potencial de mineralización y, la estructura de la comunidad de nematodos. Las líneas curvas de color azul en el esquema simbolizan al hongo endofito *Neotyphodium occultans* en simbiosis con plantas de *L. multiflorum*. Vale aclarar que es una representación de la relación simbiótica dado que, el hongo endofito se aloja en el interior de tejidos aéreos sin generar estructuras externas ni síntomas visibles. Las líneas punteadas en rojo simbolizan el pastoreo simulado.

3.2.2 Origen de los suelos utilizados

Los experimentos se realizaron con suelos de la misma clasificación taxonómica de dos sitios aledaños de la Pampa Deprimida con distinta historia de uso [Hapludol típico, franco arenoso de la serie Bolívar (Bv 9)]. Uno de los suelos correspondió a un ambiente de pastizal natural, sin disturbio antrópico, dominado por pastos nativos (denominado Pastizal, en adelante). El otro suelo correspondió a un ambiente de promoción de *L. multiflorum* con disturbio antrópico (Promoción, en adelante). La práctica de promoción consiste en sacar al ganado durante la primavera para que las plantas de *L. multiflorum* produzcan la mayor cantidad de semillas posibles y, durante el otoño siguiente, favorecer su establecimiento (generalmente, se realizan aplicaciones de glifosato para reducir la competencia) (Rodríguez y Jacobo 2010). Se generan así, pasturas casi mono-específicas de *L. multiflorum* que tienen como propósito cubrir la baja productividad de forraje durante el invierno. Particularmente, en este ambiente se realizaron promociones durante al menos, cuatro años consecutivos antes de transportar el suelo para el experimento. Las promociones se realizaron mediante la aplicación de glifosato en el mes de febrero. La dosis de glifosato dependió de la cantidad de malezas. Normalmente, las primeras aplicaciones fueron de 4 l.ha⁻¹ (esta dosis se redujo a medida que la competencia de malezas bajó). Además, se aplicaron herbicidas durante la primera quincena de abril. La dosis de los herbicidas 2-4 DB-ester y Flumetsulan (nombre comercial, Preside) fueron de 0,5 y 0,20 l.ha⁻¹, respectivamente (Poder residual de 20-30 días) y la aplicación estuvo determinada por la densidad y el tamaño de malezas dicotiledóneas [Ej.: *Carduus acanthoides* (cardo), *Echium plantagineum* (flor morada), *Rumex crispus* (lengua de vaca)] (Comunicación personal de la persona a cargo del manejo del lote).

Ambas historias de uso generaron dos ambientes distintos para el crecimiento de las plantas. Los ambientes fueron caracterizados antes del experimento. Se tomaron muestras de suelo (n= 3) que fueron tamizadas [2 mesh (número de poros en una pulgada lineal)] y enviadas a laboratorio (Cátedra de Edafología de la FAUBA). Se determinó el carbono orgánico (método Walkley y Black), el nitrógeno total (Nt, Kjeldahl), el pH y la capacidad de retención hídrica. No se encontraron diferencias entre los suelos para ninguna de las variables (nivel de significancia del 5 %). **Cuadro 3.1**. Para caracterizar la vegetación se utilizó una aproximación simplificada al método de Braun-Blanquet. La cobertura de las especies se estimó en porcentaje respecto del parche de vegetación evaluado. Aquellas especies que fueron observadas una única vez en el parche fueron consideradas raras.

3.2.3 Tratamientos

Para generar los tratamientos con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de endofitos, se utilizaron semillas de *Lolium multiflorum* que fueron generadas de la misma manera que fue descrito en el capítulo 2. Los mesocosmos se sembraron manualmente a una densidad de 3000 plantas.m⁻² (equivalente a 200 plantas.mesocosmo⁻¹) a principio de mayo de 2006. El tratamiento de Pastoreo (P+) fue simulado durante el período vegetativo de las plantas respetando una frecuencia de corte representativa en sistemas de pastoreo rotativo de la región pampeana [a los 40 y a los 130 dds (días desde siembra)] (Giordani 1973). Para simular el pastoreo, la biomasa aérea de *L. multiflorum* fue cortada con tijera hasta los 6 cm de altura. Se simuló además, el pisoteo del ganado con una pezuña artificial (adaptación a la metodología utilizada por Striker et al. 2006).

Cuadro 3.1: características de los ambientes de pastizal natural y promoción de *L. multiflorum* utilizados en los experimentos. Las determinaciones analíticas para el suelo se realizaron sobre tres muestras al inicio de los experimentos. La cobertura de especies se estimó como porcentaje del parche de vegetación. Se consideró rara (R) a especies observadas una única vez en el parche de vegetación.

	Pastizal	Promoción
Características analíticas del suelo		
Carbono orgánico (%)	4,11 ($\pm 0,02$) ^a	2,86 ($\pm 0,31$) ^a
Nitrógeno total (%)	0,42 ($\pm 0,07$) ^a	0,3 ($\pm 0,03$) ^a
Nitrógeno mineral ($\mu\text{g N.g suelo}^{-1}$)	21,41 ($\pm 2,92$) ^a	19,11 ($\pm 2,34$) ^a
PH	6,12 ($\pm 0,02$) ^a	6,17 ($\pm 0,33$) ^a
Capacidad de retención hídrica (%)	36,6 ($\pm 5,6$) ^a	25,65 ($\pm 1,23$) ^a
Vegetación (% cobertura aérea)		
<i>Lolium multiflorum</i> .	-	90*
<i>Bromus unioloides</i>	75	R
<i>Carduus acanthoides</i>	1	≤ 5
<i>Cynodon dactylon</i>	25	≤ 5
<i>Paspalum dilatatum</i>	5	-
<i>Ammi majus</i>	-	≤ 3
<i>B. mollis</i>	R	-
<i>Setaria</i> sp.	R	-
<i>Silybum marianum</i>	-	R
<i>Sonchus</i> sp.	R	-

*Las plantas de *L. multiflorum* tuvieron alta frecuencia de endofitos (superior al 95 %, n= 30)

3.2.4 Determinaciones

3.2.5 Biomasa de las plantas de *Lolium multiflorum* y análisis de suelo

Al final del ciclo de vida de las plantas se estimó la biomasa aérea y radicular (mediados de diciembre de 2006). Las estimaciones se realizaron en base a una sub-muestra tomada al azar con un cilindro de 30 cm² de superficie y 5 cm profundidad. La biomasa aérea de *L. multiflorum* fue estimada a partir del material dentro del cilindro y la biomasa radicular, a partir de las raíces contenidas en el cilindro después de separar el suelo. La biomasa se secó en estufa (60 °C, 48 h) y se pesó (con una precisión de $\pm 0,01$ g). Ambos valores de biomasa se expresan en kg.m⁻². Los valores de biomasa aérea son totales: incluyen al material extraído con los cortes y fue secado en la estufa de la misma manera. El suelo separado de las raíces fue tamizado (2 mesh). Se determinó el pH y la capacidad de retención hídrica (Laboratorio de la Cátedra de Edafología de la FAUBA). La densidad de raíces fue muy alta en todo el volumen del cilindro y el suelo obtenido fue considerado rizosférico.

3.2.6 Mineralización

La tasa potencial de mineralización de nitrógeno se determinó a partir del contenido de N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺ en la solución del suelo. Se tomaron dos sub-muestras de 10 g de suelo seco. Una fue utilizada para la determinación inicial y la segunda fue incubada en cámara a 25 °C durante 28 días (Robertson et al. 1999). Se realizaron extracciones (filtrado con solución de ClK 2 M) y se cuantificó la concentración de N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺ de las dos muestras [detector de elementos LECO TruSpec CN (Leco Corp., St. Joseph, MI)]. La tasa de mineralización se calculó como la diferencia de contenido de

nitrógeno entre las dos muestras (incubada-inicial), dividido los días de incubación. Los valores se expresan en $\mu\text{g N.g suelo}^{-1}.\text{día}^{-1}$. El nitrógeno disponible en el suelo correspondió a la determinación inicial y se expresa como $\mu\text{g N. g suelo}^{-1}$.

3.2.7 Descomposición

La tasa de descomposición se determinó *in situ* (Harmon et al. 1999) a través de la pérdida de broza de *Bromus unioloides* (1 g) contenida en bolsas cribadas (10 cm x 5 cm y poro de 2 mm). El tamaño de la malla de las bolsas permitió el acceso de la microfauna y la mesofauna del suelo. Una vez finalizado el ciclo de *Lolium multiflorum* se colocó una bolsa sobre la superficie del suelo de cada mesocosmo (**Figura 3.2**). El manto de broza producido a lo largo del ciclo de *L. multiflorum* se homogeneizó dejando igual cantidad de broza sobre las bolsas de descomposición. Las bolsas se retiraron a los 135 días (febrero-mayo de 2007) y, el material recuperado de cada una fue secado (60 °C, 48 h) y pesado (con una precisión de $\pm 0,01$ g). La descomposición se estimó a partir de los valores de biomasa remanente en las bolsas expresado como porcentaje del contenido inicial (%).

3.2.8 Origen de la broza de *Bromus unioloides*

La broza de *Bromus unioloides* se obtuvo a partir de material muerto en pie en el jardín experimental de la Cátedra de Ecología de la FAUBA. La especie *B. unioloides* es nativa, considerada bianual o cortamente perenne y similar a *L. multiflorum* por su fenología, tamaño, hábito de crecimiento y requerimientos ambientales. A diferencia de *L. multiflorum*, *B. unioloides* no establece naturalmente relaciones con hongos endofitos del género *Neotyphodium*. En consecuencia, la broza de *B. unioloides* permitió evaluar el ambiente generado por plantas de *L. multiflorum* con alta o baja frecuencia de endofitos sobre un sustrato común sin la interferencia del endofito en la calidad de la broza que se descompone (ver Omacini et al. 2004).

3.2.9 Estructura de la comunidad de nematodos del suelo:

Para caracterizar la comunidad de nematodos al final del ciclo de vida de *L. multiflorum*, se tomó una muestra de suelo con un cilindro idéntico al anterior a los 260 dds. Las muestras se procesaron siguiendo la técnica de flotación-centrifugación modificada (Shurtleff y Averre III 2000). Se realizaron recuentos sobre 100 cm^3 de muestra. Los nematodos fueron determinados hasta el nivel de género o familia utilizando un microscopio de luz invertida y luego fueron asignados a grupos tróficos según el aparato bucal en: fitófagos (*Pratylenchus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Peltamigratus* sp., *Criconemoides* sp.), fungívoros (*Tylenchus* sp.), bacteriófagos (*Rhabditis* sp.), omnívoros (*Dorilaymus* sp.) y depredadores (*Mononchus* sp.) (Yeates et al. 1993). Los nematodos constituyen el grupo más abundante dentro de la mesofauna del suelo y de cada muestra es posible extraer una gran cantidad y diversidad de nematodos. Estos organismos pueden ser capturados y separados por procedimientos de extracción sencillos y, además, son fáciles de identificar a partir de caracteres morfológicos y anatómicos. Debido a que sus hábitos de alimentación están claramente relacionados con la estructura bucal, sus funciones tróficas son fáciles de inferir (Yeates et al. 1993, Bongers y Ferris 1999, Ferris et al. 2001).

3.2.10 Análisis estadístico

Los datos de cada uno de los ambientes (i.e. pastizal y promoción) fueron analizados en forma separada. Las medidas iniciales de suelo (carbono orgánico, nitrógeno total,

pH y humedad) se compararon mediante un análisis de la varianza que incluyó al ambiente como factor fijo. Las demás comparaciones se realizaron mediante modelos lineales mixtos. Se utilizó la función lme [incluida en el paquete nlme (Pinheiro y Bates 2000, Pinheiro et al. 2009)]. Los valores de biomasa aérea, biomasa radicular, pH, nitrógeno mineral, tasa potencial de mineralización, broza remanente y, abundancia de nematodos fitófagos, bacteriófagos, fungívoros, omnívoros y depredadores fueron comparados mediante un modelo que consideró Endofito y Pastoreo como factores fijos; y los bloques como factor aleatorio. El supuesto de normalidad fue evaluado mediante la función shapiro.test (paquete basic) con los residuos de los modelos [shapiro.test(residuals(modelo))]. El supuesto de homogeneidad de varianzas fue evaluado mediante la función leveneTest [del paquete car (Fox 2009)] para los tratamientos (combinación de los niveles de los factores). Los valores de biomasa aérea, nematodos bacteriófagos y nematodos fungívoros de los ambientes de pastizal y, los valores de biomasa radicular y nematodos depredadores de los ambientes de promoción fueron transformados por el (logaritmo $(x+1)$) para cumplir con los supuestos de los modelos de análisis utilizados. La transformación por el ranking fue utilizada para nematodos omnívoros y depredadores de los ambientes de promoción. Las comparaciones *a posteriori* se realizaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$) con la función glht [paquete multcomp (Hothorn et al. 2008)]. Los resultados se presentan como los promedios no transformados de las repeticiones según corresponda \pm error estándar.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para evaluar la asociación entre diferentes variables del suelo (pH, humedad, nitrógeno disponible) y las plantas de *L. multiflorum* (biomasa aérea y radicular) con la actividad (mineralización potencial y descomposición) y la abundancia de cada uno de los grupos tróficos de nematodos del suelo. Para este análisis, se confeccionaron matrices separadas para cada uno de los ambientes. Todos los análisis fueron realizados con el programa R-cran, versión 2.10 (R Development Core Team 2007).

3.3 RESULTADOS

Mientras la presencia del endofito no tuvo efectos significativos, el pastoreo redujo la biomasa de las plantas de *Lolium multiflorum* y, los valores de pH, humedad y nitrógeno mineral del suelo en los ambientes con historia de pastizal y promoción. Solo la biomasa radicular de *L. multiflorum* en el pastizal dependió de la interacción entre el endofito y el pastoreo. El pastoreo redujo la biomasa radicular en ausencia del endofito (E-) y no tuvo efectos en presencia del endofito (E+) (**Cuadro 3.3**).

Mientras la presencia del endofito en *L. multiflorum* no modificó la tasa de mineralización de nitrógeno, el pastoreo la redujo en un 25 % y en un 38 % en el suelo con historia de pastizal y de promoción, respectivamente (**Cuadro 3.2**). La broza remanente de *Bromus unioloides* no dependió de la presencia del endofito ni del pastoreo en el suelo con historia de pastizal o de promoción (**Figura 3.3**).

La presencia del endofito no generó cambios en la abundancia de nematodos del suelo en ninguno de los grupos tróficos en los ambientes generados por la historia de pastizal o promoción (**Cuadro 3.4**, **Figura 3.4** y **Figura 3.5**). El pastoreo tendió a reducir o redujo a la mitad la abundancia de nematodos fitófagos en el suelo con historia de pastizal o promoción, respectivamente (**Figura 3.4** a y b). El pastoreo tendió a aumentar la abundancia de nematodos bacteriófagos en el suelo con historia de

promoción pero no, en el suelo son historia de pastizal (**Figura 3.4 c y d**). No hubo efectos debidos a la presencia del endofito o al pastoreo en la abundancia de nematodos fungívoros (**Figura 3.4 e y f**), omnívoros y depredadores (**Figura 3.5**) en los suelos con historia de pastizal o promoción.

Cuadro 3.2: resultado de los modelos estadísticos para los efectos de Endofito y Pastoreo sobre la tasa potencial de mineralización ($\mu\text{g N. g suelo}^{-1}.\text{día}^{-1}$) y la biomasa remanente de *B. uniolooides* (%. bolsa⁻¹). Los ambientes generados por historia de uso: pastizal y promoción de *L. multiflorum* fueron analizados de manera independiente. El cuadro muestra el estadístico, los grados de libertad asociados ($F_{1,15}$) y el valor de probabilidad (p).

Pastizal				
	Mineralización potencial		Biomasa remanente	
	$F_{1,15}$	P	$F_{1,15}$	p
Pastoreo (P)	12,63	0,003	0,92	0,352
Endofito (E)	0,19	0,670	0,11	0,740
P x E	0,58	0,459	0,01	0,912

Promoción				
	Mineralización potencial		Biomasa remanente	
	$F_{1,15}$	P	$F_{1,15}$	p
Pastoreo (P)	19,77	0,001	0,02	0,886
Endofito (E)	0,82	0,378	0,81	0,380
P x E	1,82	0,197	4,04	0,063

Los coeficientes de correlación indicaron algunas asociaciones entre variables La biomasa radicular estuvo asociada positivamente con la tasa de mineralización potencial y la abundancia de nematodos fitófagos en los suelos con historia de pastizal y de promoción (**Cuadro 3.5** y **Cuadro 3.6**). Los parámetros que describieron al ambiente del suelo (pH, nitrógeno mineral disponible y humedad) no estuvieron asociados a la actividad de los organismos o, a la abundancia de los distintos grupos tróficos de nematodos en el suelo con historia de pastizal (**Cuadro 3.5**). En cambio, el nitrógeno mineral disponible estuvo asociado negativamente con la tasa de mineralización potencial y la abundancia de nematodos depredadores, y positivamente con la abundancia de nematodos omnívoros en el suelo con historia de promoción. Otras asociaciones entre las variables no estuvieron vinculadas a los efectos de los endofitos o del pastoreo (**Cuadro 3.6**).

Cuadro 3.3: valores medios (\pm error estándar) para las biomásas aérea y radicular de las plantas de *L. multiflorum* y, los valores de pH, humedad y nitrógeno mineral del suelo. Los ambientes generados por historia de uso: pastizal o promoción de *L. multiflorum* fueron analizados de manera independiente. Las letras P y E en los encabezados de las columnas indican los tratamientos de Pastoreo (P- y P+) y frecuencia de infección con Endofitos (E- y E+). Letras distintas dentro de las celdas indican diferencias significativas para las comparaciones por fila (valor- $p < 0,05$).

	Pastizal			
	P-		P+	
	E-	E+	E-	E+
Biom. aérea de Lm ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	7,15 ($\pm 0,82$) ^a	6,87 ($\pm 1,38$) ^a	1,76 ($\pm 0,20$) ^b	1,55 ($\pm 0,36$) ^b
Biom. radicular de Lm ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	1,24 ($\pm 0,08$) ^a	0,97 ($\pm 0,07$) ^{ab}	0,76 ($\pm 0,09$) ^b	0,96 ($\pm 0,16$) ^{ab}
pH	6,95 ($\pm 0,18$) ^a	6,97 ($\pm 0,11$) ^a	6,42 ($\pm 0,13$) ^b	6,31 ($\pm 0,17$) ^b
Humedad (%)	36,49 ($\pm 1,85$) ^a	36,13 ($\pm 0,97$) ^a	28,75 ($\pm 1,31$) ^b	28,69 ($\pm 2,21$) ^b
N mineral ($\mu\text{gN}\cdot\text{g suelo}^{-1}$)	50,45 ($\pm 5,78$) ^a	52,41 ($\pm 7,57$) ^a	39,48 ($\pm 3,70$) ^b	40,89 ($\pm 4,13$) ^b

	Promoción			
	P-		P+	
	E-	E+	E-	E+
Biom. aérea de Lm ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	3,7 ($\pm 0,67$) ^a	5,2 ($\pm 0,97$) ^a	1,3 ($\pm 0,26$) ^b	1,1 ($\pm 0,21$) ^b
Biom. radicular de Lm ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	0,81 ($\pm 0,13$) ^a	1,29 ($\pm 0,23$) ^a	0,70 ($\pm 0,11$) ^b	0,68 ($\pm 0,08$) ^b
pH	7,27 ($\pm 0,09$) ^a	7,45 ($\pm 0,15$) ^a	6,92 ($\pm 0,14$) ^b	7,09 ($\pm 0,12$) ^b
Humedad (%)	29,00 ($\pm 1,59$) ^a	28,17 ($\pm 1,90$) ^a	17,12 ($\pm 0,87$) ^b	15,77 ($\pm 2,08$) ^b
N. mineral ($\mu\text{gN}\cdot\text{g suelo}^{-1}$)	30,66 ($\pm 3,51$) ^a	27,22 ($\pm 3,32$) ^a	24,76 ($\pm 3,52$) ^b	20,89 ($\pm 2,01$) ^b

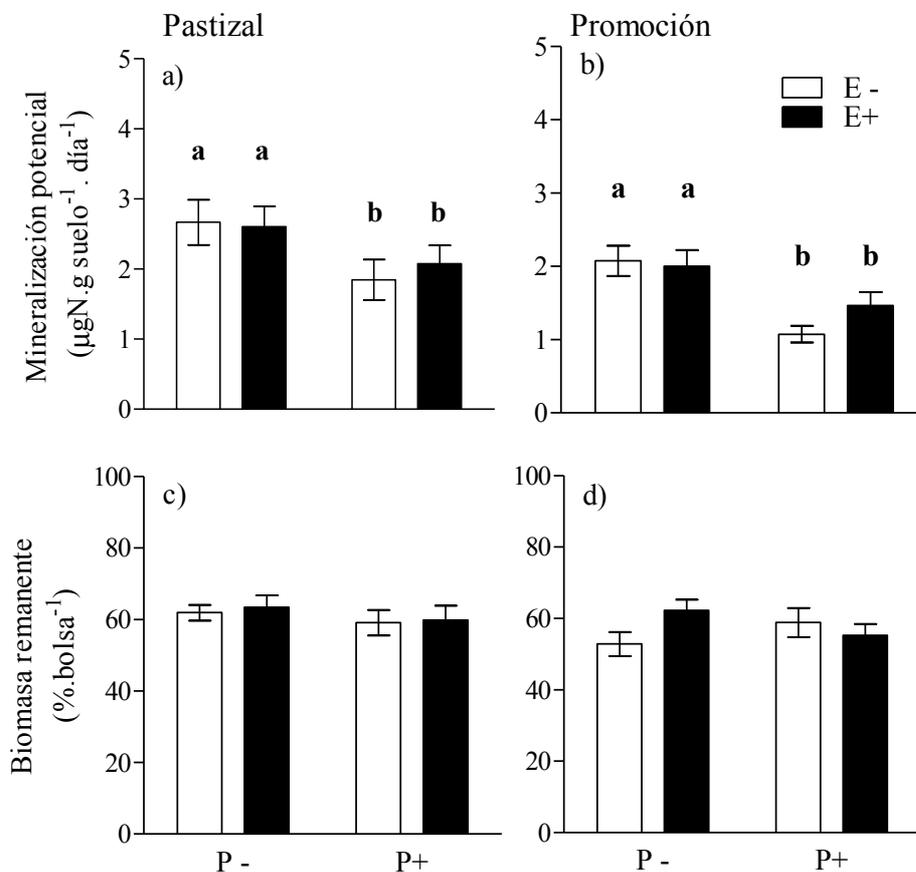


Figura 3.3: tasa potencial de mineralización de nitrógeno (a, b) y broza remanente de *B. unioides* (c, d) al final del ciclo de vida de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de endofitos en contextos definidos por el pastoreo (P+: pastoreado o P-: no pastoreado). Las variables fueron medidas en ambientes generado por la historia de uso: pastizal (panel de la izquierda) o promoción de *L. multiflorum* (panel de la derecha). Las barras muestran el promedio ($n=6 \pm$ error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($p < 0,05$. Prueba de Tukey).

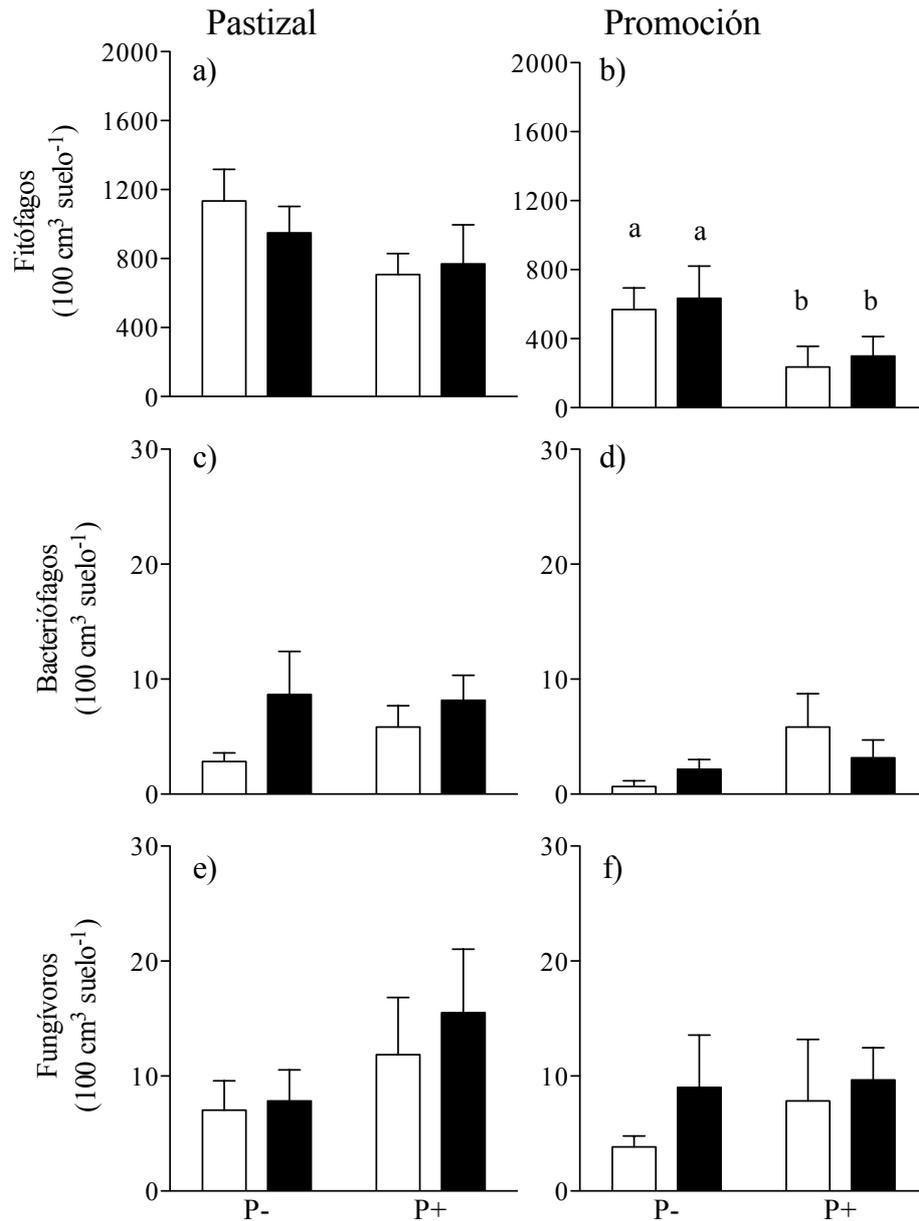


Figura 3.4: abundancia de nematodos al final del ciclo de vida de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de endofitos en contextos definidos por el pastoreo (P+: pastoreado o P-: no pastoreado). Los paneles muestran la abundancia de nematodos de fitófagos (a, b), bacteriófagos (c, d) y fungívoros (e, f) en 100 cm³ de suelo. Las variables fueron medidas en ambientes generado por la historia de pastizal (a la izquierda) o de promoción de *L. multiflorum* (a la derecha). Las barras muestran el promedio (n= 6, ± error estándar). Letras distintas indican diferencias entre tratamientos (p<0,05. Prueba de Tukey).

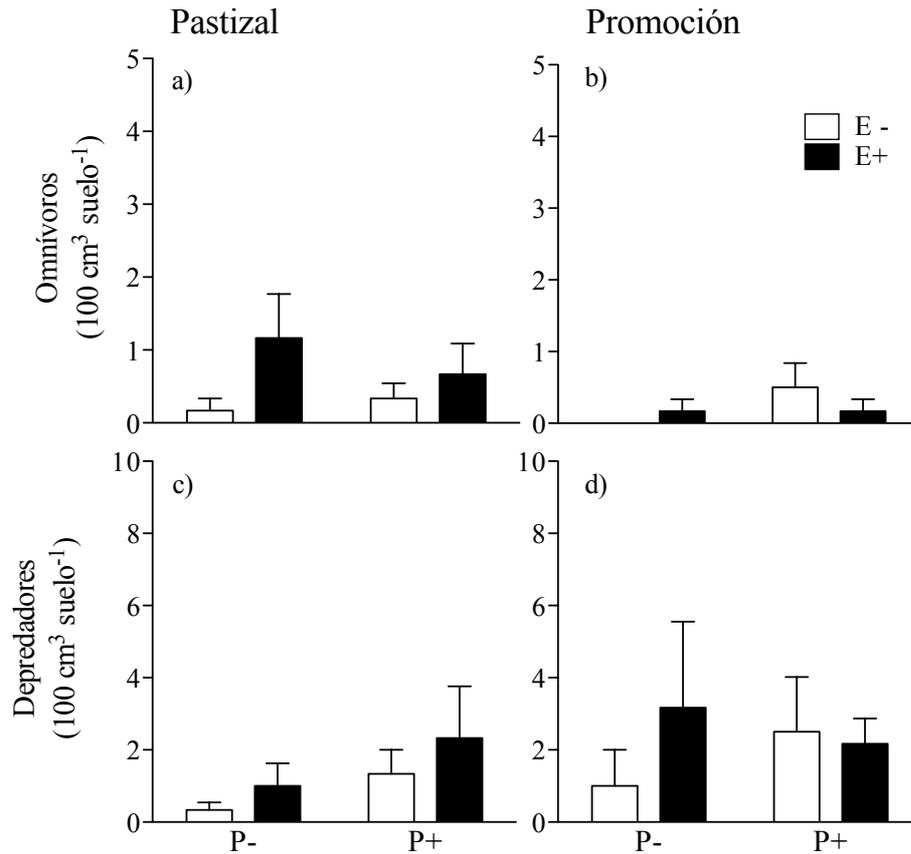


Figura 3.5: abundancia de nematodos al final del ciclo de vida de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de endofitos en contextos definidos por el pastoreo (P+: pastoreado o P-: no pastoreado). Los paneles muestran la abundancia de nematodos de omnívoros (a, b) y depredadores (c, d) en 100 cm³ de suelo. Las variables fueron medidas en ambientes generado por la historia de pastizal (a la izquierda) o de promoción de *L. multiflorum* (a la derecha). Las barras muestran el promedio (n= 6, ± error estándar). Letras distintas indican diferencias entre tratamientos (p<0,05. Prueba de Tukey).

3.4 DISCUSIÓN

En este capítulo no se detectaron cambios en los grupos tróficos de nematodos del suelo, la mineralización de nitrógeno ni en la descomposición de broza debido a la presencia previa de plantas asociadas al endofito. En este sentido, no se corroboró la hipótesis que la presencia de *N. occultans* en *L. multiflorum* genera efectos persistentes que modulan la estructura de la red trófica y los procesos del suelo aún después del ciclo de vida de la planta hospedante. Tampoco pudo corroborarse la hipótesis que el pastoreo modifica los efectos del endofito. El pastoreo tuvo un efecto negativo sobre la biomasa radicular que estuvo asociado a una menor tasa de mineralización y una menor abundancia de nematodos fitófagos después del ciclo de vida de las plantas. Estos resultados sugieren que no todas las relaciones aéreas que establecen las plantas son capaces de persistir y, que la historia de uso del ambiente

puede ser una fuente de variabilidad de las respuestas de la comunidad del suelo (Korthals et al. 2001).

Cuadro 3.4: resultado de los modelos estadísticos para los efectos de Endofito y Pastoreo sobre la abundancia de nematodos pertenecientes a los grupos tróficos: fitófagos (Fitóf), bacteriófagos (Bact), fungívoros (Fung), omnívoros (Omn) y depredadores (Depr). Los ambientes generados por historia de uso: pastizal y promoción de *L. multiflorum* fueron analizados de manera independiente. El cuadro muestra el estadístico, los grados de libertad asociados ($F_{1,15}$) y el valor de probabilidad (p).

Pastizal										
	Fitóf		Bact		Fung		Omn		Depr	
	$F_{1,15}$	p								
Pastoreo (P)	4,33	0,055	0,33	0,575	2,92	0,108	0,19	0,667	2,11	0,167
Endofito (E)	0,18	0,678	3,50	0,081	0,38	0,548	3,08	0,100	0,80	0,386
P x E	0,71	0,412	0,64	0,435	0,15	0,704	0,77	0,394	0,05	0,831

Promoción										
	Fitóf		Bact		Fung		Omn		Depr	
	$F_{1,15}$	p	$F_{1,15}$	p	$F_{1,15}$	P	$F_{1,15}$	P	$F_{1,15}$	P
Pastoreo (P)	7,40	0,016	4,39	0,054	0,08	0,781	2,13	0,165	2,87	0,111
Endofito (E)	0,27	0,609	0,12	0,732	1,62	0,222	0,01	0,909	1,63	0,221
P x E	0,00	0,994	2,32	0,149	0,23	0,637	2,13	0,165	0,37	0,553

Los resultados obtenidos no coinciden con los obtenidos previamente para otras asociaciones pasto-endofito. La presencia de *N. coenophialum* en *L. arundinaceum* generó efectos persistentes en el suelo evidentes a través de una menor mineralización de carbono y disponibilidad de nitrógeno junto con un aumento en la concentración de alcaloides respecto de ambientes del suelo donde creció *L. arundinaceum* no hospedante del endofito durante diez años (Franzluebbers y Hill 2005). Si bien, Franzluebbers et al. (2006) no encontraron diferencias significativas en las fracciones de carbono y nitrógeno asociadas a *L. arundinaceum* con o sin el endofito en dos suelos con texturas contrastantes después de un año y medio de la presencia de las plantas. El ambiente generado por las plantas de *L. multiflorum* hospedantes de *N. occultans* redujo las tasas de descomposición cuando la cantidad de broza de *L. multiflorum* dejada en el parche fue alta (Omacini et al. 2004). La cantidad de broza sobre el suelo en este capítulo fue similar a los niveles bajos del experimentos de Omacini et al. (2004) donde tampoco se observaron diferencias en las tasas de descomposición de *Bromus unioloides*. Se ha propuesto que la lixiviación de compuestos desde la broza podría inhibir la descomposición en presencia de la simbiosis *L. arundinaceum*- *N. coenophialum* (Antunes et al. 2008, Siegrist et al. 2010). Cabe considerar que los efectos a través de compuestos lixiviados o exudados en el suelo podrían desaparecer una vez finalizado el ciclo de vida de la planta hospedante (ver discusión capítulo 2). En conjunto las evidencias sugieren que sería necesaria la persistencia de la simbiosis en el ambiente durante varios años o, una mínima cantidad de broza [dependiendo de la concentración

de hifas en los tejidos (Rasmussen et al. 2007)] a partir de la cual se harían evidentes los efectos del endófito sobre las tasas de descomposición (Mack y Rudgers 2008). El pastoreo pudo tener un efecto negativo sobre el endofito (García Parisi et al. 2011) reduciendo la concentración de hifas (o, su biomasa), la producción de compuestos secundarios y por ende, sus efectos (como postulaba la hipótesis). Sin embargo, no hubo diferencias entre plantas hospedantes del endofito con y sin pastoreo, desestimando esta posibilidad.

