

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MICORRIZAS EN GRAMÍNEAS NATIVAS DE URUGUAY: DIVERSIDAD
Y COLONIZACIÓN EN RELACIÓN AL INCREMENTO DE FÓSFORO**

por

Silvina Pilar GARCÍA ESQUIBEL

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de *Magister* en Ciencias
Agrarias en
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
(Agosto 2016)

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: Ing. Agr. Dra. María del Pilar Irisarri, Ing. Agr. PhD. Fernando Latanzi, Ing. Agr. PhD. Elena Beyhaut, el 30 de agosto de 2016.
Autor/a: Lic. Silvina García., Directora académica Ing. Agr. Dra. Fabiana Pezzani,
Directora de tesis Lic. Dra. Andrea Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis orientadoras Dra. Fabiana Pezzani y Dra. Andrea Rodríguez, por todas sus enseñanzas y por su gran apoyo en este proceso.

Al Dr. Fernando Latanzi, Dra. Elena Beyhaut y la Dra. Pilar Irisarri miembros del tribunal, por sus aportes y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Dra. Graciela Quintans y al personal de la Estación Experimental Palo a Pique por permitirnos utilizar la infraestructura de la Estación y coordinar el pastoreo del ensayo.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Treinta y Tres, por el aval y apoyo logístico para la realización de este trabajo.

Agradezco también a Felipe Lezama y Gerardo Parodi por la colaboración en el trabajo de campo.

Al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía, donde se llevó a cabo parte del procesamiento de las muestras y a Gastón, Gabriela, Germán, Pamela, Jorge y Tania, compañeros de dicho laboratorio.

A mis compañeros del Dpto. de Sistemas Ambientales, en especial a Daniella Bresciano y a Santiago Baeza por su asistencia.

A Alejandra Borges por el valioso asesoramiento en el análisis estadístico de los datos.

A mi familia, por su apoyo incondicional, su contención y por creer en mí.

A mis amigas por acompañarme y alentarme en momentos difíciles. Particularmente a quienes aportaron siempre con críticas constructivas para mejorar mi trabajo.

A Pablo, por su cariño y comprensión en momentos de nervios y por festejar mis logros.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto 1814 del Fondo Clemente Estable – ANII.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | II |
| AGRADECIMIENTOS..... | III |
| RESUMEN..... | |
| VI | |
| SUMMARY..... | VIII |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1.1. GENERALIDADES SOBRE LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA)..... | 1 |
| 1.2. DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES (HMA)..... | 5 |
| 1.3. MICORRIZAS EN PASTIZALES..... | 9 |
| 2. MICORRIZAS EN GRAMÍNEAS NATIVAS: EFECTOS DE LA FERTILIZACIÓN FOSFATADA A LARGO PLAZO | 13 |
| 2.1. RESUMEN..... | 15 |
| 2.2. SUMMARY..... | 16 |
| 2.3. INTRODUCCIÓN..... | 17 |
| 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 19 |
| 2.4.1. <u>Sitio de estudio</u> | 19 |
| 2.4.2. <u>Diseño experimental</u> | 19 |
| 2.4.3. <u>Muestreo de plantas</u> | 20 |
| 2.4.4. <u>Colonización micorrícica</u> | 21 |
| 2.4.5. <u>Análisis estadístico</u> | 21 |
| 2.5. RESULTADOS..... | 22 |
| 2.6. DISCUSIÓN..... | 26 |
| 2.7. BIBLIOGRAFÍA..... | 31 |
| 3. EFECTO DEL P SOBRE LA DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES EN LA RIZOSFERA Y RAÍCES DE GRAMÍNEAS | 37 |
| 3.1. RESUMEN..... | 37 |
| 3.2. SUMMARY..... | 35 |
| 3.3. INTRODUCCIÓN..... | 39 |
| 3.4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 44 |
| 3.4.1. <u>Sitio de estudio</u> | 44 |

| | |
|---|----|
| 3.4.2. <u>Diseño experimental</u> | 44 |
| 3.4.3. <u>Muestreo de plantas</u> | 44 |
| 3.4.4. <u>Ensayo en invernadero</u> | 45 |
| 3.4.5. <u>Extracción de ADN de las raíces</u> | 46 |
| 3.4.6. <u>Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)</u> | 47 |
| 3.4.7. <u>Secuenciación y análisis de los T-RFs</u> | 48 |
| 3.4.8. <u>Abundancia y diversidad de esporas</u> | 49 |
| 3.5. RESULTADOS | 50 |
| 3.5.1. <u>Diversidad de HMA en las raíces de C. selloana y P. dilatatum</u> | 50 |
| 3.5.2. <u>Abundancia y diversidad de esporas</u> | 55 |
| 3.6. DISCUSIÓN | 57 |
| 3.7. BIBLIOGRAFÍA | 63 |
| 4. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u> | 73 |
| 5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 78 |

RESUMEN

Las micorrizas arbusculares (MA) surgen de la interacción entre hongos pertenecientes al phylum *Glomeromycota* y las raíces de las plantas vasculares. Dada la alta presencia de MA en gramíneas, principales constituyente de los pastizales, dichas interacciones son de gran relevancia en estos ecosistemas. El pastizal o campo natural (CN) es el principal ecosistema de Uruguay y sustenta la ganadería, una de las actividades económicas más importantes del país. Uno de los nutrientes limitantes para el crecimiento vegetal en el CN es el P, por lo que son frecuentes las prácticas de fertilización fosfatada. Las MA adquieren mayor relevancia en situaciones de estrés nutricional y son negativamente afectadas ante el incremento de nutrientes. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la fertilización fosfatada sobre la colonización y diversidad de HMA en dos gramíneas nativas del CN de Uruguay: *Paspalum dilatatum* y *Coelorhachis selloana*. Se utilizó un experimento de fertilización fosfatada de larga duración, instalado en INIA Palo a Pique, en el cual se constató que el efecto del P sobre la frecuencia vegetal difiere según la especie. *P. dilatatum* mantuvo su frecuencia, mientras que *C. selloana* redujo su frecuencia debido a la fertilización fosfatada. Se hipotetizó que las dos especies vegetales mostrarían distintas respuestas de micorrización ante la fertilización fosfatada, explicando en parte las diferentes persistencias de las gramíneas en situaciones fertilizadas, mientras que la diversidad de los HMA se vería negativamente afectada por esta práctica. La diversidad de esporas de HMA fue estudiada utilizando técnicas morfológicas, mientras que la diversidad de MA en raíces se abordó mediante la técnica de T-RFLP. La fertilización fosfatada redujo la micorrización en ambas gramíneas y este efecto dependió de la estación del año. Esto indicaría que la colonización por MA no sería el principal factor a la hora de determinar el comportamiento de las especies vegetales ante la fertilización. El aumento de P disponible no afectó a la diversidad de HMA, lo que podría indicar una mayor resiliencia de las comunidades fúngicas en relación a la comunidad vegetal. Sin embargo la mayor concentración de P en suelo provocó un aumento del número de esporas en *C. selloana*. Se observó efecto de la estación tanto sobre la colonización como en la diversidad de MA. Las comunidades de MA difirieron entre especies hospedadoras. *C. selloana* mostró mayor riqueza de biotipos en sus raíces y mayor abundancia de esporas que *P. dilatatum*.

Palabras clave: micorrizas arbusculares, diversidad micorrícica, T-RFLP, *Paspalum dilatatum*, *Coelorhachis selloana*.

MYCORRHIZAS IN NATIVE GRASS OF URUGUAY: DIVERSITY AND COLONIZATION IN RELATION TO THE INCREASE OF PHOSPHORUS

SUMMARY

The arbuscular mycorrhizal (AM) arise from the interaction between fungi belonging to the *phylum Glomeromycota* and the roots of vascular plants. AM are particularly important in grassland systems, since grasses, the main constituent of pastures, show high mycorrhizal colonization. Natural grasslands (NG) are the major Uruguayan ecosystem and support one of the most important economic activities of the country: livestock production. One of the limiting nutrients for plant growth in the CN is the phosphorus (P), so phosphate fertilization practices are frequent. The benefits of the AM are greater in situations of low availability of nutrients for plants, being negatively affected by the increase of these factors. The aim of this work was to study the effect of P fertilization on mycorrhizal colonization and mycorrhizal diversity in soil and plant in two native grasses: *Paspalum dilatatum* y *Coelorhachis selloana*. We used a long term phosphate fertilization experiment from INIA, Palo a Pique, in which it was found that the effect of P on the plant community differs between species. *P. dilatatum* maintained its frequency, while *C. selloana* reduced it frequency due to P fertilization. It was hypothesized that the two plant species would present differential mycorrhizal responses to phosphate fertilization, explaining in part its different persistence in fertilized situations. On the other hand, the diversity of AMF in soil and plant would be negatively affected by this practice. The diversity of AMF spores was studied using morphological techniques, while the AM diversity in plant was approached through the technique of T-RFLP. P fertilization reduced the mycorrhizal interaction in both grasses and this effect was dependent on the season. This would indicate that AM wouldn't be the main factor determining the behavior of plants on P situations. The increase of available P did not affect AMF diversity in plant or soil and it could indicate a greater resilience of the fungal communities in relation to the plant community. However a greater concentration of P in soil caused an increase in the number of spores in *C. selloana*. It was observed an effect of the season both on the colonization and the diversity of MA. MA communities differ between host species. *C. selloana* showed greater number of biotopes in its roots and most abundance of spores than *P. dilatatum*.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, mycorrhiza diversity, T-RFLP, *Paspalum dilatatum*, *Coelorhachis selloana*.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. GENERALIDADES SOBRE LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA)

La simbiosis entre los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) pertenecientes al *phylum Glomeromycota* y las raíces de las plantas vasculares se denomina micorrizas arbusculares (Smith y Read, 2008). Se trata del tipo de micorrizas más frecuente, siendo una interacción muy extendida en la naturaleza ya que está presente en varios tipos de ambientes, desde bosques tropicales y desiertos hasta cultivos (Brundrett, 2009). Las micorrizas arbusculares se encuentran colonizando alrededor de 200.000 especies de plantas (Brundrett 2009, Hoeksema 1999) entre las que se cuentan angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y muchas especies de hepáticas (Desiro et al., 2013, Brundrett 2009, Ligrone et al., 2007).

Los efectos de las interacciones micorrícicas pueden estudiarse a distintos niveles; desde los efectos a nivel de organismo cuando se considera a la planta que participa en la interacción, hasta los efectos a nivel ecosistémico. Considerando la planta hospedadora generalmente existen beneficios como resultado de estas interacciones. Entre estos beneficios se cuenta el aumento de la absorción de agua (Marulanda et al., 2003, Faber et al., 1991) y nutrientes, principalmente el P (Smith y Smith 2011, Jayachandran y Shetty 2003, Sanders y Tinker 1971) que se encuentra en forma inmóvil en el suelo y poco disponible para las plantas. Esto se debe a que la extensión de las hifas en el suelo aumenta la superficie radicular (Bender et al., 2015, Jayachandran y Shetty 2003, Smith y Gianinazzi-Pearson 1988). Por otro lado, estas interacciones le proveen a las plantas mayor resistencia contra patógenos: por ejemplo las micorrizas arbusculares son capaces de alterar las emisiones volátiles de ciertas plantas atrayendo a parasitoides capaces de atacar herbívoros (Schausberger et al., 2012).

Los beneficios de esta interacción sobre la planta hospedadora son más importantes en ambientes pobres en nutrientes y con estrés hídrico (Martínez y Pugnaire 2009, Pezzani et al., 2006, Tuomi et al., 2001, Bethlenfalvay et al., 1988). Cabe señalar que las micorrizas representan un costo para los hospederos: el hongo recibe entre un 10-60% de los fotosintatos producidos por la planta, dependiendo de los simbiontes y de

las condiciones ambientales (Gehring y Whitham, 1994). Desde un punto de vista fitocéntrico la interacción micorrícica puede representar un continuo entre mutualismo y parasitismo de acuerdo a la relación entre el costo y el beneficio obtenido por la planta, lo cual está determinado por las condiciones ambientales y por la identidad de las especies simbiotas (Pezzani et al., 2006, Johnson et al., 1997, Grime et al., 1987).

La interacción micorrícica arbuscular puede tener además beneficios sobre las poblaciones de plantas, ya que la red de micelio desarrollada en el suelo provoca la extensión del nicho de varias especies vegetales como han propuesto Klironomos et al. (2000). Dicha extensión en el nicho de las especies vegetales tiene consecuencias a nivel de comunidad, facilitando la coexistencia entre diferentes especies de plantas (van der Heijden et al., 2008).

Otras funciones de las micorrizas arbusculares pueden observarse a nivel de ecosistema, ya que estudios recientes (Hodge y Storer 2014, Veresoglou et al., 2012, Smith y Smith 2011) muestran la importancia de estas interacciones en el ciclado de los nutrientes. Existe evidencia del rol de las micorrizas arbusculares en el ciclo global del C, teniendo en cuenta que la mayoría de los sistemas terrestres muestran una alta presencia de MA y que las mismas demandan muchas veces altos porcentaje de los fotoasimilados (Zhu y Miller 2003, Bago et al., 2000, Douds et al., 2000). Por otro lado Bender et al. (2015) mostraron que las interacciones micorrícicas arbusculares redujeron las pérdidas de PO_4^- y NH_4^+ por lixiviación y las emisiones de N_2O ya que los HMA son capaces de inmovilizar hasta un 90% del P (Smith y Smith, 2011) y también cantidades significativas de N en el micelio (Hodge y Fitter, 2010). Otro de los beneficios relacionado con la presencia de micorrizas arbusculares es una mejor estructuración del suelo (Miller y Jastrow, 2002) ya que dichas interacciones aumentan la estabilidad de los agregados y mantienen unidas estas partículas. Esto se logra gracias a las secreciones de glomalina, una glicoproteína producida en grandes cantidades por los HMA, cuya función sería de resistencia contra el shock térmico (Gadkar y Rillig, 2006) y que permanece unida a las paredes fúngicas hasta que las hifas mueren (Smith y Read 2008, Purin y Rillig 2007).

El proceso de colonización de las raíces por HMA puede iniciarse a partir de esporas, fragmentos de raíces infectados o de micelio extrarradical (Klironomos y Hart 2002, Merryweather y Fitter 1998). Los HMA presentan esporas que pueden alcanzar los

500 μm de diámetro, abundantes lípidos y polisacáridos de reserva y paredes resistentes de quitina (Smith y Read, 2008). Estas pueden resistir por largos períodos de tiempo y son dispersadas por agua, viento o animales (Friese y Allen 1991, Koske y Gemma 1990). Por otra parte, el micelio forma redes de hifas que se originan de la ramificación lateral de una hifa principal (Giovannetti et al., 2004, Bago et al., 1998). Estas redes fúngicas, capaces de unir varias plantas posibilitan la colonización de las plántulas en los sistemas de vegetación perennes (Harley, 1991).