Numerosos trabajos encontraron que la presencia de endofitos influye sobre los nematodos del suelo y se ha sugerido que la presencia de toxinas en las raíces podrían explicar los efectos (revisado en Cook y Lewis 2001). La presencia de *N. lolii* en *L. perenne* redujo la densidad de varias especies de nematodos (Yeates y Prestidge 1986, West et al. 1988, Latch 1993, Elmi et al. 2000). Sin embargo, los resultados también pueden revertirse dependiendo del genotipo o cultivar del pasto hospedante (Yeates y Prestidge 1986), el grupo o especie de nematodos del suelo evaluado (Watson 1990, Stewart et al. 1993, Eerens et al. 1998). A diferencia de los trabajos anteriores, este capítulo evaluó la comunidad de nematodos después del ciclo de vida de la planta hospedante. Podría ocurrir que *N. occultans* no sea capaz de generar cambios sobre los nematodos del suelo. También podría suceder que las respuestas a los endofitos, al pastoreo u otros disturbios queden enmascaradas o sean evidentes con un retraso debido a la movilidad limitada de los nematodos (Chen y Ferris 1999, Ferris y Matute 2003, Kardol et al. 2005, Maharning et al. 2009) Además, la materia orgánica del suelo podría ser un recurso alternativo en la base de las redes tróficas asociadas a los bacteriófagos y fungívoros (Lavelle y Spain 2001) amortiguando los efectos producidos por cambios en los exudados radiculares (Viketoft 2008). Por último, artrópodos bacteriófagos o fungívoros pueden amortiguar la respuesta de los microorganismos y los nematodos a los cambios en la cantidad o calidad de recursos que proveen las plantas (Yeates et al. 1999, Wardle et al. 2002).

Varios trabajos coinciden con este al sugerir que las especies tolerantes al pastoreo como *L. multiflorum* responden a la defoliación con una reducción en la biomasa aérea y radicular (Ej.: Guitian y Bardgett 2000, Leimu y Koricheva 2006, Milchunas et al. 2008, Maharning et al. 2009). La biomasa radicular puede ser menor en las plantas defoliadas debido a una menor fotosíntesis y a que una mayor proporción de recursos se destinan al crecimiento de la parte aérea (Bardgett et al. 1998, Biondini et al. 1998, Mikola et al. 2001a). En este capítulo, el pastoreo fue suficientemente severo como para reducir la biomasa aérea y radicular de *L. multiflorum* y, a los nematodos fitófagos que estuvieron asociados a estos tejidos sugiriendo una relación trófica entre ellos. En cambio, los efectos sobre los otros grupos tróficos fueron nulos o débiles. Algunas evidencias muestran que los nematodos del suelo responden de distintas maneras al pastoreo. Por ejemplo, la abundancia de nematodos bacteriófagos, fungívoros, omnívoros y depredadores aumentó con la intensidad de la defoliación (Mikola et al. 2001b, Maharning et al. 2009). Efectos neutros de la defoliación sobre los omnívoros, bacteriófagos y fungívoros también fueron encontrados cuando las plantas fueron defoliadas al comienzo de la estación de crecimiento (Ilmarinen et al. 2005) o, en un experimento en praderas templadas (Mills y Adl 2011).

La defoliación podría alterar no solo la productividad o cantidad de biomasa sino también, la calidad de la materia orgánica (Ej.: la concentración de nutrientes y del carbono soluble) que las plantas devuelven al suelo como broza o exudados radiculares (Guitian y Bardgett 2000, Hooper et al. 2000, Mikola et al. 2001a, Mikola et al. 2001b, Hamilton III et al. 2008). En comparación con las comunidades aéreas que responden de

manera rápida a los cambios en la vegetación (Siemann et al. 1998, Koricheva et al. 2000), se sabe poco sobre factores específicos como los compuestos secundarios de las plantas sobre los organismos fitófagos (van der Putten et al. 2001). A pesar que las respuestas alelopáticas y las señales químicas que dominan en las interacciones entre especies vegetales, son también comunes en las comunidades del suelo estos mecanismos están poco estudiados en relación al pastoreo (Hassall et al. 2006).

Aunque no se identificaron los mecanismos específicos, se puede suponer que, los cambios en la comunidad de nematodos estuvieron asociados a la identidad de las plantas o a la calidad de los detritos (Bardgett y Wardle 2003, De Deyn et al. 2004), o a la presencia de compuestos de defensa en las raíces (van der Putten 2003) y no a la cantidad de biomasa. Cambios en la abundancia fueron encontrados para los nematodos en los niveles tróficos más bajos (fitófagos y bacteriófagos) y no para los fungívoros o para los niveles tróficos más altos (carnívoros, omnívoros) (De Deyn et al. 2004) [(Verschoor et al. 2002)- a lo largo de la sucesión vegetal] dando sustento a la hipótesis de que los efectos son más importantes sobre los niveles tróficos en relación más íntima con las plantas y con un fuerte control desde los recursos (fuerzas “bottom-up”) (de Ruiter et al. 1995). El grupo de los nematodos fitófagos más ligado a la vegetación que los otros grupos también fue el grupo que mostró un cambio rápido y mucho más fuerte ante los tratamientos que manipularon la vegetación en otras situaciones (Korthals et al. 2001). Los resultados de este capítulo coinciden de manera parcial con estos antecedentes dado que el grupo de los fitófagos estuvo asociado a la biomasa de las plantas de *L. multiflorum* independientemente de la presencia de *N. occultans* o el pastoreo. Sin embargo, no es posible descartar que los nematodos hayan respondido a cambios en la calidad de la broza o en el ambiente del suelo (Capítulo 2).

Además de la reducción en la biomasa de las plantas, el pastoreo severo influye sobre otras vías de conexión con el suelo (Bardgett et al. 2001). El pisoteo a través de la compactación, reduce la porosidad, el drenaje y la aireación que a su vez, conducen a un aumento de la desnitrificación, una reducción en las tasas de mineralización y probablemente, a una menor disponibilidad de nutrientes (Menneer et al. 2005). Una defoliación a 6 cm del suelo, como la producida en este experimento, redujo en trabajos previos la concentración de carbono en las raíces (Holland y Detling 1990, Hokka et al. 2004). Esta respuesta podría reducir la disponibilidad de carbono lábil en el suelo, que es el recurso para las bacterias y en consecuencia, las tasas de mineralización (fuerzas “bottom-up”) (Polis y Strong 1996, Ohgushi 2005). A pesar que el carbono lábil o los exudados no fueron cuantificados en este experimento, es probable que estén asociados de manera fuerte con la biomasa radicular y esto explique la asociación entre la biomasa radicular y las tasas de mineralización encontradas en los suelos bajo las dos historias de uso (Viketoft 2008).

Los efectos del pastoreo sobre la biomasa de las plantas de *L. multiflorum*, las características y los procesos del suelo trascendieron a los contextos dados por las dos historias de uso: pastizal o promoción. En cambio, los grupos tróficos del suelo asociadas a los ambientes de pastizal mostraron menor sensibilidad que los de promoción aun cuando sufrieron un cambio drástico en la cobertura vegetal respecto al ciclo anterior. Los resultados de Korthals et al. (2001) concuerdan con este capítulo en que los cambios en las comunidades de nematodos en el corto plazo dependieron más de la historia de uso del suelo asociada a las prácticas de manejo que a los cambios generados en las comunidades de manera experimental. Otros trabajos relacionaron la degradación del suelo con cambios en las estructuras tróficas en ambientes agrícolas que provinieron de pastizales (Elliott 1994, Ajwa et al. 1998, Cragg y Bardgett 2001,

Schipper et al. 2001, Wardle et al. 2003, Culman et al. 2010). Diferencias en la calidad de la materia orgánica generan diferencias en las familias de nematodos y, en el flujo de energía en las redes tróficas del suelo (Bardgett et al. 1999, Ferris y Matute 2003). Sin embargo, en este capítulo el carbono y el nitrógeno solo tendieron a ser mayores en el ambiente de pastizal al inicio del experimento (**Cuadro 3.1**). Otros factores como el pH o la calidad de materia orgánica también, pueden modificar la red trófica del suelo (Yeates y Bongers 1999, Lavelle y Spain 2001, Parfitt et al. 2010).

Entender las relaciones funcionales entre especies y su impacto sobre otros niveles tróficos nos puede ayudar a explicar las respuestas aparentemente idiosincrásicas (Hooper et al. 2005, van der Putten et al. 2005, Wardle 2006). Sin embargo, diferencias sutiles en las interacciones entre especies y en las condiciones del ambiente pueden hacer que los efectos sobre la estructura y el funcionamiento de las comunidades sean difíciles de predecir (Schmid et al. 2002, Berlow et al. 2004). Estudiar los efectos del pastoreo sobre los endofitos (Ej.: Clay et al. 2005, Koh y Hik 2007, García Parisi et al. 2011) y cómo estas relaciones modifican las relaciones con las comunidades del suelo es importante si consideramos que los pastizales han evolucionado con ambas interacciones. Por ejemplo, una reducción en la abundancia de nematodos fitófagos puede tener consecuencias importantes durante la siguiente estación de crecimiento. La presencia de nematodos fitófagos produce daños en las pasturas a través de distintas vías como el consumo de plántulas (Spaull et al. 1985, Mercer 1994, Sarathchandra et al. 1996), cambios en la composición de la pastura (Yeates y Prestidge 1986, Watson 1990) y, reducción de la productividad (Yeates y Prestidge 1986, Elmi et al. 1990). A pesar que no se han corroborado las hipótesis principales asociadas a este capítulo, los resultados encontrados contribuyen a entender el significado ecológico de las relaciones aéreas y a considerar potenciales consecuencias sobre la estructura de la comunidad y procesos como la invasión o la sucesión de especies que finalmente determinan la dinámica y la productividad de pastizales y praderas (Pickett et al. 1987, Grime 1998, Mills y Bever 1998, De Deyn et al. 2004, Ehrenfeld et al. 2005, Hooper et al. 2005, Kardol et al. 2006, Levine et al. 2006, Wardle 2006, Kardol et al. 2007, Hamilton III et al. 2008).

Cuadro 3.6: coeficientes de correlación (Pearson) entre pares de variables del suelo con historia de uso de promoción. Biomasa aérea (B.aér) y biomasa radicular (B.rad) de las plantas de *L. multiflorum*; pH, nitrógeno mineral (N min.) y humedad (Hum) del suelo; mineralización potencial (Miner) y biomasa remanente (B.rem); nematodos fitófagos (Fitóf), bacteriófagos (Bact), fungívoros (Fung), omnívoros (Omn) y depredadores (Depr). Coeficientes significativos a dos colas están indicadas con un punto (valor $P < 0,1$; '), un asterisco (valor $P < 0,05$; *), dos asteriscos (valor $P < 0,01$; **), tres asteriscos (valor $P < 0,001$; ***).

	<i>L. multiflorum</i>		Ambiente del suelo			Actividad			Abundancia de nematodos			
	B.aér	B.rad	pH	N min	Hum	Miner	B.rem	Fitóf	Bact	Fung	Omn	Depr
B.aér	1	0,77***	-0,19	-0,28	0,47*	0,43*	0,29	0,68***	-0,36'	-0,13	-0,22	0,07
B.rad		1	-0,42*	0,29	0,28	0,42*	0,16	0,44*	-0,26	0,1	-0,07	0,27
pH			1	0,09	0	-0,40'	0,05	-0,01	0,06	-0,09	0,23	0,08
N min.				1	0,11	-0,69***	0,15	-0,22	-0,11	-0,21	0,41*	-0,45*
Hum.					1	0,22	0,01	0,37'	-0,3	-0,3	-0,04	-0,33
Miner						1	-0,02	0,29	-0,21	-0,08	-0,39'	0,12
B.rem							1	0,17	-0,16	-0,20	-0,03	0,09
Fitóf								1	-0,50*	-0,15	-0,29	-0,11
Bact									1	0,62**	0	0,34
Fung										1	0,19	0,75***
Omn											1	0,24
Depr												1

**CAPÍTULO 4 *NEOTYPHODIUM OCCULTANS* Y EL PASTOREO
INTERFIEREN EN LAS RELACIÓN DE RETROALIMENTACIÓN
DE *LOLIUM MULTIFLORUM* CON OTRAS ESPECIES**

4.1 INTRODUCCIÓN

El ensamble de especies que conforman una comunidad depende de una serie de procesos que dan lugar a la co-existencia de las especies en un sitio (Diamond 1975, Weiher y Keddy 1999). Estos procesos pueden ser entendidos como una serie de “filtros” generados por el ambiente abiótico ó, por las relaciones entre especies. Las características de la especie determinan su capacidad para superar los filtros impuestos por el ambiente y, en consecuencia, el éxito ecológico de la especie (Saunders et al. 2010). Además de las relaciones que se establecen como resultado de la coexistencia (Burdon et al. 2006, Mitchell et al. 2006), las especies tienen que superar nuevos filtros generados a través del tiempo (Bardgett et al. 2005). Los cambios que generan las plantas en el suelo ya sea a través de la actividad radicular o los tejidos muertos que quedan como detritos, modifican las condiciones ambientales para el crecimiento durante la siguiente e incluso, las siguientes generaciones (Albers et al. 2006). A estas relaciones entre generaciones mediadas por el suelo, se las conoce con el nombre de relaciones de retroalimentación (*sensu* Bever et al. 1997). Estas relaciones de retroalimentación pueden ser tanto positivas como negativas para las plantas de la segunda generación (Bever et al. 1997, Mills y Bever 1998, Reynolds et al. 2003, Ehrenfeld et al. 2005).

A escala local las relaciones de retroalimentación contribuyen de manera importante al ensamble de especies en la comunidad vegetal y los procesos del ecosistema (Brown y Gange 1992, van Breemen y Finzi 1998, Bever 2003, De Deyn et al. 2003, Kardol et al. 2006, van der Putten et al. 2007a). La comunidad del suelo -más que la disponibilidad de nutrientes- puede inhibir algunas especies, favorecer a otras y así, contribuir a la diversidad, la sucesión y la invasión de especies en la comunidad vegetal (Brown y Gange 1992, Bever et al. 1996, Bever et al. 1997, Mills y Bever 1998, Mikola et al. 2001a, De Deyn et al. 2003, Callaway y Ridenour 2004, Bardgett et al. 2005, Ehrenfeld et al. 2005, Kardol et al. 2006, Kardol et al. 2007). Por ejemplo, la rotación de cultivos es una práctica en los sistemas agrícolas que contribuye a reducir la acumulación de patógenos y plagas que generan respuestas de retroalimentación negativas y reducen el rendimiento de los cultivos (Ej.: Belmar et al. 1987, Martin y Felton 1993, Westerman et al. 2005). Algunas plantas exóticas utilizan mecanismos de retroalimentación durante la invasión. Por ejemplo, las plantas del género *Centaurea* liberan aleloquímicos en el suelo (Vivanco et al. 2004), que inhiben hongos formadores de micorrizas asociados a las raíces de plantas nativas (Mummey y Rillig 2006). Además, estas plantas desarrollan asociaciones positivas con la biota del suelo local (Callaway y Ridenour 2004, Mummey y Rillig 2006).

Las respuestas de las plantas a las relaciones de retroalimentación (Ej.: Mills y Bever 1998, Matthews y Clay 1999, Ehrenfeld et al. 2005, Kardol et al. 2006, Carvalho et al. 2010), podrían modificar el resultado de las interacciones de estas plantas con otros componentes de la comunidad (Ohgushi 2005, Hartley y Gange 2009) (**Figura 4.1**). Los organismos del suelo tanto mutualistas (Ej.: bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos micorrízicos) como antagonistas (Ej.: nematodos parásitos de plantas, herbívoros o patógenos radiculares) pueden tener efectos positivos, neutros o negativos sobre el desempeño de insectos herbívoros del sistema aéreo y sus enemigos naturales (Ohgushi 2005, Hartley y Gange 2009). Por ejemplo, los insectos seleccionan a las plantas que visitan en base a características de atracción como el número de flores, el tamaño, el color o, recompensas como el polen o el néctar (Gange y Smith 2005, Wolfe et al. 2005). Algunos trabajos han estudiado estos efectos utilizando como modelos a los hongos micorrízicos y, en general, han observado un efecto positivo de la micorrizas

sobre los insectos polinizadores (Gange y Smith 2005, Wolfe et al. 2005, Cahill et al. 2008). Por ejemplo, Cahill et al. (2008) mostraron que la supresión de micorrizas arbusculares en pastizales nativos modifica el comportamiento, la abundancia y la estructura de la comunidad de especies de abejas polinizadoras. Hasta el momento no se sabe si estos efectos pueden transmitirse a través de relaciones de retroalimentación.

El pastoreo puede promover la invasión de especies (Chaneton et al. 2002) y modificar el ritmo de la sucesión en la comunidad (Bardgett y Wardle 2003, Kardol et al. 2006). Hasta hace poco, la mayoría de los trabajos que han estudiado el efecto de interacciones múltiples, incluyeron a no más de tres especies e ignoraron la presencia de microorganismos simbioses (Bultman et al. 2011). Sin embargo, en los pastizales y pasturas, varias especies de pastos forrajeros pueden hospedar hongos endofitos (Clay y Schardl 2002, Saikkonen et al. 2004, Schardl et al. 2004) por lo cual, para entender las relaciones de retroalimentación y, procesos ecológicos como la sucesión o la invasión, los efectos del pastoreo y de los endofitos deberían ser considerados simultáneamente. Por su lado, la presencia de *N. occultans* modifica las relaciones de retroalimentación de la especie hospedante *L. multiflorum* a través de cambios en la broza (Omacini et al. 2009). Otros trabajos encontraron que la simbiosis *L. arundinaceum* - *N. coenophialum* genera efectos de retroalimentación negativo sobre otras especies herbáceas (Clay y Holah 1999) y arbustivas (Rudgers et al. 2007, Rudgers y Orr 2009) Estos trabajos no han considerado que el pastoreo puede modificar drásticamente el efecto de los hongos endofitos (Clay et al. 2005, Koh y Hik 2007, García Parisi et al. 2011) y en consecuencia, las respuestas de retroalimentación.

El objetivo de este capítulo es evaluar en qué medida la presencia del pastoreo y el hongo simbiote *N. occultans* en *L. multiflorum* pueden mediar las relaciones de retroalimentación sobre otras especies (**Figura 4.1**). La hipótesis general establece que las interacciones aéreas que establecen las plantas modifican las relaciones de retroalimentación y, de manera potencial, las interacciones de la próxima generación de plantas con otros componentes del ecosistema. Para poner a prueba esta hipótesis, las relaciones de retroalimentación sobre plantas de soja (*Glycine max*) y cardo (*Carduus acanthoides*) son evaluadas en distintos experimentos. Por un lado, se evalúa en qué medida *N. occultans* y el pastoreo en *L. multiflorum* pueden influir sobre la emergencia, el nivel de daño o el crecimiento de plantas de soja durante la siguiente generación. De manera específica se pone a prueba la hipótesis de que la presencia de *N. occultans* en *L. multiflorum* genera una retroalimentación positiva a través de cambios en el ambiente del suelo (Siegel y Latch 1991) que podría ser contrarrestada por el pastoreo. Por otro lado, se examina en qué medida ambas relaciones aéreas pueden influir sobre el desempeño (crecimiento y reproducción) de plantas de cardo durante la siguiente generación y sobre las abejas (*Apis mellifera*) que visitan los capítulos (i.e.: inflorescencias) de estas plantas. De manera específica se pone a prueba la hipótesis de que la presencia de *N. occultans* en *L. multiflorum* genera una retroalimentación negativa sobre la biomasa y los capítulos de las plantas de cardo que puede ser contrarrestado por el pastoreo. A su vez, una menor producción de capítulos, reduce la abundancia de abejas que visitan estas plantas (Albrecht et al. 2007).

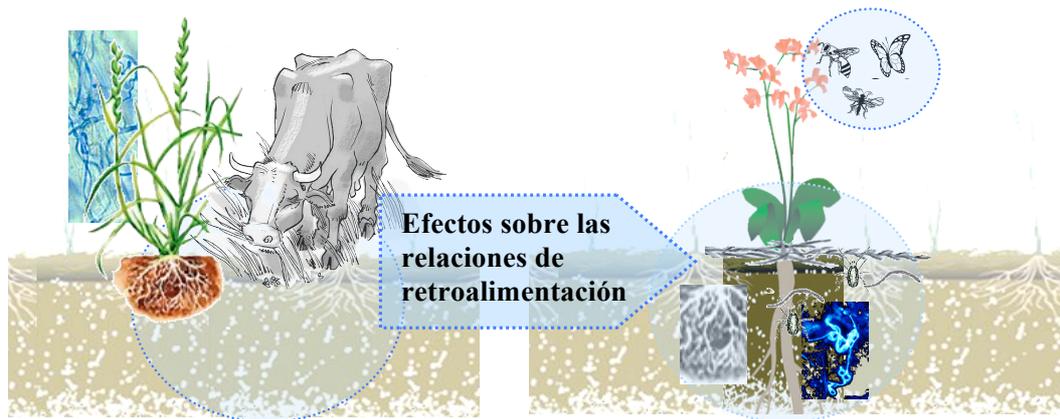


Figura 4.1: el esquema representa como la presencia de relaciones múltiples como el pastoreo y el endofito puede modificar las relaciones de retroalimentación con otras especies y además, modular otras relaciones que establecen estas especies. Esto efectos sobre las relaciones de retroalimentación podrían estar mediados por señales que perduran en el suelo rizosférico. Este capítulo evalúa las relaciones de retroalimentación a través del crecimiento de soja y cardo. A su vez, se evalúan las relaciones que estas especies generan con otros componentes de la comunidad como las visitas de abejas a las inflorescencias de cardo.

Las hipótesis serán evaluadas en distintos ambientes generados por la historia de uso sobre un mismo tipo de suelo (Ver capítulo 3) (Korthals et al. 2001, Strauss y Irwin 2004, De Deyn y van der Putten 2005, Hooper et al. 2005, Wardle 2006, van Dam 2009, Culman et al. 2010). Las comunidades del suelo de los sistemas menos disturbados (Ej.: el pastizal) son consideradas más complejas y resilientes que aquellas con mayor grado de disturbio (Ej.: la promoción de *L. multiflorum*) (Cragg y Bardgett 2001, Schipper et al. 2001, Wardle et al. 2003, Culman et al. 2010). En este sentido se espera que los efectos de retroalimentación sean más importantes en el sistema con mayor grado de disturbio representado por el suelo con historia de promoción de *L. multiflorum* a lo largo de todos los experimentos (Ver capítulo 3).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Experimentos I: relaciones de retroalimentación con soja

4.2.1.1 Diseño experimental

Una vez finalizados los dos experimentos descritos en el capítulo 3, se armaron macetas (de 3 l y 10 cm profundidad cada una) con el suelo proveniente de cada unidad experimental. Los nuevos experimentos respetaron el diseño en bloques completos y la aleatorización de los tratamientos de los experimentos anteriores. Los tratamientos originales que combinaron los factores Endofito (alta: E+ ó baja: E- frecuencia) y Pastoreo (presencia: P+ ó ausencia: P-) generaron cuatro condiciones ambientes iniciales que conformaron los tratamientos de cada experimento (4 tratamientos x 6 bloques, en cada suelo: pastizal y promoción de *L. multiflorum*. **Figura 4.2:**). Se mantuvo igual cantidad de broza sobre la superficie de las macetas: 4 g.maceta⁻¹ (equivalente a 325 g.m⁻²). Se utilizó broza proveniente de las plantas de *L. multiflorum*

que crecieron en el experimento original (Ver capítulo 3). Así, solo se evaluó el efecto de la calidad de la broza sin interferencia de la cantidad.

Los experimentos se desarrollaron bajo condiciones naturales de luz y controladas de temperatura (22 °C) y disponibilidad hídrica a través de riegos diarios (invernáculo experimental de la Cátedra de Ecología de la FAUBA. Junio de 2007). En las macetas se sembraron plantas de soja (*Glycine max*; FN 4-85¹ 2006) a una densidad de 15 semillas por maceta. La soja suele ser el primer cultivo agrícola después de un ciclo ganadero en los sistemas productivos con rotación mixta. En este sentido, utilizar plantas de soja permitió representar un sistema plausible de ser encontrado en escenarios productivos actuales. La soja es una especie anual dicotiledónea y sensible a diversas enfermedades cuyos agentes causales provienen del suelo. Por ejemplo, el grupo de hongos conocido como “complejo dumping –off” ocasionan pérdidas de densidad en los cultivos de soja por daños ocasionados en semillas y plántulas. Esta sensibilidad, permitió utilizar a las plantas de soja como “sensores” de cambios en el ambiente del suelo.

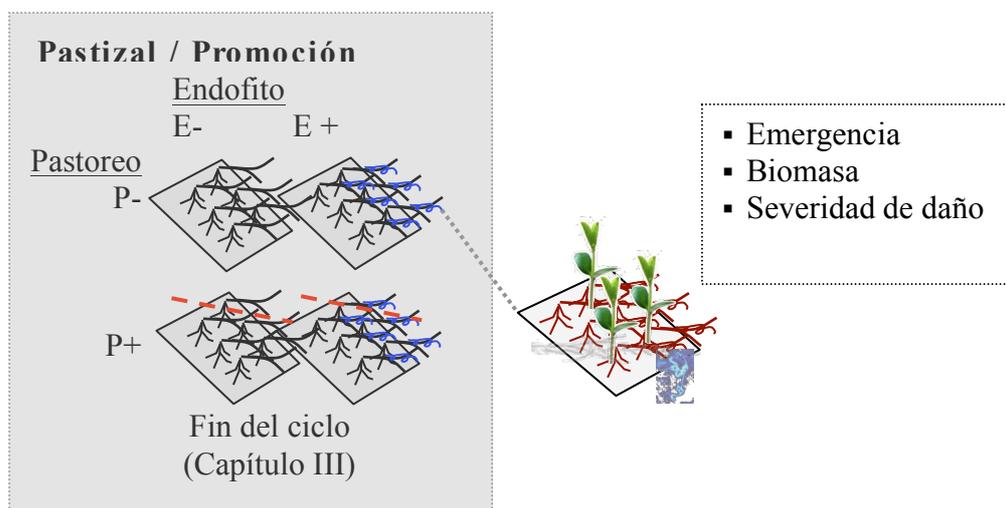


Figura 4.2: diseño de los experimentos que evaluaron los efectos de retroalimentación en dos ambientes generados por la historia de uso. En 2007 plantas de *Glycine max* fueron cultivadas en suelos de pastizal o promoción de *Lolium multiflorum*. En estos suelos crecieron previamente (2006) plantas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos y en presencia (P+) o no (P-) de pastoreo (ver capítulo 3). Se determinó la emergencia, la severidad del daño y la biomasa sobre las plantas de *G. max* sometidas al tratamiento de retroalimentación asociado a la presencia del endofito y al pastoreo en la generación anterior.

4.2.1.2 Determinaciones

Se determinó el porcentaje de plantas emergidas por maceta (% planta.maceta⁻¹). Las plantas fueron cosechadas a los 90 días desde la siembra. Se estimó la biomasa fresca por planta (g.planta⁻¹) como el cociente entre la biomasa fresca por maceta (incluyendo

¹ Propiedad de Ferias del Norte Semillas (<http://www.fnsemillas.com.ar>)

parte aérea y radicular) sobre el número de plantas emergidas. La severidad de daño ocasionado por enfermedades (Ej.: fungicas, bacterianas, viródicas o fisiogénicas) fue determinada para cada planta mediante el índice descrito en el **Cuadro 4.1**. Se compararon los valores promedios de severidad por maceta expresados como $\%.\text{planta}^{-1}.\text{maceta}^{-1}$.

Cuadro 4.1: índice de severidad utilizado para cuantificar el daño por enfermedad. Se determinó el índice expresado en porcentaje por planta. En la figura de la sección “Resultados” se muestra el valor promedio para las plantas por maceta que es la unidad experimental.

Severidad	Síntomas
0	Planta sana: con las dos primeras hojas completamente desarrolladas, raíces bien ramificadas y pigmentación clara
10	Planta con las dos primeras hojas completamente desarrolladas, raíz con alguna parte afectada (poca ramificación o sector con coloración amarillada o grisácea)
20	Planta con algún defecto en el vástago o más pequeña, con raíces un poco coloreadas pero ramificadas
30	Planta con raíces bien desarrolladas un poco coloreadas con vástago deformado (comúnmente denominado <i>fork</i>) u oscurecido.
40	Hojas desplegadas, planta pequeña sin raíces coloreadas pero poco desarrolladas
50	Hojas desplegadas, planta pequeña con raíces coloreadas y poco desarrolladas
60	Planta con vástago deformado u oscurecido y, con raíces coloreadas y poco desarrolladas
70	Planta con poco desarrollo de vástago, raíces muy afectada, poco desarrollo y oscuras
80	Planta con vástago deformado u oscurecido muy pequeñas, muy poco desarrollo radicular
90	Planta que solo presenta cotiledones verdes ó, solo presenta raíz principal con coloreada
100	Semilla no emergida podrida y rodeada de micelio

4.2.1.3 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante modelos lineales mixtos. Se utilizó la función lme [incluida en el paquete nlme (Pinheiro y Bates 2000, Pinheiro et al. 2009)]. Los valores de emergencia ($\% \text{ plantas}.\text{maceta}^{-1}$), biomasa ($\text{g}.\text{planta}^{-1}$) y la severidad del daño ($\%.\text{planta}^{-1}.\text{maceta}^{-1}$) de cada experimento fueron comparados mediante un modelo que consideró Endofitos y Pastoreo como factores fijos; los bloques fueron el factor aleatorio. Cuando hubo interacción entre los factores fijos, se realizaron comparaciones a posteriori entre tratamientos mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$) con la función glht [paquete multcomp (Hothorn et al. 2008)]. El supuesto de normalidad fue evaluado mediante la función shapiro.test (del paquete basic) con los residuos de los modelos [shapiro.test(residuals(modelo))]. El supuesto de homogeneidad de varianzas fue evaluado mediante la función leveneTest [paquete car (Fox 2009)] para los tratamientos (combinación de los niveles de los factores). Los valores de biomasa en el experimento con suelo de promoción fueron transformados por el logaritmo [$\text{Log}(x+1)$] para cumplir

con los supuestos de los modelos. Todos los análisis fueron realizados con el programa R-cran, versión 2.10 (R Development Core Team 2007). Todos los resultados se presentan como los promedios de las repeticiones \pm error estándar.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre pares de variables medidas. De acuerdo con los análisis anteriores, se confeccionaron matrices separadas para cada uno de los experimentos (suelo de pastizal y de promoción). Estas matrices sirvieron para evaluar la asociación entre las variables respuesta sobre las plantas de soja (Ej.: emergencia, severidad y biomasa de las plantas de soja) y variables descriptas en la sección resultados del capítulo 3 en esta tesis e identificar las posibles vías que pudieron mediar los efectos de retroalimentación de los endofitos y del pastoreo (i.e. la biomasa radicular de las plantas de *L. multiflorum* que crecieron durante la estación anterior, el pH, las tasas de mineralización potencial y la humedad del suelo). Todos los análisis fueron realizados con el programa R-cran, versión 2.10 (R Development Core Team 2007).

4.2.2 Experimentos II: relaciones de retroalimentación con cardo

4.2.2.1 Diseño experimental

Siguiendo un protocolo similar al descrito en para el experimento I, una vez finalizados los dos experimentos descritos en el capítulo 3, se hicieron crecer plantas de *Carduus acanthoides* en los suelos expuestos a distintos tratamientos (Ver capítulo 3). Al utilizar las mismas unidades experimentales, los nuevos experimentos respetaron el diseño en bloques completos y la aleatorización de los tratamientos de los experimentos anteriores. Los tratamientos originales que combinaron los factores Endofito (alta: E+ ó baja: E- frecuencia) y Pastoreo (presencia: P+ ó ausencia: P-) generaron cuatro condiciones ambientes iniciales que conformaron los tratamientos (4 tratamientos x 6 bloques, en cada suelo: pastizal y promoción de *L. multiflorum*. Ver capítulo 3. **Figura 4.3**).

Los experimentos se desarrollaron bajo condiciones ambientales naturales de luz y temperatura (Campo experimental de la Cátedra de Ecología de la FAUBA). Las unidades experimentales fueron regadas diariamente. La biomasa de las plantas de *L. multiflorum* varió con el pastoreo (Ver capítulo 3) y en consecuencia también lo hizo la cantidad de broza producida por estas plantas. Por este motivo, la cantidad de broza depositada en cada unidad experimental se homogeneizó cosechando todo el material producido y colocando 12,5 g de broza [equivalente a 2000 kg.ha⁻¹ factible de ser encontrados en comunidades de pradera templada (Sosa et al. 2006)] en la superficie. En consecuencia, la broza varió solo en relación al nivel de infección con endofitos (E+ o E-).