Por tratarse de una interacción de mutualismo obligado para el hongo, dicho simbionte solo puede completar su ciclo de vida asociado a una planta hospedadora (Lambers et al., 2008). Ante condiciones favorables de humedad, temperatura y pH, las esporas germinan invirtiendo sus reservas de lípidos y carbohidratos en la producción de micelio. En presencia de una planta hospedadora, el proceso de colonización se inicia a través de un diálogo molecular mediante señales químicas producidas por ambos simbiontes (Paszowski 2006, Harrison 2005). Los HMA responden a las estrigolactonas, fitohormonas liberadas por la planta al tiempo que producen oligómeros de quitina, que son percibidos por la planta hospedadora e inducen cambios en la expresión de sus genes (Gobbato, 2015), desencadenando el desarrollo y ramificación del micelio y el contacto con la raíz. En la zona de contacto se forma un apresorio, sitio donde ocurre la penetración de la raíz por el micelio, luego la hifa penetra la pared de la célula vegetal llegando al lumen celular (Rosewarne et al., 1997, Brundrett et al., 1985). Posteriormente, en el interior de las raíces se inicia la formación de estructuras características: arbuscúlos (estructuras que resultan de la ramificación de las hifas); vesículas (estructuras globosas presentes en la mayoría de los HMA) y ovillos, estructuras intrarradicales que se forman a partir de hifas muy desarrolladas (Varma, 2008).

Desde el punto de vista funcional las vesículas cumplen función de almacenamiento de lípidos de los hongos mientras que arbuscúlos y ovillos tienen como función el intercambio metabólico de nutrientes entre los simbiontes (van Aarle et al., 2005). Aunque tanto arbuscúlos como ovillos tienen la misma función representan variaciones morfológicas de la colonización. En los arbuscúlos una hifa muy desarrollada se ramifica y forma estructuras intracelulares efímeras que pueden persistir alrededor de

14 días. Los ovillos son estructuras que se forman dentro de las células a partir de hifas intracelulares muy desarrolladas que adquieren una conformación torneada (van Aarle et al., 2005).

La tasa a la cual se coloniza una raíz depende de la tasa de formación de unidades infecciosas por parte de los HMA y de la velocidad de crecimiento del sistema radicular (Sanders y Sheikh, 1983). En estadios tardíos del desarrollo fúngico se acumulan abundantes cantidades de lípidos en las vesículas (dentro de la raíz) y en las esporas (en el suelo) (Varma, 2008).

Uno de los métodos más utilizados para cuantificar la colonización micorrícica arbuscular es a través de la fracción o el porcentaje de raíz que es colonizado por cada una de las estructuras fúngicas previamente mencionadas. Dicho método, basado en la técnica de intersección de líneas ideado por Newman (1966) consiste en la observación al microscopio de fragmentos de raíces y en el cálculo del cociente entre campos con presencia de alguna estructura y el número de campos totales. Previamente, las raíces son aclaradas con KOH al 10% y teñidas con azul de tripano de acuerdo al método de Koske y Gemma (1989) para poder observar estructuras fúngicas en microscopio.

Se ha observado que la colonización micorrícica arbuscular es afectada por varios factores ambientales como la temperatura, la intensidad de luz y la disponibilidad de nutrientes, así como también por las prácticas agrícolas. El efecto de la temperatura es variable ya que diferentes combinaciones hongo-planta tienen su temperatura óptima para desarrollar la colonización (Bowen, 1987). Además, la amplia distribución geográfica de estas interacciones habla de una gran adaptabilidad a las temperaturas (Frenot et al., 2005). Existiría un efecto directo de este factor, donde las bajas temperaturas reducirían los niveles de colonización debido a una baja traslocación de fotosintatos hacia los hongos (Baon, 1994) y por otro lado un efecto indirecto, relacionado a la estacionalidad y al desarrollo fenológico de la planta hospedadora (Bentivenga y Hetrick 1992, Daft et al., 1980). La intensidad lumínica afecta los porcentajes de colonización ya que la misma determina las tasas de fotosíntesis de la planta hospedadora. A baja intensidad de luz hay menor producción de carbohidratos capaces de ser destinados a los HMA (Smith y Smith 2011, Daft y El Giahmi 1978).

Otro de los factores que afecta la colonización son las prácticas agrícolas (van der Gast et al., 2011, Sanjurjo 2009, Gosling et al., 2006), siendo particularmente estudiadas las prácticas de fertilización fosfatada, las cuales aumentan el contenido de P disponible en suelo. Según ha sido ampliamente observado, los beneficios de las micorrizas arbusculares para las plantas son más importantes en ambientes pobres en nutrientes (Martínez y Pugnaire 2009, Pezzani et al., 2006, Tuomi et al., 2001, Bethlenfalvay et al., 1988). Dado que la interacción micorrícica arbuscular se trata de una simbiosis obligada para el hongo se ha planteado que la misma es comandada por la planta (Smith y Smith 2011, Smith y Read 2008). Esto sugiere que ante altos contenidos de nutrientes disponibles, las plantas podrían prescindir de los HMA, viéndose reducidos los niveles de colonización fúngica, tal como proponen varios trabajos que reportan el efecto negativo sobre la intensidad de colonización (Chen et al., 2014, Covacevich et al., 1995).

1.2. DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES (HMA)

La diversidad biológica puede ser medida a varios niveles de organización de la vida: genética, específica y ecológica (Harper y Hawksworth, 1995). La diversidad biológica o biodiversidad es definida como la variedad y abundancia de especies en una unidad de estudio definida (Magurran, 2004). Está formada por dos componentes: la riqueza de especies, es decir el número de especies presente en un sitio de estudio y la equidad que refiere a la variabilidad de las abundancias de las especies (Simpson, 1949).

La diversidad biológica de una comunidad puede ser estimada a través de índices de diversidad. Existe un gran número de índices y los mismos varían en cuanto a la importancia que le otorgan a cada componente de la diversidad (riqueza y equidad), permitiendo llevar a cabo estudios comparativos de la diversidad entre comunidades. Uno de los índices más antiguos y utilizados es el índice de Shannon (H') (Shannon y Weaver, 1949), el cual pondera tanto la riqueza de especies (S) como la equidad. El mismo asume que los organismos son muestreados aleatoriamente de una comunidad infinita y que todos los individuos están representados. Se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: $H' = -\sum p_i (\ln p_i)$, donde p_i es la proporción de individuos encontrados en la especie i con respecto al total del número de individuos. El valor de este índice

obtenido de datos empíricos varía entre 1,5 y 3,5 (Margalef, 1972). La diversidad máxima de Shannon ocurriría si todas las especies tuvieran la misma abundancia, $H' = H_{\max} = \ln S$. A partir del índice de Shannon es posible elaborar el índice de equidad de Pielou (J') (Pielou, 1975,1969), el cual surge de la relación entre la diversidad de Shannon observada y la diversidad máxima como es expresado a continuación: $J' = H'/H_{\max} = H'/\ln S$.

La interacción micorrícica arbuscular comenzó a describirse en las últimas décadas del siglo XIX (Gallaud 1905, Janse 1897). Los HMA son simbioses obligados (Smith y Read, 2008) de las plantas, lo que imposibilita su cultivo en laboratorio y dificulta el estudio de estas comunidades. Existen dos maneras de abordar el estudio de las comunidades micorrícicas arbusculares: a través de la morfología de las esporas presentes en el suelo y mediante técnicas moleculares independientes del cultivo con las que se logra estudiar las comunidades tanto del suelo como de la planta.

En los inicios la identificación de especies se realizó mediante estudios morfológicos de esporas (Gerdemann 1961, 1955, Mosse 1953). Éstas son de suma importancia a la hora de estudiar las comunidades de HMA, ya que dichos propágulos son los únicos que permiten la identificación de estos hongos, aunque generalmente las técnicas morfológicas solo permiten la identificación de los HMA a nivel de género (Alkan et al., 2006). La metodología para lograr la identificación de los HMA se basa en la observación y clasificación de las esporas según el tamaño, la forma, la coloración, el grosor y número de paredes y el tipo de hifa sustentora presentes en los diferentes morfotipos. Las esporas son separadas del suelo mediante método de gradiente de densidad que se basa en el tamizado del suelo y centrifugado del material (Daniels y Skipper, 1982).

En un sitio determinado pueden coexistir entre 20 y 50 especies de esporas de HMA (Fitter 2005, Bever et al., 2001). La abundancia y diversidad de esporas en un sitio, así como el micelio extrarradical que ha persistido en el suelo y es capaz de colonizar una planta, se conocen como potencial micorrícico (Merryweather y Fitter 1998, Hepper 1981).

La imposibilidad de cultivar los HMA en laboratorio, ha llevado a un desarrollo de las técnicas moleculares independientes del cultivo, cada vez más utilizadas para el

estudio de las comunidades de HMA en suelo y planta. Estas técnicas se basan en el estudio de determinadas moléculas como ácidos grasos, ARN y ADN presentes en las muestras en estudio. Algunas de estas técnicas tienen como objetivo la detección y cuantificación de micorrizas arbusculares en suelo o raíces; tal es el caso de la determinación del contenido de algunas moléculas características de los HMA como la quitina (Hurston et al., 2007), el ergosterol (Hart y Reader, 2002), la glomalina (Violi et al., 2008), así como también los inmunoensayos, el análisis de proteínas e isozimas (Rosier et al., 2008) y la detección de ácidos grasos (Sharma y Buyer 2015, Beauregard et al., 2013, Beauregard et al., 2010). En las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas basadas en PCR (reacción en cadena de la polimerasa), siendo utilizada la técnica de RT-PCR (Real Time PCR, Alkan et al., 2006) para la detección de los niveles de micorrizas arbusculares y con la cual es posible cuantificar el ADN genómico o el número inicial de copias de una secuencia en estudio.

Para abordar la diversidad de HMA es posible recurrir a la identificación a nivel de especie de los HMA, la cual es llevada a cabo mediante las técnicas de clonación y secuenciación o pirosecuenciación (Colombo et al., 2014, Dai et al., 2013), utilizando primers específicos que amplifican secuencias de ADN ribosomal de la subunidad grande y pequeña.

Otra manera de abordar el estudio de la diversidad de las comunidades de HMA es a través de las técnicas de fingerprints que permiten la comparación del perfil de determinadas moléculas como ARN y ADN de las distintas muestras en estudio. Estas técnicas son muy útiles a la hora de determinar perfiles de comunidades con fines comparativos. En dichas técnicas cada comunidad presenta un patrón de bandas obtenidas de fragmentos de ADN que son resueltas por electroforesis (Hurston et al., 2007). Una vez obtenidos los amplicones del gen en estudio mediante PCR, los mismos son separados de acuerdo a sus diferentes propiedades. En el caso de las técnicas PCR-ALH (Amplicon Length Heterogeneity, Suzuki et al., 1998) y ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, Ranjard et al., 2001) los productos de PCR son separados de acuerdo a su tamaño. En el método SSCP (Single-strand conformation polymorphism, Dong y Zhu, 2005), dicha separación ocurre según la conformación que

adquiere el ADN luego de ser desnaturalizado y según su tamaño. Mientras que las técnicas DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Muyzer et al., 1993) y TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Zoetendal et al., 1998) se basan en la separación de los productos de PCR en un gel con gradiente desnaturalizante o de temperatura.

Entre los métodos fingerprints se encuentra la técnica T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, Liu et al., 1997), cuyo uso se ha incrementado en los últimos años por ser más sensible y económico que otros métodos (Singh et al., 2006). Dicha técnica consiste en la amplificación de un gen utilizando uno de los primers marcado con un fluoróforo en el extremo 5'. Los productos de PCR son digeridos con enzimas de restricción que cortan en sitios específicos de las secuencias, originando fragmentos fluorescentes de diferentes tamaños. Los fragmentos son analizados mediante un secuenciador equipado con detector de fluorescencia, obteniéndose un perfil de diferentes tamaños de fragmentos de restricción llamado electroferograma. Los picos en dicho electroferograma representan las unidades taxonómicas operacionales (OTU, Operational Taxonomic Unit) y el área debajo de los mismos, la abundancia relativa de cada una (Dickie y FitzJohn 2007, Liu et al., 1997). Este método ha sido empleado para el estudio de comunidades de HMA (Courtney et al., 2012, Hannula et al., 2010) utilizando primers específicos para la subunidad pequeña del gen que codifica para el ARNr 18S (SSU) del phylum *Glomeromycota* (Mummey y Rillig 2007, Gollotte et al., 2004).

El phylum *Glomeromycota* está compuesto por 27 géneros que componen 11 familias y 4 órdenes (Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales) (Schüssler, 2014). Actualmente se encuentran descritas 244 especies de HMA, basándose en características morfológicas de sus esporas (Schüssler, 2014) y entre 341 (Öpik et al., 2013) y 1600 (Koljalg et al., 2013) unidades taxonómicas (utilizando secuenciación de muestras mundiales de ADN ambiental de HMA). Este número de especies de HMA son capaces de asociarse con hasta 200.000 especies de plantas, sugiriendo una baja especificidad entre los simbiosomas que conforman dicha interacción (Brundrett 2009, Hoeksema 1999). Aunque hay estudios que demuestran que podría

existir cierta preferencia por parte del hospedador hacia determinados HMA (Torrecillas et al., 2012, Vandenkoornhuysen et al., 2003, Helgason et al., 1998), lo que nuevamente podría sugerir la existencia de un control del hospedador en esta interacción. Además, se ha observado que diferentes especies de plantas son beneficiadas de forma diferencial por distintos taxones de HMA (Bever 2002, van der Heijden et al., 1998). En este sentido, van der Heijden et al. (2003) observaron que la composición de las comunidades fúngicas en un sitio determinado afectaba cómo se distribuían los nutrientes entre especies vegetales y la coexistencia entre ellas.

La baja especificidad de la interacción micorrícica y el hecho de que en el suelo de un sitio determinado puede encontrarse una alta variedad de HMA, implica que una raíz esté colonizada por varias especies fúngicas, estableciéndose interacciones de competencia entre las mismas (Endresz et al., 2013, Wilson y Tommerup 1992, Daft y Hogarth 1983). Estudios en los que se utilizaron técnicas moleculares mostraron que el número de especies de HMA detectados en un mismo sistema radicular puede variar entre 7 y 71 especies (Verbruggen et al., 2010, Hempel et al., 2007).

La diversidad de las comunidades de HMA tanto en suelo como en raíces puede ser afectada por varios factores entre los que se cuentan la identidad de la planta hospedadora, el clima y el tipo de suelo (Öpik et al., 2006). Particularmente se han observado que las prácticas agrícolas muestran efectos sobre estas comunidades (Alguacil et al., 2008), siendo especialmente estudiado el efecto de las prácticas de fertilización fosfatada. Varios trabajos en los que se evaluó el efecto del agregado de P sobre las comunidades de HMA, mostraron efecto negativo del P tanto sobre la diversidad dentro de las raíces como en el potencial micorrícico (Liu et al., 2012, Lin et al., 2012, Alguacil et al., 2010, Kahiluoto et al., 2001).

1.3. MICORRIZAS EN PASTIZALES

Es destacable el papel de las micorrizas arbusculares en los pastizales ya que las gramíneas, principales constituyentes de este ecosistema, muestran altos valores de

colonización por HMA (Endresz et al., 2013, Parodi y Pezzani 2011, Pezzani et al., 2006, Hartnett y Wilson 2002, Hartnett y Wilson 1999).

Las micorrizas arbusculares determinan en cierta medida la estructuración de las comunidades de los pastizales promoviendo o reduciendo la diversidad vegetal, de acuerdo al grado de dependencia de las especies dominantes o subordinadas (van der Heijden, 2008). En algunos casos se encontró una correlación positiva entre la diversidad de HMA y la diversidad vegetal (Karanika et al., 2008, van der Heijden et al., 2006, van der Heijden et al., 1998), mientras que en otros casos se ha observado lo opuesto (Hartnett y Wilson, 1999).

El pastizal o campo natural es el ecosistema dominante en Uruguay, ocupa aproximadamente el 64% del territorio (MGAP, 2011), representa el 78% de los recursos forrajeros perennes (Baeza et al., 2014) y en él se desarrolla la ganadería extensiva, una de las principales actividades económicas del país. Los niveles de P y N disponibles en suelo en los pastizales uruguayos son muy bajos, siendo el N el nutriente limitante para el crecimiento vegetal (Berretta et al., 1998). Los contenidos de P son particularmente bajos y oscilan entre 3 y 5 mg kg⁻¹ de suelo (Hernández et al., 1995), lo que redundaría en un decremento de la producción ganadera. La práctica de “mejoramientos extensivos”, tiene como objetivo levantar estas limitantes nutricionales bajo condiciones de ganadería en campo natural. La misma incluye la incorporación de leguminosas en cobertura y la fertilización fosfatada (MGAP, 2011). Dicha práctica de manejo representa aproximadamente el 6 % de la superficie de campo natural (MGAP DICOSE, 2015).

Entre las especies de gramíneas encontradas en los pastizales de Uruguay se destacan *Paspalum dilatatum* y *Coleorhaquis selloana* debido a su abundancia, su gran palatabilidad y su alto valor forrajero (Bungenstab 2009, Rosengurt 1979, Benech 1975). Ambas especies son nativas de los pastizales del Río de la Plata, presentan metabolismo fotosintético C4, son perennes y de ciclo estival (Bungenstab 2009, Rosengurt 1979). Estudios recientes en interacciones micorrícicas, revelan que ambas especies son altamente colonizadas por micorrizas arbusculares (García 2012, Parodi y Pezzani 2011). *Paspalum dilatatum* es una especie autóctona de América del Sur y se cree que su biotipo común se originó en el oeste de Uruguay (Burson, 1991). Pese a ser de ciclo

estival presenta gran tolerancia al frío (da Costa y Scheffer-Basso, 2003) y a las sequías dada la gran capacidad exploratoria de sus raíces (Evers y Burson, 2004). Se caracteriza por presentar rizomas cortos, ser muy frondosa y crecer hasta 50 cm de altura. *Coelorhaquis selloana* muestra un crecimiento de tipo mata, habita en lugares muy diversos ya que resiste alta humedad, sequía y exceso de pastoreo (Berretta, 1997).

Para llevar a cabo el presente estudio se utilizó un ensayo de fertilización fosfatada de larga duración en el cual se cuantificó el impacto del incremento del P a largo plazo sobre la comunidad vegetal. Luego de 13 años de fertilización fosfatada, *P. dilatatum* no varió su frecuencia en la comunidad, mientras que *C. selloana* redujo su frecuencia (Jaurena et al., 2015). La figura 1 muestra los valores de frecuencia de ambas gramíneas en 2009 (Jaurena y Lezama com. pers.). Las diferentes respuestas de las especies vegetales al aumento de P disponible podrían estar mediadas por distintos factores entre los que se cuentan las interacciones con los microorganismos del suelo, particularmente con las micorrizas arbusculares. Dado el rol que tienen estas interacciones en la dinámica del P, las mismas podrían explicar en parte la persistencia de estas gramíneas en suelos fertilizados.

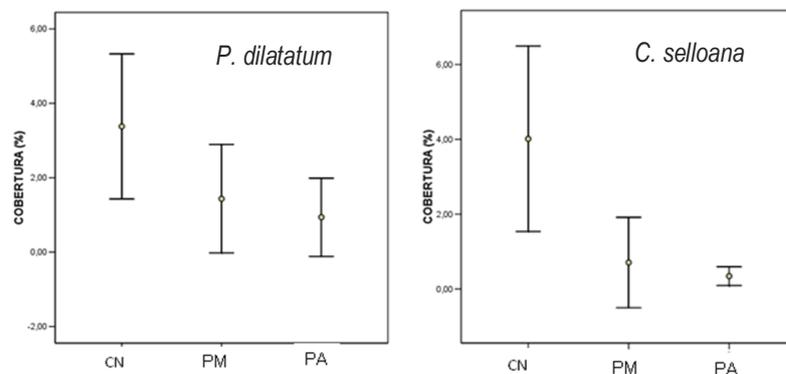


Figura 1. Frecuencias de *P. dilatatum* y *C. selloana* en el ensayo de larga duración de INIA, Palo a Pique. CN: campo natural, PM: tratamiento con fósforo medido, PA: tratamiento con fósforo alto.

El objetivo general de este trabajo fue conocer el efecto de la fertilización fosfatada sobre la colonización y la diversidad de las comunidades de micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas del campo natural: *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana*. El presente trabajo de tesis consiste en dos capítulos. El primero tuvo como objetivo estudiar el efecto del incremento de P disponible en el suelo sobre la intensidad de

colonización total y por estructuras de HMA en ambas gramíneas. El objetivo del segundo capítulo fue conocer el efecto de la fertilización fosfatada sobre la diversidad en suelo y raíces de las comunidades de HMA asociadas a las dos gramíneas estudiadas.

La hipótesis que se plantea es que la intensidad de colonización por micorrizas arbusculares sería afectada por el P en forma diferencial en las dos gramíneas estudiadas, dado que dichas interacciones estarían afectando las diferentes respuestas que presentaron las especies vegetales a la fertilización fosfatada. En el caso de *C. selloana* (la especie que redujo su frecuencia en el pastizal fertilizado) se espera que la presencia de micorrizas se vea reducida a causa del incremento de P, ya que estas interacciones le conferirían una mayor capacidad para competir con las especies invasoras en las situaciones fertilizadas. En cambio en *P. dilatatum* (especie que no fue afectada por la fertilización fosfatada) esperamos que la intensidad de colonización no sea afectada, lo cual contribuiría a explicar la persistencia de esta gramínea en situaciones de fertilización fosfatada. La diversidad de las comunidades de HMA, serían negativamente afectadas debido a la fertilización fosfatada.

El presente trabajo es uno de los primeros aportes al desarrollo del conocimiento sobre las micorrizas arbusculares en Uruguay. Es importante conocer si ciertas prácticas agrícolas provocan la reducción de la presencia y del funcionamiento de las micorrizas arbusculares lo que podría redundar en un peor desempeño de las plantas. Además, conocer cómo responden las comunidades de HMA como importantes componentes de los pastizales ante estas perturbaciones, puede ayudar a comprender mejor el funcionamiento del principal ecosistema del país.

2. MICORRIZAS EN GRAMÍNEAS NATIVAS: EFECTOS DE LA FERTILIZACIÓN FOSFATADA A LARGO PLAZO

Artículo publicado en *Agrociencia Uruguay*. Volumen 20 (1): 7-16

García Silvina¹, Pezzani Fabiana¹, Rodríguez Andrea², del Pino Amabelia³

¹ *Ecología. Departamento de Sistemas Ambientales. Facultad de Agronomía. Universidad de la República.*

Garzón 810, 12900 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: fabiana@fagro.edu.uy

² *Microbiología. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República.*

³ *Fertilidad. Departamento de Suelos y Aguas. Facultad de Agronomía. Universidad de la República.*

2.1. RESUMEN

En Uruguay el campo natural (CN) es el ecosistema dominante, relevante para la producción ganadera extensiva. Está constituido principalmente por gramíneas, especies que muestran alta micorrización. Los contenidos de fósforo (P) del CN son bajos, por lo que se llevan a cabo prácticas de fertilización fosfatada. El impacto de esta práctica sobre la comunidad vegetal difiere entre especies. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del P sobre la colonización micorrícica en dos gramíneas nativas con respuestas diferenciales al agregado de P: *Paspalum dilatatum* y *Coelorhachis selloana*. Se planteó que las dos especies vegetales presentarían diferente micorrización en respuesta al P, lo que podría explicar en parte su persistencia en suelos fertilizados. Se utilizó un experimento de larga duración instalado en INIA, Palo a Pique, con tres tratamientos: CN sin fertilización y con fertilización fosfatada media y alta. Se evaluó la micorrización (total y por estructuras fúngicas) en *P. dilatatum* (mantuvo su frecuencia en parcelas fertilizadas con P) y en *C. selloana* (redujo su frecuencia con la fertilización fosfatada). La fertilización fosfatada afectó negativamente la micorrización de ambas gramíneas y dicho efecto dependió de la estación del año. Dado que estos resultados fueron independientes de la respuesta de la especie en la comunidad vegetal, existirían otros factores involucrados en determinar el desempeño de estas gramíneas en situaciones de incremento de P. En ambientes con mayor contenido de P habría un control fitocéntrico que limitaría la micorrización considerando el costo energético que esta interacción tiene para las plantas.

Palabras clave: *Paspalum dilatatum*, *Coelorhachis selloana*, campo natural, fósforo, colonización micorrícica

Mycorrhizae in native grasses: long-term effects of phosphorus fertilization

2.2. SUMMARY

Natural grasslands (NG) are the major Uruguayan ecosystem and are relevant for extensive livestock production. They consist mainly of grasses with high mycorrhizal colonization. NG soils have low phosphorus (P) content, so fertilization practices are carried out. The impact of this practice on the vegetal community differs between species. The aim of this work was to study the effect of P on mycorrhizal colonization in two native grasses with differential responses to the addition of P: *Paspalum dilatatum* and *Coelorhachis selloana*. It was suggested that the two species would present different mycorrhizal response to P, which could partly explain its persistence in fertilized soil. We used a long-term experiment from INIA, Palo a Pique, with three treatments: NG without fertilization, and with high and medium levels of P fertilization. We evaluated mycorrhizal colonization (total and by fungal structures) in *P. dilatatum* (which maintained its frequency in plots fertilized with P) and in *C. selloana* (which reduced its frequency). P fertilization negatively affected mycorrhizal interaction with both grasses, and this effect was dependent on the season. Since these results were independent of the response of the species in the plant community, we postulated that there would be other factors involved in determining the performance of these grasses in situations of increasing P. In environments with higher content of P there would be a phytocentric control that would limit the mycorrhization considering the energetic cost that this interaction has for plants.

Keywords: *Paspalum dilatatum*, *Coelorhachis selloana*, natural grassland, phosphorus, mycorrhizal colonization.

2.3. INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares son el tipo de micorrizas más comunes, están presentes en una amplia variedad de ambientes y son particularmente de interés en ecosistemas agrarios ya que inciden en la productividad de las plantas (Johnson *et al.*, 1997; Lekberg y Koide, 2005; Hoeksema *et al.*, 2010; van der Heijden *et al.*, 2015). Representan una interacción simbiótica entre hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) del *phylum Glomeromycota* y las raíces de la mayoría de las plantas vasculares (Smith y Read, 2008). Entre las estructuras fúngicas que se desarrollan en las células corticales de las raíces de las plantas, los arbusculos son particularmente importantes ya que es donde se produce el intercambio de sustancias y nutrientes entre los simbioses. Otras estructuras que se desarrollan en las raíces son: hifas, ovillos y vesículas. Las hifas son estructuras tubulares que forman el micelio cenocítico y se desarrollan tanto dentro de las raíces como en el suelo. Los ovillos son hifas que penetran en las células corticales y adquieren una conformación torneada; podrían también participar en el intercambio metabólico aunque su función aún no se conoce cabalmente. Las vesículas son estructuras globosas que almacenan lípidos y representan reservas para los hongos. La fracción o el porcentaje de raíz que es colonizado por cada una de estas estructuras fúngicas (que se pueden observar y cuantificar luego de un procedimiento de tinción) es el método más usado para evaluar la presencia de micorrizas a nivel radicular (Smith y Read, 2008).

Se ha demostrado que esta interacción podría otorgar ciertos beneficios a las plantas hospedantes entre los que se destacan el aumento en la absorción de agua (Faber *et al.*, 1991; Marulanda *et al.*, 2003) y nutrientes, particularmente P (Sanders y Tinker, 1971; Jayachandran y Shetty, 2003; Smith y Smith, 2011) por tratarse este de un elemento inmóvil en el suelo. La planta por su parte destina entre el 10 y el 60 % de los carbohidratos que produce por fotosíntesis para mantener esta interacción (Stribley *et al.*, 1980). Se ha encontrado que los beneficios de las micorrizas arbusculares para las plantas son más importantes en ambientes pobres en nutrientes así como con estrés hídrico (Bethlenfalvay *et al.*, 1988; Tuomi *et al.*, 2001; Pezzani *et al.*, 2006; Martínez y Pugnaire, 2009). En este sentido, Bethlenfalvay *et al.* (1983) y Bethlenfalvay y Dakessian

(1984) demostraron experimentalmente que el resultado de la interacción entre HMA y las plantas depende en gran medida de las concentraciones de P disponible en el suelo y los beneficios para las plantas sólo se observaron en un rango estrecho de concentración de P (4 -12 mg kg⁻¹). Trabajos realizados en gramíneas y otras especies herbáceas demostraron que la fertilización fosfatada afectó negativamente la colonización micorrícica total así como las estructuras fúngicas, particularmente la presencia de arbusculos (Covacevich *et al.*, 1995; Aguilar *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2014).

En comunidades de pastizales se ha encontrado que las micorrizas arbusculares juegan un papel en la estructuración de las mismas, pudiendo tanto aumentar (Grime *et al.*, 1987; van der Heijden *et al.*, 1998, 2006; Karanika *et al.*, 2008) como disminuir la diversidad de la comunidad vegetal (Hartnett y Wilson, 1999). En los pastizales las gramíneas constituyen la familia predominante y numerosos antecedentes han demostrado una importante presencia de micorrizas en estas especies (Hartnett y Wilson, 1999, 2002; Endresz *et al.*, 2013). En Uruguay el pastizal, conocido como campo natural, es el ecosistema dominante, ocupando aproximadamente el 64 % del territorio nacional (MGAP, 2011), siendo además el sustento de una de las principales actividades económicas del país como lo es la ganadería extensiva. En los suelos de campo natural tanto el N como el P son nutrientes limitantes para el crecimiento vegetal (Berretta *et al.*, 1998). Particularmente, los contenidos de P que se han reportado son bajos, con valores que oscilan entre 3 y 5 mg kg⁻¹ de suelo (Hernández *et al.*, 1995). Con el fin de levantar estas restricciones, desde la década de 1950, se lleva a cabo una práctica agronómica conocida como “mejoramientos extensivos” que incluye la siembra de alguna especie de leguminosas y la fertilización fosfatada. De acuerdo al último censo agropecuario estos mejoramientos representan aproximadamente el 5 % de la superficie de campo natural (MGAP, 2011). Si bien se reconoce el impacto positivo de esta práctica sobre la productividad forrajera a corto plazo, existen evidencias que señalan la escasa persistencia de las especies introducidas así como cambios en la composición florística del campo natural (Milot *et al.*, 1987). Estos cambios fueron cuantificados en un experimento de larga duración instalado en 1996 en el Departamento de Treinta y Tres (Uruguay) en el que se observaron respuestas diferenciales en la frecuencia de gramíneas nativas, así como un aumento de especies exóticas como *Cynodon dactylon* y

Lolium multiflorum. Luego de 13 años de fertilización fosfatada, algunas de las gramíneas nativas desaparecieron del tapiz (por ej. *Paspalum notatum*, *Stipa neesiana*) otras mantuvieron su frecuencia (como *Paspalum dilatatum* y *Panicum hians*), mientras que otras disminuyeron su presencia en la comunidad sin llegar a desaparecer (por ej. *Coelorhachis selloana*) (Jaurena *et al.*, 2008a, 2008b.). Considerando estas diferentes respuestas se planteó que las especies vegetales presentarían diferente micorrización en respuesta al P, lo que podría explicar en parte su persistencia en suelos fertilizados.