Las semillas de *Carduus acanthoides* fueron colectadas en pastizales en el Oeste de región pampeana durante la primavera del 2003. Estas fueron conservadas a 4 °C hasta el momento del experimento. Las condiciones de almacenamiento y el período previo a la utilización aseguraron la pérdida de dormición de las semillas. Las semillas de *C. acanthoides* fueron colocadas en placas con agar en condiciones controladas (cámara de crecimiento a 22 °C) para inducir la germinación. En consecuencia, el efecto de los tratamientos sobre la germinación no fue considerado. En junio de 2007, se transplantaron tres plántulas en cada unidad experimental y, a la semana, las dos plántulas de menor tamaño fueron raleadas dejando crecer un individuo en cada unidad experimental (**Figura 4.3**).

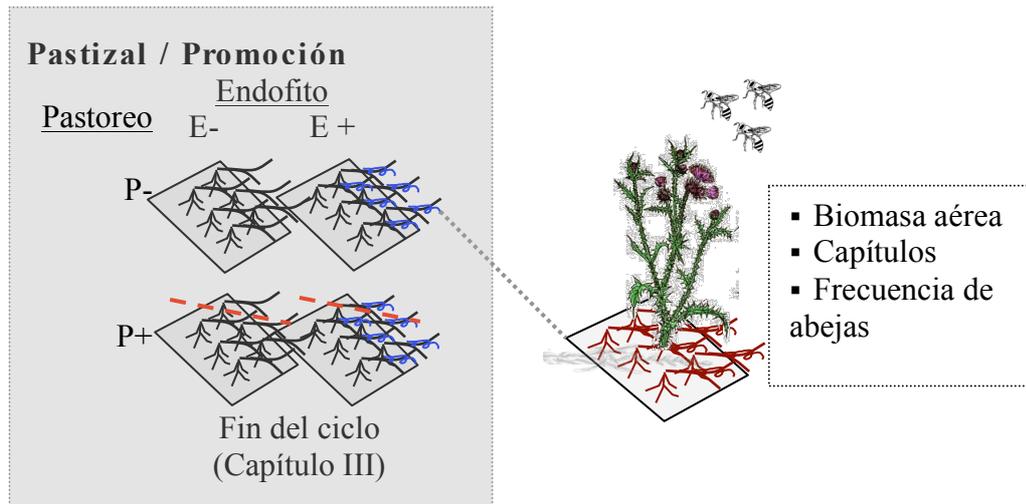


Figura 4.3: diseño del experimento de retroalimentación. En 2007 plantas de *C. acanthoides* fueron cultivadas en suelos ocupados previamente (2006) por plantas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos y presencia (P+) o no (P-) de pastoreo (En suelos de pastizal o promoción de *L. multiflorum*, ver capítulo 3). Las plantas de *C. acanthoides* estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia del endofito y al pastoreo durante la generación anterior. Se determinó la biomasa aérea de las plantas, la cantidad de capítulos producidos y, la frecuencia de abejas melíferas que visitaron los capítulos.

La especie *C. acanthoides* es considerada una maleza en sistemas agrícolas y ganaderos y, suele ser encontrada en estadios sucesionales tempranos en pastizales donde *L. multiflorum* es una especie común (Omacini et al. 2005). La dispersión anemófila (Feldman y Lewis 1990) facilita la llegada a ambientes alterados donde logra establecerse y colonizar (i.e.: pasturas, pastizales, cultivos). El éxito de la especie como invasora ha sido atribuido a la producción prolífica de semillas, a la longevidad de las semillas, a la habilidad competitiva y a la ausencia de enemigos naturales (Kok 2001, Mandak et al. 2009). A pesar de no ser una especie dominante en ambientes naturales, suele ser abundante en ambientes disturbados (Dunn 1976, Desrochers et al. 1988). Los capítulos se encuentran solitarios o en pequeños racimos y son visitados principalmente, por *Bombus* spp. y *Apis* spp. (Desrochers et al. 1988). Estos insectos siguen un patrón de alimentación irregular y visitan una vez cada flor (Giurfá y Núñez 1993).

4.2.2.2 Determinaciones

Las plantas de *C. acanthoides* fueron cosechadas aproximadamente a los 80 días desde el transplante cuando había terminado el período de floración en febrero de 2008 para estimar la biomasa aérea. Algunas de las plantas transplantadas permanecieron como rosetas a lo largo de todo el experimento (pastizal, n= 5 y promoción, n= 7). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre las plantas en estadio de roseta y los tratamientos. El material cosechado (tallos, hojas y capítulos) fue secado hasta peso constante (durante al menos 72h a 60 °C) y pesado (con una precisión de 0,001 g). Los valores de biomasa aérea se expresan en gramos por planta (g.planta⁻¹). Dada la variación en el momento de aparición, la duración y la cantidad de capítulos entre las plantas, en cada sección (ver más adelante), se determinó la cantidad de capítulos

abiertos de todas las plantas de *C. acanthoides*. La sumatoria de capítulos por planta a lo largo del período de floración estimó la atracción visual a los insectos.

Para determinar la frecuencia de abejas (*Apis mellifera*), durante el período de floración (diciembre de 2007 – enero de 2008), se realizaron secciones de observación sobre cada planta de *C. acanthoides*. Cada sección de observación duró 15 minutos entre las 8:00 y las 14:00 h (cuando la actividad de los insectos es máxima) en días soleados y cuando la velocidad del viento fue baja. Solo los insectos que se posaron sobre capítulos abiertos fueron considerados como visitantes. En cada día de observación se seleccionaron de 4- 5 unidades experimentales al azar. A pesar de que se observaron e identificaron taxonómicamente un total de 2197 insectos, solo se reportan los datos correspondientes a las abejas. Las abejas fueron la especie más abundante (10:1 respecto de los otros morfotipos de insectos. Datos no mostrados) e importantes como visitadoras de *C. acanthoides* dado el carácter anemófilo de esta especie. Los datos que refieren a la frecuencia de abejas se expresan como el promedio por día en relación a la cantidad de observaciones realizadas sobre la unidad experimental.

4.2.2.3 *Análisis estadístico*

Los análisis se realizaron de manera independiente para los suelos con historia de pastizal y de promoción. La falta de desarrollo de algunas plantas de *C. acanthoides* (permanecieron en estado de roseta) determinó que el experimento quedara desbalanceado (Pastizal, n= 19; Promoción, n= 17). Todos los análisis fueron realizados mediante modelos lineales mixtos. Se utilizó la función lme [incluida en el paquete nlme (Pinheiro y Bates 2000, Pinheiro et al. 2009)]. Los valores de biomasa aérea (g.planta^{-1}), la cantidad de capítulos abiertos (total.planta^{-1}), la frecuencia de abejas melíferas ($\text{abejas.planta}^{-1}.\text{día}^{-1}$) fueron comparados mediante un modelo que consideró Endofitos y Pastoreo como factores fijos; los bloques fueron el factor aleatorio. Para examinar la relación entre la cantidad de capítulos abiertos y la frecuencia de abejas, un segundo análisis incluyó a la cantidad de capítulos abiertos como factor de covarianza. La frecuencia de abejas melíferas fue transformada por el ranking para cumplir con los supuestos del modelo estadístico. Cuando hubo interacción entre los factores fijos (Endofito y Pastoreo), se realizaron comparaciones *a posteriori* entre tratamientos mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$) con la función glht [paquete multcomp (Hothorn et al. 2008)]. El supuesto de normalidad fue evaluado mediante la función shapiro.test (paquete basic) con los residuos de los modelos [shapiro.test(residuals(modelo))]. El supuesto de homogeneidad de varianzas fue evaluado mediante la función leveneTest [paquete car (Fox 2009)] para los tratamientos (combinación de los niveles de los factores). Todos los análisis fueron realizados con el programa R-cran, versión 2.10 (R Development Core Team 2007). Las figuras en la sección de resultados muestran los promedios de las repeticiones \pm error estándar.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Relaciones de retroalimentación con soja

La presencia del endofito o el pastoreo en las plantas de *L. multiflorum* no generaron cambios en la emergencia de las plantas de soja en el experimento con suelo de pastizal (**Cuadro 4.2** y **Figura 4.4 a**). La emergencia de las plantas de soja en el experimento con suelo de promoción dependió de la interacción entre la presencia previa del endofito y del pastoreo (**Cuadro 4.2** y **Figura 4.4 b**). La presencia del endofito tendió a

aumentar la emergencia cuando no hubo pastoreo y, la redujo del 82 % al 67,7 % cuando hubo pastoreo.

La presencia del endofito o el pastoreo no generaron cambios en la severidad del daño y tampoco en la biomasa promedio de las plantas de soja en los experimentos con suelo con historia de pastizal o promoción (**Cuadro 4.2** y **Figura 4.4 c - f**).

No hubo evidencias de asociación entre la emergencia, la biomasa o la severidad de daño y, la biomasa radicular de las plantas de *L. multiflorum*, el pH, la humedad del suelo ó, la tasa de mineralización potencial para ninguno de los experimentos (suelo de pastizal y promoción. **Cuadro 4.3**).

4.3.2 Relaciones de retroalimentación con cardo

Ni la presencia del endofito ni el pastoreo en las plantas de *Lolium multiflorum* generaron cambios en la biomasa aérea de las plantas de cardo (*Carduus acanthoides*) en los experimentos con suelo con historia de pastizal o promoción (**Cuadro 4.4** y **Figura 4.5 a y b**). La cantidad de capítulos abiertos tampoco dependió de la presencia del endofito o del pastoreo en *L. multiflorum* en el experimento con suelo de pastizal. En cambio, en el experimento con suelo de promoción hubo una interacción entre ambas relaciones aéreas observándose que la cantidad total de capítulos abiertos fue un 70 % superior en el tratamiento sin pastoreo y con baja frecuencia de endofitos (P-E-) respecto de los otros tres tratamientos (P-E+, P+E- y P+E+. **Cuadro 4.4** y **Figura 4.5 c y d**).

En el experimento con suelo de pastizal, ni la presencia del endofito en las plantas de *L. multiflorum* ni el pastoreo afectaron a la frecuencia de visitas de abejas. En cambio, en el experimento con suelo de promoción, las dos relaciones aéreas tuvieron efectos negativos sobre la frecuencia de abejas que visitaron las plantas de cardo (**Cuadro 4.4** y **Figura 4.6**). Los análisis que incluyeron a la cantidad de capítulos como covariable indican que esta variable podría mediar el efecto del pastoreo pero, no el de los endofitos (**Cuadro 4.4**).

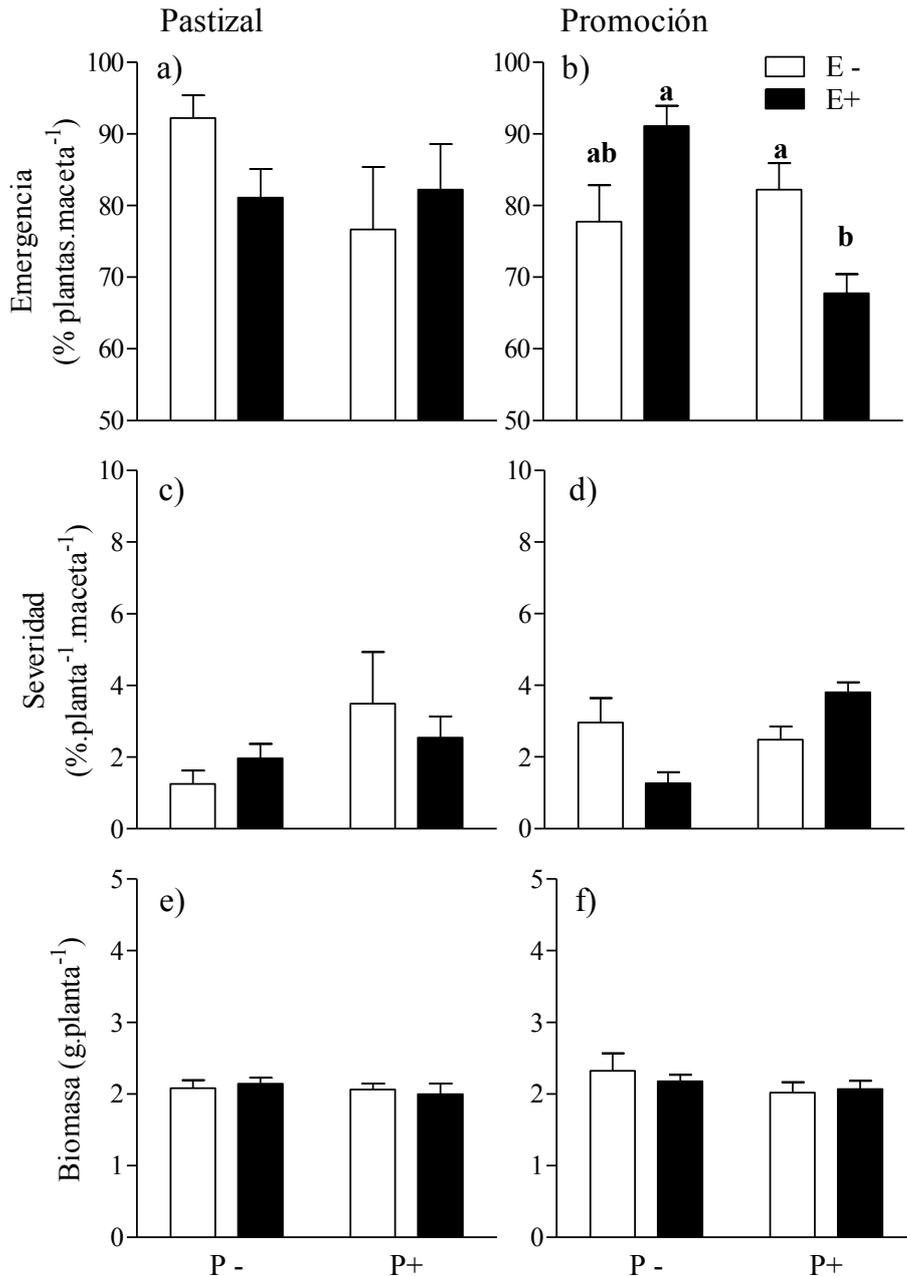


Figura 4.4: porcentaje de emergencia (a y b), severidad de daño (c y d) y biomasa de las plantas de soja (e y f). Las plantas de *G. max* (soja) crecieron en suelos provenientes de ambientes de pastizal (derecha) o de promoción de *L. multiflorum* (izquierda) y estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia de plantas de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de hongos endofitos y a la presencia o ausencia de pastoreo (P+ vs. P-) durante la generación anterior. La combinación de los factores endofito y pastoreo generaron cuatro condiciones previas al crecimiento de las plantas de soja. Las barras muestran el promedio (\pm error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($p < 0,05$. Prueba de Tukey).

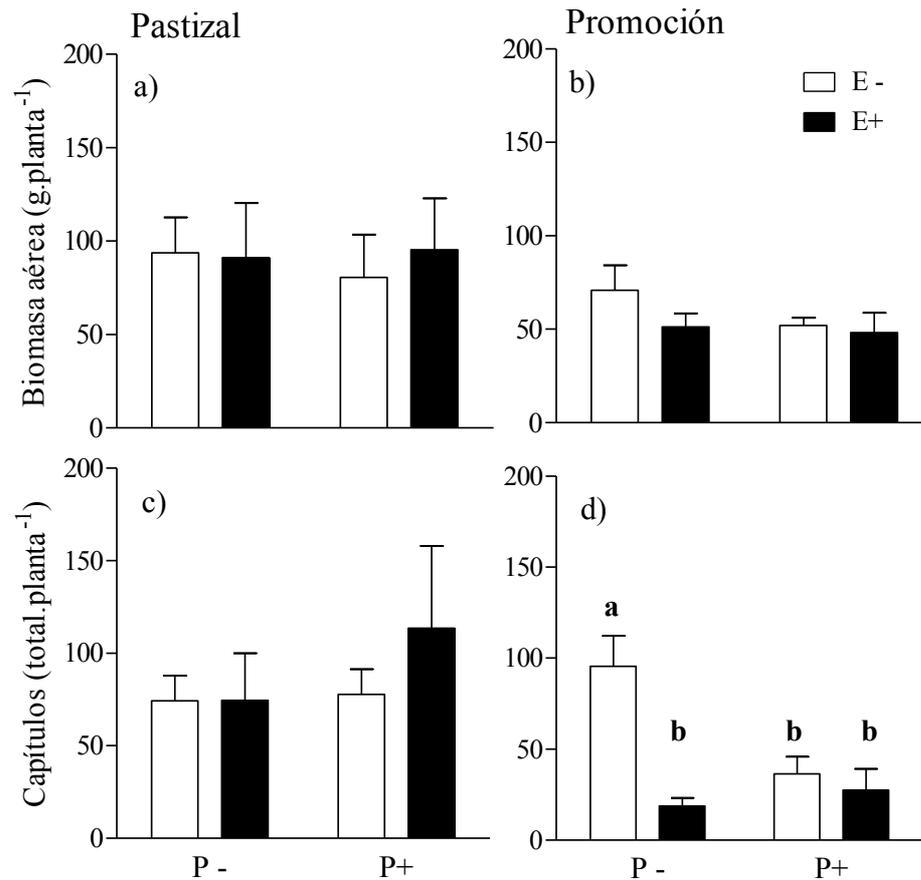


Figura 4.5: biomasa aérea (a, b), capítulos acumulados durante el período de floración (c, d) de las plantas de *C. acanthoides*. Las plantas crecieron en suelos provenientes de ambientes de pastizal (derecha) o de promoción de *L. multiflorum* (izquierda) y estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia de plantas de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de hongos endofitos y a la presencia o ausencia de pastoreo (P+ vs. P-) durante la generación anterior. La combinación de los factores endofito y pastoreo generaron cuatro condiciones previas al crecimiento de las plantas de *C. acanthoides*. Las barras muestran el promedio (\pm error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($p < 0,05$. Prueba de Tukey).

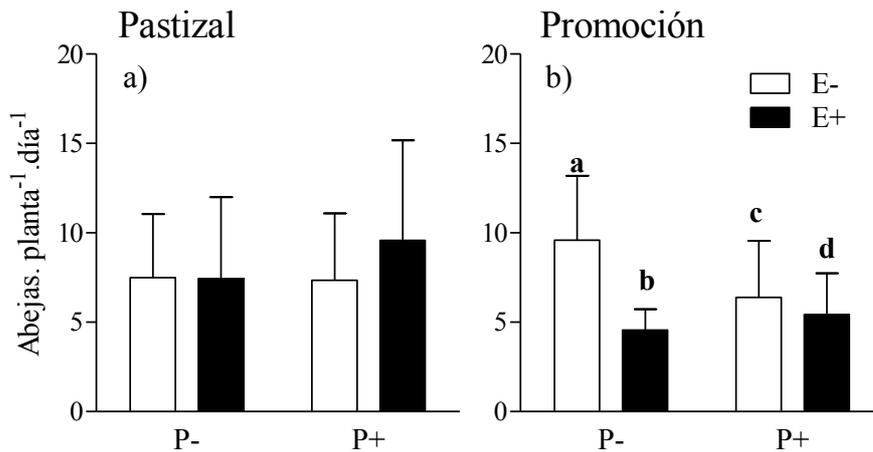


Figura 4.6: frecuencia de abejas (*A. mellifera*) que visitaron los capítulos de *C. acanthoides*. Las plantas de *C. acanthoides* crecieron en suelos provenientes de ambientes de pastizal (derecha) o de promoción de *L. multiflorum* (izquierda) y estuvieron sometidas a los efectos de retroalimentación asociado a la presencia de plantas de *L. multiflorum* con alta (E+) o baja (E-) frecuencia de hongos endofitos y a la presencia o ausencia de pastoreo (P+ vs. P-) durante la generación anterior. La combinación de los factores endofito y pastoreo generaron cuatro condiciones previas al crecimiento de las plantas de *C. acanthoides*. Las barras muestran el promedio (\pm error estándar). Diferencias entre tratamientos están indicadas con distintas letras ($p < 0,05$. Prueba de Tukey).

4.4 DISCUSIÓN

A escala local las relaciones de retroalimentación tienen un fuerte impacto sobre la composición de las comunidades y los procesos del ecosistema (van Breemen y Finzi 1998, Bever 2003). En este capítulo, las relaciones aéreas previas redujeron la cantidad de capítulos en las plantas de *Carduus acanthoides* y la emergencia de las plantas de *Glycine max* en la siguiente generación. Los resultados apoyan la hipótesis general de que las relaciones aéreas que establecen las plantas modulan las relaciones de retroalimentación (Newsham et al. 1995, Ehrenfeld et al. 2005, Ohgushi 2005). Los endofitos tuvieron un impacto nulo o negativo sobre las variables medidas y el pastoreo no siempre redujo el impacto de los endofitos como se esperaba. Al contrario, los resultados sugieren que el pastoreo podría intensificar los efectos del endofito. A su vez, se puso en evidencia que las relaciones de retroalimentación influyen sobre nuevas relaciones aéreas -*C. acanthoides* y *Apis mellifera*, a través de distintas vías. Por último, los efectos de retroalimentación dependieron del contexto ecológico dado por la historia de uso (Ehrenfeld et al. 2005, Kardol et al. 2007): los efectos fueron solo evidentes en el ambiente con historia de promoción y mayor grado de disturbio como se esperaba.

Cuadro 4.2: resultado de los modelos estadísticos para los efectos de Endofito y Pastoreo sobre la emergencia, la severidad de daño y la biomasa de las plantas de soja. Las condiciones generadas por la historia de uso (pastizal y promoción de *L. multiflorum*) fueron analizadas de manera independiente. El cuadro muestra los valores del estadístico con los grados de libertad asociados (F_{gl}) y el valor de probabilidad (p -valor).

	Pastizal					
	Emergencia		Severidad		Biomasa	
	$F_{1,15}$	p -valor	$F_{1,15}$	p -valor	$F_{1,15}$	p -valor
Endofito (E)	0.26	0.617	0.08	0.779	0.001	0.978
Pastoreo (P)	1.77	0.204	3.89	0.067	0.70	0.417
E x P	2.35	0.146	0.59	0.455	0.47	0.505

	Promoción					
	Emergencia		Severidad		Biomasa	
	$F_{1,15}$	p -valor	$F_{1,15}$	p -valor	$F_{1,15}$	p -valor
Endofito (E)	0.02	0.882	2.33	0.148	0.01	0.923
Pastoreo (P)	6.54	0.022	0.28	0.604	3.03	0.102
E x P	14.14	0.002	1.42	0.252	0.46	0.506

Cuadro 4.3: coeficientes de correlación (Pearson) entre pares de variables medidas (emergencia, biomasa y severidad de las plantas de soja) y posibles vías que pudieron mediar los efectos de retroalimentación de los endofitos y el pastoreo: la biomasa radicular de las plantas de *L. multiflorum* (Lm) que crecieron durante la estación anterior, el pH, las tasas de mineralización potencial y la humedad del suelo (Ver resultados en capítulo 3). Los coeficientes de correlación fueron calculados por separado para los suelos con historia de pastizal y de promoción. Coeficientes significativos a dos colas están indicadas con un asterisco (valor $P < 0,05$; *), dos asteriscos (valor $P < 0,01$; **) o tres asteriscos (valor $P < 0,001$; ***). No los hubo.

	Pastizal		
	Emergencia	Biomasa soja	Severidad
Biom. radicular Lm ($g.m^{-2}$)	-0.11	-0.34	0.12
pH suelo	0.16	-0.28	-0.14
Humedad suelo (%)	-0.07	-0.14	0.03
Min.pot suelo ($mg\ N. g\ suelo^{-1}. día^{-1}$)	0.04	-0.05	0.04

	Promoción		
	Emergencia	Biomasa soja	Severidad
Biom. radicular Lm ($g.m^{-2}$)	0.36	0.10	-0.38
pH suelo	0.23	-0.19	-0.25
Humedad suelo (%)	0.33	0.17	-0.34
Min.pot suelo ($mg\ N. g\ suelo^{-1}. día^{-1}$)	0.18	0.17	-0.15

Cuadro 4.4: resultado de los modelos para los efectos de retroalimentación de los Endofito (E+ vs. E-) en contextos de Pastoreo (P+ vs. P-) sobre la biomasa aérea, la cantidad de capítulos abiertos y la frecuencia de abejas (*A. mellifera*) que visitaron los capítulos de *C. acanthoides*. Las condiciones generadas por historia de uso (pastizal y promoción de *L. multiflorum*) fueron analizados de manera independiente. El segundo modelo para las abejas en el suelo de promoción incluyó a los capítulos abiertos como covariable con el objeto de probar su importancia como mecanismo a través del cuál podrían propagarse los efectos (ver **Figura 4.5 d**). El cuadro muestra los valores del estadístico con los grados de libertad asociados (F_{g_i}) y el valor de probabilidad (p -valor).

Pastizal						
	Biom aérea		Capítulos		Abejas	
	$F_{1,10}$	p -valor	$F_{1,10}$	p -valor	$F_{1,10}$	p -valor
Endofito (E)	0,34	0,574	0,46	0,512	0,40	0,543
Pastoreo (P)	0,15	0,709	0,46	0,514	0,24	0,637
E x P	0,14	0,714	0,30	0,597	0,29	0,605

Promoción						
	Biom aérea		Capítulos		Abejas	
	$F_{1,8}$	p -valor	$F_{1,8}$	p -valor	$F_{1,8}$	p -valor
Endofito (E)	1,43	0,266	12,30	0,008	12,62	0,008
Pastoreo (P)	1,57	0,245	5,70	0,044	9,04	0,017
E x P	0,78	0,403	9,00	0,017	2,05	0,190

Endofito (E)	8,88	0,041
Pastoreo (P)	3,02	0,157
E x P	0,71	0,448
Capítulos (C)	6,99	0,057
E x C	1,77	0,254
P x C	6,31	0,066
E x P x C	2,83	0,168

Ambas relaciones aéreas generaron una retroalimentación negativa sobre las plantas de *C. acanthoides* que fue evidente a través de la producción de capítulos. Estos resultados apoyan parcialmente las hipótesis de trabajo dado que hubo efectos sobre la cantidad de capítulos pero no, sobre la biomasa de las plantas (Orr et al. 2005) como proponía la hipótesis de trabajo. Por otro lado, no se corroboró la hipótesis respecto de que el pastoreo reduce los efectos del endofito (García Parisi et al. 2011). En cambio, los resultados muestran por primera vez que el pastoreo y el endofito en *L. multiflorum* tuvieron un impacto similar sobre la respuesta de retroalimentación (i.e.: la producción de capítulos de *C. acanthoides*).

Las relaciones aéreas pudieron generar cambios en las comunidades de descomponedores (Hughes y Uowolo 2006, Liao et al. 2008) y, en la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno (Zou et al. 2006), fósforo (Chapuis-Lardy et al. 2006) y otros minerales (Vanderhoeven et al. 2005) con consecuencias negativas sobre la producción o duración de los capítulos de *C. acanthoides*. El trabajo de Newsham et al. (1994)

sugiere que las infecciones de patógenos del suelo pueden alterar el éxito reproductivo de otras especies. Un mecanismo similar no puede ser descartado en este caso. Aunque no podamos dilucidar el mecanismo específico, este efecto podría tener consecuencias negativas sobre la producción de semillas y finalmente, sobre la dinámica de la población, la estructura de la comunidad y la sucesión de especies en la comunidad.

Tanto el endofito en las plantas de *L. multiflorum* como el pastoreo tuvieron un impacto negativo sobre la frecuencia de abejas que visitaron a *C. acanthoides* durante la siguiente estación de crecimiento. Estos resultados apoyan parcialmente la hipótesis de trabajo dado que el número de capítulos en las plantas de *C. acanthoides* podría explicar en parte el efecto del pastoreo y no el efecto del endófito (**Cuadro 4.2**). Estos resultados sugieren que mecanismos alternativos intervinieron para modificar la frecuencia de visitas de abejas. Además del atractivo generado por la cantidad de flores, las abejas podrían responder a cambios en el olor distintivo del néctar o a la presencia de otros compuestos volátiles a distancias cortas (Giurfa y Núñez 1993). Los resultados coinciden con trabajos previos en sugerir que las visitas de las abejas a los capítulos de *C. acanthoides* no es azarosa y esta guiada por la recompensa de néctar (Real 1981, Visscher y Seeley 1982, Zimmerman y Cook 1985, Fewell y Winston 1992) o un repelente dejado por ellas mismas en las flores ya visitadas y agotadas (Giurfa y Núñez 1992, 1993, Giurfa et al. 1994). Este tipo de señales también fueron sugeridas por otros autores que estudiaron el comportamiento de recolección de las abejas (Frankie et al. 1997, Goulson 2000, Reader et al. 2005). Aunque no podemos identificar los compuestos responsables, cambios en las recompensas o en las señales olorosas son todos mecanismos a través de los cuales las respuestas de retroalimentación pudieron reducir la frecuencia de visitas no explicada por la cantidad de capítulos. Como consecuencia, las abejas podrían visitar otras especies y eventualmente, influir sobre el éxito ecológico de las especies vecinas a *C. acanthoides*. Sin embargo, las consecuencias de estos efectos sobre la estructura y dinámica de la comunidad son más difíciles de predecir (Ohgushi 2005).

Los efectos de retroalimentación tampoco fueron evidentes a través de la biomasa de las plantas de *Glycine max*. En cambio, la interacción entre el endofito y el pastoreo determinó el establecimiento de las plantas a través de sus efectos sobre la emergencia. Estos resultados dieron sustento parcial a la hipótesis de que el endofito genera una retroalimentación negativa sobre la biomasa, la emergencia y la severidad de daño en las plantas de *G. max*. En este capítulo el efecto más importante ocurrió sobre la mortalidad y no sobre el nivel de daño en las plántulas de *G. max*. Cabe destacar que las plantas pudieron permanecer asintomáticas (Larkin et al. 1995a). A pesar de no tener síntomas, estas plantas podrían tener menor productividad o un menor desarrollo del sistema radicular [(Ej.: Larkin et al. 1995a)- en alfalfa (*Medicago sativa*)]. Estas evidencias sugieren que las plantas que han emergido podrían no ser capaces de compensar la menor densidad y en consecuencia tampoco el rendimiento del cultivo.

Aunque no podemos identificar los organismos o factores específicos responsables de los efectos observados, este capítulo muestra que la respuesta neta de retroalimentación fue perjudicial para las dos especies exóticas evaluadas. Estos resultados sugieren que los cambios en el suelo inhibieron la emergencia de *G. max* mientras que no fueron capaces de generar un efecto similar sobre las plantas de *C. acanthoides* dando sustento a la idea de especificidad en las retroalimentaciones (Bever et al. 1997, Hedlund 2002, Kowalchuk et al. 2002, Kowalchuk et al. 2003). Pero además, podrían estar involucrados en los mecanismos responsables de la capacidad

invasora de la simbiosis *L. multiflorum* – *N. occultans* (Richardson et al. 2000a, Keane y Crawley 2002, Klironomos 2002, Reinhart et al. 2003, Reinhart y Callaway 2006).

Se ha sugerido que los patógenos juegan un papel importante en la evolución de las poblaciones (Clay y Kover 1996) y en la composición de las especies en las comunidades naturales (Packer y Clay 2000, Klironomos 2002, Bever 2003, van der Putten 2003, Burdon et al. 2006, Kardol et al. 2006). A pesar de que en este experimento no se aislaron los agentes causales del daño, algunos trabajos previos permiten especular que los hongos patógenos del suelo como por el ejemplo los del complejo del “damping-off” (Ej.: *Pythium* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp.) podrían estar involucrados (revisado en Hendrix y Campbell 1973, Jarosz y Davelos 1995, Larkin et al. 1995b, Pankhurst et al. 1995, Deep y Lipps 1996, Rizvi y Yang 1996, Yang et al. 1996, Bever et al. 1997, Mills y Bever 1998, Zhang y Yang 2000). En particular, los hongos de este complejo son responsables de pérdidas de densidad en los cultivos de soja por daños ocasionados en semillas y plántulas. En este experimento, las respuestas de retroalimentación pudieron influir sobre el suelo (Ej.: con cambios en la humedad del suelo o en la presencia de compuestos exudados específicos) estimulando la germinación de las esporas o el crecimiento del micelio de hongos patógenos. Hasta el momento, se han observado efectos negativos de los endofitos sobre algunos hongos patógenos solo bajo condiciones *in vitro* (Newsham et al. 1995). Bajo condiciones naturales, la acumulación de hongos patógenos específicos como *Pythium* spp. es poco probable en el corto plazo de una estación de crecimiento. Además, las esporas y esclerocios de hongos en el suelo suelen ser altamente persistentes (Jarosz y Davelos 1995). Tampoco se puede descartar el papel de otros componentes de la comunidad del suelo. Por ejemplo, otro tipo de hongos o de bacterias de la rizosfera (Westover y Bever 2001), hongos micorrícicos (Bever et al. 1996), artrópodos [Ej.: nematodos (Capítulo 3)] o, incluso enfermedades fisiogénicas que podrían generar efectos similares.

Las respuestas de retroalimentación dependieron de la historia del ambiente. De acuerdo con lo predicho, los efectos fueron más importantes en ambientes con mayor grado de disturbio- representado por la promoción (Capítulo 3). Los resultados de este capítulo concuerdan con la idea de que los ambientes menos disturbados son además, más resilientes probablemente debido a complejidad en sus comunidades (Cragg y Bardgett 2001, Schipper et al. 2001, Wardle et al. 2003, Culman et al. 2010). Una mayor resiliencia en el suelo de pastizal podría explicar la ausencia de efectos de retroalimentación. Estas diferencias entre ambientes no son menores si consideramos las implicancias sobre la dinámica de las comunidades. La historia de los ambientes debería ser considerada como un aspecto importante a la hora diseñar estrategias de manejo o planificar el uso de los ambientes.