El objetivo general de este trabajo fue conocer el efecto de la fertilización fosfatada sobre la colonización por micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas del campo natural de Uruguay que presentaron respuestas diferenciales al agregado de P. En este contexto, se estudió cómo afecta el aumento en la disponibilidad de P la intensidad de colonización total y por estructuras de los HMA en *P. dilatatum* (especie considerada indiferente al P en términos de su frecuencia relativa) y en *C. selloana* (especie que decrece con P también considerando el cambio de su frecuencia). La hipótesis que se plantea es que en *C. selloana* la presencia de micorrizas se verá reducida a causa del incremento de P y que en *P. dilatatum* no será afectada.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Sitio de estudio

El trabajo se realizó durante 2011 y 2012 en un experimento instalado en 1996 en la estación experimental Palo a Pique del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Departamento de Treinta y Tres, Uruguay (33°14'58" S, 54°29'24" W). El suelo en el experimento corresponde a un Argisol Típico de la Unidad Alférez (Salvo *et al.*, 2008).

2.4.2. Diseño experimental

El experimento consistió en tres tratamientos de fertilización fosfatada, con niveles medio y alto de P (PM y PA, respectivamente) y parcelas testigo de campo natural sin fertilizar (CN). Cuando se instaló el experimento, en las parcelas fertilizadas se sembró en cobertura *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus*, especies que desaparecieron del tapiz vegetal luego de transcurridos 10 años (Jaurena *et al.*, 2008a, 2008b).

Cada tratamiento tuvo cinco réplicas de 2 ha cada una, distribuidas en bloques al azar. Para el presente trabajo se seleccionaron tres bloques de acuerdo a la homogeneidad topográfica y edafológica, resultando en un total de nueve parcelas.

En el tratamiento con nivel medio de P (PM) se incorporaron 45 kg ha⁻¹ de P₂O₅ a la siembra y refertilizaciones de 30 kg ha⁻¹ de P₂O₅ y en el tratamiento con nivel alto de P (PA) se fertilizó con 90 kg ha⁻¹ de P₂O₅ a la siembra y refertilizaciones de 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Las refertilizaciones se realizaron anualmente, en otoño. El Cuadro 1 muestra el contenido de P disponible (P Bray I) en mayo y noviembre de 2011 en las parcelas seleccionadas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Contenidos de P disponible en suelo en parcelas de campo natural sin fertilizar (CN), con fertilización fosfatada media (PM) y con fertilización fosfatada alta (PA) en el experimento de Palo a Pique, INIA, Treinta y Tres.

| | CN | PM | PA |
|----------------|-----------|------------|------------|
| Mayo 2011 | 2,7 ± 0 | 8,3 ± 6,2 | 16,3 ± 2,7 |
| Noviembre 2011 | 5,6 ± 1,1 | 13,7 ± 3,8 | 22,5 ± 1,8 |

2.4.3. Muestreo de plantas

Los criterios con los cuales se seleccionaron las especies para el presente estudio fueron: a) haber tenido una respuesta diferencial de su frecuencia relativa frente a las situaciones de fertilización fosfatada; b) presentar alta frecuencia en las parcelas y buena calidad forrajera y c) estar presentes en todas las parcelas que se incluyeron en este trabajo. Con estos criterios se seleccionó a *C. selloana*, la cual redujo su frecuencia en parcelas fertilizadas (especie decreciente al P) y a *P. dilatatum* que no varió su frecuencia debido al incremento de P (especie indiferente al P; Jaurena *et al.*, 2008a, 2008b).

Se realizaron muestreos estacionales para evaluar la micorrización de las plantas en los meses de febrero (verano), mayo (otoño), agosto (invierno) y noviembre (primavera) de los años 2011 y 2012. En particular para los años 2011 y 2012 las precipitaciones acumuladas fueron de 1497 y 1045 mm respectivamente, mientras que

las temperaturas promedio fueron de 16,6 °C en el 2011 y 17,3 °C en el año 2012 (INIA, 2015).

Previo a los muestreos se realizó un manejo del pastoreo de manera de homogeneizar la altura del tapiz vegetal en las nueve parcelas estudiadas. Para ello se establecieron cargas ganaderas altas y de poca duración de un rodeo vacuno de la Estación Palo a Pique. La altura remanente del tapiz fue de aproximadamente 15 cm al momento de hacer los muestreos. De cada una de las nueve parcelas y en cada fecha se extrajeron muestras de raíces de cinco individuos de *P. dilatatum* y de *C. selloana* seleccionados al azar considerando una distancia mínima entre ellos no menor a 5 m. Las raíces fueron conservadas en vinagre hasta su procesamiento en el laboratorio.

2.4.4. Colonización micorrícica

Las raíces colectadas fueron lavadas y aclaradas con una solución de KOH al 10 % y posteriormente teñidas con azul de tripano (0,05 %) según el método de Koske y Gemma (1989). Para cada planta se montaron en portaobjetos 30 segmentos de raíz de 1 cm de largo. Mediante observación al microscopio se identificaron las estructuras características de los HMA (arbúsculos, hifas, ovillos y vesículas). Para cada planta se cuantificó el porcentaje de colonización micorrícica total así como el porcentaje de las diferentes estructuras de los HMA a través del cociente de campos con presencia de alguna estructura fúngica y el número de campos observados.

2.4.5. Análisis estadístico

El modelo utilizado para el análisis de los resultados fue un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), familia binomial, utilizando el programa estadístico InfoStat 2015. Se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas con los factores: año, estación de muestreo y tratamiento para las variables de respuesta: colonización total; colonización por estructuras de intercambio (arbúsculos y ovillos) y colonización por vesículas. Las pruebas a posteriori de comparación de medias se realizaron mediante el test de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) y se trabajó con una significancia de 0,05.

$$Y = \mu + A_i + E_j + T_k + (AxT)_{jk} + (ExT)_{jk} + (AxExT)_{ijk} \quad i=1,2 \quad j=1,2,3,4 \quad k=1,2,3$$

Y= variable de respuesta

μ =media general

A_i = efecto del año

E_j = efecto de la estación de muestreo

T_k = efecto del tratamiento

$(AxT)_{jk}$ = efecto de la interacción Año x Tratamiento

$(ExT)_{jk}$ = efecto de la interacción Estación x Tratamiento

$(AxExT)_{ijk}$ = efecto de la interacción Año x Estación x Tratamiento

2.5. RESULTADOS

La fertilización fosfatada afectó negativamente la mayoría de las variables analizadas sobre la interacción micorrícica para las dos gramíneas estudiadas y dicho efecto fue dependiente en todos los casos de la estación de muestreo. El factor año mostró efectos significativos para la mayoría de las variables, a excepción de la colonización por arbusculos. De acuerdo al modelo utilizado, no se observó un efecto significativo de la triple interacción entre año x estación x tratamiento para ninguna de las variables analizadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resumen de resultados de los ANOVAs de medidas repetidas con los factores y las interacciones que mostraron efecto significativo ($p < 0,05$) sobre cada variable estudiada para *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana*.

| Variable | <i>Paspalum dilatatum</i> | <i>Coelorhaquis selloana</i> |
|--------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Colonización micorrícica total | A, E, T, EXT | A, T, EXT, AXT |
| Colonización por vesículas | A, E, T, EXT | A, E, T, EXT, AXT |
| Colonización por arbusculos | E, EXT | T, EXT |
| Colonización por ovillos | A, E, T, EXT | A, T, EXT |

Si bien los niveles de P disponible en suelo son significativamente diferentes entre los tratamientos (Cuadro 1), dichas diferencias no se vieron reflejadas en la mayoría de

las variables referidas a la micorrización entre las plantas provenientes de las parcelas con fertilización media y alta (Figura 1 y Cuadro 3).

En relación a la colonización micorrícica total, las plantas de *P. dilatatum* presentaron alta presencia de micorrizas en sus raíces en ambos años y en todas las estaciones. Para esta variable y esta especie se observó un efecto significativo del año ($p < 0,0001$), de la estación ($p < 0,0001$), del tratamiento ($p < 0,0001$) y de la interacción estación x tratamiento ($p = 0,0026$) (Cuadro 2). Esta especie en 2011 mostró valores de colonización micorrícica total superiores a los de 2012, con un promedio de 88,5 y de 81,6 %, respectivamente (Figura 1a y 1c). En todas las estaciones la presencia de micorrizas fue significativamente mayor en las parcelas de CN en comparación con los tratamientos con fertilización. *P. dilatatum* mostró mayor presencia de micorrizas en febrero (verano) momento en el cual el efecto negativo del P fue el más bajo provocando una reducción del 2 % en el año 2011 y de 4,4 % en el 2012. La reducción de la colonización debida al P fue mayor en noviembre durante el 2011 y en agosto en 2012, donde se observaron decrementos del 21 y 25 % de la colonización micorrícica total respectivamente.

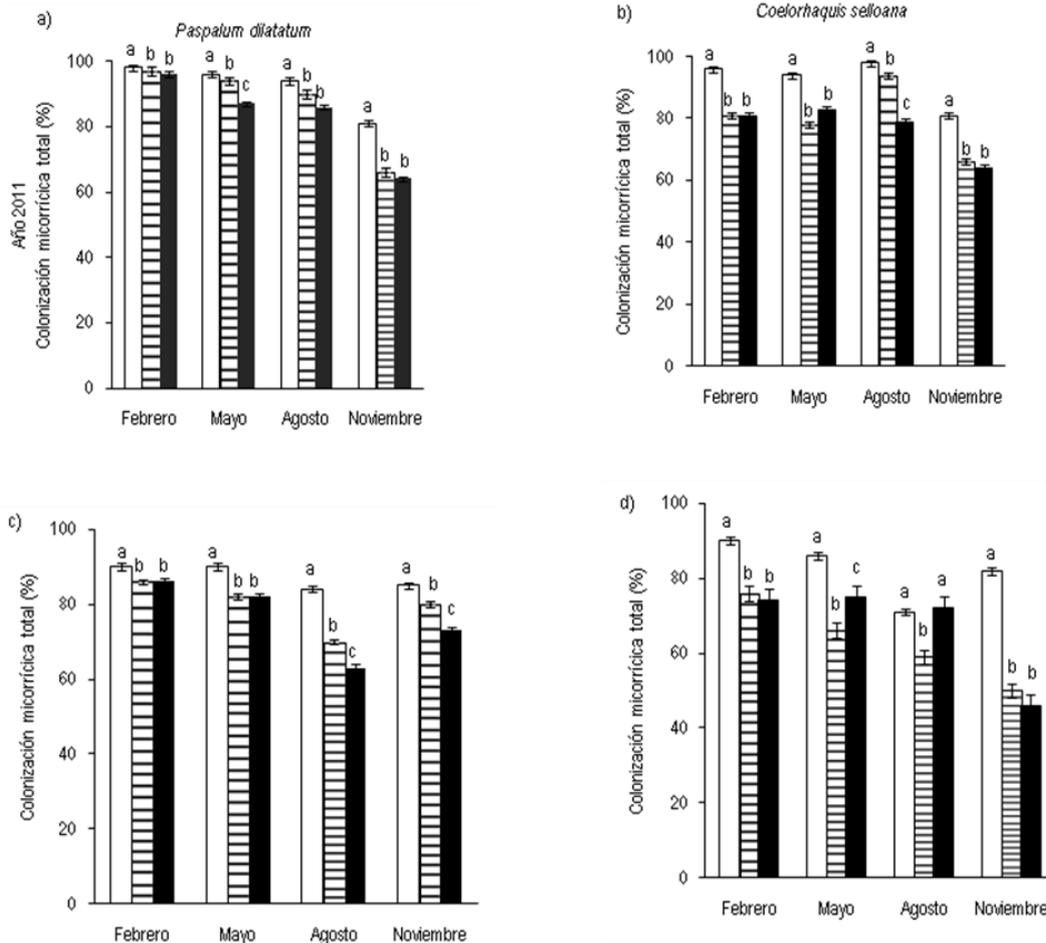


Figura 2. Colonización micorrícica total (porcentaje) en *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana* correspondientes al año 2011 (a y b) y 2012 (c y d). Barras blancas: campo natural sin fertilizar; barras rayadas: tratamiento de fertilización fosfatada media (PM) y barras negras: tratamiento de fertilización fosfatada alta (PA). Las barras representan promedio ($n=15$) \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada estación (DGC, $p=0,05$).

En *C. selloana*, la colonización total también fue importante y difirió significativamente entre años ($p<0,0001$), teniendo un promedio de 84,8 % y 74,5 % en 2011 y 2012, respectivamente (Figura 1b y 1d). Se observó además un efecto significativo de la estación del año ($p<0,0001$), así como del tratamiento ($p<0,0001$), de la interacción estación x tratamiento ($p<0,0001$) y de la interacción año x tratamiento ($p<0,0001$) (Cuadro 2). También para esta especie, los mayores valores de la presencia de HMA se observaron en las parcelas de CN en todas las estaciones en 2011 y 2012.

En agosto de 2011 y en febrero de 2012 *C. selloana* presentó la mayor presencia de micorrizas y el efecto negativo del P fue mayor en noviembre (primavera) en ambos años.

En ambas gramíneas se observó escasa presencia de arbuscúlos en todas las muestras analizadas (registros menores al 5 % en todos los casos) (Cuadro 3). En *P. dilatatum*, la presencia de arbuscúlos fue afectada significativamente por la estación ($p < 0,0001$) y la interacción estación x tratamiento ($p = 0,0063$) (Cuadro 2). Para todas las épocas del año los registros de arbuscúlos fueron superiores en las parcelas de CN que en las fertilizadas con valores máximos en febrero (verano). En agosto se observó la mayor reducción del nivel de arbuscúlos debido al P con decrementos del 75 % (Cuadro 3). La colonización por arbuscúlos en *C. selloana* fue afectada significativamente por el tratamiento ($p < 0,0001$) y la interacción estación x tratamiento ($p = 0,0086$) (Cuadro 2). Los mayores niveles de estas estructuras, al igual que en *P. dilatatum*, se vieron en CN, con un registro máximo también en febrero (Cuadro 3).