La especie *L. multiflorum* generalmente hospeda al endofito *N. occultans* y ha evolucionado junto con herbívoros vertebrados en ambientes de pastizal y en pasturas. Es probable que estas relaciones conjuntamente tengan una influencia importante en la configuración de estas comunidades (Bardgett et al. 1998). Este trabajo es uno de los primeros en examinar los efectos de retroalimentación de simbiosis *L. multiflorum*-*N. occultans* y el pastoreo sobre otras especies exóticas (*C. acanthoides* y *G. max*). Mientras es difícil especular un mecanismo específico asociado al efecto sobre *C. acanthoides* ó, de *G. max*, los efectos se propagaron a otras relaciones como las abejas que visitan los capítulos de *C. acanthoides*. A pesar que los mecanismos no fueron dilucidados, los resultados contribuyen a la comprender cómo una simbiosis puede alterar la composición y la trayectoria sucesional de la comunidad y, potencialmente, la productividad o el rendimiento de cultivos agrícolas.

**CAPÍTULO 5 LAS CONSECUENCIAS ECOLÓGICAS DE
NEOTYPHODIUM OCCULTANS EN COMUNIDADES DE PASTIZAL**

5.1 INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de invasión la especie invasora puede tener un impacto negativo en la comunidad receptora debido a que desplaza especies nativas, altera la biodiversidad y la productividad (Vitousek et al. 1987, Maron y Connors 1996, Kiers et al. 2000, Richardson et al. 2000a, Hartnett y Wilson 2002). Entender el proceso de invasión, los factores que la favorecen y sus consecuencias, son temas prioritarios para la conservación y la gestión de los recursos naturales (Ricciardi y Cohen 2007). Los filtros a la invasión incluyen factores abióticos (disponibilidad de agua y nutrientes, la ocurrencia de disturbios o características climáticas), así como interacciones bióticas negativas (competencia, herbivoría, parasitismo) o positivas (facilitación, mutualismo) que pueden perjudicar o favorecer el establecimiento, la colonización o la expansión de la población invasora (Keddy 1992, Weiher y Keddy 1999, Tilman y Lehman 2001, Levine et al. 2004, Mitchell et al. 2006, Saunders et al. 2010).

Las interacciones mutualistas pueden contribuir al establecimiento de algunas especies invasoras (Bruno et al. 2003). En estos casos, la ausencia del simbiote en la comunidad receptora puede limitar el éxito de la especie invasora (Richardson et al. 2000b). Esto es así, cuando el simbiote es un organismo de vida libre como los hongos micorrícicos o las bacterias fijadoras de nitrógeno (van der Heijden et al. 1998, Klironomos et al. 2000, Parker 2001, Desprez-Loustau et al. 2007). Una situación distinta ocurre cuando el simbiote se dispersa junto con la especie invasora como sucede con los microorganismos de transmisión vertical exclusiva.

Los hongos endofitos del género *Neotyphodium* crecen sistemáticamente dentro de los tejidos aéreos de numerosas especies de pastos y se transmiten de generación en generación a través de las semillas de la planta hospedante, es decir, no hay propagación del hongo por contagio (Clay 1990, Leuchtman 1993, Clay y Schardl 2002). La planta hospedante proporciona protección, nutrientes y un medio de dispersión al hongo endofito que hospeda. A su vez, el endofito beneficia a la planta al aumentar la tolerancia ante situaciones de estrés biótico y abiótico a través de distintos mecanismos (Malinowski y Belesky 2000, Clay y Schardl 2002, Cheplick y Faeth 2009). Algunas evidencias muestran que los endofitos contribuyen a superar los filtros impuestos por el ambiente (Uchitel 2008, Omacini et al. 2009), contribuyendo a la expansión geográfica de la población que los hospeda y generando cambios dramáticos en la estructura y funcionamiento de las comunidades vegetales (Rudgers et al. 2004, Clay et al. 2005, Rudgers y Clay 2007).

Se ha sugerido que, los hongos endofitos mejoran la capacidad invasora de *Lolium arundinaceum* (festuca) (Rudgers y Orr 2009). En particular, la presencia de *N. coenophialum* en *L. arundinaceum* aumentó la abundancia del pasto hospedante y redujo la riqueza de especies (Clay y Holah 1999). Estos efectos fueron evidentes un año después de la siembra y cuatro años después las parcelas sembradas con la simbiosis *L. arundinaceum* – *N. coenophialum* fueron casi monoespecíficas demostrando que el endofito mejoró la producción de biomasa de la planta hospedante y modificó la estructura de la comunidad (Clay y Holah 1999). Además, el pastoreo aumentó la frecuencia de *L. arundinaceum* hospedantes de *N. coenophialum* del 50 al 80 % (Clay et al. 2005). Este efecto a su vez, significó un aumento en la biomasa de *L. arundinaceum* y, una reducción en la biomasa de otras especies de la comunidad (Clay et al. 2005). Hok y Hik (2007) encontraron una mayor frecuencia del endofito en poblaciones de *Festuca altaica* a medida que aumentaba el nivel de pastoreo. Sin embargo, otros estudios sugieren que la combinación de genotipos involucrados en la

simbiosis o, las características de la comunidad receptora pueden modular el resultado de la relación pasto-endofito-herbívoro y, alterar de manera sustancial los efectos de la simbiosis sobre la comunidad (Spyreas et al. 2001, Faeth et al. 2004, Cheplick y Faeth 2009). Este capítulo propone que el sesgo en el estudio de unos pocos hospedantes: *L. arundinaceum* y *L. perenne* (Clay 1990, Clay 1997, Spyreas et al. 2001) ha descuidado el impacto de los endofitos en el proceso de invasión de pastos anuales así como la importancia de considerar a la comunidad receptora.

La especie *L. multiflorum* de origen europeo se encuentra naturalizada en las comunidades de pastizal de la Región Pampeana (Perelman et al. 2001, Chaneton et al. 2002, Perelman et al. 2007). Esta especie ha aumentado su rango de distribución y su abundancia local probablemente debido a su alta capacidad competitiva y producción de biomasa - estrategia de crecimiento ruderal (Grime 2001). Este fenómeno es evidente tanto en pastizales pastoreados como en campos abandonados donde también se ha observado una disminución en la riqueza de especies nativas (Chaneton et al. 1988, Omacini et al. 1995, Chaneton et al. 2002, Perelman et al. 2007, Gundel et al. 2009, Tognetti 2010). Las poblaciones naturalizadas de *L. multiflorum* suelen presentar altos valores de infección con *N. occultans* en distintos ambientes (Gundel et al. 2009). A pesar de que se ha encontrado que la presencia de *N. occultans* favorece el reclutamiento de plántulas y el crecimiento de *L. multiflorum* (Omacini et al. 2009, Uchitel et al. 2011), no se han registrado trabajos que consideren los efectos de esta simbiosis sobre las comunidades en experimentos a campo.

El paisaje de la subregión de la Pampa Deprimida, es un mosaico fino de comunidades determinado en gran medida por los filtros impuestos por el ambiente (Perelman et al. 2001). La topografía, las características edáficas, las inundaciones frecuentes en invierno y la sequía durante el verano representan los principales filtros abióticos que determinan la composición de especies y la productividad de estas comunidades (Insausti et al. 1999). Además, la ganadería (i. e.: cría de ganado vacuno) ha sido la principal actividad productiva y las diferencias en el manejo del pastoreo en estos pastizales impuso cambios drásticos en la estructura de las comunidades (Sala et al. 1986, Chaneton et al. 2002). En la actualidad, las praderas de mesofitas cubren la mayor parte de esta subregión bajo condiciones de pastoreo (ver Perelman et al. 2001). A su vez, en estos pastizales el pastoreo promueve la invasión de especie exóticas y la riqueza de la comunidad mientras reduce la heterogeneidad en la composición y los grupos funcionales de especies a escala de paisaje (Chaneton et al. 2002). Estos cambios se deberían a que el pastoreo modula el equilibrio de las relaciones de competencia entre especies y, en consecuencia, el éxito de las especies invasoras en una comunidad receptora (Milchunas y Lauenroth 1993). Si bien se encontró una correlación negativa entre la cobertura de *L. multiflorum* y la de los pastos nativos que crecen en verano (Perelman et al. 2007) aún se desconoce el papel potencial de los hongos endofitos sobre la capacidad invasora de este pasto exótico.

El objetivo de este capítulo es evaluar en condiciones de campo, el papel de *N. occultans* sobre la capacidad invasora del hospedante *L. multiflorum* así como su impacto sobre la composición de la comunidad en pastizales de la subregión Pampa Deprimida. Dado que el pastoreo vacuno produjo cambios profundos en la estructura de las comunidades y en los filtros ambientales a la invasión, el papel de los hongos endofitos es evaluado en comunidades pastoreadas y en comunidades no pastoreadas donde el ganado ha sido excluido desde el año 2004. La hipótesis asociada a este objetivo propone que la presencia de hongos endofitos aumenta la capacidad de las plantas hospedantes de superar los filtros de la comunidad, y por lo tanto favorece el

establecimiento de plántulas y la cobertura de la planta hospedante. Además, los hongos endofitos modifican la composición de la comunidad dependiendo de los filtros a la invasión que esta imponga (Diamond 1975, Weiher y Keddy 1999, Mitchell et al. 2006, Saunders et al. 2010). Las comunidades no pastoreadas establecen filtros para el reclutamiento de plantas desde semillas (Grime 2001) y serían entonces, más resistentes a la invasión que las comunidades constantemente perturbadas por el pastoreo (Crawley 1987, Rejmánek 1989, Chanton et al. 2002, Shea y Chesson 2002). Si los hongos endofitos favorecen la invasión del hospedante, sería esperable que los efectos del endofito sean más importantes en las comunidades con filtros más fuertes. Para contrastar dichas hipótesis se realizó un experimento a campo en el que se agregaron semillas de *L. multiflorum* con alto o bajo nivel de infección con hongos endofitos en parcelas con diferente historia de pastoreo y, hacia el final de la estación de crecimiento, se determinó la cobertura de *L. multiflorum* y la de otras especies agrupadas en grupos funcionales.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Diseño experimental

El experimento fue conducido en un área de 200 ha en un pastizal seminatural, pradera de mesofitas (ver Perelman et al. 2001) ubicado en la Pampa Deprimida, cerca de la localidad de Pila, Buenos Aires (36° 30' S, 58° 30' O). Las temperaturas medias varían de 8,2 °C en julio a 21,4 °C en enero. La precipitación total anual para el área es »900 mm. Los sitios experimentales compartieron la misma posición topográfica y tipo de suelo [Natracuol típico: horizonte A franco, levemente ácido, no salinos y horizonte B arcilloso – franco arcilloso, alcalino y salino, (Berasategui y Barberis 1992)]. En otoño de 2009, se seleccionaron sitios experimentales (4 m²) en comunidades con distintas historias de pastoreo (pastoreadas, n= 12 y no pastoreado, n= 7). Los sitios no pastoreados fueron cercados en el otoño de 2004, mientras que los sitios pastoreados fueron cercados para protegerlos de ganado al inicio del experimento en el verano de 2008. Las cercas colocadas excluyeron al ganado vacuno, mientras que animales pequeños pudieron estar presentes durante todo el experimento (aves, insectos, ratones, conejos, etc.).

Dado que la disponibilidad de recursos (es decir, los nutrientes del suelo, la humedad del suelo, temperatura o luz) y la identidad de las especies de plantas no fueron controladas, los parches pastoreados y no pastoreados fueron caracterizadas en relación a la estructura y composición florística, la incidencia de la luz y el suelo. Dentro de cada sitio, la biomasa aérea se cortó a ras de suelo (marco de 20 cm x 50 cm). El material verde se separó del material muerto en pie y la broza. Las especies de plantas fueron identificadas. Todo el material fue secado (60 °C, 48 h) y pesado (con una precisión de 0,01 g). Se determinó la riqueza de especies. Antes de realizar el corte al ras, la radiación interceptada por encima y por debajo de la cobertura vegetal se midió con un sensor cuántico (line quantum sensor, Cavadevices). Se realizaron tres determinaciones (sub-réplicas) en cada sitio (n= 6 no pastoreado y n= 8 pastoreado). El sensor cuántico mide el flujo de fotones fotosintéticos (FFF), ubicado a lo largo de una barra de un metro. La penetración de la luz (%) fue calculada como el porcentaje del FFF que llega al suelo (por debajo de la cobertura vegetal) en relación a la registrada por encima de la cobertura vegetal (plena luz solar). En cada sitio se tomaron muestras de suelo (3 cilindros de 2,5 cm de diámetro de 0 a 15 cm de profundidad cada uno; n= 6 no pastoreado y n= 10 pastoreado). Los análisis de fertilidad química se realizaron en los laboratorios del INGEIS (Conicet, Buenos Aires, Argentina). Se determinó el pH 1:2,5,

la conductividad eléctrica (c.e), el carbono orgánico (Corg, método Walkley y Black), el nitrógeno total (Nt, Kjeldahl), el fósforo (P, Kurtz y Bray). Las determinaciones de capacidad de intercambio catiónico (CIC), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), sodio (Na^+) y potasio (K^+) se realizaron en acetato de amonio 1 N a pH 7 (**Cuadro 5.1**). Las fluctuaciones de la temperatura y la humedad del suelo se obtuvieron mediante sensores que permanecieron en los sitios durante todo el experimento (Echo 2 CE-10 Decagon, n= 3 en cada tipo de comunidad. **Figura A.1**). Desafortunadamente, varios sensores se rompieron o fueron dañados por animales y los datos obtenidos no pudieron ser analizados estadísticamente.

El experimento de agregado de semillas fue conducido durante abril-diciembre de 2009. Se aplicaron tres tratamientos que consistieron en el agregado de semillas de *L. multiflorum* con alta frecuencia de endofitos *N. occultans* (E+), el agregado de semillas de *L. multiflorum* con baja frecuencia de endofitos *N. occultans* (E-) o, el control sin agregado de semillas (C). Cada tratamiento se aplicó al azar en una de tres parcelas (0,6 x 0,9 m) dentro de cada sitio ([7 ó 12]) x 3 = 57 parcelas). Una cantidad de 3 y 5 gramos de semillas (equivalente a 5000 y 8300 semillas.m⁻²) fue agregada en las parcelas correspondientes a mediados de otoño y principios de invierno en 2009, respectivamente. La emergencia de plántulas a mediados de otoño fue baja, presumiblemente debido a la sequía (**Figura A.1**). Entonces, el agregado de las semillas se repitió a principios del invierno. Antes de agregar las semillas, se removieron las plantas de *L. multiflorum* que crecieron naturalmente en las parcelas y, la biomasa aérea se cortó a ras de suelo en todos los sitios (como se explicó antes). Este procedimiento homogeneizó el microambiente de las parcelas respecto de factores que influyen en la germinación y el establecimiento de plantas de *L. multiflorum*.

Las semillas de *L. multiflorum* E+ y E- fueron cosechadas a fines de primavera (diciembre) y se almacenaron hasta comenzar el experimento. Estas semillas fueron obtenidas siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3. Es importante considerar que no se trató de controlar el genotipo de la plantas; en cambio, se trabajó con grupos de semillas procedentes de poblaciones naturales de *L. multiflorum*. El potencial de germinación de las semillas de las poblaciones E+ y E- fue evaluado bajo condiciones de laboratorio (15-25 °C, 8 horas de luz, 5 d, n= 4). No hubo diferencias en el porcentaje de germinación entre los dos grupos de semillas [E+= 98,75 % (95-100 %) vs. E-= 95 %. P> 0.10, prueba de Welch-T, n= 5 (4,97)] lo que ya se ha observado en estudios previos (Vila-Aiub et al. 2005, Gundel et al. 2006a, Gundel et al. 2006b, Uchitel et al. 2011). Los niveles iniciales de frecuencia de endofitos se examinaron mediante tinción con rosa de Bengala y observación bajo microscopio óptico (n= 30 semillas por población). Las frecuencias expresadas en porcentaje de semillas fueron del 80 % y 4 % para las poblaciones E+ y E-, respectivamente.

5.2.2 Determinaciones

Los datos fueron recolectados en primavera, durante la floración de *L. multiflorum* y en verano, al final de la estación de crecimiento. Se determinó la riqueza de especies y la cobertura basal a lo largo de transecciones permanentes (60 cm) colocadas en una diagonal fija en cada parcela. La complejidad de la cobertura herbácea hizo impráctica la determinación de densidad. Por lo tanto, los valores de cobertura se expresan como porcentaje en base a la cobertura basal de especies vivas de cada transección (Chaneton et al. 2002). Dado que *L. multiflorum* fue manipulado experimentalmente, su cobertura fue excluida al determinar los porcentajes. La cobertura de *L. multiflorum* en primavera se utilizó para estimar su capacidad de colonización. Las especies fueron clasificadas en

grupos funcionales según: pastos nativos, pastos exóticos y dicotiledóneas. El grupo de los pastos incluyó especies gramíneas y graminoides.

La frecuencia de endofitos se comprobó a partir de tinción y observación microscópica de semillas de *L. multiflorum* cosechadas en cada parcela, a finales de primavera (n= 30, diciembre de 2009) (Moon et al. 2000). El agregado de semillas modificó la frecuencia de endofitos en *L. multiflorum* en las parcelas. Independientemente de la historia del sitio, el 93 % de las semillas producidas por las plantas en las parcelas E+ hospedaron a *N. occultans* en tanto que, el 75 % y el 50 % de las semillas hospedaron al endofito en las parcelas control y E-, respectivamente (Cuadro 5.2). La frecuencia de *N. occultans* en las parcelas control y E- fue superior a los niveles de infección en las semillas agregadas (4 %); esto sugiere que parte de las plantas de *L. multiflorum* que se midieron en las parcelas provino del banco de semillas natural a pesar de que se eliminaron las espigas y plántulas antes del experimento.

5.2.3 Análisis estadístico

Las medidas iniciales: la biomasa verde (g.m^{-2}), la biomasa muerta en pie y la broza (g.m^{-2}), la riqueza de especies (parcela^{-1}), la penetración de la luz (%) y los parámetros químicos del suelo (pH, c.e., CIC, carbono orgánico, nitrógeno total, fósforo disponible, Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+), fueron comparadas mediante el mismo modelo estadístico. El modelo incluyó a la comunidad (pastoreada o no pastoreada) como factor fijo. La riqueza fue transformada por el ranking para cumplir con los supuestos del modelo. Las medidas posteriores: el porcentaje de semillas de *L. multiflorum* cosechadas con endofitos, la cobertura de *L. multiflorum* (%), la riqueza de especies y la cobertura relativa de los grupos funcionales [pastos nativos, pastos exóticos y dicotiledóneas (%)] fueron analizadas mediante un modelo que incluyó a la historia del sitio y al agregado de semillas (C, E- o E+) como factores fijos. Los datos se analizaron con modelos lineales de efectos mixtos que consideraron el anidamiento de las parcelas (tratamiento de agregado de semillas) dentro de los sitios. Por lo tanto, el sitio fue el factor aleatorio de los modelos. Los modelos se realizaron utilizando la función lme en el paquete nlme (Pinheiro y Bates 2000, Pinheiro et al. 2009). Cuando hubo efectos estadísticamente significativos debidos al agregado de semillas, se realizó un segundo análisis para evaluar a la cobertura de *L. multiflorum* como un posible mecanismo capaz de explicar los efectos observados. El segundo modelo incluyó la cobertura relativa de *L. multiflorum* y la interacción con los factores fijos (es decir: historia y agregado de semillas). Los datos de pastos exóticos fueron transformados por la raíz cuadrada para cumplir con los supuestos del modelo. Los datos de dicotiledóneas fueron transformados por la raíz cuadrada [Sin embargo, los residuos no se distribuyeron normalmente (Shapiro-Wilk, $P < 0,001$)]. Las comparaciones *a posteriori* entre tratamientos se realizaron mediante pruebas de Tukey ($p < 0,05$). Las pruebas de Tukey se realizaron con la función glht en el paquete multcomp (Hothorn et al. 2008). Los cambios en la composición florística a lo largo de las estaciones, hizo que fuera sensato separar los análisis para cada estación en lugar de considerarlos medidas repetidas. Todos los análisis se realizaron con el software R-cran, la versión 2.10.1 (R Development Core Team 2007). Los resultados se presentan como las medias no transformadas de las repeticiones correspondientes \pm error estándar.

5.3 RESULTADOS

La historia previa dada por la presencia o ausencia de pastoreo, generaron cambios entre sitios (Cuadro 5.1). El pastoreo no modificó la cantidad de biomasa verde pero,

redujo nueve veces la biomasa muerta y, en consecuencia aumentó la penetración de luz en comparación con los sitios no pastoreados (**Cuadro 5.1**). A pesar, de que la riqueza fue similar en sitios con distinta historia de pastoreo, la composición de especies fue diferente. Los sitios pastoreados estuvieron dominados por pastos nativos y exóticos y, una pequeña proporción de dicotiledóneas. Las especies dominantes fueron todas nativas estivales perennes: *Stenotaphrum secundatum*, *Distichlis scoparia*, *Paspalum dilatatum* y *Sporobolus indicus*. Los sitios no pastoreados estuvieron dominados de manera exclusiva por pastos nativos estivales perennes. En estos sitios, las especies dominantes fueron: *P. dilatatum*, *P. paludivagum* y *D. scoparia* (ver en el Anexo **Cuadro A.2**).

La historia previa también generó diferencias en el ambiente del suelo entre sitios con o sin pastoreo (**Cuadro 5.1**). Parámetros químicos como el pH, la conductividad eléctrica (c.e.) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) fueron significativamente mayores en los sitios pastoreados que en los sitios no pastoreados. Además, en los sitios pastoreados la disponibilidad de nutrientes fue en general, mayor que en los sitios no pastoreados. Estas diferencias fueron significativas para los valores de carbono orgánico, nitrógeno total, fósforo, magnesio y sodio. A pesar de que no fue posible el análisis comparativo, los sensores mostraron mayores valores de humedad en el suelo de los sitios pastoreados que en los sitios no pastoreados (**Figura A.1**).

La cobertura de las plantas de *Lolium multiflorum* dependió de la historia del sitio y del agregado de semillas (**Cuadro 5.2** y **Figura 5.1**). La interacción muestra que en los sitios pastoreados el agregado de semillas aumentó la cobertura de *L. multiflorum* pero no el nivel de infección con endofitos de las semillas agregadas (i.e. la cobertura de esta especie fue igual en las parcelas E- y E+). En cambio, en los sitios no pastoreados, la cobertura de *L. multiflorum* aumentó como consecuencia del agregado de semillas y de la presencia del hongo endofito.

La riqueza de especies y la cobertura de los grupos funcionales variaron con la historia de pastoreo y el agregado de semillas durante la primavera. En cambio, durante el verano –cuando el ciclo de *L. multiflorum* había terminado, la riqueza y la cobertura de los grupos funcionales solo dependió de la historia del sitio (**Cuadro 5.3**). En primavera, el agregado de semillas con endofitos (E+) aumentó la riqueza de especies en los sitios pastoreados mientras que no generó cambios en esa variable en los sitios no pastoreados (**Cuadro 5.3**). La riqueza de especies varió de 4,3 en las parcelas control a 5,8 en las parcelas E+ en los sitios pastoreados y, fue de 4,6 en las parcelas de los sitios no pastoreados independientemente del agregado de semillas. Este efecto estuvo explicado por la cobertura de *L. multiflorum* (**Cuadro 5.3**).

Cuadro 5.1: características de la vegetación y del suelo en los sitios con historia de pastoreo y no pastoreados utilizados en el experimento. Las parcelas fueron instaladas en un área de 200 ha y compartieron el mismo tipo de suelo y ubicación topográfica. Los datos muestran el valor medio y el error estándar al comienzo del experimento. La penetración de la luz fue incluida dentro de las características de la vegetación dado que esta determinada por la biomasa aérea (i.e.: verde, muerta en pie y broza). Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios (Tukey, $P < 0.05$).

	Pastoreado	No pastoreado
Vegetación		
Riqueza de especies (parcela ⁻¹)	8,2±0,91 ^a	6,6±0,42 ^a
Biomasa aérea verde (g.m ⁻²)	256,97±40,87 ^a	310,4±86,79 ^a
Biomasa muerta en pie (g.m ⁻²)	72,97±42,62 ^a	672,33±191,19 ^b
Penetración de luz (%)	85,60±5,85 ^a	32,48±10,49 ^b
Suelo		
C orgánico (g.kg ⁻¹)	32,76±1,35 ^a	27,32±0,85 ^b
N total (g.kg ⁻¹)	3,1±0,14 ^a	2,6±0,08 ^b
P (mg.kg ⁻¹)	2,46±0,10 ^a	1,88±0,048 ^b
pH del suelo	7,29±0,13 ^a	6,75±0,06 ^b
Conductividad eléctrica (dS.m ⁻¹)	1,69±0,23 ^a	0,83±0,02 ^b
CIC (cmolc.kg ⁻¹)	22,80±0,65 ^a	18,95±0,55 ^b
Na (cmolc.kg ⁻¹)	3,33±0,41 ^a	2,06±0,10 ^b
Mg (cmolc.kg ⁻¹)	6,29±0,37 ^a	4,90±0,15 ^b
Ca (cmolc.kg ⁻¹)	8,6±0,5 ^a	7,3±0,3 ^a
K (cmolc.kg ⁻¹)	1,50±0,06 ^a	1,56±0,08 ^a

Cuadro 5.2: resultado de los modelos para los efectos de la historia (pastoreado y no pastoreado) y el agregado de semillas (Control, E+ o E-) sobre los niveles de infección con *Neotyphodium occultans* (Infección) y los valores de cobertura relativa de *Lolium multiflorum* (Cobertura). El cuadro muestra los grados de libertad (gl), el estadístico (F) y el valor de probabilidad (p-valor).

	Infección			Cobertura		
	gl	F	p-valor	gl	F	p-valor
Historia (H)	1,16	0,79	0,387	1,17	6,42	0,021
Semillas (S)	2,32	23,83	<0,0001	2,34	28,16	<0,0001
H x S	2,32	2,06	0,145	2,34	24,11	<0,0001

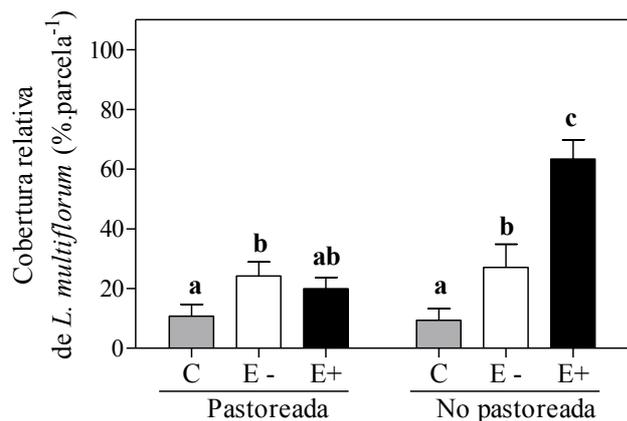


Figura 5.1: cobertura relativa de las plantas de *L. multiflorum* en los sitios pastoreados (n= 12) o no pastoreados (n= 7). El factor agregado de semillas incluyó parcelas: control (C. Sin agregado de semillas), con agregado de semillas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E +) frecuencia de *N. occultans*. Las barras muestran los valores medios (\pm error estándar). Letras distintas indican diferencias significativas con una probabilidad de error menor a 0,05.

La cobertura de pastos nativos (i.e.: *Panicum sabolorum*, *Paspalidium paludivagum*, *Paspalum dilatatum*, *P. vaginatum*, *Phalaris angusta*, *Setaria geniculata*, *Sporobolus indicus*, *Stenotaphrum secundatum* con cobertura mayor al 1%, ver **Cuadro A.2**) dependió de la historia del sitio y del agregado de semillas durante la primavera (**Cuadro 5.3** y **Figura 5.2 a**). Independientemente del agregado de semillas, la cobertura de pastos nativos fue del 33 % en los sitios pastoreados. En cambio, solo el agregado de semillas con endofitos redujo casi a la mitad la cobertura de este grupo funcional (pastos nativos) en los sitios no pastoreados. La cobertura de pastos nativos fue del 63 % tanto en las parcelas control como en las parcelas E- y, del 33 % en las parcelas E+. El efecto del agregado de semillas estuvo explicado por la cobertura de *L. multiflorum* (**Cuadro 5.3**).

La cobertura de pastos exóticos (*Gaudinia fragilis*, *Hordeum* spp., *Festuca arundinaceum*, *Cynodon dactylon*) dependió de la historia del sitio y del agregado de semillas en primavera. El agregado de semillas redujo la cobertura de pastos exóticos en los sitios pastoreados y no pastoreados (**Cuadro 5.3** y **Figura 5.2 b**). En los sitios pastoreados, la cobertura de pastos exóticos varió del 51 % al 38 % en las parcelas E+ y control, respectivamente. En los sitios no pastoreados, la cobertura de pastos exóticos varió del 24,5 % a 2 % en las parcelas E+ y control, respectivamente. En cambio, al comparar las parcelas sembradas con alta y baja frecuencia de endofitos (E- vs. E+), la reducción en la cobertura de este grupo fue marginal. Esto concuerda con el modelo que incluyó a la cobertura de *L. multiflorum* donde el efecto de los factores simples (historia y agregado de semillas) persistió al agregar la cobertura de *L. multiflorum* como covariable (**Cuadro 5.3**). El agregado de semillas no generó cambios en la cobertura de especies dicotiledóneas. Independientemente del agregado de semillas, la cobertura de dicotiledóneas fue mayor en los sitios pastoreados que en los sitios no pastoreados (**Cuadro 5.3** y **Figura 5.2 c**).

En los censos de verano, no hubo diferencias significativas entre tratamientos para la riqueza de especies (**Cuadro 5.3**). La riqueza promedio de las parcelas fue de cinco especies independientemente de la historia o el agregado de semillas. Si bien se mantuvieron las diferencias en la cobertura de pastos exóticos y dicotiledóneas debido a la historia de pastoreo, no hubo diferencias significativas debidas al agregado de semillas en ninguno de los grupos funcionales. La cobertura de pastos nativos fue del 42 % en los sitios pastoreados y del 67 % en los sitios no pastoreados; la cobertura de pastos exóticos fue del 46 % en los sitios pastoreados y del 7,2 % en los sitios no pastoreados y, la cobertura de dicotiledóneas fue del 5 % en los sitios pastoreados y del 0,14 % en los no pastoreados (**Cuadro 5.3**).

Cuadro 5.3: resultado de los modelos estadísticos para los efectos de la historia del sitio (pastoreado y no pastoreado) y el agregado de semillas (Control, E+ y E-) sobre la riqueza de especies y la cobertura relativa de pastos nativos (P. nativos), pastos exóticos (P. exóticos) y dicotiledóneas (Dicot). Los censos fueron realizados en primavera y en verano. El segundo modelo en primavera incluyó a la cobertura de *Lolium multiflorum* como covariable con el objeto de probar su importancia como mecanismo a través del cuál podrían producirse los efectos. Este modelo solo tuvo sentido cuando se encontraron efectos del factor “semillas”. El cuadro muestra los grados de libertad (gl), los valores del estadístico (F) y de probabilidad (*p*-valor).

	gl	Riqueza		P. nativos		P. exóticos		Dicot.	
		F	<i>p</i> -valor	F	<i>p</i> -valor	F	<i>p</i> -valor	F	<i>p</i> -valor
Primavera									
Historia (H)	1,17	0,23	0,636	2,89	0,107	7,18	0,016	3,66	0,073
Semillas (S)	2,34	1,50	0,237	0,59	0,560	4,90	0,014	0,15	0,861
H x S	2,34	4,06	0,026	7,90	0,002	1,25	0,299	0,31	0,734
Historia (H)	1,17	0,22	0,643	3,04	0,099	7,53	0,014		
Semillas (S)	2,28	1,51	0,238	0,51	0,608	4,50	0,020		
H x S	2,28	1,47	0,248	2,27	0,122	0,56	0,577		
Cobertura (Lm)	1,28	5,63	0,025	9,48	0,005	4,90	0,035		
H x Lm	2,28	0,07	0,790	1,01	0,324	0,09	0,766		
S x Lm	1,28	0,74	0,485	0,22	0,805	0,04	0,962		
H x S x Lm	2,28	1,78	0,187	0,11	0,899	0,11	0,899		
Verano									
Historia (H)	1,16	0,87	0,365	4,52	0,050	12,01	0,003	4,58	0,048
Semillas (S)	2,31	0,36	0,700	1,32	0,283	0,35	0,706	0,01	0,993
H x S	2,31	0,71	0,498	1,11	0,344	0,11	0,893	0,34	0,718

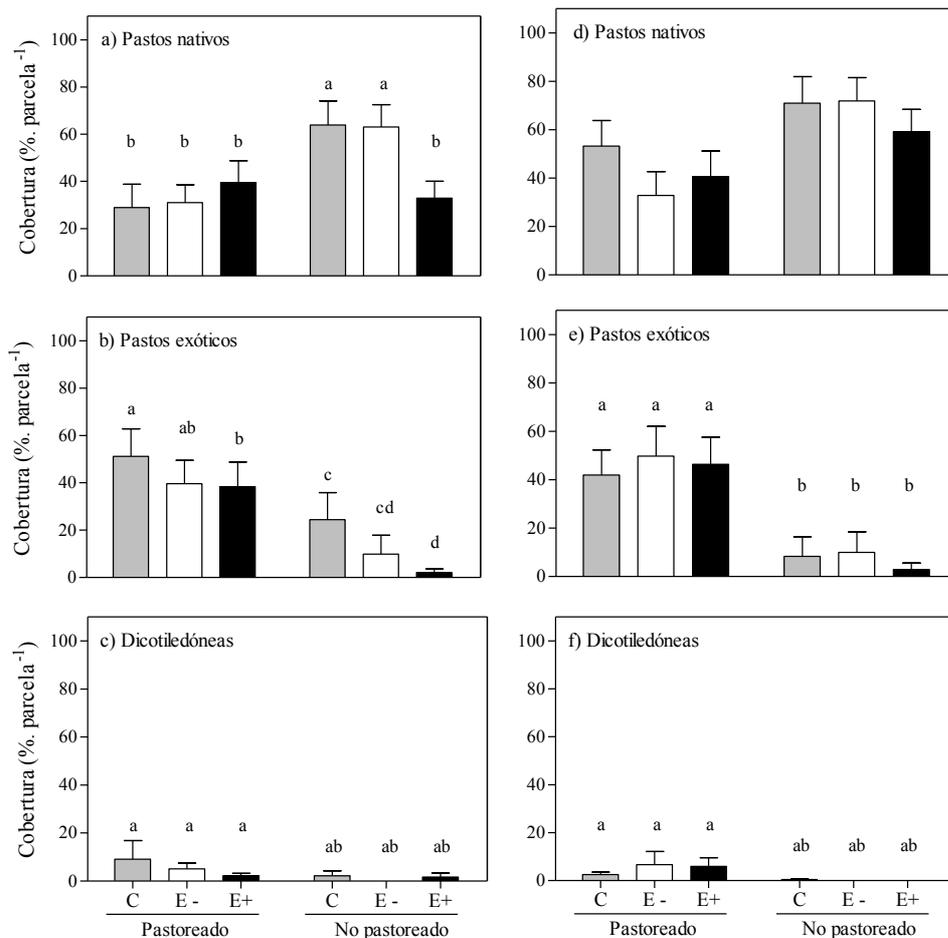


Figura 5.2: cobertura relativa de: a y d) pastos nativos, b y e) pastos exóticos y c y f) dicotiledóneas en los sitios pastoreados (n=12) o no pastoreados (n=7) en primavera de 2009 a la izquierda y en verano de 2010 a la derecha. El factor agregado de semillas incluyó parcelas: control (C. Sin agregado de semillas), con agregado de semillas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de *N. occultans*. Las barras muestran los valores medios (\pm error estándar). Letras distintas indican diferencias significativas con una probabilidad de error menor a 0,05.