Cuadro 3. Colonización por arbuscúlos (porcentaje) en *P. dilatatum* y *C. selloana* en parcelas de campo natural (CN), con fertilización fosfatada media (PM) y con fertilización fosfatada alta (PA). Los valores corresponden a promedio de los años 2011 y 2012.

| Mes de muestreo | <i>P. dilatatum</i> | | | <i>C. selloana</i> | | |
|-----------------|---------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|
| | CN | PM | PA | CN | PM | PA |
| Febrero | 2a | 1b | 1b | 3a | 0,48b | 1b |
| Mayo | 2a | 1b | 1b | 1a | 0,15b | 0,11b |
| Agosto | 2a | 1b | 0,49c | 2a | 1b | 1b |
| Noviembre | 1a | 0,31b | 0,17b | 2a | 0,33b | 1b |

La presencia de ovillos fue escasa en ambas gramíneas en todas las muestras analizadas, sin embargo se observaron valores superiores de estas estructuras fúngicas en relación a los arbuscúlos. La colonización por ovillos fue afectada por casi todos los factores e interacciones (Cuadro 2). En general la adición de P provocó una disminución en la presencia de ovillos, aunque no existió un patrón tan definido como en el caso de los arbuscúlos ya que hubo variaciones entre años y estaciones. En este sentido es

destacable señalar que en el caso de *P. dilatatum* los mayores registros de ovillos ocurrieron en plantas sin fertilizar en febrero de 2011 ($6 \% \pm 0,4$) y en mayo de 2012 ($5 \% \pm 0,2$). Por su parte en *C. selloana* la mayor ocurrencia de ovillos se dio también en plantas de CN en febrero de ambos años (2011: $17 \% \pm 0,1$; 2012: $5 \% \pm 0,1$).

La presencia de vesículas de hongos micorrizógenos alcanzó valores elevados en ambas especies, entre 27 % y 68 %. Para *P. dilatatum* el máximo fue 48 % en agosto de 2011 y para *C. selloana* 68 % en febrero de 2011 respectivamente, aunque la variación en ambos casos fue muy importante debido a varios de los factores analizados. En *P. dilatatum* la colonización por vesículas fue afectada por el factor año ($p < 0,0001$), estación ($p < 0,0001$), tratamiento ($p = 0,0012$) y por la interacción entre tratamiento y estación ($p = 0,0012$). En ambos años y en la mayoría de las estaciones existió una mayor presencia de vesículas en CN en relación a las parcelas fertilizadas. En *C. selloana*, la presencia de vesículas fue afectada por el año ($p < 0,0001$), el tratamiento ($p = 0,0013$) la interacción entre tratamiento x estación ($p < 0,0001$) y la interacción año x tratamiento ($p < 0,0001$). También para esta especie la mayor presencia de estas estructuras fúngicas se presentó en las parcelas de CN (excepto en agosto 2011 y mayo 2012).

2.6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permitieron rechazar la hipótesis planteada dado que se constató un efecto negativo sobre la interacción micorrícica debido al incremento de P disponible en ambas gramíneas. De acuerdo a lo esperado, en *C. selloana*, la especie que redujo su frecuencia en respuesta al aumento en la disponibilidad de P, la interacción micorrícica fue negativamente afectada por la fertilización. La menor presencia de esta especie en el pastizal fertilizado podría explicarse entre otros factores por la reducción de la micorrización. En *P. dilatatum*, contrariamente a lo esperado, el P también afectó negativamente la micorrización. En esta especie hipotetizamos que el incremento de P no disminuiría la presencia de micorrizas, considerando que el resultado de esta interacción podría beneficiar a las plantas permitiendo así mantener la frecuencia

de esta especie en la comunidad. Por lo tanto, en el caso de *P. dilatatum* existirían otros factores y procesos involucrados en determinar el desempeño de las plantas de esta especie en el pastizal en situaciones de incremento de P.

Dado que la interacción micorrícica arbuscular se trata de una simbiosis obligada para el hongo (el cual permanecería en forma de espora si no colonizara una planta hospedadora) se sugiere que la misma es comandada por la planta (Smith y Read, 2008; Smith y Smith, 2011). Anderson *et al.* (1994), Tuomi *et al.* (2001) y Chen *et al.* (2014) proponen que las plantas permitirían que la colonización se estableciera sólo en situaciones de escasez de nutrientes en las que las micorrizas aumentarían la capacidad de acceder a los mismos. Esto podría explicar la reducción de la colonización micorrícica en las situaciones de alta disponibilidad de P. Otra posible explicación de los resultados puede relacionarse con los cambios en la composición florística ocurridos en la comunidad vegetal del pastizal en el ensayo de larga duración en Palo a Pique. En las parcelas fertilizadas se registró un aumento de gramíneas invasoras como *Lolium multiflorum* y *Cynodon dactylon*, las cuales pueden haber alterado las comunidades de HMA de las gramíneas nativas, reduciendo la abundancia de dichos hongos como estrategia para establecerse en el nuevo ambiente (Wolfe y Klironomos, 2005; Hawkes *et al.*, 2006; Pezzani *et al.*, 2012; Endresz *et al.*, 2013). En este sentido resulta interesante analizar a futuro si las gramíneas invasoras de esta comunidad presentan micorrizas y si dicha interacción es afectada por la fertilización fosfatada.

Nuestros resultados concuerdan con trabajos previos, realizados con gramíneas y especies herbáceas de otras familias, que reportaron efectos negativos del incremento de P sobre la micorrización (Covacevich *et al.*, 1995; Aguilar *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2014).

Luego de 15 años de iniciado el experimento en el cual se desarrolló este estudio los valores de P disponible en suelo reflejaron los tratamientos de fertilización a los que fueron sometidas las parcelas. En este sentido se encontró que en el tratamiento de fertilización con niveles medios (PM) el contenido de P disponible aproximadamente triplicó el de las parcelas testigo sin fertilizar (CN) y que en el caso del tratamiento de alta dosis (PA) el P disponible en suelo fue seis y cuatro veces mayor en relación al testigo en mayo y noviembre de 2011 respectivamente. El aumento observado en el P

disponible entre mayo y noviembre podría estar relacionado con procesos de mineralización de P orgánico en la primavera tardía, así como con fenómenos vinculados a las condiciones de óxido-reducción del suelo en las diferentes estaciones (Hernández y Meurer, 2000). En la zona este de Uruguay los suelos presentan una importante diferenciación, con un horizonte subsuperficial de textura pesada, lo que lleva a que cuando ocurren precipitaciones se produzcan períodos más o menos extendidos de condiciones reductoras. En esas condiciones el Fe^{+3} pasa a Fe^{+2} , aumentando la solubilidad de los compuestos de Fe y P y por lo tanto la disponibilidad de P para las plantas. Al volver el suelo a las condiciones de oxidación este proceso se revierte. Estas fluctuaciones se han observado en suelos de la zona este de Uruguay, donde se ubica el experimento de Palo a Pique. En el presente trabajo no es posible afirmar que ocurrieron este tipo de fenómenos, ya que no se realizaron muestreos sucesivos ni se midió el contenido de agua del suelo durante el período estudiado. No obstante, teniendo en cuenta estos antecedentes, una posible explicación del cambio en el nivel de P disponible se podría relacionar a este fenómeno (Ferrando *et al.*, 2002).

Sin embargo, a pesar de estas notorias diferencias en los contenidos de P en el suelo, los efectos sobre la micorrización sólo se observaron al comparar plantas que no recibieron fertilización con aquellas fertilizadas, no registrándose diferencias significativas para la mayoría de las variables estudiadas entre los tratamientos de fertilización media y alta. Los niveles de P disponible alcanzados en las parcelas PA están por encima del límite de 12 mg kg^{-1} que algunos antecedentes (Bethlenfalvay *et al.*, 1983; Bethlenfalvay y Dakessian, 1984) señalaron como la máxima concentración de P en la cual la interacción micorrízica otorgó beneficios para las plantas. Como fue previamente mencionado, en ambientes con mayor contenido de P podría haber un control fitocéntrico que limitara la presencia de los hongos considerando el costo energético que la interacción tiene para las plantas (Smith y Smith, 2011; Tuomi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2014).

Independientemente del efecto de la fertilización fosfatada, las raíces tanto de *P. dilatatum* y *C. selloana* mostraron altos valores de colonización por micorrizas arbusculares. Este resultado concuerda con estudios previos con estas mismas especies

(Parodi y Pezzani, 2011; García, 2012) o con otras gramíneas que también son estivales y poseen metabolismo fotosintético C₄ (Wilson y Hartnett 1998; Lugo *et al.*, 2003). En dichos trabajos se sugiere que la mayor micorrización de gramíneas C₄ en relación a las de tipo C₃ podría deberse a que las primeras presentan raíces más gruesas y las hifas del micelio desarrollado en la colonización por los HMA podrían comportarse como las raíces finas participando activamente en la absorción de agua y nutrientes.

Los resultados evidenciaron efecto del año para la mayoría de las variables analizadas. En ambas especies de gramíneas observamos una mayor presencia de micorrizas durante el año 2011 con respecto al 2012. Esto podría relacionarse con los mayores niveles de precipitaciones que en el 2011 fueron 30 % superiores a los ocurridos en 2012 (INIA, 2015). Esta mayor disponibilidad hídrica podría haber permitido un mayor crecimiento de las plantas, lo que redundaría en mayor energía disponible para ser destinada a los HMA. Sin embargo, existen múltiples procesos y factores que pueden verse afectados con el aumento en la disponibilidad hídrica.

Los resultados obtenidos demostraron una marcada estacionalidad en la presencia de micorrizas en ambas especies, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Parodi y Pezzani (2011) en un trabajo realizado también con gramíneas nativas de Uruguay. Los mayores valores de colonización micorrícica total se detectaron en febrero (verano) tanto de 2011 como de 2012. Esto podría relacionarse con el ciclo fenológico de las especies estudiadas, que al tratarse de gramíneas estivales, en verano presentan el mayor desarrollo del área foliar (Millot *et al.*, 1987; Carámbula, 2004), lo que les permitiría una mayor producción de fotoasimilados, parte de los cuales podrían asignarse a la interacción micorrícica. Otra evidencia del efecto estacional sobre las micorrizas lo constituye la mayor presencia, también en verano, de las estructuras fúngicas de intercambio: los mayores registros tanto de arbuscúlos como de ovillos ocurrieron en febrero en ambas especies (en *P. dilatatum* también se observó una importante cantidad de ovillos en mayo 2012). Tanto los arbuscúlos como los ovillos son estructuras de los hongos que están presentes durante pocos días en las células de la raíz (Toth, 1992). La mayor ocurrencia en época estival de estas estructuras

también estaría apoyando la relación entre el funcionamiento de las micorrizas con el ciclo fenológico de las gramíneas estudiadas.

El efecto del nivel de P sobre las micorrizas varió a lo largo del año ya que para todas las variables analizadas la interacción estación x tratamiento fue significativa en ambas especies. Se observó que el efecto negativo del P fue menor en verano que en los restantes momentos del año. En noviembre (primavera) en ambas especies la micorrización presentó los valores más bajos y además fue la época del año en la que el aumento de P causó la mayor reducción de la presencia de los HMA. En las especies estivales desde finales de la primavera las plantas priorizan la asignación de energía a la función reproductiva (Millot *et al.*, 1987; Carámbula, 2004) lo cual podría comprometer los recursos destinados al mantenimiento de la micorrización. A su vez los contenidos de P disponible en suelo fueron superiores en noviembre en relación a mayo (al menos para el 2011). Por lo tanto, la reducción en la micorrización de estas especies en primavera podría explicarse tanto por aspectos relacionados a la fenología de las plantas como también por una mayor cantidad de P disponible en el ambiente.

Las plantas provenientes de las parcelas de campo natural presentaron más vesículas de hongos micorrizógenos que las plantas de parcelas fertilizadas por lo cual el incremento de P en suelo también afectó negativamente esta variable. Los resultados obtenidos coinciden con los de Smith y Read (2008) quienes reportaron efectos negativos sobre la presencia de vesículas en condiciones ambientales de mayor concentración de P y de baja radiación. Tanto en *P. dilatatum* como en *C. selloana* observamos niveles importantes de colonización por estas estructuras, superiores a 50 %, en 2011, el año de mayores precipitaciones. No se encontraron antecedentes que analicen la relación entre la disponibilidad hídrica y la presencia de estas estructuras.

Este trabajo representa la primera contribución en el estudio de la fertilización fosfatada a largo plazo sobre la micorrización en gramíneas nativas del campo natural de Uruguay. Plantea interrogantes que podrían abordar futuras investigaciones sobre el impacto que podría tener la reducción de la micorrización en el contenido de P en los tejidos vegetales así como en el crecimiento de las plantas y su desempeño en la comunidad vegetal.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Treinta y Tres, por el aval y apoyo logístico para la realización de este trabajo. Un particular agradecimiento a Graciela Quintans y al personal de la Estación Experimental Palo a Pique por permitirnos utilizar la infraestructura de la Estación y coordinar el pastoreo del ensayo. Agradecemos también a Felipe Lezama y Gerardo Parodi por la colaboración en el trabajo de campo y a Alejandra Borges por el asesoramiento en el análisis estadístico. Este trabajo fue financiado por el Proyecto 1814 del Fondo Clemente Estable – ANII.

2.7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar C, Casanova O, Bordoli JM. 2004. Evaluación de la micorrización y la fertilización fosfatada en Lotus Rincón. En: Memorias de la XX Reunión del grupo Técnico Regional del Cono Sur en el Mejoramiento y Utilización de los Recursos Forrajeros del Área Subtropical y Tropical – Grupo Campos; Salto, Uruguay. Salto: UR. pp. 281 - 282.

Anderson RC, Hetrick BAD, Wilson GWT. 1994. Mycorrhizal dependence of *Andropogon gerardii* and *Schizachyrium scoparium* in two prairie soils. *American Midland Naturalist*, 132: 366 – 376.

Berretta EJ, Risso DF, Levratto JC, Zamit WS. 1998 Mejoramiento de campo natural de basalto fertilizado con nitrógeno y fósforo. En: Seminario de Actualización en tecnologías para Basalto. Montevideo: INIA. (Serie Técnica nº 102). pp. 63 - 73.

Bethlenfalvay G, Thomas RS, Dakkessian S, Brown MS, Ames RN. 1988. Mycorrhizae in stressed environments : effects on plant growth, endophyte development, soil stability and soil water. En: Whitehead E, Hutchinson C, Timmermann B, Varady RG. [Eds.]. *Arid Lands: Today and Tomorrow*. Boulder: Westview Press. pp. 1015 - 1035.

- Bethlenfalvai GJ, Dakessian S.** 1984. Grazing effects on mycorrhizal colonization and floristic composition of the vegetation on a semiarid range in northern Nevada. *Journal of Range Management*, 37: 312 - 316.
- Bethlenfalvai GJ, Bayne HG, Pacovsky RS.** 1983. Parasitic and mutualistic associations between mycorrhizal fungus and soybean : the effect of phosphorous on host plant-endophyte interactions. *Physiologia Plantarum*, 57: 543 - 548.
- Carámbula M.** 2004. Pasturas y forrajes, manejo, persistencia y renovación de pasturas. Montevideo: Hemisferio Sur. 413p.
- Chen Y-L, Zhang X, Ye J-S, Han H-Y, Wan S-Q, Chen B-D.** 2014 Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in Inner Mongolia. *Soil Biology and Biochemistry*, 69: 371 - 381.
- Covacevich F, Echeverria HE, Andreoli E.** 1995. Micorrización vesículo-arbuscular espontánea en trigo en función de la disponibilidad de fósforo. *Ciencia del Suelo*, 13: 47 - 51.
- Endresz G, Somodi I, Kalapos T.** 2013. Arbuscular mycorrhizal colonization of roots of grass species differing in invasiveness. *Community Ecology*, 14: 67 - 76.
- Faber BA, Zasoski RJ, Munns DN, Shackel K.** 1991. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Canadian Journal of Botany*, 69: 87 – 94.
- Ferrando M, Mercado G, Hernández J.** 2002. Dinámica del hierro y disponibilidad de fósforo durante períodos cortos de anaerobiosis en los suelos. *Agrociencia Uruguay*, 6: 1 - 9.
- García S.** 2012. Respuestas de la colonización micorrícica a los componentes del pastoreo en *Paspalum dilatatum* (Poir) [Tesis de grado]. Montevideo: Universidad de la República. 29p.
- Grime JP, JM Mackey, SH Hillier, DJ Read.** 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature*, 328: 420 - 422.
- Hartnett DC, Wilson GWT.** 2002. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics : lessons from grasslands. *Plant and Soil*, 244: 319 - 331.

Hartnett D, Wilson T. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology*, 80: 1187 - 1195.

Hawkes C, Belnap J, D'Antonio C, Firestone M. 2006. Arbuscular mycorrhizal assemblages in native plant roots change in the presence of invasive exotic grasses. *Plant and Soil*, 281: 369 – 380.

Hernández J, Meurer E. 2000. Phosphorus availability in six Uruguayan soils affected by alternation of the flooded-drained conditions. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 19 - 26.

Hernández J, Otegui O, Zamalvide JP. 1995. Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos de Uruguay. *Boletín de Investigaciones (Facultad de Agronomía)*, (43): 32p.

Hoeksema J, Chaudhary V, Gehring C, Johnson N, Karst J, Koide R, Pringle A, Zabinski C, Bever J, Moore J. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13: 394 – 407.

INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). 2015. Banco de Información Agroclimática [En línea]. Consultado 23 febrero 2015. Disponible en:

<http://www.inia.uy/investigacion-e-innovacion/unidades/GRAS/Clima/Banco-datos-agroclimatico>.

Jaurena M, Ayala W, Terra J, Bermúdez R, Lagomarcino X. 2008a. Impacts of long-term phosphorus fertilization and addition of perennial legumes on a temperate natural grassland : I. Changes in species biodiversity and stability. En: XXI International Grassland and VIII International Rangeland Congress; 28 - 29 junio, 2008; Hohhot, Inner Mongolia, China. Vol. 1. Hohhot: Guangdong People's Publishing House. pp. 82.

Jaurena M, Salvo L, Terra J, Ayala W, Bermúdez R, Barrios E, Lezama F. 2008b. Cambios en el largo plazo de características de suelo y vegetación de mejoramientos de campo natural. En: XXII Reunión del Grupo Técnico en Forrajeras del Cono Sur (Grupo Campos); 21 - 23 octubre, 2008; Minas, Uruguay. Montevideo: INIA. pp. 188.

Jayachandran K, Shetty KG. 2003. Growth response and phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizae of wet prairie sawgrass. *Aquatic Botany*, 76: 281 - 290.

Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135: 575 - 585.

Karanika ED, Mamolos AP, Alifragis DS, Kalburtji KL, Veresoglou DS. 2008. Arbuscular mycorrhizas contribution to nutrition, productivity, structure and diversity of plant community in mountainous herbaceous grassland of northern Greece. *Plant Ecology*, 199: 225 – 234.

Koske R, Gemma J. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, 92: 486 - 505.

Lekberg Y, Koide RT. 2005. Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist*, 168: 189 – 204.

Lugo M, González Maza M, Cabello M. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland II : seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycologia*, 93: 407 - 415.

Martínez L, Pugnaire F. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Revista Ecosistemas*, 18: 44 – 54.

Marulanda A, Azcón R, Ruiz-Lozano JM. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119: 526 – 533.

MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2011. Censo General Agropecuario 2011: resultados definitivos [En línea]. Consultado 16 julio 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-censo-2011-resultados-definitivos>.

Millot JC, Risso D, Methol R. 1987. Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay: Informe técnico para la Comisión Honoraria del Plan Agropecuario. Montevideo: MAP. 199p.

Parodi G, Pezzani F. 2011. Micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas de Uruguay en áreas con y sin pastoreo. *Agrociencia Uruguay*, 15: 1 - 10.

Pezzani C, del Pino A, Lezama F, Rodriguez M, Garcia S, Parodi G. 2012. Interacciones complejas: micorrizas arbusculares y fósforo en pastizales naturales de Uruguay [En línea]. En: VII Simposio Nacional y IV Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrícica; 27 - 30 mayo, 2012; Xalapa. México. Consultado 19 febrero 2016. Disponible en: <http://www.uv.mx/Simbiosis-Micorrizica/resumenes.html>.

Pezzani F, Montaña C, Guevara R. 2006. Associations between arbuscular mycorrhizal fungi and grasses in the successional context of a two-phase mosaic in the Chihuahuan Desert. *Mycorrhiza*, 16: 285-295.

Salvo L, Terra J, Ayala W, Bermudez R, Correa J, Avila P, Hernández J. 2008. Long-term phosphorous fertilization and perennials legumens addition impacts on a temperate natural grassland : II. Total and particulate soil organic carbon. En: XXI International Grassland and VIII International Rangeland Congress; 28 - 29 junio 2008; Hohot, Inner Mongolia, China. Vol. 1. Hohot: Guangdong People's Publishing House. pp. 382.

Sanders FE, Tinker PB. 1971. Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizas. *Nature*, 233: 278 - 279.

Smith SE, Smith FA. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth : new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 227 – 250.

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd. Ed. New York: Academic Press. 787p.

Stribley DP, Tinker PB, Rayner JH. 1980. Relation of internal phosphorus concentration and plant weight in plants infected by vesicular arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, 86: 261 - 266.

Toth R. 1992. The quantification of arbuscules and related structures using morphometric cytology. En: JR Norris, DJ Read, Varma AK. [Eds.]. *Methods in Microbiology*. Vol. 24. London: Academic Press. pp. 275 – 299.

- Tuomi J, Kytöviita MM, Härdling R.** 2001. Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos*, 92: 62 - 70.
- van der Heijden M, Martin F, Selosse MSI, Sanders I.** 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205: 1406–1423.
- van der Heijden M, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller T, Wiemken A, Sanders I.** 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172: 739 – 752.
- van der Heijden M, Boller T, Wiemken A, Sanders IR.** 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*, 79: 2082 – 2091.
- Wilson G, Hartnett D.** 1998. Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany*, 85: 1732 – 1738.
- Wolfe BE, Klironomos JN.** 2005. Breaking new ground: soil communities and exotic plant invasion. *Bioscience*, 55: 477 – 487.

**3. EFECTO DEL FÓSFORO SOBRE LA DIVERSIDAD DE HONGOS
MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES EN LA RIZOSFERA Y RAÍCES DE
GRAMÍNEAS**

Este artículo se presenta de acuerdo a las instrucciones para autores de la revista *Agrociencia Uruguay*.

3.1. RESUMEN

Las micorrizas arbusculares (MA) son particularmente relevantes en pastizales debido a los altos valores de colonización en gramíneas, principales constituyentes de este ecosistema. El pastizal o campo natural (CN) es el ecosistema predominante de Uruguay y sustenta una de las principales actividades económicas del país: la ganadería. Los contenidos de fósforo (P) en suelos del CN son bajos, siendo frecuentes las prácticas de fertilización fosfatada. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la fertilización fosfatada sobre la diversidad de las comunidades de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) de dos gramíneas nativas del campo natural de Uruguay: *Paspalum dilatatum* y *Coelorhachis selloana*. Se estudió la diversidad y abundancia de esporas de HMA en la rizósfera de ambas especies de gramíneas mediante técnicas morfológicas, así como la diversidad de HMA dentro las raíces utilizando la técnica T-RFLP. El estudio se realizó en un experimento de larga duración de fertilización fosfatada. El aumento de P disponible no afectó la diversidad de HMA en las raíces de ninguna de las dos gramíneas ni alteró la diversidad de esporas en *P.dilatatum*, mientras que aumentó el número de esporas en *C. selloana*. La riqueza de biotipos de HMA en raíces y el número de esporas difirieron entre especies hospedadoras, mientras que se observaron diferencias en la diversidad entre estaciones del año, siendo la riqueza de biotipos mayor en invierno que en verano.

Palabras clave: potencial micorrícico, T-RFLP, *Paspalum dilatatum*, *Coelorhachis selloana*, campo natural.

Effect of phosphorus on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in rizosphere and roots of grasses

3.2. SUMMARY

Arbuscular mycorrhizas (AM) are particularly relevant in grassland due to the high colonization in grasses, main constituent of this ecosystem. Natural grassland (NG) is the predominant ecosystem of Uruguay and it supports one of the main economic activities of the country: livestock. The contents of phosphorus (P) in soils in the NG are low, being frequent practices of phosphate fertilization. The aim of this work was to study the effect of the phosphate fertilization on the diversity of the communities of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) of two native grasses of the natural grassland of Uruguay: *Paspalum dilatatum* and *Coelorhachis selloana*. The diversity and abundance of AMF spores in the rhizosphere of both grasses species were studied using morphological techniques, while AMF diversity in roots was studied using the T-RFLP technique. The study was conducted in a long-term experiment of phosphate fertilization. The increase in available P did not affect the diversity of AMF in the roots of any of the two grasses, or altered the diversity of spores in *P. dilatatum*, while it increased the number of spores in *C. selloana*. The richness of AMF biotypes in roots and the number of spores differed between host species, while differences in the AMF diversity between seasons of the year were observed, with greater number of biotypes in winter than in summer.

Keywords: mycorrhizal potential, T-RFLP, *Paspalum dilatatum*, *Coelorhachis selloana*, natural grassland.

3.3. INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares resultan de la interacción entre hongos pertenecientes al *phylum Glomeromycota* y las raíces de la mayoría de las plantas terrestres (Smith y Read, 2008). Dicho grupo de hongos está compuesto por 27 géneros distribuidos en 11 familias y 4 órdenes (Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales) (Schüssler, 2014).

Esta simbiosis, muy frecuente en la naturaleza (Brundrett 2009, Smith y Read 2008) es de gran relevancia en los sistemas agrarios y naturales ya que incide en la estructuración y diversidad de las comunidades vegetales como han reportado varios estudios que muestran una correlación positiva entre la diversidad de los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y la diversidad de las comunidades vegetales (Karanika et al., 2008, van der Heijden et al., 2006, van der Heijden et al., 1998). Esta promoción de la diversidad vegetal por las interacciones micorrícicas se explica porque diferentes especies de HMA podrían proveer de distintos servicios a las plantas (Newsham et al., 1995). Además la diversidad espacial de la comunidad de HMA ayudaría a generar ambientes heterogéneos que podrían contribuir a mantener la diversidad vegetal (Bever et al., 2001).

Hasta el momento se han descrito unas 244 especies de HMA basándose en características morfológicas de sus esporas (Schüssler, 2014) y entre 341 (Öpik et al., 2013) y 1600 (Koljalg et al., 2013) unidades taxonómicas utilizando secuenciación de muestras de ADN ambiental de HMA. Este número de especies de HMA es capaz de asociarse con alrededor de 200.000 especies de plantas, lo que muestra la baja especificidad de la interacción micorrícica (Brundrett 2009, Hoeksema 1999). La mayoría de las comunidades vegetales, sostienen una riqueza de entre 1 y 75 unidades taxonómicas de HMA (Verbruggen et al., 2010, Oehl et al., 2010).

Aunque se han estudiado a fondo los beneficios que las micorrizas le otorgan a las plantas, entre los que se destacan la absorción de agua (Marulanda et al., 2003, Faber et al., 1991) y nutrientes inmóviles como el P (Smith y Smith 2011, Jayachandran y Shetty 2003, Sanders y Tinker 1971), es necesario profundizar acerca de cómo la diversidad de los HMA puede promover sistemas diversos y estables. Para esto se requiere conocer

los factores y procesos involucrados en la estructuración y diversidad de estas comunidades fúngicas.

Se ha encontrado que la comunidad de HMA que colonizan dentro de las raíces de una planta determinada depende tanto de la composición de la comunidad vegetal y de las especies de plantas vecinas, como de la identidad de la planta hospedadora (Öpik et al., 2006, Vandenkoornhuyse et al., 2003, Johnson et al., 2003). Por otra parte, varios antecedentes muestran que tanto el número de esporas como el número de especies de HMA en el suelo varían con la especie vegetal hospedadora, dado que se ha encontrado que diferentes especies vegetales promueven distintas tasas de esporulación (Bever 2002, Bever et al., 2001, Bever et al., 1996).

Por otra parte, el efecto de la estacionalidad sobre las comunidades fúngicas ha sido poco estudiado. Algunos trabajos no encontraron cambios en la estructura de las comunidades fúngicas entre las diferentes estaciones de muestreo (Davison et al., 2012), así como tampoco entre los distintos estadios fenológicos de las plantas hospedadoras (Rosendahl et al., 2004). Otros estudios reportan que existieron variaciones solo en la abundancia de algunos taxones de HMA en particular ya que distintos taxones de hongos, presentan diferencias en su estacionalidad, no alterándose la comunidad global (Bever et al., 2001). Estas variaciones son adjudicadas a cambios en las tasas de mineralización en ciertas épocas del año, en las cuales por aumentar los niveles de nutrientes, podría esperarse una menor abundancia de dichas especies de HMA (Santos-González et al., 2007, Hijri et al., 2006). El número de esporas en el suelo rizosférico también ha mostrado ser dependiente de la estacionalidad, variando con la fenología de la planta (Bever et al., 1996, Gemma et al., 1989).

El estudio de las comunidades de HMA resulta difícil de abordar dado que estos hongos son simbioses obligados de las plantas, por lo que no son cultivables en laboratorio (Smith y Read, 2008), existiendo dos modos para estudiar este tema. Una de las metodologías con que se logra identificar mayoritariamente a nivel de género estos organismos es mediante el estudio morfológico de las esporas (Alkan et al., 2006, Pearson et al., 1993) y la otra forma, cada vez más frecuentemente utilizada, es el uso de métodos moleculares basados en el estudio del ADN. Estos últimos permiten

determinar la diversidad de HMA tanto dentro de la planta colonizada como en el suelo (Colombo et al., 2014, Dong y Zhu 2005, Liu et al., 1997).

El potencial micorrícico refiere al micelio externo y a la diversidad (abundancia y riqueza) de esporas encontradas en el suelo que corresponden a distintas especies de HMA. Trabajos realizados sobre diversidad de micorrizas arbusculares, han demostrado que la agrupación de esporas en un sitio determinado puede estar compuesta por 20 a 50 especies de HMA (Fitter 2005, Bever et al., 2001). Las mismas se encuentran en la rizósfera de las plantas que potencialmente pueden colonizar.

Dentro de las técnicas moleculares independientes del cultivo, las técnicas de fingerprints son cada vez más utilizadas para el estudio de las comunidades fúngicas ya sea en suelo o planta. Una de las técnicas de fingerprints más utilizada para el estudio de las comunidades microbianas es el T-RFLPs (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; Liu et al., 1997). La misma refiere al uso de uno de los primers marcado con un fluoróforo combinado con enzimas de restricción. Como resultado de las diferentes localizaciones del sitio de corte en los diversos amplicones, se obtienen fragmentos terminales (T-RFs) marcados de diferentes tamaños, los cuales representan unidades taxonómicas diferentes (Dickie y FitzJohn 2007, Liu et al., 1997).