5.4 DISCUSIÓN

Este capítulo puso en evidencia que la presencia de los hongos endofitos del género *Neotyphodium* puede tener un papel importante en el éxito de un hospedante anual y en la cobertura de otros pastos (nativos y exóticos) dependiendo de la condición inicial de la comunidad receptora. El endofito *N. occultans* aumentó la capacidad de *L. multiflorum* de pasar los filtros ambientales que podrían impedir la invasión en los sitios no pastoreados (Levine et al. 2004, Mitchell et al. 2006). Otros autores habían detectado que *L. arundinaceum* en simbiosis con *N. coenophialum* redujo el crecimiento posterior de algunas especies arbustivas (Orr et al. 2005, Rudgers y Orr 2009) pero no, el de dicotiledóneas herbáceas (Matthews y Clay 1999). Los resultados de este capítulo, muestran por primera vez el impacto del endofito sobre la comunidad herbácea bajo

condiciones de campo cuando el hospedante es un pasto anual. La presencia de *N. occultans* modificó la estructura de la comunidad vegetal que creció durante la primavera y estos efectos fueron explicados solo en parte a través de la cobertura que alcanzó *L. multiflorum*. Los resultados de este capítulo apoyan fuertemente la idea de que las diferencias impuestas por los filtros ambientales propios de cada comunidad y, la reacción de la comunidad determinan a escala local los efectos finales de la simbiosis (Stachowicz 2001, Bruno et al. 2003, Cheplick 2007, Vesterlund et al. 2011).

Uno de los resultados más importantes de este capítulo es que el efecto del endofito sobre la capacidad invasora de *L. multiflorum* fue evidente solo en los sitios no pastoreados. Este resultado da sustento parcial a la hipótesis planteada dado que hubo interacción entre el pastoreo y el endofito no observándose efectos similares en los sitios pastoreados. Algunas características de las comunidades que podrían imponer filtros diferentes entre las comunidades - la biomasa aérea, la disponibilidad de luz o el mantillo de broza- no intervinieron en este caso dado que la vegetación fue cortada a una misma altura y la broza fue removida al inicio del experimento. En cambio, diferencias en el ambiente del suelo (**Cuadro 5.1**), en las estrategias, en las tasas de crecimiento ó, en adaptaciones morfológicas de las especies dominantes en los sitios con distinta historia (Grime 2001) pudieron determinar diferencias en la recuperación después del corte inicial y en los filtros al establecimiento de *L. multiflorum* (Diamond 1975, Keddy 1992, Weiher y Keddy 1999, Tilman y Lehman 2001, Levine et al. 2004, Saunders et al. 2010).

La presencia de *N. occultans* puede influir en la capacidad invasora de *L. multiflorum* en los pastizales pampeanos. Aunque no se ha identificado el mecanismo responsable de estos efectos, las evidencias actuales permiten hacer algunas especulaciones. Por ejemplo, la presencia de *Neotyphodium* sp. pudo modificar la absorción de nutrientes de la planta hospedante, la actividad enzimática y la disponibilidad de nutrientes en el suelo [(Malinowski et al. 1998a, Malinowski et al. 2004)-*L. arundinaceum*]. Estos efectos pudieron favorecer a *L. multiflorum* especialmente en los sitios no pastoreados donde las condiciones del suelo fueron más restrictivas (Ej.: menor disponibilidad de nutrientes) y, donde las especies dominantes (i.e.: especies nativas perennes) se caracterizan por tener tasas de crecimiento relativamente lentas (Grime 2001). En cambio, los efectos pudieron quedar enmascarados en los sitios pastoreados donde las condiciones del suelo fueron más o menos restrictivas y, donde estuvieron presentes especies invernales con altas tasas de crecimiento como *L. multiflorum*. Sin embargo, no contamos con trabajos previos que hayan estudiado de manera específica en qué medida la presencia de *N. occultans* modifica la absorción de nutrientes de *L. multiflorum* para dar sustento a esta idea.

La presencia de pequeños vertebrados o invertebrados herbívoros (Clay et al. 2005) también puede ser un filtro biótico importante para el establecimiento y colonización de *L. multiflorum*. De hecho, los granívoros (Ej.: roedores, pájaros o insectos) pueden ser un importante control a las invasiones (Levine et al. 2004, Mitchell et al. 2006). A pesar de que no se estimó la abundancia de semillas depredadas, un trabajo reciente muestra que la presencia de *N. occultans* protegió a las semillas de *L. multiflorum* de ser depredadas por roedores (Uchitel et al. 2011) probablemente, debido a la concentración de alcaloides (Sugawara et al. 2006). Si bien la granivoría podría explicar las diferencias en la cobertura de *L. multiflorum* entre las parcelas E+ y E- en los sitios no pastoreados, no explicaría los valores similares de cobertura de *L. multiflorum* E+ y E- en los sitios pastoreados. Podría ocurrir que una mayor presión de granívoros en los sitios pastoreados suprimió el consumo selectivo de semillas anulando las diferencias.

Además, la presencia de *N. occultans* podría favorecer la colonización de *L. multiflorum* a través de reducir la susceptibilidad a patógenos. La presencia de *Neotyphodium* sp. inhibió diversas especies de patógenos foliares (Yue et al. 2000, Clarke et al. 2006, Li et al. 2007, Zabalgoeazcoa 2008) o patógenos del suelo (Siegel y Latch 1991) en estudios *in vitro*. Sin embargo, los resultados no fueron inequívocos (Trevathan 1996, Wäli et al. 2006) y son necesarios ensayos a campo que corroboren estos resultados. En definitiva, las evidencias actuales sugieren que *N. occultans* podría mejorar la capacidad invasora de *L. multiflorum* a través de mejorar la habilidad competitiva (Levine et al. 2004), brindar nuevas armas (Callaway y Ridenour 2004) y aumentar la resistencia biótica (Parker 2001, Parker y Hay 2005).

Los resultados de este capítulo y los de Spyreas et al. (2001) sugieren que la presencia de *Neotyphodium* sp. y el pastoreo aumentan la riqueza de especies cuando actúan simultáneamente y ponen en evidencia cierta complejidad en los mecanismos que explican la estructura y dinámica de las comunidades. Los resultados de este capítulo concuerdan con Spyreas et al. (2001) en que la presencia del endofito aumentó la riqueza de especies respecto de la situación control pero, solo en los sitios pastoreados y que estos efectos están asociados de manera positiva a la cobertura del pasto hospedante. Spyreas et al. (2001) sugieren que el pastoreo intenso redujo la humedad del suelo lo suficiente como para reducir la habilidad competitiva de *L. arundinaceum* y entonces, promovió la diversidad local. Esta propuesta parece contradecir la idea de que *N. coenophialum* beneficia a *L. arundinaceum* aumentando resistencia ante condiciones de estrés hídrico (Elmi et al. 1990, Hill et al. 1994, West 1994, Malinowski y Belesky 2000). En cambio, en este capítulo, los menores niveles de humedad ocurrieron en los sitios no pastoreados donde *N. occultans* aumentó la cobertura de *L. multiflorum* mientras, la riqueza aumentó en las parcelas pastoreadas. Esto sugiere que mecanismos alternativos fueron responsables de los efectos observados en cada caso.

Por otro lado, el efecto positivo de *N. occultans* sobre la riqueza en los sitios pastoreados estuvo acompañado por una reducción en la cobertura de pastos exóticos. Estos efectos podrían sugerir cambios en la habilidad competitiva de las especies (Clay y Holah 1999, Rudgers et al. 2004). Algunos trabajos evaluaron la competencia intra e interespecífica de *L. arundinaceum* bajo condiciones ambientales controladas y mostraron que las plantas hospedantes de *N. coenophialum* son mejores competidoras con y sin herbivoría (Clay 1990, Hill et al. 1990, Clay 1993, Clay 1997, Clay y Holah 1999). Unos pocos trabajos han evaluado estos efectos en comunidades naturales (Clay 1997, Leuchtman y Clay 1997, Clay y Holah 1999, Rudgers et al. 2004, Rudgers et al. 2005) y sugieren que la presencia de *N. coenophialum* en *L. arundinaceum* reduce la diversidad de especies en la comunidad a través de un efecto asociado a la mayor biomasa de las plantas hospedantes del endofito (Clay y Holah 1999, Rudgers et al. 2004). La presencia de *N. occultans* en *L. multiflorum* podría generar relaciones de retroalimentación negativas con determinadas especies (Capítulo 4) (Rudgers y Orr 2009) y una reducción en la cobertura de algunos pastos exóticos, reduciendo su habilidad competitiva y permitiendo el establecimiento de nuevas especies.

La presencia de los endofitos interfirió en otras relaciones planta-planta dependiendo de la combinación particular de filtros impuestos por la comunidad receptora (**Cuadro 5.3**) (Levine 2000, Shea y Chesson 2002). Dando sustento parcial a la hipótesis, la presencia de los endofitos redujo la cobertura de los pastos nativos (solo en las comunidades pastoreadas) y, de manera marginal la de los pastos exóticos. Mientras el efecto de *N. occultans* sobre la riqueza y la cobertura de pastos nativos estuvo asociada

a la cobertura de *L. multiflorum*, en el caso de la cobertura de pastos exóticos la cobertura de *L. multiflorum* explicó solo parcialmente los resultados sugiriendo que otros mecanismos estuvieron involucrados. La presencia *Neotyphodium sp.* podría reducir la habilidad competitiva de otras especies a través de modificar la disponibilidad de nutrientes (Malinowski et al. 1998a, Malinowski et al. 1998b), generar efectos indirectos a través de la broza (Omacini et al. 2004, Antunes et al. 2008, Omacini et al. 2009) o, a través de modificar otras relaciones bióticas (Mitchell et al. 2006) como se discutió anteriormente. Por ejemplo, algunos compuestos no identificados podrían lixiviarse desde la broza de plantas de *L. arundinaceum* hospedantes de *N. coenophialum* y reducir la colonización de los hongos micorrícicos en otras especies de pastos como *Bromus inermis* (Antunes et al. 2008). En cambio, Matthews y Clay (1999) no detectaron efectos de la simbiosis *L. arundinaceum* - *N. coenophialum* sobre las respuestas de retroalimentación en otras especies herbáceas dicotiledóneas como *Trifolium repens* o *Plantago lanceolata*. Rudgers y Orr (2009) sugirieron que los efectos negativos de la misma simbiosis (*L. arundinaceum* y *N. coenophialum*) sobre especies arbóreas nativas dependieron de la especie y podrían estar mediados por cambios en las comunidades del suelo (Rudgers y Orr 2009).

A pesar que no es posible identificar el mecanismo responsable, la reducción progresiva de la cobertura de nativas podría conducir a la pérdida de estas especies, amenazar la conservación de relictos de pastizal seminaturales y aumentar su susceptibilidad a la invasión (**Figura A.2 – A4**). La especie *L. multiflorum* es un importante componente en pasturas como especie forrajera implantada y, en pastizales donde se encuentra naturalizada. Considerando que en ambos sistemas, es común encontrar a *L. multiflorum* en simbiosis con *N. occultans*, queda abierta la pregunta si siembras sucesivas son capaces de intensificar los efectos y finalmente, influir sobre las comunidades de verano.

Si bien los endofitos son simbiosis aéreas hasta ahora muy poco explorados, estos pueden tener papeles equivalentes a los organismos del suelo patogénicos o mutualistas en determinar la diversidad, la estructura de la comunidad y potencialmente, el funcionamiento del ecosistema (van der Putten et al. 2007a). Este capítulo da sustento parcial a la noción de que los hongos endofitos de transmisión vertical puedan proporcionar una ventaja ecológica a los pastos exóticos que los hospedan en las comunidades invadidas (Rudgers et al. 2005, Rudgers y Clay 2007). Los resultados ponen de manifiesto la influencia de los endofitos sobre la estructura de la comunidad herbácea a una escala local y aun en el corto plazo durante la estación de crecimiento. Además, se puso en evidencia la importancia de los filtros ambientales como modeladores del impacto de la simbiosis y, de la susceptibilidad a la invasión de la comunidad receptora.

CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN GENERAL

6.1 INTRODUCCIÓN

Durante muchos años la ecología ha intentado entender los procesos o factores que determinan la dinámica de sistemas complejos como las comunidades (Clements 1936, Odum y Heald 1972, Connell y Slatyer 1977, Pickett et al. 1987, Pickett y Pearl 2001, Levine et al. 2004). En los últimos años han cobrado importancia las interacciones múltiples y las relaciones de retroalimentación en los procesos de invasión y en la sucesión de especies vegetales que, en última instancia, determinan la dinámica de toda la comunidad (Bever et al. 1997, Bardgett et al. 1998, Oksanen y Oksanen 2000, Wardle et al. 2004a, Wolfe y Klironomos 2005). Las interacciones múltiples entre organismos producidas a través de vías directas o indirectas están ganando cada vez más la relevancia (Wajnberg et al. 2001, Gange y Brown 2002, Tscharntke y Hawkins 2002). La interacción tripartita que ha recibido más atención es la que se establece entre plantas, herbívoros y enemigos naturales de los herbívoros (Price et al. 1980, Heinrich y Collins 1983, Rudgers 2004, Parker y Gilbert 2007).

A pesar de la ubicuidad de los microorganismos endosimbiontes en la naturaleza (Fitter y Moyerson 1997, Thompson 2001), su importancia como estructuradores de las comunidades en el marco de interacciones múltiples ha sido poco estudiado (Chaneton y Omacini 2007, Rudgers y Clay 2007, 2008, Faeth y Shochat 2010, Jani et al. 2010). El objetivo general de esta tesis fue evaluar los efectos de la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans* sobre las comunidades del suelo y las relaciones de retroalimentación al final de la estación de crecimiento de la planta hospedante. El contexto de interacciones múltiples estuvo dado por la presencia de pastoreo y, por ambientes que se diferenciaron por la historia de uso. Específicamente, se determinó la importancia relativa de la broza y el ambiente del suelo como vías mediadoras de la influencia de la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans* sobre distintos grupos tróficos y la descomposición (Capítulo 2). Además, se evaluó la estructura de la comunidad de nematodos del suelo y los procesos de mineralización y descomposición en el contexto de relaciones múltiples dados por la presencia de la simbiosis y el pastoreo, en ambientes con distinta historia de uso (Capítulo 3). El capítulo 4 se centró en las relaciones de retroalimentación sobre el crecimiento de plantas de soja (*Glycine max*) y el daño por enfermedad ó; sobre el crecimiento de plantas de cardo (*Carduus acanthoides*) y la relación con las abejas (*Apis mellifera*). Finalmente, se evaluó a campo el efecto de la simbiosis sobre la capacidad invasora de la planta hospedante y el impacto de su colonización sobre la estructura de la comunidad vegetal (Capítulo 5). En ese capítulo la estructura de la comunidad fue examinada durante y una vez finalizada la estación de crecimiento de *L. multiflorum*, dado que es un hospedante de ciclo anual.

Esta tesis estuvo sustentada en la necesidad de considerar los efectos de esta simbiosis sobre la estructura y la dinámica de la comunidad en el contexto más realista de interacciones múltiples. Se integraron conocimientos previos sobre el impacto individual del pastoreo (McNaughton 1978, Milchunas y Lauenroth 1993, Bardgett et al. 1998, Hamilton y Frank 2001, Wardle et al. 2005) o la simbiosis (Clay 1990, Clay 2001, Clay y Schardl 2002, Rudgers et al. 2004, Rudgers et al. 2005, Rudgers y Clay 2007, Cheplick y Faeth 2009) sobre otros componentes de la comunidad y su funcionamiento con nueva información sobre el impacto de ambas relaciones aéreas de manera conjunta y bajo distintos ambientes. La combinación de estudios en microcosmos ubicados en sus ambientes naturales o en un jardín común, donde se controló la frecuencia de endofitos en plantas de *L. multiflorum* y el pastoreo en distintos ambientes, permitieron hacer inferencias sobre factores y condiciones que controlan la estructura y la dinámica de la comunidad. El experimento de invasión

reprodujo este proceso bajo la estructura de las comunidades dada por el pastizal de manera natural, y permitió responder preguntas ecológicas relevantes a una escala de comunidad (Fraser y Keddy 1997, Benton et al. 2007). Los resultados generaron aportes a la ecología de comunidades y de la simbiosis pasto-endofito que se desarrollarán en las siguientes secciones de este capítulo. En las últimas dos secciones, se presentan perspectivas y nuevas líneas de investigación que se abren a partir de los resultados y, las consideraciones finales.

6.2 APORTES DE LA TESIS A LA ECOLOGÍA DE COMUNIDADES

6.2.1 La impronta de las interacciones múltiples sobre la estructura de la comunidad

Las interacciones aéreas tienen efectos diferenciales sobre los patógenos y los parásitos, los mutualistas y los descomponedores del suelo (van der Putten et al. 2007a). El efecto neto sobre estos grupos determina el impacto sobre las comunidades del suelo, así como las consecuencias sobre la estructura de la comunidad aérea y las respuestas de retroalimentación. A pesar de su importancia, la mayoría de los antecedentes se limita al impacto de interacciones aéreas como la herbivoría (de insectos o mamíferos) sobre unas pocas especies del suelo (Klironomos et al. 2000) generalmente, micorrizas (Gange et al. 2002, Mitchell et al. 2006, Gange 2007, van der Putten et al. 2007a). En esta tesis la presencia de *N. occultans* y el pastoreo controlaron la estructura de la comunidad de plantas durante la siguiente estación de crecimiento a través de las interacciones de *L. multiflorum* con el suelo (Omacini et al. 2011). La presencia de *N. occultans* redujo las tasas de descomposición y modificó algunos grupos tróficos (fungívoros y omnívoros) del suelo probablemente a través de cambios en la actividad radicular de *L. multiflorum* más que por la broza (Capítulo 2). Por su lado, el pastoreo redujo las tasas de mineralización y la frecuencia de nematodos fitófagos (Capítulo 3).

La revisión realizada por Ohgushi et al. (2005) propone que la herbivoría de insectos genera respuestas de retroalimentación medidos por los cambios en la calidad y la arquitectura de la planta y, que estos efectos son los responsables de la heterogeneidad espacial y temporal en la disponibilidad de recursos. Las evidencias actuales muestran que otras relaciones como la herbivoría de vertebrados o la presencia de organismos simbiotes endofitos generan efectos similares. A pesar que los efectos del endofito no fueron evidentes al final del ciclo de vida de *L. multiflorum* (Capítulo 3), tanto la presencia del endofito como el pastoreo interactuaron y tuvieron consecuencias importantes sobre la emergencia de *G. max* y la producción de capítulos en *C. acanthoides* en los ambientes más disturbados con historia de promoción (Capítulo 4). A su vez, estos efectos se propagaron a relaciones aéreas como la visita de abejas que, podrían modificar la productividad y la dinámica poblacional de estas especies.

Unos pocos trabajos sugieren que la impronta generada por la presencia de la simbiosis entre *L. multiflorum* y *N. occultans* en el suelo puede afectar a la próxima generación de plantas de la misma especie hospedante o no del hongo endofito (Uchitel 2008, Omacini et al. 2009). La presencia previa de *N. coenophialum* en *L. arundinaceum* retrasó el establecimiento de especies nativas leñosas (Rudgers y Orr 2009) pero no de herbáceas (Matthews y Clay 1999) durante la siguiente estación de crecimiento. En cambio, los resultados de esta tesis mostraron que *N. occultans* y el pastoreo en *L. multiflorum* tuvieron un fuerte impacto negativo sobre otras especies herbáceas nativas y exóticas (Capítulos 4 y 5). En conjunto, estos resultados suman

evidencias a la idea que simbiosis entre pasto-endofito podría retrasar la sucesión de especies (Rudgers et al. 2007, Rudgers y Orr 2009) o modificar su trayectoria.

6.2.2 Las invasiones en contextos de interacciones múltiples

La invasión de especies exóticas es una de las amenazas más importantes para la diversidad local y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Williamson y Fitter 1996, Williamson 1999, Mooney y Hobbs 2000). Las especies invasoras, los microbios patógenos y mutualistas del suelo pueden ser importantes determinantes de la abundancia de especies individuales, la diversidad de la comunidad y el funcionamiento del ecosistema (van der Putten et al. 2007a). Algunos trabajos recientes han estudiado el impacto de microorganismos patógenos particulares sobre la estructura de la comunidad a los largo de distintos ecosistemas (Liebhold et al. 1995, Gerlach 2001, Jules et al. 2002). En contraposición, se ha prestado menos atención al papel que juegan microorganismos no patogénicos como algunos hongos endofitos aéreos de pastos en el proceso de invasión. De acuerdo con las evidencias presentadas en esta tesis (Capítulo 5), *N. coenophialum* tuvo un impacto positivo sobre la capacidad invasora de su hospedante *L. arundinaceum* (Rudgers et al. 2005) y la composición de las comunidades en praderas en los Estados Unidos (Rudgers et al. 2010). Por otro lado, mientras muchos trabajos se han centrado en el efecto de las plantas invasoras sobre las especies vegetales nativas (Kourtev et al. 2002, Callaway y Ridenour 2004, Ehrenfeld et al. 2005, Wolfe y Klironomos 2005) esta tesis puso en evidencia que la interacción *L. multiflorum* - *N. occultans* y el pastoreo es capaz de generar efectos negativos sobre especies nativas y exóticas (Capítulo 4 y 5).

Numerosos estudios sobre invasiones biológicas se han concentrado en las características de la especie que le confieren capacidad invasora (Pattison et al. 1998, Callaway y Aschehoug 2000, Claridge y Franklin 2002, Klironomos 2002, van der Putten et al. 2005, Herron et al. 2007) ó, en las características de la comunidad receptora que determinan la susceptibilidad a la invasión (Crawley 1987, Callaway y Aschehoug 2000, Richardson et al. 2000a, Callaway y Ridenour 2004, Levine et al. 2004, Perelman et al. 2007, Tognetti 2010). En el caso de las especies vegetales que dependen de asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos o bacterias fijadoras de nitrógenos (van der Heijden et al. 1998, Klironomos et al. 2000, Parker 2001, Desprez-Loustau et al. 2007), la ausencia del microorganismo simbiote en la comunidad del suelo puede limitar el éxito de la invasión (Richardson et al. 2000a, Bruno et al. 2003). Esta tesis muestra que las características de la comunidad del suelo también son importantes determinantes del efecto de la simbiosis *L. multiflorum*-*N. occultans* a pesar que ambas especies se dispersan de manera conjunta. El impacto de *N. occultans* sobre las redes tróficas del suelo (Capítulo 3), las respuestas de retroalimentación (Capítulo 4) o la capacidad invasora de *L. multiflorum* (Capítulo 5) dependieron del contexto dado por la historia de uso del ambiente. En un trabajo previo, la presencia de micorrizas en *L. perenne* redujo el efecto protector del endofito *N. lolii* ante la herbivoría por insectos (Vicari et al. 2002) dado apoyo a esta idea.

Las interacciones múltiples que establecen las plantas así como la historia del ambiente deberían ser consideradas en los modelos que describen los mecanismos o estrategias de las plantas y explican los cambios en la vegetación a lo largo de la sucesión (Connell y Slatyer 1977, Grime 1998). A pesar que no es posible una comparación estricta, esta noción se sustenta en las discrepancias entre los efectos del endofito en los ambientes de pastizal y promoción de *L. multiflorum* (Capítulo 3) y, en las comunidades pastoreadas y no pastoreadas (cobertura de grupos funcionales;

capítulo 5). Considerar que el efecto de las interacciones múltiples entre *N. occultans* y el pastoreo en *L. multiflorum* dependen de las características de las redes tróficas del suelo (composición y abundancia) y/o, el contexto abiótico generado por la historia de uso del ambiente podría explicar el impacto positivo del endofito sobre la capacidad invasora de *L. multiflorum* solo en las comunidades no pastoreadas (Capítulo 5). Es posible especular que la presencia del endofito influya sobre las especies de fitófagos (Capítulo 3) reduciendo la agresividad sobre las plantas hospedantes, dando apoyo a la hipótesis de liberación de enemigos (Williamson y Fitter 1996, Keane y Crawley 2002).

A diferencia de los efectos del endofito a través de su impronta, los efectos del pastoreo trascendieron la historia de uso del ambiente (Capítulo 3). Esto sugiere jerarquías en el impacto de las relaciones aéreas sobre el suelo. Sin embargo, es importante notar que estas jerarquías desaparecieron al evaluar las respuestas de retroalimentación donde hubo interacción entre la presencia de *N. occultans* y el pastoreo, al menos en el contexto generado por la historia previa de promoción (Capítulo 4). Estas evidencias refuerzan la idea de que las características del ambiente determinan el significado ecológico de las interacciones múltiples que albergan (Faeth y Bultman 2002, Faeth y Sullivan 2003, Faeth y Hamilton 2006, Saikkonen et al. 2006, Cheplick 2007, Omacini et al. 2009, Uchitel et al. 2011).

6.3 APORTES DE LA TESIS A LA SIMBIOSIS PASTO- ENDOFITO

6.3.1 ¿Qué hay de particular entre *L. multiflorum* y *N. occultans*?

En comparación con otras relaciones pasto-endofito, *N. occultans* tiene una ubicación extrema en la planta hospedante, confinado a la base de las láminas y en las flores o semillas (Latch et al. 1988). Esto hace que *N. occultans* sea más difícil de observar en plantas vegetativas que otros hongos del mismo género pero además, puede tener importantes consecuencias sobre los efectos de la simbiosis. El hongo endofito *N. occultans* crece más lento y no prolifera de una manera tan abundante dentro de los tejidos del pasto hospedante como *N. lolii* [el hongo endofito de *L. perenne* (Latch et al. 1988)]. Estas u otras diferencias en la biología de *N. occultans* podrían explicar la presencia de distintos o, una menor concentración de compuestos secundarios y los efectos sutiles sobre otros componentes de la comunidad (Capítulo 3), o sobre el ganado (Prestidge 1991) en comparación con otras simbiosis pasto-endofito. A diferencia de otras relaciones pasto- endofito, el endofito *N. occultans* en *L. multiflorum* no parece proveer una protección clara contra herbívoros invertebrados o mamíferos en la planta adulta (Ej.: solo algunas especies de áfidos y minadores de hojas Omacini et al. 2001). Los efectos del endofito han sido consistentes cuando se comparó el éxito de semillas [Ej.: granivoría (Uchitel 2008)] y plántulas con diferente nivel de infección bajo diferentes condiciones ambientales [Ej.: establecimiento (Omacini et al. 2009, Uchitel et al. 2011)]. No así cuando se comparó el desempeño ecológico de plantas adultas. Esto se podría deber a que, en las semillas y en las plántulas hospedantes de *N. occultans* se encuentran las concentraciones más altas de alcaloides que luego se diluyen a medida que la planta crece (Sugawara et al. 2006).

Hasta el momento, la mayoría de los trabajos han evaluado las consecuencias de la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans* considerando los efectos sobre las especies integrantes de la relación [Ej.: germinación de las semillas (Gundel et al. 2006a, Gundel et al. 2006b); eficiencia de transmisión del endofito (García Parisi et al. 2011); herbivoría de insectos (Omacini et al. 2001, Sugawara et al. 2006); colonización

micorrícica (Omacini et al. 2006, Uchitel et al. 2011); granivoría (Uchitel et al. 2011); establecimiento de plántulas (Omacini et al. 2009)] y, con menor frecuencia, el impacto sobre otros componentes y procesos de la comunidad [Ej.: tasa de descomposición de broza (Omacini et al. 2004); capacidad metabólica de los microorganismos del suelo (Casas et al. 2011)]. Además, pocos experimentos han intentado reproducir condiciones más cercanas a los contextos reales, manipulando la presencia de otras relaciones como el pastoreo (García Parisi et al. 2011) o la historia de uso del ambiente.

Esta tesis aporta evidencias al cuerpo de trabajos que sugiere que cambios en los compuestos exudados por las plantas podrían mediar importantes efectos de los endofitos sobre el suelo (Capítulos 2 y 3) con repercusiones en las respuestas de retroalimentación (Capítulo 4), la capacidad invasora de la planta hospedante y la estructura de la comunidad (Capítulo 5). En definitiva, esta tesis sostiene que la simbiosis *L. multiflorum* –*N. occultans* puede ser más que un mutualismo defensivo (Clay 2001, Clay y Schardl 2002) y que puede modular interacciones múltiples y, la estructura y dinámica de las comunidades. Resta dilucidar de manera específica qué compuestos son exudados, qué cambios se generan en el suelo y qué grupo o especies de organismos (Ej.: patógenos, benéficos) del suelo son afectados. Conocer estos aspectos permitiría predecir algunos efectos de los endofitos que hasta hoy parecen azarosos.

6.3.2 ¿Qué hay de generalidad, patrones y sesgo?

En base a la evidencia de que los endofitos favorecen la colonización y la expansión de su hospedante (Capítulo 5- *L. multiflorum*)(Clay et al. 2005- *L. arundinaceum*) algunos autores defienden la naturaleza mutualista de la simbiosis (Clay 1988, Clay 1994, Clay 2001, Clay y Schardl 2002). En cambio, otros autores critican fuertemente esta idea y sostienen que es consecuencia del sesgo en el estudio de unas pocas simbiosis de importancia agronómica [Ej.: *L. arundinaceum* y *L. perenne* (Saikkonen et al. 1999, Faeth y Fagan 2002, Faeth y Sullivan 2003, Faeth et al. 2004, Faeth 2009, Faeth y Shochat 2010)]. Algunos trabajos discuten que no es posible arribar a generalidades respecto de estas simbiosis dado que el resultado de la relación son altamente dependientes del contexto, con una relación que varía de mutualista a parasítica a lo largo del espacio, el tiempo y que depende de los genotipos involucrados (Saikkonen et al. 1998, Faeth y Fagan 2002, Saikkonen et al. 2004, Müller y Krauss 2005, Faeth y Hamilton 2006, Saikkonen et al. 2006, Cheplick 2007, Rasmussen et al. 2007, Cheplick y Faeth 2009, Rudgers y Orr 2009). En particular, estos trabajos proponen que diferencias en la compatibilidad genética entre los integrantes de la simbiosis (i.e.: planta hospedante y hongo endofito), así como diferencias en el uso de los ambientes, la edad sucesional de la comunidad, el nivel y tipo de herbivoría y la textura del suelo, entre otras condiciones ambientales podrían explicar la diversidad de respuestas encontradas en la comunidad del suelo y en la comunidad aérea. Los resultados encontrados en esta tesis concuerdan con esta noción. Por otro lado, vale considerar que el impacto de la simbiosis sobre otras especies vegetales también podría variar por ejemplo, de inhibición a facilitación (Connell y Slatyer 1977) dependiendo de la presencia de otras relaciones y la historia del ambiente. Estos aspectos de la simbiosis aun deben ser explorados.

Por otro lado, casi toda la información disponible se refiere a la relación entre *L. arundinaceum* y *N. coenophialum* (Ej.: Clay 1988, 1993, Malinowski y Belesky 2000, Clay y Schardl 2002, Schardl et al. 2004, Franzluebbbers y Hill 2005, Franzluebbbers 2006, Saikkonen et al. 2006, Rudgers y Clay 2007, Belesky et al. 2010, Rudgers et al.

2010, Omacini et al. 2011). En conjunto, estos trabajos sugieren que la presencia de *N. coenophialum* modifica el ambiente del suelo, reduce las tasas de descomposición, aumenta la biomasa microbiana, reduce las tasas de mineralización y favorece el secuestro de carbono (Franzluebbbers et al. 1999, Franzluebbbers y Stuedemann 2005, Van Hecke et al. 2005, Jenkins et al. 2006, Buyer et al. 2011, Handayani et al. 2011, ver revisión de Omacini et al. 2011, Iqbal et al. 2012). A pesar que la influencia de la simbiosis *L. multiflorum*- *N. occultans* fue débil, este y otros trabajos (Omacini et al. 2004, Omacini et al. 2006, Uchitel 2008, Casas et al. 2011) concuerdan en gran medida con las evidencias sobre *L. arundinaceum* mencionadas. Estas consistencias contradicen las críticas anteriores (i.e.: respuestas total o altamente dependientes del contexto) y contribuyen a entender el significado ecológico de estas simbiosis dentro de un marco más amplio en el que se consideran otros pastos hospedantes. Sin embargo, hay que considerar que las simbiosis, *L. multiflorum*- *N. occultans* y *L. arundinaceum*- *N. coenophialum* difieren de manera importante en el perfil de compuestos secundarios (Ej.: alcaloides) (Sugawara et al. 2006, Rasmussen et al. 2007) y en el ciclo de vida de los hospedantes. Esto sugiere que los mecanismos involucrados en las respuestas observadas también podrían ser diferentes.

6.4 PERSPECTIVAS Y NUEVAS LÍNEAS

La capacidad de predecir cuándo y dónde las especies generan efectos de retroalimentación sobre otras especies de plantas o sus interacciones depende de la comprensión de los mecanismos mediante los cuales las especies se relacionan en un contexto de interacciones múltiples (Stanton 2003, Hartley y Gange 2009). Las interacciones aéreas y las del suelo están influidas de manera frecuente por efectos indirectos (van der Putten et al. 2001). Mientras muchos trabajos han estudiado interacciones de forma individual, los resultados de esta tesis ponen en relieve la importancia de considerar interacciones múltiples en contextos realistas (Price et al. 1980, van der Putten et al. 2001, Gange y Brown 2002, Gange et al. 2003, Strauss y Irwin 2004, van der Putten et al. 2009). Estudiar un sistema relativamente simple, como el que proponen las relaciones entre tres especies: *L. multiflorum*, *N. occultans* y el ganado vacuno (a través del pastoreo) en microcosmos con suelo, permitió revelar interacciones tróficas, interacciones no tróficas y sus consecuencias en cascada. Sin duda, aún queda mucho por estudiar sobre los efectos directos e indirectos y cómo estos efectos son modulados por otras interacciones a través del tiempo. Por otro lado, el énfasis en los efectos no tróficos e indirectos mediados por el suelo ofrece una ventana aun poco explorada que puede enriquecer las investigaciones ecológicas y la comprensión de la naturaleza.

Los endofitos y el pastoreo en trabajos sobre *L. arundinaceum* generaron preguntas sobre potenciales consecuencias de estas interacciones múltiples a nivel comunidad (Clay 1997, Clay y Holah 1999, Clay 2001, Clay et al. 2005, Rudgers et al. 2005)[(Müller 2003, Mack y Rudgers 2008)-interacciones múltiples planta-endofito-micorrizas]. En el caso de *L. multiflorum*, la presencia de *N. occultans* benefició el reclutamiento de plántulas del pasto hospedante (Omacini et al. 2009) y redujo la colonización micorrícica de plantas vecinas de la misma especie no hospedantes del endofito (Omacini et al. 2006). La presencia de *Neotyphodium* sp. tuvo efectos similares en otras simbiosis [Ej.: (Antunes et al. 2008, Mack y Rudgers 2008) en *L. arundinaceum*; (Müller 2003) en *L. perenne*]. Sin embargo, Novas et al. (2005) y Novas et al. (2009) encontraron una asociación positiva entre *Neotyphodium* sp. y las

micorrizas cuando los hospedantes *Bromus setifolius* y *Poa bonariensis*, respectivamente fueron estudiados en sus ambientes nativos. Sabemos poco respecto del impacto de las interacciones múltiples sobre otras especies a nivel comunitario. Y aún no sabemos si estos efectos a nivel comunitario están mediados, al menos en parte, por cambios sobre la comunidad del suelo como sugiere esta tesis. Sería interesante evaluar estas interacciones múltiples en sus ambientes nativos considerando que *Neotyphodium* sp. está presente en numerosas especies de pastos con una amplia distribución en nuestro país (Iannone et al. 2011) y del mundo (Saikkonen et al. 1998, Roberts et al. 2005, Kane 2011) y, que la mayoría de los trabajos previos han estudiado el efecto de estas interacciones en sistemas controlados o ambientes no nativos (Saikkonen et al. 2006).

La especie *L. multiflorum* es una especie de gran importancia por su calidad como forrajera en los pastizales y pasturas de la región pampeana (De Battista 2005, Gundel et al. 2009) y otras regiones del mundo (Sugawara et al. 2006). Las poblaciones de *L. multiflorum* de manera usual hospedan a *N. occultans* presentando distintos niveles de infección. Los resultados actuales sugieren que el efecto neto de la presencia de *N. occultans* podría ser diferente en ambientes de pastizal, pasturas implantadas, promociones de *L. multiflorum* o cultivos agrícolas (donde *L. multiflorum* es maleza). Desde una perspectiva agro-ecológica sería importante poder identificar efectos que trascienden de los que dependen del contexto.

Por otro lado, los avances recientes en biotecnología, en el conocimiento de la simbiosis y la importancia del endofito permitieron el desarrollo de nuevas simbiosis artificiales. En el caso de *L. arundinaceum* y *L. perenne* se pueden encontrar simbiosis generadas por la inoculación con otras especies de *Neotyphodium* (es decir, diferentes a las que naturalmente hospedan) o con el mismo hongo mejorado genéticamente dando origen a “endofito seguros” (Murray et al. 1992, Easton 2007). Las nuevas combinaciones pasto-endofito que mantienen los beneficios de la interacción sin ocasionar toxicidad al ganado son comercializadas en Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia y Europa (Funk et al. 1993, Bouton et al. 2002, Easton 2007). Estas tecnologías podrían ofrecer oportunidades aún no exploradas para el uso forrajero de *L. multiflorum*. Por ejemplo, *L. multiflorum* y *L. perenne* son dos especies capaces de hibridarse y se han encontrado poblaciones híbridas similares a *L. multiflorum* infectadas con *N. lolii*, el endofito de *L. perenne*. Conocer el impacto de la simbiosis sobre otros componentes de la comunidad (esta tesis) puede contribuir a nuevos objetivos en los programas de mejoramiento genético de la simbiosis. Por ejemplo, a través del mejoramiento genético del endofito se podrían generar combinaciones de ciertos genotipos de *L. multiflorum* y de *Neotyphodium* spp. que presenten una mayor concentración de peraminas con un claro efecto protector contra insectos herbívoros.

6.5 CONSIDERACIONES FINALES

Las redes tróficas del suelo, los procesos y servicios del ecosistema que dependen de su actividad, son el resultado de una compleja interacción de factores abióticos e interacciones bióticas que tienen lugar tanto en la rizosfera como en el resto del suelo. En esta tesis se ha puesto énfasis en el impacto de la simbiosis pasto-endofito sobre las interacciones bióticas del suelo y las relaciones de retroalimentación; se ha considerado además, el impacto del pastoreo y la historia del ambiente que explora la relación.

Los resultados de esta tesis apoyan la creciente conciencia de que las simbiosis entre pastos y hongos endofitos asexuales juegan un papel importante en la estructura de las

comunidades y los procesos de invasión de especies (Clay et al. 2005, Rudgers et al. 2005). La simbiosis aérea entre *L. multiflorum* y *N. occultans* demostró tener efectos significativos en el comportamiento de una gran diversidad de especies presentes en sistemas naturales y agrícolas tanto durante como después del ciclo de vida de la planta hospedante. Sin embargo, hay que considerar que la impronta del endofito como estructurador de las comunidades aéreas y subterráneas solo fue evidente bajo condiciones particulares dadas por el pastoreo y la historia del ambiente mientras que el impacto del pastoreo sobre algunas funciones y grupo de organismos del suelo trascendió la historia de uso del ambiente. De todos modos los resultados de esta tesis junto con los antecedentes previos sugieren que nuestra habilidad para entender, predecir y manejar comunidades de pastizal y pradera implantadas mejorará en la medida en que los trabajos de investigación integren interacciones entre herbívoros, microorganismos simbioses y, consideren el impacto sobre las comunidades aéreas y del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, L. R., L. Ma, y D. J. Timlin. 2006. Trans-disciplinary soil physics research critical to synthesis and modeling of agricultural systems. *Soil Science Society of America Journal* **70**:311-326.
- Ajwa, H. A., C. W. Rice, y D. Sotomayor. 1998. Carbon and nitrogen mineralization in tallgrass prairie and agricultural soil profiles. *Soil Science Society of America Journal* **62**:942-951.
- Albers, D., M. Schaefer, y S. Scheu. 2006. Incorporation of plant carbon into the soil animal food web of an arable system. *Ecology* **87**:235-245.
- Albrecht, M., P. Duelli, B. Schmid, y C. B. Müller. 2007. Interaction diversity within quantified insect food webs in restored and adjacent intensively managed meadows. *Journal of Animal Ecology* **76**:1015-1025.
- Antunes, P. M., J. Miller, L. M. Carvalho, J. N. Klironomos, y J. A. Newman. 2008. Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. *Functional Ecology* **22**:912-918.
- Arnold, E. A. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* **21**:51-66.
- Bacon, C. W. y J. F. White, Jr. 1994. Biotechnology of endophytic fungi of grasses Page 214. CRC Press, Boca Raton (USA).
- Ball, O. J.-P., C. O. Miles, y R. A. Prestidge. 1997. Ergopeptine alkaloids and *Neotyphodium lolii*-mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronychus arator* (*Coleoptera: Scarabaeidae*). *Journal of Economic Entomology* **90**:1382-1391.
- Bardgett, R., R. Cook, G. Yeates, y C. Denton. 1999. The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems. *Plant and Soil* **212**:23-33.
- Bardgett, R. D., W. D. Bowman, R. Kaufmann, y S. K. Schmidt. 2005. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **20**:634-641.
- Bardgett, R. D. y K. F. Chan. 1999. Experimental evidence that soil fauna enhance nutrient mineralization and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* **31**:1007-1014.
- Bardgett, R. D., A. C. Jones, D. L. Jones, S. J. Kemmitt, R. Cook, y P. J. Hobbs. 2001. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* **33**:1653-1664.
- Bardgett, R. D. y D. A. Wardle. 2003. Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology* **84**:2258-2268.
- Bardgett, R. D., D. A. Wardle, y G. W. Yeates. 1998. Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. *Soil Biology and Biochemistry* **30**:1867-1878.

- Bazot, S., J. Mikola, C. Nguyen, y C. Robin. 2005. Defoliation-induced changes in carbon allocation and root soluble carbon concentration in field-grown *Lolium perenne* plants: do they affect carbon availability, microbes and animal trophic groups in soil? *Functional Ecology* **19**:886-896.
- Belesky, D. P., D. M. Burner, y J. M. Ruckle. 2008. Does endophyte influence resource acquisition and allocation in defoliated tall fescue as a function of microsite conditions? *Environmental and Experimental Botany* **63**:368-377.
- Belesky, D. P., J. M. Ruckle, y J. J. Halvorson. 2010. Carbon isotope discrimination as an index of tall fescue–endophyte association response to light availability and defoliation. *Environmental and Experimental Botany* **67**:515-521.
- Belmar, S. B., R. K. Jones, y J. L. Starr. 1987. Influence of crop rotation on inoculum density of *Rhizoctonia solani* and sheath blight incidence in rice. *Phytopathology* **77**:1138-1143.
- Bellinger, P. F., K. A. Christiansen, y F. Janssens. 1996-2011. Checklist of the collembola of the world.
- Benton, T. G., M. Solan, J. M. J. Travis, y S. M. Sait. 2007. Microcosm experiments can inform global ecological problems. *Trends in Ecology and Evolution* **22**:516-521.
- Berasategui, L. A. y L. A. Barberis. 1992. Los suelos de las comunidades vegetales de la región Castelli-Pila, Depresión del Salado (Pcia. de Buenos Aires). *Revista Facultad de Agronomía* **3**:13-25.
- Berlow, E. L., A.-M. Neutel, J. E. Cohen, P. C. De Ruiter, B. Ebenman, M. Emmerson, J. W. Fox, V. A. A. Jansen, J. Iwan Jones, G. D. Kokkoris, D. O. Logofet, A. J. McKane, J. M. Montoya, y O. Petchey. 2004. Interaction strengths in food webs: issues and opportunities. *Journal of Animal Ecology* **73**:585-598.
- Bever, J. D. 2003. Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist* **157**:465-473.
- Bever, J. D., J. B. Morton, J. Antonovics, y P. A. Schultz. 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *The Journal of ecology* **84**:71-82.
- Bever, J. D., K. M. Westover, y J. Antonovics. 1997. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology* **85**:561-573.
- Bezemer, T. M., G. B. De Deyn, T. M. Bossinga, N. M. Van Dam, J. A. Harvey, y W. H. Van der Putten. 2005. Soil community composition drives aboveground plant–herbivore–parasitoid interactions. *Ecology Letters* **8**:652-661.
- Bezemer, T. M. y N. M. van Dam. 2005. Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends in Ecology and Evolution* **20**:617-624.
- Biondini, M. E., B. D. Patton, y P. E. Nyren. 1998. Grazing intensity and ecosystem processes in a northern mixed-grass prairie, USA. *Ecological Applications* **8**:469-479.
- Bongers, T. y H. Ferris. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution* **14**:224-228.

- Bouton, J. H., G. C. M. Latch, N. S. Hill, C. S. Hoveland, M. A. McCann, R. H. Watson, J. A. Parish, L. L. Hawkins, y F. N. Thompson. 2002. Re-infection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid producing endophytes. *Agronomy Journal* **94**:567–574.
- Brown, V. K. y A. C. Gange. 1992. Secondary plant succession: how is it modified by insect herbivory? *Plant Ecology* **101**:3-13.
- Bruno, J. F., J. J. Stachowicz, y M. D. Bertness. 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology and Evolution* **18**:119-125.
- Brussaard, L. 1998. Soil fauna, guilds, functional groups and ecosystem processes. *Applied Soil Ecology* **9**:123-135.
- Bultman, T. L., A. Aguilera, y T. J. Sullivan. 2011. Influence of fungal isolates infecting tall fescue on multitrophic interactions. *Fungal Ecology*: en prensa.
- Bultman, T. L., G. Bell, y W. D. Martin. 2004. A fungal endophyte mediates reversal of wound-induced resistance and constrains tolerance in a grass. *Ecology* **85**:679-685.
- Burdon, J. J., P. H. Thrall, Ericson, y Lars. 2006. The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annual Review of Phytopathology* **44**:19-39.
- Bush, L. P., H. H. Wilkinson, y C. L. Schardl. 1997. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology* **114**:1-7.
- Buyer, J., D. Zuberer, K. Nichols, y A. Franzluebbers. 2011. Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil* **339**:401-412.
- Cadenasso, M. L., S. T. A. Pickett, y P. J. Morin. 2002. Experimental test of the role of mammalian herbivores on old field succession: community structure and seedling survival. *Journal of the Torrey Botanical Society* **129**:228-237.
- Cahill, J. F., E. Elle, G. R. Smith, y B. H. Shore. 2008. Disruption of a belowground mutualism alters interactions between plants and their floral visitors. *Ecology* **89**:1791-1801.
- Callaway, D. S. y A. Hastings. 2002. Consumer movement through differentially subsidized habitats creates a spatial food web with unexpected results. *Ecology Letters* **5**:329-332.
- Callaway, R. M. y E. T. Aschehoug. 2000. Invasive plants versus their new and old neighbors: A mechanism for exotic invasion. *Science* **290**:521-523.
- Callaway, R. M. y W. M. Ridenour. 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment* **2**:436-443.
- Carvalho, L. M., P. M. Antunes, M. A. Martins-Loução, y J. N. Klironomos. 2010. Disturbance influences the outcome of plant–soil biota interactions in the invasive *Acacia longifolia* and in native species. *Oikos* **119**:1172-1180.
- Casas, C., M. Omacini, M. Montecchia, y O. Correa. 2011. Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. *Plant and Soil* **340**:347-355.

- Claridge, K. y S. B. Franklin. 2002. Compensation and plasticity in an invasive plant species. *Biological Invasions* **4**:339-347.
- Clark, D. A., E. R. Thom, y C. D. Waugh. 1996. Milk production from pastures and pasture silage with different levels of endophyte infection. Pages 292-296 *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*.
- Clarke, B. B., J. F. White, R. H. Hurley, M. S. Torres, S. Sun, y D. R. Huff. 2006. Endophyte-mediated suppression of Dollar Spot disease in fine fescues. *Plant Disease* **90**:994-998.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**:10-16.
- Clay, K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**:275-297.
- Clay, K. 1993. The ecology and evolution of endophytes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **44**:39-64.
- Clay, K. 1994. The potential role of endophytes in ecosystems. Pages 73-99 *in* C. W. Bacon y J. F. J. White, editors. *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Clay, K. 1997. Consequences of endophyte-infected grasses on plant biodiversity. Pages 109-124. *in* C. W. Bacon y N. S. Hill, editors. *Neotyphodium/grass interactions*. Plenum.
- Clay, K. 2001. Symbiosis and the regulation of communities. *American Zoologist* **41**:810-824.
- Clay, K. y J. Holah. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* **285**:1742-1744.
- Clay, K., J. Holah, y J. A. Rudgers. 2005. Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:12465-12470.
- Clay, K. y P. Kover. 1996. Evolution and stasis in plant-pathogen associations. *Ecology* **77**:997-1003.
- Clay, K. y C. Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* **160**:99-127.
- Clements, F. E. 1936. Nature and structure of the climax. *Journal of Ecology* **24**:252-284.
- Connell, J. H. y R. O. Slatyer. 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *The American Naturalist* **111**:1119-1144.
- Cook, R. y G. C. Lewis. 2001. Fungal endophytes and nematodes of agricultural and amenity grasses. *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations*. . Pages 35-61 *Proceedings British Society for Plant Pathology / Association of Applied Biologists' Virology Group Conference, Oxford*.

- Cragg, R. G. y R. D. Bardgett. 2001. How changes in soil faunal diversity and composition within a trophic group influence decomposition processes. *Soil Biology and Biochemistry* **33**:2073-2081.
- Crawley, M. J. 1987. What makes a community invasible? Pages 429-453 *Colonization, succession and stability*. Blackwell Scientific Publications.
- Culman, S., A. Young-Mathews, A. Hollander, H. Ferris, S. Sánchez-Moreno, A. O'Geen, y L. Jackson. 2010. Biodiversity is associated with indicators of soil ecosystem functions over a landscape gradient of agricultural intensification. *Landscape Ecology* **25**:1333-1348.
- Chaneton, E. J., J. M. Facelli, y R. J. C. León. 1988. Floristic changes induced by flooding on grazed and ungrazed lowland grasslands in Argentina. *Journal of Range Management* **41**:495-499.
- Chaneton, E. J. y M. Omacini. 2007. Bottom-up cascades induced by fungal endophytes in multitrophic systems. Pages 164-187 *in* T. Ohgushi, T. P. Craig, y P. W. Price, editors. *Ecological communities: plant mediation in indirect interaction*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. .
- Chaneton, E. J., S. B. Perelman, M. Omacini, y R. J. C. León. 2002. Grazing, environmental heterogeneity, and alien plant Invasions in temperate Pampa grasslands. *Biological Invasions* **4**:7-24.
- Chapin III, S. F., H. A. Mooney, y P. A. Matson. 2002. *Principles of terrestrial ecosystem ecology* Springer, New York.
- Chapuis-Lardy, L., S. Vanderhoeven, N. Dassonville, L. S. Koutika, y P. Meerts. 2006. Effect of the exotic invasive plant *Solidago gigantea* on soil phosphorus status. *Biology and Fertility of Soils* **42**:481-489.
- Chen, J. y H. Ferris. 1999. The effects of nematode grazing on nitrogen mineralization during fungal decomposition of organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **31**:1265-1279.
- Cheplick, G. P. 2007. Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from Eurasia and North Africa under extreme resource limitation. *Environmental and Experimental Botany* **60**:202-210.
- Cheplick, G. P. y S. H. Faeth. 2009. *Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis* Oxford University Press.
- Christensen, M. J., R. J. Bennett, H. A. Ansari, H. Koga, R. D. Johnson, G. T. Bryan, W. R. Simpson, J. P. Koolaard, E. M. Nickless, y C. R. Voisey. 2008. *Epichloë* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. *Fungal Genetics and Biology* **45**:84-93.
- Chu-Chou, M., B. Z. Guo, Z.-Q. An, J. W. Hendrix, R. S. Ferriss, y M. R. Siegel. 1992. Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *Acremonium coenophialum* endophyte. *Soil Biology & Biochemistry* **24**:633-637.
- D'Angela, E., R. J. C. León, y J. M. Facelli. 1986. Pioneer stages in a secondary succession of a pampean subhumid grassland. Urban and Fischer, Jena, Germany.
- Davis, M. A., J. Pergl, A.-M. Truscott, J. Kollmann, J. P. Bakker, R. Domenech, K. Prach, A.-H. Prieur-Richard, R. M. Veeneklaas, P. Pyšek, R. del Moral, R. J.

- Hobbs, S. L., Collins, S. T. A., Pickett, y P. B. Reich. 2005a. Vegetation change: a reunifying concept in plant ecology. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **7**:69-76.
- Davis, M. A., K. Thompson, y J. Philip Grime. 2005b. Invasibility: the local mechanism driving community assembly and species diversity. *Ecography* **28**:696-704.
- De Battista, J. D. 2005. *Neotyphodium* research and application: current trends in South America. Pages 65-71 in R. C. A., W. C. P, y S. D. E, editors. *Neotyphodium in Cool Season Grasses*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- De Deyn, G. B., C. E. Raaijmakers, J. Van Ruijven, F. Berendse, y W. H. Van Der Putten. 2004. Plant species identity and diversity effects on different trophic levels of nematodes in the soil food web. *Oikos* **106**:576-586.
- De Deyn, G. B., C. E. Raaijmakers, H. R. Zoomer, M. P. Berg, P. C. de Ruiter, H. A. Verhoef, T. M. Bezemer, y W. H. van der Putten. 2003. Soil invertebrate fauna enhances grassland succession and diversity. *Nature* **422**:711-713.
- De Deyn, G. B. y W. H. van der Putten. 2005. Linking aboveground and belowground diversity. *Trends in Ecology & Evolution* **20**:625-633.
- de la Peña , E. 2009. Efectos de la biota edáfica en las interacciones planta-insecto a nivel foliar *Ecosistemas* **18**:64-78.
- de Ruiter, P. C., A.-M. Neutel, y J. C. Moore. 1995. Energetics, patterns of interaction strengths, and stability in real ecosystems. *Science* **269**:1257-1260.
- de Ruiter, P. C., A.-M. Neutel, y J. C. Moore. 1998. Biodiversity in soil ecosystems: the role of energy flow and community stability. *Applied Soil Ecology* **10**:217-228.
- Deep, I. W. y P. E. Lipps. 1996. Recovery of *Pythium arrhenomanes* and its virulence to corn. *Crop Protection* **15**:85-90.
- Denison, R. F. y E. T. Kiers. 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters* **237**:187-193.
- Desprez-Loustau, M.-L., C. Robin, M. Buée, R. Courtecuisse, J. Garbaye, F. Suffert, I. Sache, y D. M. Rizzo. 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **22**:472-480.
- Desrochers, A. M., J. F. Bain, y S. I. Warwick. 1988. The biology of Canadian weeds 89. *Carduus nutans* L. and *Carduus acanthoides* L. *Canadian Journal of Plant Science* **68**:1053-1068.
- Diamond, J. M. 1975. The island dilemma: Lessons of modern biogeographic studies for the design of natural reserves. *Biological Conservation* **7**:129-146.
- Douglas, A. E. 1996. Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. *Journal of Insect Physiology* **42**:247-255.
- Duncan, L. W. y C. W. McCoy. 2001. Hydraulic lift increases herbivory by *Diaprepes abbreviatus* larvae and persistence of *Steinernema riobrave* in dry soil. *Journal of Nematology* **33**:142-146.
- Dunn, P. H. 1976. Distribution of *Carduus nutans*, *C. acanthoides*, *C. pycnocephalus*, and *C. crispus*, in the United States. *Weed Science* **24**:518-524.

- Easton, H. 2007. Grasses and *Neotyphodium* endophytes: co-adaptation and adaptive breeding. *Euphytica* **154**:295-306.
- Eerens, J. P. J., M. H. P. W. Visker, R. J. Lucas, H. S. Easton, y J. G. H. White. 1998. Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool moist environment IV. Plant parasitic nematodes. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **41**:209-217.
- Ehrenfeld, J. G., B. Ravit, y K. Elgersma. 2005. Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of the Environment and Resources* **30**:75-115.
- Elmi, West, Robbins, y Kirkpatrick. 2000. Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) and osmotic adjustment in tall fescue. *Grass and Forage Science* **55**:166-172.
- Elmi, A. A., C. P. West, T. L. Kirkpatrick, y R. T. Robbins. 1990. *Acremonium* endophyte inhibits root-knot nematodes reproduction in tall fescue. *Arkansas Farm Research* **39**:3.
- Elliott, E. T. 1994. The potential use of soil biotic activity as an indicator of productivity, sustainability, and pollution. Pages 250-256 in C. E. Pankhurst, B. M. Doube, V. V. S. R. Gupta, y P. R. Grace, editors. *Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Universidad de Wisconsin, Madison.
- Faeth, S. y C. Hamilton. 2006. Does an asexual endophyte symbiont alter life stage and long-term survival in a perennial host grass? *Microbial Ecology* **52**:748-755.
- Faeth, S. H. 2009. Asexual fungal symbionts alter reproductive allocation and herbivory over time in their native perennial grass hosts. *The American Naturalist* **173**:554-565.
- Faeth, S. H. y T. L. Bultman. 2002. Endophytic fungi and interactions among host plants, herbivores, and natural enemies. Pages 89-123 in T. Tscharrntke y B. A. Hawkins, editors. *Multitrophic level interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Faeth, S. H. y W. F. Fagan. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology* **42**:360-368.
- Faeth, S. H., M. L. Helander, y K. T. Saikkonen. 2004. Asexual *Neotyphodium* endophytes in a native grass reduce competitive abilities. *Ecology Letters* **7**:304-313.
- Faeth, S. H. y E. Shochat. 2010. Inherited microbial symbionts increase herbivore abundances and alter arthropod diversity on a native grass. *Ecology* **91**:1329-1343.
- Faeth, S. H. y T. J. Sullivan. 2003. Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist* **161**:310-325.
- Feldman, S. R. y J. P. Lewis. 1990. Output and dispersal of propagules of *Carduus acanthoides* L. *Weed Research* **30**:161-169.
- Ferris, H., T. Bongers, y R. G. M. de Goede. 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology* **18**:13-29.
- Ferris, H. y M. M. Matute. 2003. Structural and functional succession in the nematode fauna of a soil food web. *Applied Soil Ecology* **23**:93-110.

- Fewell, J. H. y M. L. Winston. 1992. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **30**:387-393.
- Findlay, S., M. Carreiro, V. Krischik, y C. G. Jones. 1996. Effects of damage to living plants on leaf litter quality. *Ecological Applications* **6**:269-275.
- Finkes, L. K., A. B. Cady, J. C. Mulroy, K. Clay, y J. A. Rudgers. 2006. Plant–fungus mutualism affects spider composition in successional fields. *Ecology Letters* **9**:347-356.
- Fitter, A. H. y B. Moyerson. 1997. Evolutionary trends in root-microbe symbiosis. Pages 265–282 in J. Silvertown, M. Franco, y J. L. Harper, editors. *Plant life histories*. Camaridge University Press, Cambridge.
- Foster, B. L. y K. L. Gross. 1998. Species richness in a successional grassland: effects of nitrogen enrichment and plant litter. *Ecology* **79**:2593-2602.
- Foster, B. L., V. H. Smith, T. L. Dickson, y T. Hildebrand. 2002. Invasibility and compositional stability in a grassland community: relationships to diversity and extrinsic factors. *Oikos* **99**:300-307.
- Foster, B. L. y D. Tilman. 2003. Seed limitation and the regulation of community structure in oak savanna grassland. *Journal of Ecology* **91**:999-1007.
- Foster, J. y M. S. Gaines. 1991. The effects of a successional habitat mosaic on a small mammal community. *Ecology* **72**:1358-1373.
- Fox, J. 2009. *car: Companion to Applied Regression*.
- Frank, D. A., P. M. Groffman, R. D. Evans, y B. F. Tracy. 2000. Ungulate stimulation of nitrogen cycling and retention in Yellowstone Park grasslands. *Oecologia* **123**:116-121.
- Frankie, G. W., S. B. Vinson, M. A. Rizzardi, T. L. Griswold, S. O'Keefe, y R. R. Snelling. 1997. Diversity and abundance of bees visiting a mass flowering tree species in disturbed seasonal dry forest, Costa Rica. *Journal of the Kansas Entomological Society* **70**:281-296.
- Franzluebbers, A. J. 2006. Short-term responses of soil C and N fractions to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil* **282**:153-164.
- Franzluebbers, A. J. y N. S. Hill. 2005. Soil carbon, nitrogen, and ergot alkaloids with short- and long-term exposure to endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Soil Science Society of America Journal* **69**:404-412.
- Franzluebbers, A. J., N. Nazih, J. A. Stuedemann, J. J. Fuhrmann, H. H. Schomberg, y P. G. Hartel. 1999. Soil carbon and nitrogen pools under low- and high-endophyte-infected tall fescue. *Soil Science Society of America Journal* **63**:1687-1694.
- Franzluebbers, A. J. y J. A. Stuedemann. 2005. Soil carbon and nitrogen pools in response to tall fescue endophyte infection, fertilization, and cultivar. *Soil Science Society of America Journal* **69**:396-403.
- Fraser, L. H. y P. Keddy. 1997. The role of experimental microcosms in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* **12**:478-481.

- Funk, C. R., R. H. White, y J. P. Breen. 1993. Importance of *Acremonium* endophytes in turf-grass breeding and management. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **44**:215-232.
- Gange, A., E. Bower, y V. Brown. 2002. Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecologia* **131**:103-112.
- Gange, A. C. 2007. Insect-mycorrhizal interactions: patterns, process, and consequences. Pages 124-144 *in* T. Ohgushi, T. P. Craig, y P. W. Price, editors. *Ecological communities: plant mediation in indirect interaction webs*. Cambridge University press, Edinburgh building, Cambridge, UK.
- Gange, A. C. y V. K. Brown. 2002. Multitrophic interactions in terrestrial systems. 36th Symposium of the British Ecological Society. Page 458 *Symposia of the British Ecological Society*.
- Gange, A. C., V. K. Brown, y D. M. Aplin. 2003. Multitrophic links between arbuscular mycorrhizal fungi and insect parasitoids. *Ecology Letters* **6**:1051-1055.
- Gange, A. C. y A. K. Smith. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi influence visitation rates of pollinating insects. *Ecological Entomology* **30**:600-606.
- García Parisi, P. A., C. Casas, P. E. Gundel, y M. Omacini. 2011. Consequences of grazing on the vertical transmission of a fungal *Neotyphodium* symbiont in an annual grass population. *Austral Ecology*: en prensa.
- Garner, G. B., G. E. Rottinghaus, C. N. Cornell, y H. Testereci. 1993. Chemistry of compounds associated with endophyte/grass interaction: ergovaline- and ergopeptine-related alkaloids. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **44**:65-80.
- Gentile, A., M. S. Rossi, D. Cabral, K. D. Craven, y C. L. Schardl. 2005. Origin, divergence, and phylogeny of *Epichloë* endophytes of native Argentine grasses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**:196-208.
- Gerlach, J. 2001. Predator, prey and pathogen interactions in introduced snail populations. *Animal Conservation* **4**:203-209.
- Giordani, C. A. 1973. Método de aprovechamiento de pasturas. *in* C. T. J. C. d. Carne, editor. Conferencia pronunciada en el curso sobre técnicas de pastoreo y suplementación.
- Giurfa, M., J. Núñez, y W. Backhaus. 1994. Odour and colour information in the foraging choice behaviour of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **175**:773-779.
- Giurfa, M. y J. A. Núñez. 1992. Honeybees mark with scent and reject recently visited flowers. *Oecologia* **89**:113-117.
- Giurfa, M. y J. A. Núñez. 1993. Efficient floret inspection by honeybees in capitula of *Carduus acanthoides*. *Ecological Entomology* **18**:116-122.
- Goulson, D. 2000. Why do pollinators visit proportionally fewer flowers in large patches? *Oikos* **91**:485-492.
- Grewal, S., P. Grewal, y R. Gaugler. 1995. Endophytes of fescue grasses enhance susceptibility *Popillia japonica* larvae to an entomopathogenic nematode. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **74**:219-224.