Numerosos antecedentes muestran una alta presencia de micorrizas arbusculares en las gramíneas (Endresz et al., 2013, Parodi y Pezzani 2011, Pezzani et al., 2006, Hartnett y Wilson 2002, Hartnett y Wilson 1999), familia de gran importancia y predominancia en los pastizales. El pastizal o campo natural (CN), es el principal ecosistema de Uruguay, ocupa el 64 % del territorio (MGAP, 2011) y representa el 78% de los recursos forrajeros perennes del país (Baeza et al., 2014), sustentando la ganadería, una de las principales actividades económicas del país. Los suelos del CN presentan al nitrógeno como nutriente limitante para el crecimiento vegetal (Berretta et al., 1998), siendo además los contenidos de P particularmente bajos con valores que oscilan entre 3 y 5 mg kg⁻¹ de suelo (Hernández et al., 1995). Los mejoramientos extensivos son prácticas cuyo objetivo es levantar estas restricciones nutricionales e incluyen la siembra de alguna especie de leguminosa y la fertilización fosfatada. Aunque

en el corto plazo, dicha práctica muestra impactos positivos sobre la calidad nutricional forrajera, existen evidencias acerca de la baja persistencia de las especies introducidas así como también de cambios en la composición florística del campo natural (Millot et al., 1987).

Los efectos de los mejoramientos extensivos sobre la composición florística fueron evaluados en un experimento a los 13 años de iniciados los tratamientos de fertilización fosfatada, constatándose respuestas diferenciales en la frecuencia de gramíneas nativas y un aumento de especies exóticas como *Cynodon dactylon* y *Lolium multiflorum*. Algunas de las gramíneas nativas desaparecieron de la comunidad (por ej. *Paspalum notatum*, *Stipa neesiana*), otras mantuvieron su frecuencia (como *Paspalum dilatatum* y *Panicum hians*), mientras que otras disminuyeron su presencia en el tapiz vegetal sin llegar a desaparecer (por ej. *Coelorhaquis selloana*) (Jaurena et al., 2015). Los valores de cobertura de las gramíneas estudiadas se muestran en la figura 1 (Jaurena y Lezama com. pers.).

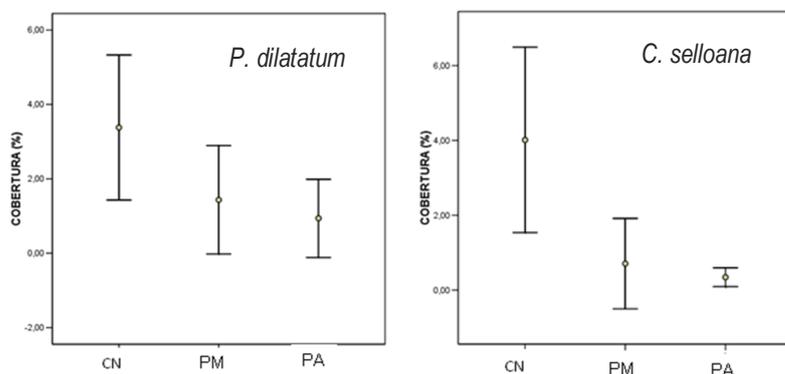


Figura 1. Frecuencias de *P. dilatatum* y *C. selloana* en el ensayo de larga duración de INIA, Palo a Pique. CN: campo natural, PM: tratamiento con fósforo medido, PA: tratamiento con fósforo alto.

Por otra parte, en el año 2011 luego de 15 años del agregado de P, se estudió la intensidad de colonización micorrícica arbuscular en dos gramíneas que formaban parte de la comunidad vegetal en el sitio: *P. dilatatum* y *C. selloana* (García et al., 2016). Los

resultados obtenidos por los autores mostraron una reducción de los niveles de colonización por HMA en ambas gramíneas en las parcelas fertilizadas.

Numerosos antecedentes a nivel internacional (van der Gast et al., 2011, Alguacil et al., 2008), así como también a nivel nacional (Sanjurjo, 2009) muestran que las prácticas agrícolas tiene importantes efectos sobre las comunidades fúngicas, entre las cuales se ha estudiado principalmente la fertilización fosfatada (Liu et al., 2012, Lin et al., 2012, Alguacil et al., 2010, Kahiluoto et al., 2001). Dado que los beneficios de las micorrizas arbusculares son mayores en ambientes pobres en nutrientes y agua (Martínez y Pugnaire 2009, Pezzani et al., 2006, Tuomi et al., 2001, Bethlenfalvay et al., 1988), varios trabajos muestran efectos negativos del aumento en la disponibilidad de P sobre la diversidad de las comunidades de HMA. En estudios realizados mediante técnicas moleculares se ha encontrado que la fertilización fosfatada provocó cambios en la composición y reducción de la diversidad de las comunidades fúngicas dentro de las raíces (Liu et al., 2012, Lin et al., 2012, Alguacil et al., 2010). Por otra parte, en trabajos realizados en gramíneas y utilizando técnicas morfológicas se encontró que tanto la densidad de esporas como el número de especies de HMA en la rizósfera de las plantas estaba negativamente correlacionado con el contenido de fósforo del suelo (Kahiluoto et al., 2001, Martensson y Carlgren 1994). Se planteó entonces el interés de conocer los efectos de la fertilización sobre la diversidad de HMA que colonizaban ambas especies.

El objetivo general de este trabajo fue conocer el efecto de la fertilización fosfatada sobre la diversidad de las comunidades de los hongos micorrizógenos arbusculares en dos gramíneas nativas del campo natural de Uruguay. En este contexto, los objetivos específicos planteados fueron: a) estudiar cómo afecta el aumento en la disponibilidad de P a la diversidad micorrícica arbuscular dentro de las raíces de *P. dilatatum* y de *C. selloana* y b) conocer el efecto de la fertilización fosfatada sobre el potencial micorrícico del suelo rizosférico de *P. dilatatum* y de *C. selloana*. La hipótesis que se plantea es que la fertilización fosfatada reduciría la diversidad de las comunidades de HMA en ambas especies de gramíneas.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Sitio de estudio

El trabajo se realizó durante el año 2012 en un experimento instalado en la estación experimental Palo a Pique del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Departamento de Treinta y Tres, Uruguay (33°14'58" S, 54°29'24" W). El suelo en el experimento corresponde a un Argisol Típico de la Unidad Alférez (Salvo et al., 2008).

3.4.2. Diseño experimental

El ensayo montado en el año 1996, consistió en dos tratamientos con niveles medio y alto de P y parcelas testigo sin fertilizar. Al momento de instalar el experimento en las parcelas fertilizadas se realizó además la siembra en cobertura de leguminosas (mejoramiento), donde se incluyeron *Trifolium repens* (trébol blanco) y *Lotus corniculatus* (lotus), especies que no estaban presentes al momento de realizar nuestros muestreos. Los tratamientos consistieron en cinco réplicas distribuidas en bloques al azar de 2 ha cada uno, seleccionando para el presente trabajo tres réplicas de acuerdo a la homogeneidad topográfica y edáfica, resultando en un total de nueve parcelas. En el tratamiento de fertilización media (PM) se agregaron 45 kg ha⁻¹ de P₂O₅ a la siembra y refertilizaciones de 30 kg ha⁻¹ de P₂O₅ y en el tratamiento con nivel alto de P (PA) se fertilizó con 90 kg ha⁻¹ de P₂O₅ a la siembra y refertilizaciones de 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Las refertilizaciones se realizaron anualmente en otoño.

3.4.3. Muestreo de plantas

Las especies seleccionadas para el presente trabajo se caracterizaron por: a) haber tenido una respuesta diferencial de su frecuencia relativa frente a las situaciones de fertilización fosfatada; b) presentar alta frecuencia en las parcelas y buena calidad forrajera y c) estar presentes en todas las parcelas que se incluyeron en este trabajo. Con estos criterios se seleccionó a *C. selloana*, la cual redujo su frecuencia en parcelas

fertilizadas (especie decreciente al P) y a *P. dilatatum* que no varió su frecuencia debido al incremento de P (especie indiferente al P), (Jaurena et al., 2015).

Con el fin de homogeneizar el tapiz vegetal, se realizó un manejo del pastoreo previo a los muestreos en las nueve parcelas estudiadas, estableciéndose cargas ganaderas altas y de poca duración de un rodeo vacuno de la Estación Palo a Pique. La altura remanente del tapiz fue de aprox 15 cm al momento de hacer los muestreos.

Se realizaron dos muestreos durante el año 2012: uno en agosto, momento de menor crecimiento de las plantas y otro en febrero momento en el cual presentan un crecimiento mayor (dado que se trata de especies estivales). La temperatura diaria promedio en febrero y agosto del 2012 fue de 27 °C y 14,5 °C respectivamente, mientras que se registraron valores de precipitaciones acumuladas de 129 mm en agosto y 130 mm en febrero (INIA, 2015). Para determinar la diversidad de HMA en las raíces, de cada una de las nueve parcelas y en cada fecha de muestreo se extrajeron muestras de raíces de cinco individuos de *P. dilatatum* y cinco de *C. selloana* seleccionados al azar considerando una distancia mínima entre ellos no menor a 5 m.

Para determinar la abundancia y diversidad de esporas en la rizósfera de las gramíneas estudiadas en otoño de 2012 se, seleccionaron cinco plantas de cada especie vegetal en cada parcela de los tratamientos CN y PA. Dichas plantas fueron colectadas con un pan de tierra de aproximadamente 30 cm de diámetro y 20 cm de profundidad y fueron trasladadas para la instalación de un ensayo en invernadero.

3.4.4. Ensayo en invernadero

Las plantas enteras de *P. dilatatum* y de *C. selloana* provenientes de las parcelas CN y PA fueron separadas de otras especies vegetales presentes en los panes de tierra con el fin de reducir el efecto de otras plantas que coexistían con ellas en el campo. Las plantas en estudio fueron divididas para generar individuos con tres macollos cada uno. Se apartaron 15 individuos correspondientes al tratamiento de PA y 15 al CN, contemplando cinco individuos por parcela. Cada individuo fue plantado en macetas de polietileno, de 14 cm de diámetro y 20 cm de altura con aproximadamente 2,8 kg de mezcla constituida por 3/4 de suelo perteneciente a cada parcela y 1/4 de arena de río.

Previamente, para cada tratamiento, el suelo proveniente de cada una de las parcelas fue homogeneizado junto con el sustrato arenoso. Las plantas fueron regadas con un volumen de agua de 50 ml (previamente decantada con el fin de volatilizar el cloro) y la frecuencia de riego se ajustó en base a mediciones de pérdida de agua; esto se realizó mediante el peso de las macetas regadas con 50 ml de agua y el peso en los días sucesivos hasta alcanzar el peso inicial previo al regado. Las macetas se rotaron una vez a la semana para evitar posibles efectos relacionados con su posición en el invernadero. Las plantas fueron mantenidas en invernadero durante 6 meses, momento en que se les separó el suelo rizosférico para proceder al aislamiento de esporas y determinación del potencial micorrízico.

3.4.5. Extracción de ADN de las raíces

Las raíces de los cinco individuos de cada parcela fueron mezcladas, obteniéndose muestras compuestas que fueron lavadas repetidas veces con agua destilada estéril, cortadas y maceradas en nitrógeno líquido hasta la consistencia de polvo. La extracción de ADN, se realizó siguiendo la técnica de Gollotte et al. (2004) con modificaciones. Se utilizaron 100 mg de material vegetal al que se le agregó 1000 µl de buffer 2X CTAB e incubó durante una hora a 65 °C, agitándolo cada 15 minutos. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó un volumen de cloroformo: isoamil alcohol 24:1 y se agitó durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa se retiró a un nuevo tubo al que se le agregó 2/3 de volumen de isopropanol frío. Se agitó por inversión varias veces y se llevó a freezer por 2 horas. Se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se enjuagó el pellet con alcohol 70%, se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm y se repitió el lavado con alcohol 70%. El sobrenadante se descartó y se secó el pellet durante toda la noche. El ADN se resuspendió con 25 µl de TE (10 mM Tris [pH 8.0] 1 mM EDTA). El producto obtenido se visualizó en gel de agarosa al 1% teñido con Good View (SBS, China). La electroforesis se realizó a 90 V durante 40 minutos usando como buffer TBE 0,5X.

3.4.6. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

Con el fin de estudiar la diversidad de las comunidades de HMA en nuestros tratamientos, se utilizó la técnica de T-RFLP amplificando una región del ADNr 18S de los hongos *Glomeromycota*.

Se llevó a cabo una PCR anidada, utilizando en la primera amplificación los primers LR1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA-3') y FLR2 (5'-GTC GTT TAA AGC CAT TAC GTC-3'), específicos para la división hongos (Martínez y Pugnaire 2011, Trouvelot et al., 1999). En la segunda ronda, se amplificó una región de ADN del ARNr 18S utilizando primers específicos para la división *Glomeromycota*: FLR3 (5'-TTG AAA GGG AAA CGA TTG AAG T-3') y FLR4 (5'-TAC GTC AAC ATC CTT AAC GAA-3') (Gollotte et al., 2004). Las concentraciones finales de la reacción fueron: buffer 1X, 2,5mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 5mg/ml de BSA, 1U de Taq polimerasa (Fermentas, USA), 5 µl de ADN diluido 1/10 y agua hasta completar 25 µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Biometra, Alemania), programado con 35 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, temperatura de alineamiento de 58°C durante 1 minuto y de elongación de 72°C durante 1 minuto. Para la segunda ronda se utilizaron las mismas condiciones anteriormente descritas y como molde el producto de PCR de la primera ronda diluido 1/10 y el primer FLR3 marcado con el fluoróforo FAM en el extremo 5'.

El producto de amplificación, fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1 % con buffer TBE 0,5X a 90 V durante 40 minutos. Los geles fueron teñidos con Good View (SBS, China) y observados en transiluminador. Se realizó una purificación del producto de PCR utilizando el kit comercial Gene JET Gel Extraction (Thermo Scientific, USA), en condiciones de oscuridad. El ADN obtenido se cuantificó en gel de agarosa 1% utilizando el marcador de peso molecular Gene Ruler 100pb ADN (Fermentas, USA). La digestión del producto de PCR se realizó en un volumen total de 15 µl, con 100ng de ADN (volumen entre 8 y 12 µl del producto de PCR purificado), buffer 1X (Fermentas), agua (volumen ajustado de acuerdo al volumen del producto de PCR empleado) y 5 unidades de enzima Mbo (Fermentas). La reacción se llevó a cabo durante 5 horas a 37 °C en baño seco, en condiciones de oscuridad. Se detuvo la reacción e inactivó la enzima de restricción a 65°C durante 30 minutos.

3.4.7. Secuenciación y análisis de los T-RFs

Los fragmentos terminales marcados fueron analizados por Macrogen (Seul, Corea del Sur) utilizando un secuenciador Applied Biosystem 3730X, USA. Para calcular el largo de los fragmentos marcados se utilizó como estándar de tamaño GS500LIZ-3370 y el programa GeneScan™ (Applied Biosystem, USA).