- Grime, J. P. 1998. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecology* **86**:902-910.
- Grime, J. P. 2001. *Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties*. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Grubb, P. J. y A. J. M. Hopkins. 1986. Resilience at the level of the plant community. Pages 21-37 *in* B. Dell, A. J. M. Hopkins, y B. B. Lamont, editors. *Resilience in mediterranean-type ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Guitian, R. y R. Bardgett. 2000. Plant and soil microbial responses to defoliation in temperate semi-natural grassland. *Plant and Soil* **220**:271-277.
- Gundel, P., L. Garibaldi, P. Tognetti, R. Aragón, C. Ghera, y M. Omacini. 2009. Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the Flooding Pampa. *Microbial Ecology* **57**:740-748.
- Gundel, P., P. Maseda, C. Ghera, y R. Benech-Arnold. 2006a. Effects of the *Neotyphodium* endophyte fungus on dormancy and germination rate of *Lolium multiflorum* seeds. *Austral ecology*. **31**:767-775.
- Gundel, P. E., W. B. Batista, M. Texeira, M. A. Martínez-Ghera, M. Omacini, y C. M. Ghera. 2008. *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society* **275**:897-905.
- Gundel, P. E., P. H. Maseda, M. M. Vila-Aiub, C. M. Ghera, y R. Benech-Arnold. 2006b. Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany* **97**:571-577.
- Guo, B. Z., J. W. Hendrix, Z.-Q. An, y R. S. Ferriss. 1992. Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. *Mycologia* **84**:882-885.
- Hamilton, E. W. y D. A. Frank. 2001. Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology* **82**:2397-2402.
- Hamilton III, E. W., D. A. Frank, P. M. Hinchey, y T. R. Murray. 2008. Defoliation induces root exudation and triggers positive rhizospheric feedbacks in a temperate grassland. *Soil Biology and Biochemistry* **40**:2865-2873.
- Handayani, I., M. Coyne, y T. Phillips. 2011. Soil organic carbon fractions differ in two contrasting tall fescue systems. *Plant and Soil* **338**:43-50.
- Harmon, M. E., K. J. Nadelhoffer, y J. M. Blair. 1999. Measuring decomposition, nutrient turnover and stores in plant litter. Page 480 *in* G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe, y P. Sollins, editors. *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research*. Oxford, University Press, Oxford.
- Hartley, S. E. y A. C. Gange. 2009. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology* **54**:323-342.
- Hartnett, D. C. y G. W. T. Wilson. 2002. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and Soil* **244**:319-331.
- Harvey, J. A., T. Bukovinszky, y W. H. van der Putten. 2010. Interactions between invasive plants and insect herbivores: A plea for a multitrophic perspective. *Biological Conservation* **143**:2251-2259.

- Hassall, M., S. Adl, M. Berg, B. Griffiths, y S. Scheu. 2006. Soil fauna–microbe interactions: towards a conceptual framework for research. *European Journal of Soil Biology* **42**, **Supplement 1**:S54-S60.
- Hättenschwiler, S., A. V. Tiunov, y S. Scheu. 2005. Biodiversity and Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**:191-218.
- Hedlund, K. 2002. Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land. *Soil Biology and Biochemistry* **34**:1299-1307.
- Heil, M. y D. McKey. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**:425-453.
- Heinrich, B. y S. L. Collins. 1983. Caterpillar Leaf Damage, and the Game of Hide-and-Seek with Birds. *Ecology* **64**:592-602.
- Hendrix, F. F. y W. A. Campbell. 1973. Pythiums as Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **11**:77-98.
- Herron, P. M., C. T. Martine, A. M. Latimer, y S. A. Leicht-Young. 2007. Invasive plants and their ecological strategies: prediction and explanation of woody plant invasion in New England. *Diversity and Distributions* **13**:633–644.
- Hill, N. S., D. P. Belesky, y W. C. Stringer. 1990. Competitiveness of tall fescue as influenced by *Acremonium coenophialum*. *Crop Science* **31**:185-190.
- Hill, N. S., J. G. Pachon, y C. W. Bacon. 1994. *Acremonium coenophialum*-mediated short- and long-term drought acclimation in tall fescue. *Crop Science* **36**:665-672.
- Hokka, V., J. Mikola, M. Vestberg, y H. Setälä. 2004. Interactive effects of defoliation and an AM fungus on plants and soil organisms in experimental legume–grass communities. *Oikos* **106**:73-84.
- Holland, E. A. y J. K. Detling. 1990. Plant response to herbivory and belowground nitrogen cycling. *Ecology* **71**:1040-1049.
- Holland, J. N., W. Cheng, y D. A. Crossley. 1996. Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of below-ground C fluxes using carbon-14. *Oecologia* **107**:87-94.
- Hooper, D. U., D. E. Bignell, V. K. Brown, L. Brussard, J. Mark Dangerfield, D. H. Wall, D. A. Wardle, D. C. Coleman, K. E. Giller, P. Lavelle, W. H. Van Der Putten, P. C. De Ruiter, J. Rusek, W. L. Silver, J. M. Tiedje, y V. Wolters. 2000. Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: patterns, mechanisms, and feedbacks. *Bioscience* **50**:1049-1061.
- Hooper, D. U., F. S. Chapin, J. J. Ewel, A. Hector, P. Inchausti, S. Lavorel, J. H. Lawton, D. M. Lodge, M. Loreau, S. Naeem, B. Schmid, H. Setälä, A. J. Symstad, J. Vandermeer, y D. A. Wardle. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**:3-35.
- Hopkin, S. P. 2007. A key to the springtails (Collembola) of Britain and Ireland. Field Studies Council (AIDGAP Project).

- Hothorn, T., F. Bretz, y P. Westfall. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal* **50**:346-363.
- Hubbell, S. P. 2001. *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. Princeton University Press.
- Hudson, B. D. 1994. Soil organic matter and available water capacity. *Journal of Soil and Water Conservation* **49**:189-194.
- Hughes, R. y A. Uowolo. 2006. Impacts of *Falcataria moluccana* invasion on decomposition in Hawaiian lowland wet forests: the importance of stand-level controls. *Ecosystems* **9**:977-991.
- Hunter, M. y P. Price. 1992. Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom-up and topdown forces in natural communities. *Ecology* **73**:724-732.
- Iannone, L., J. White, L. Giussani, D. Cabral, y M. Victoria Novas. 2011. Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycological Progress* **10**:9-19.
- Ilmarinen, K., J. Mikola, M. Nieminen, y M. Vestberg. 2005. Does plant growth phase determine the response of plants and soil organisms to defoliation? *Soil Biology & Biochemistry* **37**:433-443.
- Insausti, P., E. J. Chaneton, y A. Soriano. 1999. Flooding reverted grazing effects on plant community structure in mesocosms of lowland grassland. *Oikos* **84**:266-276.
- Iqbal, J., J. A. Siegrist, J. A. Nelson, y R. L. McCulley. 2012. Fungal endophyte infection increases carbon sequestration potential of southeastern USA tall fescue stands. *Soil Biology and Biochemistry* **44**:81-92.
- Izzo, T. y H. Vasconcelos. 2002. Cheating the cheater: domatia loss minimizes the effects of ant castration in an Amazonian ant-plant. *Oecologia* **133**:200-205.
- Jacobo, E. J., A. M. Rodriguez, J. L. Rossi, L. P. Salgado , y V. A. Deregibus. 2000. Rotational stocking and production of italian ryegrass on Argentinean rangelands. *Journal of Range Management* **54**:483-488.
- Jani, A. J., S. H. Faeth, y D. Gardner. 2010. Asexual endophytes and associated alkaloids alter arthropod community structure and increase herbivore abundances on a native grass. *Ecology Letters* **13**:106-117.
- Jarosz, A. M. y A. L. Davelos. 1995. Tansley Review No. 81. Effects of disease in wild plant populations and the evolution of pathogen aggressiveness. *New Phytologist* **129**:371-387.
- Jenkins, M., A. Franzluebbers, y S. Humayoun. 2006. Assessing short-term responses of prokaryotic communities in bulk and rhizosphere soils to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil* **289**:309-320.
- Johnson, N. C., J. H. Graham, y F. A. Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**:575-586.
- Jules, E. S., M. J. Kauffman, W. D. Ritts, y A. L. Carroll. 2002. Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: a nonnative root rot on port orford cedar. *Ecology* **83**:3167-3181.

- Kane, K. H. 2011. Effects of endophyte infection on drought stress tolerance of *Lolium perenne* accessions from the Mediterranean region. *Environmental and Experimental Botany* **71**:337-344.
- Kardol, P., T. M. Bezemer, A. van der Wal, y W. H. van der Putten. 2005. Successional trajectories of soil nematode and plant communities in a chronosequence of ex-arable lands. *Biological Conservation* **126**:317-327.
- Kardol, P., N. J. Cornips, M. M. L. van Kempen, J. M. T. Bakx-Schotman, y W. H. van der Putten. 2007. Microbe-mediated plant-soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecological Monographs* **77**:147-162.
- Kardol, P., T. Martijn Bezemer, y W. H. Van Der Putten. 2006. Temporal variation in plant-soil feedback controls succession. *Ecology Letters* **9**:1080-1088.
- Keane, R. M. y M. J. Crawley. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:164-170.
- Keddy, P. A. 1992. A pragmatic approach to functional ecology. *Functional Ecology* **6**:621-626.
- Keogh, R. G., B. A. Tapper, y R. H. Fletcher. 1996. Distributions of the fungal endophyte *Acremonium lolii*, and of the alkaloids lolitrem B and peramine, within perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **39**:121-127.
- Kiers, E. T., M. Duhamel, Y. Beesetty, J. A. Mensah, O. Franken, E. Verbruggen, C. R. Fellbaum, G. A. Kowalchuk, M. M. Hart, A. Bago, T. M. Palmer, S. A. West, P. Vandenkoornhuyse, J. Jansa, y H. Bücking. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* **333**:880-882.
- Kiers, E. T., C. E. Lovelock, E. L. Krueger, y E. A. Herre. 2000. Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecology Letters* **3**:106-113.
- Kiers, E. T., R. A. Rousseau, S. A. West, y R. F. Denison. 2003. Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* **425**:78-81.
- Klironomos, J. N. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* **417**:67-70.
- Klironomos, J. N., J. McCune, M. Hart, y J. Neville. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters* **3**:137-141.
- Koh, S. y D. S. Hik. 2007. Herbivory mediates grass-endophyte relationships. *Ecology* **88**:2752-2757.
- Kok, L. T. 2001. Classical biological control of nodding and plumeless thistles. *Biological Control* **21**:206-213.
- Koppenhöfer, A. M. y E. M. Fuzy. 2003. Effects of turfgrass endophytes (Clavicipitaceae: Ascomycetes) on white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Environmental Entomology* **32**:392-396.

- Koricheva, J., C. P. H. Mulder, B. Schmid, J. Joshi, y K. Huss-Danell. 2000. Numerical responses of different trophic groups of invertebrates to manipulations of plant diversity in grasslands. *Oecologia* **125**:271-282.
- Korthals, G. W., P. Smilauer, C. Van Dijk, y W. H. Van Der Putten. 2001. Linking above- and below-ground biodiversity: abundance and trophic complexity in soil as a response to experimental plant communities on abandoned arable land. *Functional Ecology* **15**:506-514.
- Koulman, A., G. A. Lane, M. J. Christensen, K. Fraser, y B. A. Tapper. 2007. Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. *Phytochemistry* **68**:355-360.
- Kourtev, P. S., J. G. Ehrenfeld, y M. Häggblom. 2002. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology* **83**:3152-3166.
- Kowalchuk, G., D. Buma, W. de Boer, P. Klinkhamer, y J. van Veen. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:509-520.
- Kowalchuk, G. A., M. Bruinsma, y J. A. van Veen. 2003. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. *Trends in Ecology and Evolution* **18**:403-410.
- Kuldau, G. y C. Bacon. 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control* **46**:57-71.
- Kunkel, B. A., P. S. Grewal, y M. F. Quigley. 2004. A mechanism of acquired resistance against an entomopathogenic nematode by *Agrotis ipsilon* feeding on perennial ryegrass harboring a fungal endophyte. *Biological Control* **29**:100-108.
- Kuzyakov, Y., P. Hill, y D. Jones. 2007. Root exudate components change litter decomposition in a simulated rhizosphere depending on temperature. *Plant and Soil* **290**:293-305.
- Laakso, J. y H. Setälä. 1999. Population- and ecosystem-level effects of predation on microbial-feeding nematodes. *Oecologia* **120**:279-286.
- Larimer, A., J. Bever, y K. Clay. 2010. The interactive effects of plant microbial symbionts: a review and meta-analysis. *Symbiosis* **51**:139-148.
- Larkin, R. P., J. T. English, y J. D. Mihail. 1995a. Effects of infection by *Pythium* spp. on root system morphology of alfalfa seedlings. *Phytopathology* **85**:430-435.
- Larkin, R. P., J. T. English, y J. D. Mihail. 1995b. Identification, distribution and comparative pathogenicity of *Pythium* spp associated with alfalfa seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* **27**:357-364.
- Latch, G. C. M. 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **44**:143-156.
- Latch, G. C. M., M. J. Christensen, y R. E. Hickson. 1988. Endophytes of annual and hybrid ryegrasses. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **31**:57-63.
- Lavelle, P. y A. V. Spain. 2001. *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.

- Leimu, R. y J. Koricheva. 2006. A meta-analysis of tradeoffs between plant tolerance and resistance to herbivores: combining the evidence from ecological and agricultural studies. *Oikos* **112**:1-9.
- Lekberg, Y. y R. T. Koide. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, available soil P and nodulation of groundnut (*Arachis hypogaea*) in Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **110**:143-148.
- Lemons, A., K. Clay, y J. A. Rudgers. 2005. Connecting plant–microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. *Oecologia* **145**:595-604.
- Leuchtman, A. 1993. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins* **1**:150-162.
- Leuchtman, A. y K. Clay. 1997. The population biology of grass endophytes. Pages 185-202 in G. C. Carroll y P. Tudzynski, editors. *The mycota. Plant relationships*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Levine, J. M. 2000. Species diversity and biological invasions: relating local process to community pattern. *Science* **288**:852-854.
- Levine, J. M., P. B. Adler, y S. G. Yelenik. 2004. A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions. *Ecology Letters* **7**:975-989.
- Levine, J. M., E. Pachepsky, B. E. Kendall, S. G. Yelenik, y J. H. R. Lambers. 2006. Plant–soil feedbacks and invasive spread. *Ecology Letters* **9**:1005-1014.
- Li, C.-J., J.-H. Gao, y Z.-B. Nan. 2007. Interactions of *Neotyphodium gansuense*, *Achnatherum inebrians*, and plant-pathogenic fungi. *Mycological Research* **111**:1220-1227.
- Liao, C., R. Peng, Y. Luo, X. Zhou, X. Wu, C. Fang, J. Chen, y B. Li. 2008. Altered ecosystem carbon and nitrogen cycles by plant invasion: a meta-analysis. *New Phytologist* **177**:706-714.
- Liebhold, A. M., W. L. MacDonald, D. Bergdahl, y V. C. Mastro. 1995. Invasion by exotic forest pests: a threat to forest ecosystems. *Forest Science* **41**:a0001-z0001.
- Lonsdale, W. M. 1999. Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology* **80**:1522-1536.
- Ludwig, F., T. E. Dawson, H. H. T. Prins, F. Berendse, y H. de Kroon. 2004. Below-ground competition between trees and grasses may overwhelm the facilitative effects of hydraulic lift. *Ecology Letters* **7**:623-631.
- Mack, K. M. L. y J. A. Rudgers. 2008. Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos* **117**:310-320.
- Maharning, A. R., A. A. S. Mills, y S. M. Adl. 2009. Soil community changes during secondary succession to naturalized grasslands. *Applied Soil Ecology* **41**:137-147.
- Malinowski, D. P., G. A. Alloush, y D. P. Belesky. 1998a. Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Plant and Soil* **205**:1-12.

- Malinowski, D. P. y D. P. Belesky. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* **40**:923-940.
- Malinowski, D. P. y D. P. Belesky. 2006. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. *Grassland Science* **52**:1-14.
- Malinowski, D. P., D. P. Belesky, N. S. Hill, V. C. Baligar, y J. M. Fedders. 1998b. Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and Soil* **198**:53-61.
- Malinowski, D. P., D. P. Belesky, y G. C. Lewis. 2005. Abiotic stresses in endophytic grasses. Pages 187-199 *Neotyphodium in cool-season grasses*. Blackwell Publishing Ltd.
- Malinowski, D. P., H. Zuo, D. P. Belesky, y G. A. Alloush. 2004. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes. *Plant and Soil* **267**:1-12.
- Mandak, B., P. Zakravsky, D. Korinkova, P. Dostal, y I. Plackova. 2009. Low population differentiation and high genetic diversity in the invasive species *Carduus acanthoides* L. (Asteraceae) within its native range in the Czech Republic. *Biological journal of the Linnean Society*. Linnean Society of London **98**:596-607.
- Margulis, L. y R. Fester. 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. MIT Press, Cambridge.
- Maron, J. L. y P. G. Connors. 1996. A native nitrogen-fixing shrub facilitates weed invasion. *Oecologia* **105**:302-312.
- Martin, R. J. y W. L. Felton. 1993. Effect of crop rotation, tillage practice, and herbicides on the population dynamics of wild oats in wheat. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **33**:159 - 165
- Matthews, J. W. y K. Clay. 1999. Influence of fungal endophyte infection on plant–soil feedback and community interactions. *Ecology* **82**:500-509.
- McCook, L. J. 1994. Understanding ecological community succession - causal models and theories, a review. *Vegetatio* **110**.
- McNaughton, S. J. 1978. Serengeti ungulates: feeding selectivity influences the effectiveness of plant defense guilds. *Science* **199**:806-807.
- Menneer, J. C., S. Ledgard, C. McLay, y W. Silvester. 2005. Animal treading stimulates denitrification in soil under pasture. *Soil Biology and Biochemistry* **37**:1625-1629.
- Mercer, C. F. 1994. Plant-parasitic nematodes in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* **21**:57-65.
- Mikola, J. y H. Setälä. 1998. Productivity and trophic-level biomasses in a microbial-based soil food web *Oikos* **82**:158-168.
- Mikola, J., G. W. Yeates, G. M. Barker, D. A. Wardle, y K. I. Bonner. 2001a. Effects of defoliation intensity on soil food-web properties in an experimental grassland community. *Oikos* **92**:333-343.

- Mikola, J., G. W. Yeates, D. A. Wardle, G. M. Barker, y K. I. Bonner. 2001b. Response of soil food-web structure to defoliation of different plant species combinations in an experimental grassland community. *Soil Biology and Biochemistry* **33**:205-214.
- Milchunas, D. G. y W. K. Lauenroth. 1993. Quantitative effects of grazing on vegetation and soils over a global range of environments. *Ecological Monographs* **63**:327-366.
- Milchunas, D. G., W. K. Lauenroth, I. C. Burke, y J. K. Detling. 2008. Effects of grazing on vegetation. Page 522 *in* W. K. Lauenroth y I. C. Burke, editors. *Ecology of the shortgrass steppe: a long-term perspective*. Oxford University Press, Oxford.
- Mills, A. A. S. y M. S. Adl. 2011. Changes in nematode abundances and body length in response to management intensive grazing in a low-input temperate pasture. *Soil Biology & Biochemistry* **43**:150-158.
- Mills, K. E. y J. D. Bever. 1998. Maintenance of diversity within plant communities: soil pathogens as agents of negative feedback. *Ecology* **79**:1595-1601.
- Mitchell, C. E., A. A. Agrawal, J. D. Bever, G. S. Gilbert, R. A. Hufbauer, J. N. Klironomos, J. L. Maron, W. F. Morris, I. M. Parker, A. G. Power, E. W. Seabloom, M. E. Torchin, y D. P. Vázquez. 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecology Letters* **9**:726-740.
- Moon, C. D., B. Scott, C. L. Schardl, y M. J. Christensen. 2000. Evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia* **92**:1103-1108.
- Moon, D. C., J. Moon, y A. Keagy. 2010. Direct and indirect interactions. *Nature Education Knowledge* **1**:9.
- Mooney, H. y R. J. Hobbs 2000. *Invasive species in a changing world*. Island Press, Washington.
- Moore, J. C., E. L. Berlow, D. C. Coleman, P. C. de Ruiter, Q. Dong, A. Hastings, N. C. Johnson, K. S. McCann, K. Melville, P. J. Morin, K. Nadelhoffer, A. D. Rosemond, D. M. Post, J. L. Sabo, K. M. Scow, M. J. Vanni, y D. H. Wall. 2004. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* **7**:584-600.
- Moore, J. C. y H. W. Hunt. 1988. Resource compartmentation and the stability of real ecosystems. *Nature* **333**:261-263.
- Mueller-Dombois, D. 1974. *Aims and methods of vegetation ecology*. John Wiley, New York.
- Mueller, C., I. Williams, y J. Hardie. 2001. The role of nutrition, crowding and interespecific interactions in the development of winged aphids. *Ecological Entomology* **26**:330-340.
- Mueller, U. G., A. S. Mikheyev, S. E. Solomon, y M. Cooper. 2011. Frontier mutualism: coevolutionary patterns at the northern range limit of the leaf-cutter ant–fungus symbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**:3050-3059.
- Müller, C. B. y J. Krauss. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:450-456.

- Müller, J. 2003. Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonisation of *Lolium perenne*. *Functional Plant Biology* **30**:419-424.
- Mummey, D. y M. Rillig. 2006. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil* **288**:81-90.
- Murray, F. R., G. C. M. Latch, y D. B. Scott. 1992. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Molecular and General Genetics* **233**:1-9.
- Nahmani, J. y J.-P. Rossi. 2003. Soil macroinvertebrates as indicators of pollution by heavy metals. *Comptes Rendus Biologies* **326**:295-303.
- Newsham, K. K., A. H. Fitter, y A. R. Watkinson. 1994. Root pathogenic and arbuscular mycorrhizal fungi determine fecundity of asymptomatic plants in the field. *Journal of Ecology* **82**:805-814.
- Newsham, K. K., A. H. Fitter, y A. R. Watkinson. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of Ecology* **83**:991-1000.
- Novas, M. V., D. Cabral, y A. M. Godeas. 2005. Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis* **40**:23-30.
- Novas, M. V., L. J. Iannone, A. M. Godeas, y D. Cabral. 2009. Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycology Progress* **8**:75-81.
- Odum, W. E. y E. J. Heald. 1972. Trophic analyses of an estuarine mangrove community. *Bulletin of Marine Science* **22**:671-738.
- Ohgushi, T. 2005. Indirect interaction webs: herbivore-induced effects through trait change in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**:81-105.
- Oksanen, J., F. G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, y H. Wagner. 2010. vegan: community ecology package. R package version 1.17-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Oksanen, L. y T. Oksanen. 2000. The logic and realism of the hypothesis of exploitation ecosystems. *The american naturalist* **155**:703-723.
- Omacini, M., E. J. Chaneton, L. Bush, y C. M. Ghera. 2009. A fungal endosymbiont affects host plant recruitment through seed- and litter-mediated mechanisms. *Functional Ecology* **23**:1148-1156.
- Omacini, M., E. J. Chaneton, y C. M. Ghera. 2005. A hierarchical framework for understanding the ecosystem consequences of endophyte-grass symbioses. Pages 141-162. *in* C. A. Robert, C. P. West, y D. E. Spiers, editors. *Neothyphodium* in Cool Season Grasses. Blackwell Publishing Ltd.
- Omacini, M., E. J. Chaneton, C. M. Ghera, y C. B. Muller. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* **409**:78-81.
- Omacini, M., E. J. Chaneton, C. M. Ghera, y P. Otero. 2004. Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos* **104**:581-590.

- Omacini, M., E. J. Chaneton, R. J. C. León, y W. B. Batista. 1995. Old-field successional dynamics on the Inland Pampa, Argentina. *Journal of Vegetation Science* **6**:309-316.
- Omacini, M., T. Eggers, M. Bonkowski, A. C. Gange, y T. H. Jones. 2006. Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology* **20**:226-232.
- Omacini, M., M. Semmartin, L. I. Pérez, y P. E. Gundel. 2011. Grass–endophyte symbiosis: A neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology*: en prensa.
- Orr, S. P., J. A. Rudgers, y K. Clay. 2005. Invasive plants can inhibit native tree seedlings: Testing potential allelopathic mechanisms. *Plant Ecology* **181**:153-165.
- Packer, A. y K. Clay. 2000. Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature* **404**:278-281.
- Paine, R. T. 1980. Food webs: linkage, interaction strength and community infrastructure. *Journal of Animal Ecology* **49**:666-685.
- Pankhurst, C. E., H. J. McDonald, y B. G. Hawke. 1995. Influence of tillage and crop rotation on the epidemiology of *Pythium* infections of wheat in a red-brown earth of South Australia. *Soil Biology and Biochemistry* **27**:1065-1073.
- Paracer, S. y V. Ahmadjian. 2000. *Symbiosis. An introduction to biological associations*. Oxford University Press, Oxford.
- Parfitt, R. L., G. W. Yeates, D. J. Ross, N. L. Schon, A. D. Mackay, y D. A. Wardle. 2010. Effect of fertilizer, herbicide and grazing management of pastures on plant and soil communities. *Applied Soil Ecology* **45**:175-186.
- Parker, I. M. y G. S. Gilbert. 2007. When there is no escape: the effects of natural enemies on native, invasive, and noninvasive plants. *Ecology* **88**:1210-1224.
- Parker, J. D. y M. E. Hay. 2005. Biotic resistance to plant invasions? Native herbivores prefer non-native plants. *Ecology Letters* **8**:959-967.
- Parker, M. A. 2001. Mutualism as a constraint on invasion success for legumes and rhizobia. *Diversity and Distributions* **7**:125-136.
- Parodi, L. R. 1930. Ensayo fitosociológico sobre el partido de Pergamino. *Revista Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires* **7**:7:65-271.
- Paterson, E., B. Thornton, A. J. Midwood, y A. Sim. 2005. Defoliation alters the relative contributions of recent and non-recent assimilate to root exudation from *Festuca rubra*. *Plant, Cell & Environment* **28**:1525-1533.
- Pattison, R. R., G. Goldstein, y A. Ares. 1998. Growth, biomass allocation and photosynthesis of invasive and native Hawaiian rainforest species. *Oecologia* **117**:449-459.
- Peet, R. K. y N. L. Christensen. 1980. Succession: A population process. *Plant Ecology* **43**:131-140.
- Perelman, S. B., E. J. Chaneton, W. B. Batista, S. E. Burkart, y R. J. C. León. 2007. Habitat stress, species pool size and biotic resistance influence exotic plant richness in the Flooding Pampa grasslands. *Journal of Ecology* **95**:662-673.

- Perelman, S. B., R. J. C. León, y M. Oesterheld. 2001. Cross-scale vegetation patterns of Flooding Pampa grasslands. *Journal of Ecology* **89**:562-577.
- Philipson, M. N. y M. C. Christey. 1986. The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. *New Zealand Journal of Botany* **24**:125-134.
- Pickett, K. E. y M. Pearl. 2001. Multilevel analyses of neighbourhood socioeconomic context and health outcomes: a critical review. *Journal of Epidemiology and Community Health* **55**:111-122.
- Pickett, S. T. A., S. L. Collins, y J. J. Armesto. 1987. A hierarchical consideration of causes and mechanisms of succession. *Plant Ecology* **69**:109-114.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, y the R Core team. 2009. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-96.
- Pinheiro, J. C. y D. M. Bates. 2000. Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer-Verlag, New York.
- Polis, G. A. y D. R. Strong. 1996. Food web complexity and community dynamics. *The American Naturalist* **147**:813-846.
- Polis, G. A. y K. O. Winemiller. 1996. Food webs: integration of patterns and dynamics. Chapman and Hall, New York.
- Ponce, M. A., M. J. Bompadre, J. M. Scervino, J. A. Ocampo, E. J. Chaneton, y A. M. Godeas. 2009. Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. *Biochemical Systematics and Ecology* **37**:245-253.
- Popay, A. J. y S. A. Bonos. 2005. Biotic responses in endophytic grasses. Pages 163-185 *Neotyphodium in cool-season grasses*. Blackwell Publishing Ltd.
- Potter, D. A., J. T. Stokes, C. T. Redmond, C. L. Schardl, y D. G. Panaccione. 2008. Contribution of ergot alkaloids to suppression of a grass-feeding caterpillar assessed with gene knockout endophytes in perennial ryegrass. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **126**.
- Poveda, K., I. Steffan-Dewenter, S. Scheu, y T. Tschardt. 2007. Plant-mediated interactions between below nad aboveground process:decomposition, herbivory, parasitism and pollination. Pages 147-163 *in* T. Ohgushi, T. P. Craig, y P. W. Price, editors. *Ecological communities: plant mediation in indirect interaction webs*. Cambridge Iniversity press, Edinburgh building, Cambridge, UK.
- Prestidge, R. 1991. Susceptibility of Italian ryegrasses (*Lolium multiflorum* Lam.) to Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis* Kuschel) feeding and oviposition. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **34**:119-125.
- Price, P. W., C. E. Bouton, P. Gross, B. A. McPherson, J. N. Thompson, y A. E. Weis. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**:41-65.
- R Development Core Team. 2007. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *in* R. F. f. S. Computing, editor., Vienna, Austria.

- Rasmussen, S., A. J. Parsons, S. Bassett, M. J. Christensen, D. E. Hume, L. J. Johnson, R. D. Johnson, W. R. Simpson, C. Stacke, C. R. Voisey, H. Xue, y J. A. Newman. 2007. High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytologist* **173**:787-797.
- Rasmussen, S., A. J. Parsons, K. Fraser, H. Xue, y J. A. Newman. 2008. Metabolic profiles of *Lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content, and fungal endophyte infection. *Plant Physiology* **146**:1440-1453.
- Reader, T., I. MacLeod, P. T. Elliott, O. J. Robinson, y A. Manica. 2005. Inter-order interactions between flower-visiting insects: foraging bees avoid flowers previously visited by hoverflies. *Journal of Insect Behavior* **18**:51-57.
- Real, L. A. 1981. Uncertainty and pollinator-plant interactions: the foraging behavior of bees and wasps on artificial flowers. *Ecology* **62**:20-26.
- Reinhart, K. O. y R. M. Callaway. 2006. Soil biota and invasive plants. *New Phytologist* **170**:445-457.
- Reinhart, K. O., A. Packer, W. H. van der Putten, y K. Clay. 2003. Plant–soil biota interactions and spatial distribution of black cherry in its native and invasive ranges. *Ecology Letters* **6**:1046–1050.
- Rejmánek, M. 1989. Invasibility of plant communities. *Biological Invasions a Global Perspective* **16**: 369-388.
- Reynolds, H. L., A. Packer, J. D. Bever, y K. Clay. 2003. Grassroots ecology: plant–microbe–soil interactions as drivers of plant community structure and dynamics. *Ecology* **84**:2281-2291.
- Ricciardi, A. y J. Cohen. 2007. The invasiveness of an introduced species does not predict its impact. *Biological Invasions* **9**:309-315.
- Richardson, D. M., N. Allsopp, C. M. D'Antonio, S. J. Milton, y M. Rejmánek. 2000a. Plant invasions: the role of mutualisms. *Biological Reviews* **75**:65-93.
- Richardson, D. M., P. Pyšek, M. Rejmánek, M. G. Barbour, F. D. Panetta, y C. J. West. 2000b. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* **6**:93-107.
- Richmond, D. S. y C. A. Bigelow. 2009. Variation in endophyte-plant associations influence black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) performance and susceptibility to the parasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Environmental Entomology* **38**:996-1004.
- Rizvi, S. S. y X. B. Yang. 1996. Fungi associated with soybean seedling disease in Iowa. *Plant Disease* **80**:57-60.
- Roberts, C. A., H. R. Benedict, N. S. Hill, R. L. Kallenbach, y G. E. Rottinghaus. 2005. Determination of ergot alkaloid content in tall fescue by near-infrared spectroscopy. *Crop Science* **45**:778-783.
- Roberts, C. A., C. P. West, y D. E. Spiers. 2008. *Neotyphodium* in cool-season grasses. John Wiley & Sons.
- Robertson, G. P., D. Wedin, P. M. Groffman, J. M. Blair, E. A. Holland, K. J. Nadelhoffer, y D. Harris. 1999. Soil carbon and nitrogen availability. nitrogen

mineralization, nitrification, and soil respiration potentials. Oxford University press, Oxford.

- Rodriguez, A. M. y E. J. Jacobo. 2010. Glyphosate effects on floristic composition and species diversity in the Flooding Pampa grassland (Argentina). *Agriculture, Ecosystems and Environment* **138**:222-231.
- Rudgers, J., S. Fischer, y K. Clay. 2010. Managing plant symbiosis: fungal endophyte genotype alters plant community composition. *Journal of Applied Ecology*. **47**:468-477.
- Rudgers, J., W. Mattingly, y J. Koslow. 2005. Mutualistic fungus promotes plant invasion into diverse communities. *Oecologia* **144**:463-471.
- Rudgers, J. A. 2004. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. *Ecology* **85**:192-205.
- Rudgers, J. A. y K. Clay. 2007. Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems? *Fungal Biology Reviews* **21**:107-124.
- Rudgers, J. A. y K. Clay. 2008. An invasive plant-fungal mutualism reduces arthropod diversity. *Ecology Letters* **11**:831-840.
- Rudgers, J. A., J. Holah, S. P. Orr, y K. Clay. 2007. Forest succession suppressed by an introduced plant-fungal symbiosis. *Ecology* **88**:18-25.
- Rudgers, J. A., J. M. Koslow, y K. Clay. 2004. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters* **7**:42-51.
- Rudgers, J. A. y S. Orr. 2009. Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *Journal of Ecology* **97**:247-255.
- Saffo, M. B. 1992. Invertebrates in endosymbiotic associations. *American Zoologist* **32**:557-565.
- Saikkonen, K., S. H. Faeth, M. Helander, y T. J. Sullivan. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**:319-343.
- Saikkonen, K., M. Helander, S. H. Faeth, F. Schulthess, y D. Wilson. 1999. Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia* **121**:411-420.
- Saikkonen, K., P. Lehtonen, M. Helander, J. Koricheva, y S. H. Faeth. 2006. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science* **11**:428-433.
- Saikkonen, K., P. Wäli, M. Helander, y S. H. Faeth. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* **9**:275-280.
- Sala, O. E., M. Oesterheld, R. J. C. León, y A. Soriano. 1986. Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. *Plant Ecology* **67**:27-32.
- Sapp, J. 2004. The dynamics of symbiosis: an historical overview. *Canadian Journal of Botany* **82**:1046-1056.
- Sarathchandra, S. U., R. N. Watson, N. R. Cox, M. E. Menna, J. A. Brown, G. Burch, y F. J. Neville. 1996. Effects of chitin amendment of soil on microorganisms,

- nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biology and Fertility of Soils* **22**:221-226.
- Saunders, M., A. E. Glenn, y L. M. Kohn. 2010. Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural systems: using functional traits to reveal mechanisms in community processes. *Evolutionary Applications* **3**:525-537.
- Schaefer, M. 2002. *Brohmer, Fauna von Deutschland*. Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co, Wiebelsheim.
- Schardl, C. L., K. D. Craven, S. Speakman, A. Stromberg, A. Lindstrom, y R. Yoshida. 2008. A novel test for host-symbiont codivergence indicates ancient origin of fungal endophytes in grasses. *Systematic Biology* **57**:483-498.
- Schardl, C. L., A. Leuchtman, y M. J. Spiering. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* **55**:315-340.
- Scheu, S. 2001. Plants and generalist predators as links between the below-ground and above-ground system. *Basic and Applied Ecology* **2**:3-13.
- Scheu, S., A. Theenhaus, y T. H. Jones. 1999. Links between the detritivore and the herbivore system: effects of earthworms and Collembola on plant growth and aphid development. *Oecologia* **119**:541-551.
- Schipper, L. A., B. P. Degens, G. P. Sparling, y L. C. Duncan. 2001. Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. *Soil Biology and Biochemistry* **33**:2093-2103.
- Schmid, B., J. Joshi, y F. Schläpfer. 2002. Empirical evidence for biodiversity-ecosystem functioning relationships. Pages 120–150 in A. Kinzig, D. Tilman, y P. Pacala, editors. *Functional consequences of biodiversity: Experimental progress and theoretical extensions*. Princeton University Press., Princeton.
- Schmitz, O., E. Kalies, y M. Booth. 2006. Alternative dynamic regimes and trophic control of plant succession. *Ecosystems* **9**:659-672.
- Shea, K. y P. Chesson. 2002. Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:170-176.
- Shurtleff, M. C. y C. W. Averre III. 2000. *Diagnosing plant diseases caused by nematodes*. APS Press.
- Siegel, M. R. y G. C. M. Latch. 1991. Expression of antifungal activity in agar culture by isolates of grass endophytes. *Mycologia* **83**:529-537.
- Siegrist, J. A., R. L. McCulley, L. P. Bush, y T. D. Phillips. 2010. Alkaloids may not be responsible for endophyte-associated reductions in tall fescue decomposition rates. *Functional Ecology* **24**:460-468.
- Siemann, E., D. Tilman, J. Haarstad, y M. Ritchie. 1998. Experimental tests of the dependence of arthropod diversity on plant diversity. *The American Naturalist* **152**:738-750.
- Smith, S. E. y D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal symbiosis* Elsevier Ltd.
- Sosa, O., B. Martín, G. Zerpa, y S. Montico. 2006. Evolución anual de la broza en diversidad unidades forrajeras de un pastizal natural. *Revista Científica Agropecuaria* **10**:33-45.

- Southwood (Sir.), R. y P. A. Henderson. 2000. Ecological methods. 3rd edition. Wiley-Blackwell.
- Söyrintki, N. 2001. On the alien flora of the province of Buenos Aires, Argentina. *Annales Botanici Fennici* **28**:59-79.
- Spaull, A. M., P. G. Mewton, y R. O. Clements. 1985. Establishment and yield of three ryegrasses following aldicarb use, and changes in abundance of plant parasitic nematodes. *Annals of Applied Biology* **106**:313-321.
- Spyreas, G., D. J. Gibson, y B. A. Middleton. 2001. Effects of endophyte infection in tall fescue (*Festuca arundinacea*: Poaceae) on community diversity. *International Journal of Plant Sciences* **162**:1237-1245.
- Stachowicz, J. J. 2001. Mutualism, facilitation, and the structure of ecological communities. *Bioscience* **51**:235-246.
- Stanton, M. L. 2003. Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *The American Naturalist* **162**:10.23.
- Stewart, T., C. Mercep, y J. Grante. 1993. Development of *Meloidogyne naasi* on endophyte-infected and endophyte-free perennial ryegrass. *Australasian Plant Pathology* **22**:40-41.
- Strauss, S. Y. y R. E. Irwin. 2004. Ecological and evolutionary consequences of multispecies plant-animal interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**:435-466.
- Strauss, S. Y., R. E. Irwin, y V. M. Lambrix. 2004. Optimal defence theory and flower petal colour predict variation in the secondary chemistry of wild radish. *Journal of Ecology* **92**:132-141.
- Striker, G. G., P. Insausti, A. A. Grimoldi, y R. J. C. León. 2006. Root strength and trampling tolerance in the grass *Paspalum dilatatum* and the dicot *Lotus glaber* in flooded soil. *Functional Ecology* **20**:4-10.
- Sugawara, K., T. Inoue, M. Yamashita, y H. Ohkubo. 2006. Distribution of the endophytic fungus, *Neotyphodium occultans* in naturalized Italian ryegrass in western Japan and its production of bioactive alkaloids known to repel insect pests. *Grassland Science* **52**:147-154.
- Symstad, A. J. y D. Tilman. 2001. Diversity loss, recruitment limitation, and ecosystem functioning: lessons learned from a removal experiment. *Oikos* **92**:424-435.
- Tansley, A. G. 1935. The use and abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology* **16**:284-307.
- TePaske, M. R., R. G. Powell, y S. L. Clement. 1993. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**:2299-2303.
- Thompson, J. N. 2001. Coevolution. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London.
- Tilman, D. 1997. Community invasibility, recruitment limitation, and grassland biodiversity. *Ecology* **78**:81-92.

- Tilman, D. y C. Lehman. 2001. Human-caused environmental change: impacts on plant diversity and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**:5433-5440.
- Tognetti, P. M. 2010. Mecanismos de sucesión en pastizales: dispersión, disponibilidad de recursos y competencia. Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Trebino, H. J., E. J. Chaneton, y R. J. C. León. 1996. Flooding, topography, and successional age as determinants of species diversity in old-field vegetation. *Canadian Journal of Botany* **74**:582-588.
- Trevathan, L. E. 1996. Performance of endophyte-free and endophyte-infected tall fescue seedlings in soil infested with *Cochliobolus sativus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **18**:415-418.
- Tscharntke, T. y B. A. Hawkins. 2002. *Multitrophic level interactions*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Uchitel, A. 2008. El papel de la simbiosis con endofitos foliares en la invasión de gramíneas exóticas y su impacto sobre organismos del suelo. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Uchitel, A., M. Omacini, y E. Chaneton. 2011. Inherited fungal symbionts enhance establishment of an invasive annual grass across successional habitats. *Oecologia* **165**:465-475.
- van Breemen, N. y A. C. Finzi. 1998. Plant-soil interactions: ecological aspects and evolutionary implications. *Biogeochemistry* **42**:1-19.
- van Dam, N. M. 2009. How plants cope with biotic interactions. *Plant Biology* **11**:1-5.
- van der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett, y N. M. van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**:296-310.
- van der Heijden, M. G. A., T. Boller, A. Wiemken, y I. R. Sanders. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* **79**:2082-2091.
- van der Putten, W., R. Bardgett, P. de Ruiter, W. Hol, K. Meyer, T. Bezemer, M. Bradford, S. Christensen, M. Eppinga, T. Fukami, L. Hemerik, J. Molofsky, M. Schädler, C. Scherber, S. Strauss, M. Vos, y D. Wardle. 2009. Empirical and theoretical challenges in aboveground–belowground ecology. *Oecologia* **161**:1-14.
- van der Putten, W. H. 2003. Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. *Ecology* **84**:2269-2280.
- van der Putten, W. H., J. N. Klironomos, y D. A. Wardle. 2007a. Microbial ecology of biological invasions. *International Society for Microbial Ecology* **1**:28-37.
- van der Putten, W. H., G. A. Kowalchuk, E. P. Brinkman, G. T. A. Doodeman, R. M. van der Kaaij, A. F. D. Kamp, F. B. J. Menting, y E. M. Veenendaal. 2007b. Soil feedback of exotic savanna grass relates to pathogen absence and mycorrhizal selectivity. *Ecology* **88**:978-988.

- van der Putten, W. H., L. E. M. Vet, J. A. Harvey, y F. L. Wäckers. 2001. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends in Ecology and Evolution* **16**:547-554.
- van der Putten, W. H., G. W. Yeates, H. Duyts, C. S. Reis, y G. Karsen. 2005. Invasive plants and their escape from root herbivory: a worldwide comparison of the root-feeding nematode communities of the dune grass *Ammophila arenaria* in natural and introduced ranges. *Biological Invasions* **7**:733-746.
- Van Hecke, M., A. Treonis, y J. Kaufman. 2005. How does the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum* affect Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) rhizodeposition and soil microorganisms? *Plant and Soil* **275**:101-109.
- Vanderhoeven, S., N. Dassonville, y P. Meerts. 2005. Increased topsoil mineral nutrient concentrations under exotic invasive plants in Belgium. *Plant and Soil* **275**:169-179.
- Verschoor, B. C., T. E. Pronk, R. G. M. De Goede, y L. Brussaard. 2002. Could plant-feeding nematodes affect the competition between grass species during succession in grasslands under restoration management? *Journal of Ecology* **90**:753-761.
- Vesterlund, S.-R., M. Helander, S. Faeth, T. Hyvönen, y K. Saikkonen. 2011. Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. *Fungal Diversity* **47**:109-118.
- Vicari, M., P. E. Hatcher, y P. G. Ayres. 2002. Combined effect of foliar and mycorrhizal endophytes on an insect herbivore. *Ecology* **83**:2452-2464.
- Viketoft, M. 2008. Effects of six grassland plant species on soil nematodes: A glasshouse experiment. *Soil Biology and Biochemistry* **40**:906-915.
- Vila-Aiub, M. M., C. M. Ghersa, y E. Chaneton. 1997. Dinámica de infección de hongos endofíticos a través de la sucesión secundaria post-agrícola. Page 129 XVIII Reunión Argentina de Ecología Asociación Argentina de Ecología, Buenos Aires, Argentina.
- Vila-Aiub, M. M., P. E. Gundel, y C. M. Ghersa. 2005. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology* **30**:49-57.
- Visscher, P. K. y T. D. Seeley. 1982. Foraging strategy of honeybee colonies in a temperate deciduous forest. *Ecology* **63**:1790-1801.
- Vitousek, P. M., L. R. Walker, L. D. Whiteaker, D. Mueller-Dombois, y P. A. Matson. 1987. Biological invasion by *Myrica faya* alters ecosystem development in Hawaii. *Science* **238**:802-804.
- Vivanco, J. M., H. P. Bais, F. R. Stermitz, G. C. Thelen, y R. M. Callaway. 2004. Biogeographical variation in community response to root allelochemistry: novel weapons and exotic invasion. *Ecology Letters* **7**:285-292.
- Wajnberg, E., J. K. Scott, y P. C. Quimby. 2001. Evaluating indirect ecological effects of biological control. CABI, Wallingford.
- Wäli, P. R., M. Helander, O. Nissinen, y K. Saikkonen. 2006. Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Canadian Journal of Botany* **84**:1043-1051.

- Wardle, D. A. 2006. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecology Letters* **9**:870-886.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. v. d. Putten, y D. H. Wall. 2004a. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**:1629-1633.
- Wardle, D. A., K. I. Bonner, y G. M. Barker. 2002. Linkages between plant litter decomposition, litter quality, and vegetation responses to herbivores. *Functional Ecology* **16**:585-595.
- Wardle, D. A., K. I. Bonner, y K. S. Nicholson. 1997. Biodiversity and plant litter: experimental evidence which does not support the view that enhanced species richness improves ecosystem function. *Oikos* **79**:247-258.
- Wardle, D. A., G. Hörnberg, O. Zackrisson, M. Kalela-Brundin, y D. A. Coomes. 2003. Long-term effects of wildfire on ecosystem properties across an island area gradient. *Science* **300**:972-975.
- Wardle, D. A., W. M. Williamson, G. W. Yeates, y K. I. Bonner. 2005. Trickle-down effects of aboveground trophic cascades on the soil food web. *Oikos* **111**:348-358.
- Wardle, D. A., G. W. Yeates, W. M. Williamson, K. I. Bonner, y G. M. Barker. 2004b. Linking aboveground and belowground communities: the indirect influence of aphid species identity and diversity on a three trophic level soil food web. *Oikos* **107**:283-294.
- Watson, R. N. 1990. Effects of plant nematodes and *Acremonium* endophyte on white clover establishment with ryegrass or tall fescue. Pages 347-351 Proceedings of the Forty Third New Zealand Weed and Pest Control Conference.
- Weiher, E. y P. A. Keddy. 1999. Relative abundance and evenness patterns along diversity and biomass gradients. *Oikos* **87**:355-361.
- West, C., E. Izekor, D. Oosterhuis, y R. Robbins. 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant and Soil* **112**:3-6.
- West, C. P. 1994. Endophyte-infected grass physiology and drought tolerance. Pages 87-99 in C. W. Bacon y J. F. J. White, editors. *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Westerman, P. R., M. Liebman, F. D. Menalled, A. H. Heggenstaller, R. G. Hartzler, y P. M. Dixon. 2005. Are many little hammers effective? Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) population dynamics in two- and four-year crop rotation systems *Weed Science* **53**:382-392.
- Westover, K. M. y J. D. Bever. 2001. Mechanisms of plant species coexistence: roles of rhizosphere bacteria and root fungal pathogens. *Ecology* **82**:3285-3294.
- Wilson, J. B. y A. D. Q. Agnew. 1992. Positive-feedback switches in plant-communities. *Advances in Ecological Research* **23**:263-336.
- Williamson, C. R. y D. A. Potier. 1997. Turfgrass species and endophyte effects on survival, development, and feeding preference of black cutworms (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **90**:1290-1299.
- Williamson, M. 1999. Invasions. *Ecography* **22**:5-12.

- Williamson, M. y A. Fitter. 1996. The Varying Success of Invaders. *Ecology* **77**:1661-1666.
- Wolfe, B. E., B. C. Husband, y J. N. Klironomos. 2005. Effects of a belowground mutualism on an aboveground mutualism. *Ecology Letters* **8**:218-223.
- Wolfe, B. E. y J. N. Klironomos. 2005. Breaking new ground: soil communities and exotic plant invasion. *Bioscience* **55**:477-487.
- Wootton, J. T. 2002. Mechanisms of successional dynamics: Consumers and the rise and fall of species dominance. *Ecological Research* **17**:249-260.
- Wright, J. P. y C. G. Jones. 2006. The concept of organisms as ecosystem engineers ten years on: progress, limitations, and challenges. *Bioscience* **56**:203-209.
- Yang, X. B., R. L. Ruff, X. Q. Meng, y F. Workneh. 1996. Races of *Phytophthora sojae* in Iowa soybean fields. *Plant Disease* **80**:1418-1420.
- Yao, Q., H.-H. Zhu, Y.-L. Hu, y L.-Q. Li. 2008. Differential influence of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth of dominant and subordinate plants. *Plant Ecology* **196**:261-268.
- Yeates, G. W. y T. Bongers. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **74**:113-135.
- Yeates, G. W., T. Bongers, R. G. M. De Goede, D. W. Freckman, y S. S. Georgieva. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera—An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* **25**:315–331.
- Yeates, G. W. y R. A. Prestidge. 1986. Nematode populations and their effects on herbage production in a volcanic plateau pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **29**:517-523.
- Yeates, G. W., D. A. Wardle, y R. N. Watson. 1999. Responses of soil nematode populations, community structure, diversity and temporal variability to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry* **31**:1721-1733.
- Yu, D. W. y N. E. Pierce. 1998. A castration parasite of an ant–plant mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **265**:375-382.
- Yue, Q., C. J. Miller, J. F. White, y M. D. Richardson. 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:4687-4692.
- Zabalgogazcoa, I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**:138-146.
- Zhang, B. Q. y X. B. Yang. 2000. Pathogenicity of *Pythium* populations from corn-soybean rotation fields. *Plant Disease* **84**:94-99.
- Zilber-Rosenberg, I. y E. Rosenberg. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **32**:723-735.
- Zimmerman, M. y S. Cook. 1985. Pollinator foraging, experimental nectar-robbing and plant fitness in *Impatiens capensis*. *American Midland Naturalist* **113**:84-91.

Zou, J., W. Rogers, S. DeWalt, y E. Siemann. 2006. The effect of Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*) ecotype on soil–plant system carbon and nitrogen processes. *Oecologia* **150**:272-281.

ANEXO

Cuadro A.1: clasificación trófica y taxonómica (Orden, Clase, Phylum) para la fauna encontrada en bolsas de descomposición con broza de tejido aéreo y de raíces. El nombre corresponde al máximo nivel determinado en la clasificación. Los 37 grupos identificados fueron utilizados para calcular la riqueza y la diversidad taxonómica.

Nombre	Grupo trófico	Orden	Clase	Phylum
Araneae	Predador	Araneae	Arachnida	Arthropods
Brachypauropodidae	Fungívoros	Tetramerocerata	Pauropoda	Arthropods
Curculionidae	Fitófagos	Coleoptera	Insecta	Arthropods
<i>Deuterostminthurus pallipes</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Entomobrya cf. lanuginosa</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Entomobrya multifasciata</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Entomobrya</i> sp.	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
Gamasina	Predadores	Mesostigmata	Arachnida	Arthropods
Gastropoda	Omnívoros	Gastropoda	Gastropoda	Mollusca
<i>Isotoma anglicana</i>	Fungívoros	Collembola	Elliplura	Arthropods
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Oniscus asellus</i>	Omnívoros	Isopoda	Malacostraca	Arthropods
Oribatida	Omnívoros	Oribatida	Arachnida	Arthropods
Psocoptera	Omnívoros	Psocoptera	Insecta	Arthropods
<i>Sminthurus viridis</i>	Fungívoros	Collembola	Elliplura	Arthropods
Staphylinidae	Predadores	Coleoptera	Insecta	Arthropods
<i>Stenacidia violacea</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
Tardigrada	Fitófagos			Tardigrada
Tenebrionidae	Detritívoros	Coleoptera	Insecta	Arthropods
Thysanoptera	Fitófagos	Thysanoptera	Insecta	Arthropods
Uropodina	Predadores	Mesostigmata	Arachnida	Arthropods

Cuadro A.1: continuación. Incluye fauna encontrada exclusivamente en bolsas de descomposición con broza de tejido de raíces.

Nombre	Grupo trófico	Orden	Clase	Phylum
<i>Brachystomella parvula</i>	Fungívoros	Collembola	Elliplura	Arthropods
<i>Brachystomella parvula</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Desoria</i> sp.	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
Enchytraeidae	Fungívoros	Enchytraeida	Oligochaeta	Annelida
<i>Folsomia</i> sp.	Fungívoros	Collembola	Elliplura	Arthropods
<i>Isotomidae</i> sp. (black)	Fungívoros	Collembola	Elliplura	Arthropods
<i>Isotomidae</i> sp. (small)	Fungívoros	Collembola	Elliplura	Arthropods
<i>Isotomodes productus</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Isotomurus palustris</i>	Fungívoros	Collembola	Elliplura	Arthropods
Julidae	Detritívoros	Julida	Diplopoda	Arthropods
Lithobius	Predadores	Lithobiida	Chilopoda	Arthropods
Lumbricidae	Omnívoros	Opisthopora	Oligochaeta	Annelida
<i>Paranillbergia callipygos</i>	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Poduroidea</i> sp. (braun)	Fungívoros	Collembola	Entognatha	Arthropods
<i>Porcellio scaber</i>	Omnívoros	Isopoda	Malacostraca	Arthropods
Scutigerellidae	Omnívoros	Symphyla	Symphyla	Arthropods

Cuadro A.2: grupos florísticos y los géneros o especies identificados durante los censos de vegetación. Los valores para *L. multiflorum* fueron excluidos de la lista. Las columnas "Primavera 2009" y "Verano 2010" indican los dos momentos en que se realizaron los censos. Para todos los casos se distingue entre comunidades pastoreadas (P) y no pastoreadas (No P). El grupo de los pastos incluye a gramíneas y graminoides (#). El cuadro muestra los valores de cobertura aérea (en intervalos de 5%) a lo largo de los sitios. Los valores de cobertura <0.1 se indican con R y valores <1 con +. La cobertura se evaluó utilizando la escala de abundancia de Braun-Blanquet modificada (Mueller-Dombois 1974). En el análisis presentado en la sección "Resultados" incluyó los grupos "pastos nativos", "pastos exóticos" o "dicotiledóneas". Las especies están clasificadas además, según la estación de máximo crecimiento (especies invierno-primaverales [I] o estivo-otoñales [E]) y el ciclo de vida (especies anuales [A] o perennes [P]).

Grupo	Género/Especie	Estación	Ciclo	Primavera 2009		Verano 2010	
				No P (n=21)	P (n=36)	No P (n=21)	P (n=32)
Pastos nativos	<i>Bromus unioloides</i>	I	P	+	+	+	+
	<i>Carex phalaroides</i> #	I	P	15	+	13,5	+
	<i>Cypella herbertii</i> #	I	P	+	+	+	
	<i>Cyperus spp.</i> #	I	P	+	+		
	<i>Danthonia montevidensis</i>	I	P	+	+		+
	<i>Eleocharis sp.</i> #	I	P	7	3,5	5	2,5
	<i>Nothoscordum inodorum</i> #	I	P			+	+
	<i>Juncus spp.</i> #	I	P				+
	<i>Syrrinchium platensis</i> #	I	P		+		
	<i>Trifurcia lauhe</i> #	I	P		R		
	<i>Bothriochloa laguroides</i>	E	P				+
	<i>Distichlis scoparia</i>	E	P	1,5	1,0	2,5	4
	<i>Distichlis spicata</i>	E	P	+	2	+	1,5
	<i>Leersia hexandra</i>	E	P		R		+
	<i>Panicum berguui</i>	E	P		+	+	+
	<i>Panicum gounii</i>	E	P	+	R	+	+
<i>Panicum milioides</i>	E	P	3		3,5	1	

Cuadro A.2: continuación

Grupo	Género/Especie	Estación	Ciclo	Primavera 2009		Verano 2010		
				No P (n=21)	P (n=36)	No P (n=21)	P (n=32)	
Pastos nativos	<i>Panicum sabolorum</i>	E	P	+	R	+	+	
	<i>Paspalum paludivagum</i>	E	P	8	1	17	6	
	<i>Paspalum dilatatum</i>	E	P	7,5	1,5	10	1,5	
	<i>Paspalum vaginatum</i>	E	P		1,5	+	+	
	<i>Phalaris angusta</i>	E	P		R			
	<i>Setaria geniculata</i>	E	P		+	+	+	
	<i>Sporobolus indicus</i>	E	P	+	+		+	
	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	E	P	6,5	20	12	22	
	Pastos exóticos	<i>Gaudinia fragilis</i>	I	A	2	1,5		
		<i>Hordeum sp</i>	I	A	6,5	3	+	
<i>Festuca arundinaceum</i>		I	P	+	19	1	21,5	
<i>Cynodon dactylon</i>		E	P	3,5	20	6	24,5	
Dicotil. exóticas		<i>Bupleurum tenuissimum</i>	I	A		1		+
	<i>Linum usitatissimum</i>	I	A		R			
	<i>Plantago lanceolata</i>	E	P		2,5			
	<i>Sida leprosa</i>	E	P		R			
	<i>Spilanthes stolonifera</i>	E	P		+			
	<i>Hydrocotyle bonariensis</i>	I	P		+		+	
	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	E	P		+		2,5	
	<i>Phyla canescens</i>	E	P		+		1,5	
	<i>Eryngium ebracteatum</i>	E	P	+	+		+	
	<i>Cirsium vulgare</i>	E	P	+		+	+	

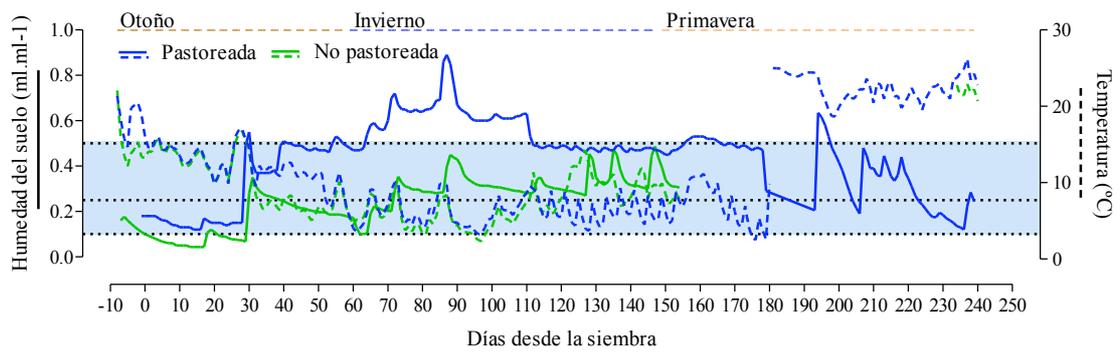


Figura A.1: fluctuaciones en la humedad (ml.ml^{-1} , líneas completas) y la temperatura del suelo ($^{\circ}\text{C}$, líneas punteadas) en las comunidades pastoreadas (azul) y no pastoreadas (verde). Los datos representan el valor promedio diario ($n=3$). Las medidas fueron tomadas con sensores de suelo (FDR, tipo ECH2O Decagon de) integrando una profundidad de 0-10 cm y con una frecuencia horaria. Las medidas se tomaron desde abril a diciembre de 2009. Las estaciones están representadas con líneas punteadas de colores en la parte superior). Los valores estimados para "punto de marchitez permanente" ($0,1 \text{ ml.ml}^{-1}$), "capacidad de campo" ($0,25 \text{ ml.ml}^{-1}$) y la "saturación" ($0,5 \text{ ml.ml}^{-1}$) se indican mediante las líneas horizontales punteadas en gris. El área celeste indica el agua disponible para las plantas.

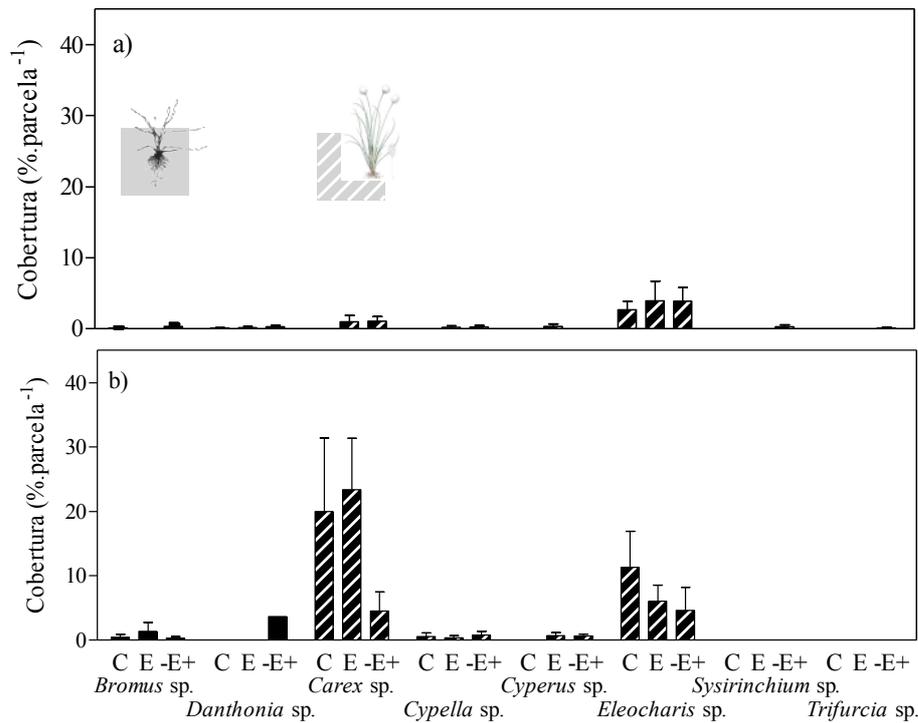


Figura A.2: cobertura de pastos nativos de invierno en a) las comunidades pastoreadas (n= 12) y, b) no pastoreadas (n= 7) durante la primavera de 2009. Las barras muestran los valores medios (\pm error estándar) para las parcelas control (C), sembradas con semillas con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos. Las especies de izquierda a derecha son: *Bromus unioides*, *Danthonia montevidensis*, *Carex* spp. *Cypella herbertii*, *Eleocharis* spp. *Sysirinchium platensis* y *Trifurcia lauhe*. Las barras llenas muestran gramíneas (*B. unioides* y *D. montevidensis*) y las barras rayadas indican especies graminoides.

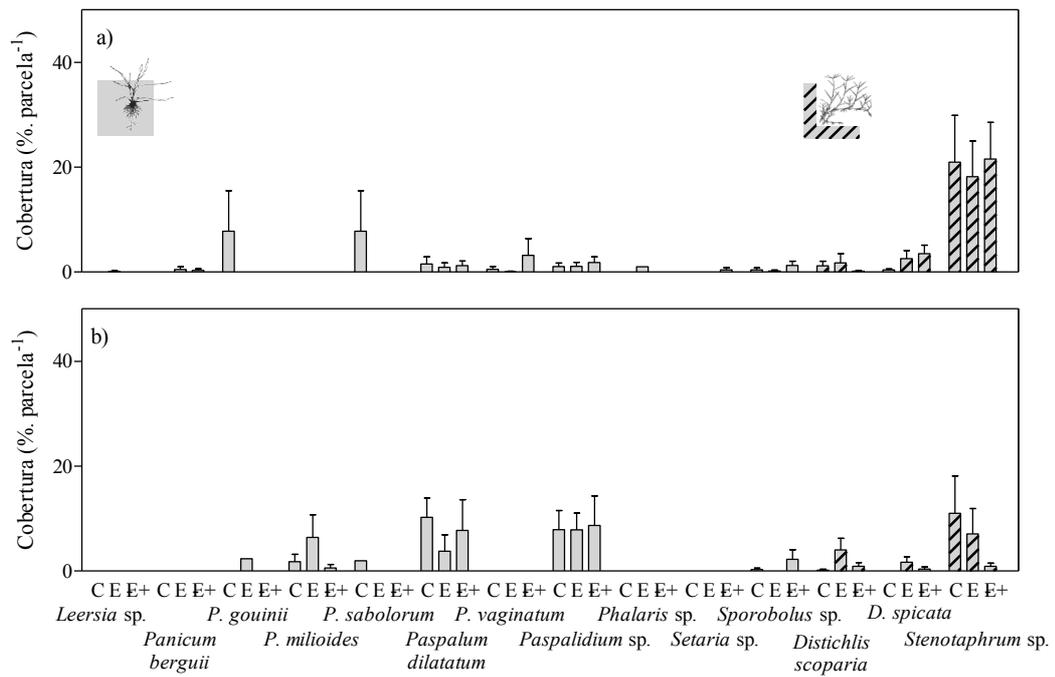


Figura A.3: cobertura de pastos nativos de verano en a) las comunidades pastoreadas (n= 12) y, b) no pastoreadas (n= 7) durante la primavera de 2009. Las barras muestran los valores medios (\pm error estándar) para las parcelas control (C), sembradas con semillas con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos. Las especies de izquierda a derecha son: *Leersia hexandra*, *Panicum berguui*, *Panicum gouinii*, *P. milioides*, *P. sabolorum*, *Paspalum dilatatum*, *P. vaginatum*, *Paspalidium paludivagum*, *Phalaris angusta*, *Setaria geniculata*, *Sporobolus indicus*, *Distichlis scoparia*, *D. spicata* y *Stenotaphrum secundatum*. Las barras llenas muestran gramíneas cespitosas y las barras rayadas indican especies gramíneas rastreras (*D. scoparia*, *D. spicata* y *S. secundatum*).

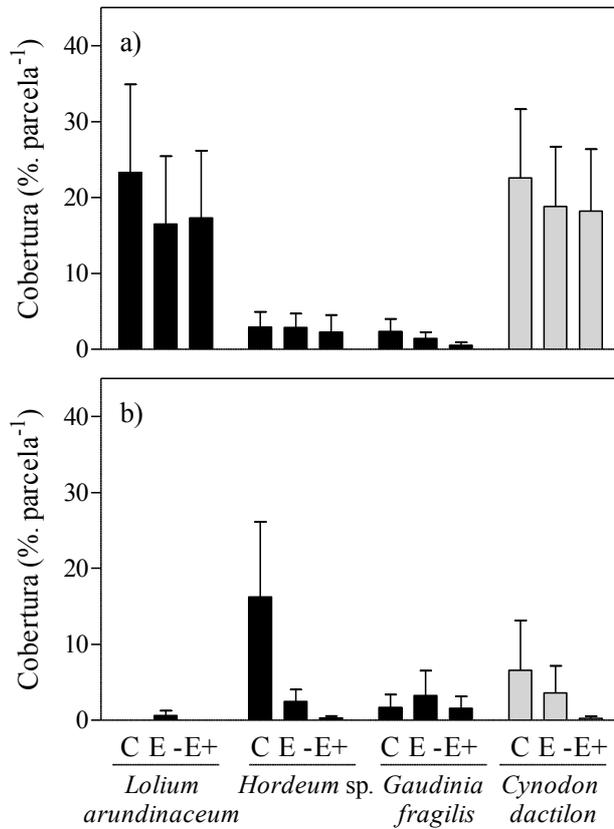


Figura A.4: cobertura de pastos exóticos en a) las comunidades pastoreadas (n= 12) y, b) no pastoreadas (n= 7) durante la primavera de 2009. Las barras muestran los valores medios (\pm error estándar) para las parcelas control (C), sembradas con semillas con baja (E-) o alta (E+) frecuencia de endofitos. Las barras negras muestran gramíneas de invierno y las barras grises indican especies gramíneas de verano. *L. arundinaceum* y *Cynodon dactylon* son especies perennes mientras, *Hordeum sp* y *Gaudinia fragilis* son especies anual.