Los electroferogramas obtenidos, fueron estandarizados eliminando aquellos picos de fragmentos terminales de restricción (T-FRs) menores de 30 pb y mayores a 360 pb. Utilizando el programa T-Rex (Culman et al., 2009) se calculó la frecuencia relativa de cada pico (área de cada pico/fluorescencia total de la muestra) y se construyó una matriz de frecuencias, considerando presente los picos que mostraron áreas mayores al 1%. El número de picos representó el número de biotipos de HMA en las muestras. Con esta matriz se calculó la riqueza, el índice de diversidad de Shannon (H') y el índice de equidad de Pielou (J'), utilizando el software PAST 2,07 (Hammer et al., 2001). El índice de diversidad de Shannon (H') es un estimador de la diversidad que combina dos componentes de la diversidad biológica: la riqueza de especies y la equidad y se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: $H' = -\sum p_i (\ln p_i)$, donde p_i es la proporción de individuos encontrados en la especie i con respecto al total del número de individuos (Shannon y Weaver, 1949). El índice de equidad de Pielou (J'), se calcula como: $J' = H' / \log_2 S$, donde S = es el número máximo de especies en la muestra (Pielou, 1975, 1969).

El modelo empleado para el análisis de los resultados fue un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), familia Poisson, utilizando el programa estadístico INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2014). Los factores analizados fueron: especie, estación de muestreo y tratamiento, siendo las variables de respuesta: riqueza, índice de diversidad de Shannon (H') e índice de equidad de Pielou (J'). Las pruebas a posteriori de comparación de medias se realizaron mediante el test de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) y se trabajó con una significancia de 0,05.

$$Y = \mu + E_i + M_j + T_k + (ExT)_{jk} + (MxT)_{jk} + (ExMxT)_{ijk} \quad i=1,2 \quad j=1,2 \quad k=1,2,3$$

Y= variable de respuesta

μ =media general

E_i = efecto de la especie

M_j = efecto del mes de muestreo

T_k = efecto del tratamiento

$(ExT)_{ik}$ = efecto de la interacción Especie x Tratamiento

$(MxT)_{jk}$ = efecto de la interacción Mes x Tratamiento

$(ExMxT)_{ijk}$ = efecto de la interacción Especie x Mes x Tratamiento

A partir de la matriz de frecuencias de T-RFLP, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de obtener los grados de agrupamiento y de similitud entre las comunidades de HMA, mediante el programa estadístico PAST 2.07 (Hammer et al., 2001). Como prueba a posteriori se utilizó el Análisis de similaridad (ANOSIM) (Lugo González et al., 2013), el cual dota de un test estadístico no paramétrico para comparar agrupaciones de las unidades.

3.4.8. Abundancia y diversidad de esporas

El suelo de las cinco macetas correspondientes a cada parcela fue mezclado, obteniéndose muestras compuestas. Se pesaron 100 g de suelo por parcela de cada uno de los tratamientos (CN y PA) y para cada especie y se realizó la separación de las esporas por el método de gradiente de densidad propuesto por Menge (Daniels y Skipper, 1982). Las esporas fueron observadas utilizando un estereomicroscopio (Nikon, Eclipse E100, Japón) y se identificaron los diferentes morfotipos de esporas, clasificándolos según color, forma, tamaño y se los nombró numerándolos según el orden de aparición. El número de morfotipos encontrado en cada muestra fue cuantificado, lo que representó la riqueza de morfotipos de esporas (S) para cada tratamiento. Se contabilizó el número de esporas de cada morfotipo, así como también el número total de esporas, lo que representó la abundancia.

El análisis de los datos correspondientes al potencial micorrícico, se realizó a través del cálculo de la riqueza de morfotipos de esporas, el índice de diversidad de Shannon (Shannon y Weaver, 1949) y el índice de equidad de Pielou (Pielou, 1975, 1969), utilizando el software PAST 2.07 (Hammer et al., 2001).

El modelo utilizado para el análisis de los resultados fue un Modelo Lineal Generalizado Mixto, familia Poisson, utilizando el programa estadístico INFOSTAT (2014). Mediante el mismo, se estudió el efecto de la especie vegetal y del tratamiento

sobre la abundancia de esporas, la riqueza de morfotipos y los índices de diversidad de esporas.

Las diferencias entre las medias comparadas, se analizaron mediante el test Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC, Di Rienzo et al., 2014), con una significancia de 0,05.

$$Y = \mu + E_i + T_j + (ExT)_{ij} \quad i=1,2 \quad j=1,2$$

Y= variable de respuesta

μ =media general

E_i = efecto de la especie

T_j = efecto del tratamiento

$(ExT)_{ij}$ = efecto de la interacción Especie x Tratamiento

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Diversidad de HMA en las raíces de *C. selloana* y *P. dilatatum*

La fertilización fosfatada no mostró efectos sobre las variables relacionadas a la diversidad de los HMA en las raíces, mientras que sí pudo apreciarse un efecto de la especie hospedadora así como también del mes de muestreo sobre la riqueza (cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la especie, el tratamiento, el mes de muestreo y sus interacciones sobre la riqueza y diversidad de biotipos de HMA en raíces de *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana* analizadas mediante T-RFLP. Se muestran los valores de significancia utilizando MLGM.

| Factores | Variables | | |
|----------|-----------|------------------------|------------------------|
| | Riqueza | Índice de Shannon (H') | Índice de equidad (J') |
| E | p= 0,041* | p= 0,545 | p= 0,640 |
| T | p= 0,102 | p= 0,461 | p= 0,464 |
| M | p= 0,002* | p= 0,185 | p= 0,607 |
| ExT | p= 0,828 | p= 0,616 | p= 0,368 |
| ExM | p= 0,857 | p= 0,900 | p= 0,948 |
| TxM | p= 0,149 | p= 0,620 | p= 0,451 |
| ExTxM | p= 0,132 | p= 0,130 | p= 0,571 |

Factores: E= especie, T= tratamiento, M= mes de muestreo, EXT= interacción especie X tratamiento, ExM= interacción especie x mes, TxM= tratamiento x mes. ExTxM= especie x tratamiento x mes. * factores con efecto significativo. (DGC, p= 0,05).

El número total de biotipos obtenidos (riqueza) utilizando la técnica de T-RFLP, fue de 68, variando entre un mínimo de 6 y un máximo de 25 T-RFs en muestras de *P.dilatatum* correspondientes al tratamiento PM en febrero y al CN en a muestras de raíces de *C.selloana* del CN durante agosto respectivamente. El promedio general de número de T-RFs para ambos muestreos fue de $14,3 \pm 3,3$. Para esta variable en estudio pudo observarse un efecto de la especie y del mes de muestreo. *C. selloana* mostró mayor número de biotipos de HMA en sus raíces que *P. dilatatum*, mientras que en ambas especies se observó una riqueza de biotipos significativamente mayor en agosto en comparación con febrero (cuadro 2).

Cuadro 2. Riqueza de biotipos de HMA en raíces de *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana* en época cálida (febrero) y fría (agosto).

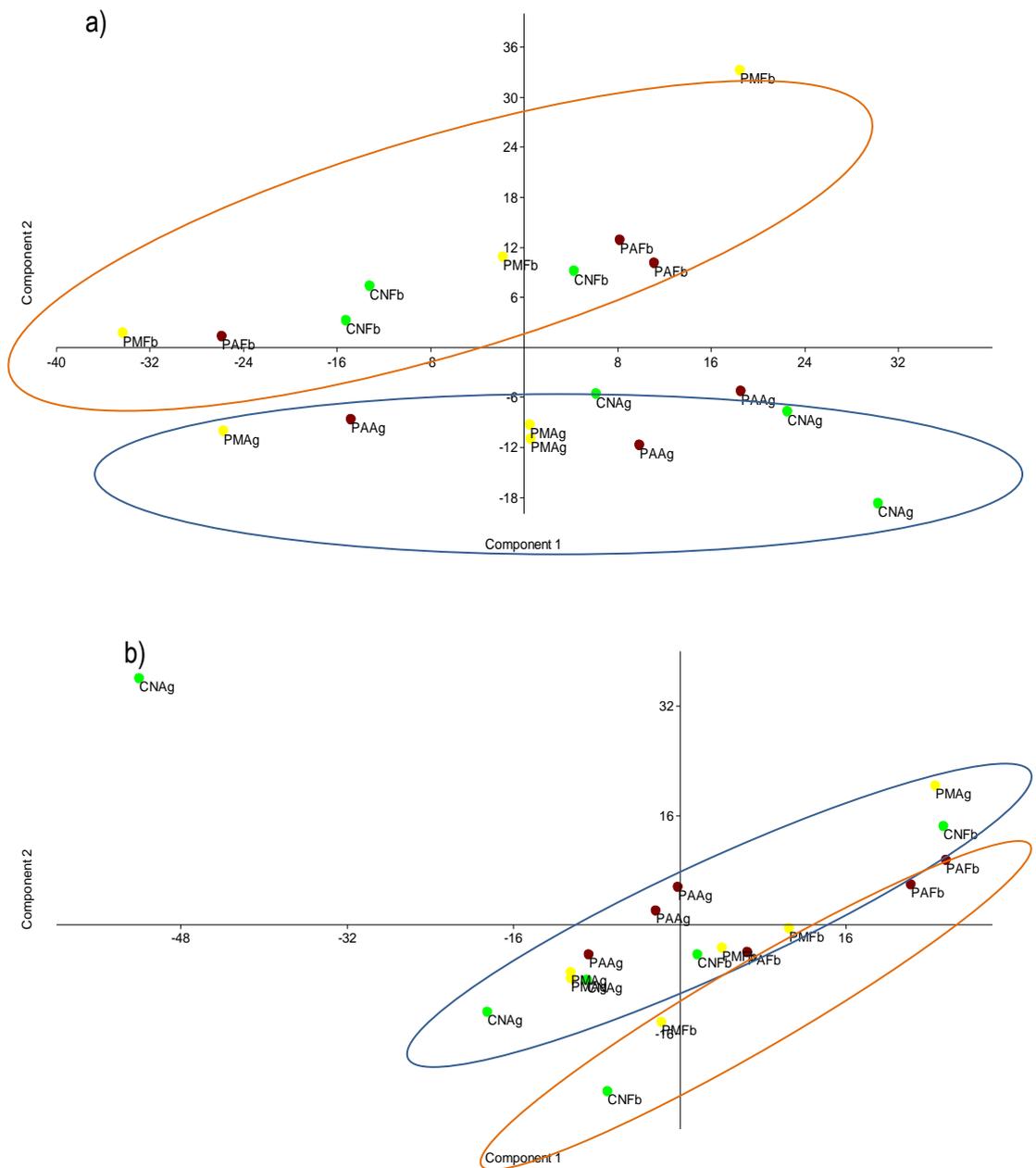
| Especie | Agosto | Febrero | Promedio |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>C. selloana</i> | 17,3 ± 0,9 a | 13,4 ± 1,3 b | 15,4 ± 0,9 A |
| <i>P. dilatatum</i> | 14,6 ± 1,3 a | 11 ± 1,1 b | 12,8 ± 0,8 B |

Se muestran promedios (n=3) ± error estándar. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias entre los meses de muestreo dentro de una misma especie. Letras mayúsculas diferentes muestran diferencias entre especies (DGC, p= 0,05).

El índice de Shannon varió entre 1,8 y 2,7, ambos valores corresponden a muestras de *C.selloana* provenientes del tratamiento PA en febrero y agosto respectivamente. El índice de equidad de Pielou (J') mostró valores entre 0,76 y 0,87 y se registró en raíces de *C.selloana* en agosto pertenecientes a parcelas de CN y PA respectivamente. Los índices de diversidad no fueron significativamente afectados por ninguno de los factores estudiados (cuadro 1).

El análisis de componentes principales (PCA), agrupó a las muestras de acuerdo a la fecha de muestreo al analizar las dos especies vegetales por separado. En *P.dilatatum* los componentes principales uno (CP1) y dos (CP2) explicaron el 42 % y 20 % de la variación respectivamente (figura 2a), mientras que en *C.selloana* el CP1 explicó el 36 % y el CP2 el 20 % de la variación (figura 2b). En ambas especies de gramíneas se observaron dos grupos diferentes conformados por las muestras de agosto y febrero. Estos grupos fueron estadísticamente diferentes como pudo corroborarse mediante el test ANOSIM (cuadro 3).

Figura 2. Diagrama de ordenamiento del Análisis de Componentes Principales para las muestras de *P. dilatatum* (a) y *C. selloana* (b) para los tres tratamientos estudiados y los dos meses de muestreo. CN: tratamiento de campo natural, PM: tratamiento de fertilización media, PA: tratamiento de fertilización alta. Ag: agosto (época fría), Fb: febrero (época cálida).



Cuadro 3. Resultados del test ANOSIM, comparando los grupos correspondientes a los dos meses de muestreo en *P. dilatatum* y *C. selloana*. Ag: agosto (época fría), Fb: febrero (época cálida). El valor de significancia utilizado fue de $p=0,05$.

| | <i>P. dilatatum</i> | | <i>C. selloana</i> | |
|----|---------------------|--------|--------------------|--------|
| | Ag | Fb | Ag | Fb |
| Ag | 0 | 0,0001 | 0 | 0,0001 |
| Fb | 0,0001 | 0 | 0,0001 | 0 |

El análisis estadístico de las comunidades de HMA en las muestras analizadas reveló que no existieron diferencias en cuanto al número y frecuencia de biotipos al comparar entre tratamientos de fertilización fosfatada, por eso es que se tomaron en cuenta las especies y las estaciones para comparar las estructuras de las comunidades. En el cuadro 4 se muestran los biotipos de HMA mas abundantes en las raíces de las gramíneas en estudio. De acuerdo a este análisis, existieron cinco biotipos presentes en todas las muestras con una alta abundancia, entre los que se destaca el biotipo de 185 pb, dominante en todas las muestras analizadas. Por otro lado, pudo observarse que un solo biotipo fue exclusivo de *P. dilatatum* (T-RF 221 pb), mientras que se registraron dos que solo estuvieron presentes en la raíces de *C. selloana* (T-RFs de 211 y 109 pb). Los biotipos correspondientes a T-RFs de 230, 199 y 300 pb estuvieron presentes en el mes de agosto, sin ser detectados en febrero. Finalmente el T-RF de 97 pb, mostró una alta frecuencia pero solo estuvo presente en las raíces de *C. selloana* en el mes de agosto (cuadro 4).

Cuadro 4. Abundancia relativa (%) de los principales biotipos presentes en *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana* en las dos estaciones en estudio. Fb: febrero (época cálida), Ag: agosto (época fría)

| Tamaño del T-RF (pb) | Abundancia relativa de T-RFs (%) | | | |
|----------------------|----------------------------------|-----|--------------------|------|
| | <i>P. dilatatum</i> | | <i>C. selloana</i> | |
| | Fb | Ag | Fb | Ag |
| 185 | 30 | 18 | 26,5 | 21,3 |
| 151 | 13 | 7,8 | 13 | 8,7 |
| 226 | 5,7 | 3,1 | 8,5 | 5,1 |
| 105 | 6,1 | 7,2 | 4,5 | 2,3 |
| 54 | 4,5 | 5 | 7 | 3,3 |
| 221 | 2,7 | 5,4 | 0 | 0 |
| 230 | 0 | 6,3 | 0 | 0,5 |
| 199 | 0 | 1,2 | 0 | 1,8 |
| 300 | 0 | 1 | 0 | 1,2 |
| 211 | 0 | 0 | 3,5 | 1,2 |
| 109 | 0 | 0 | 2 | 1,6 |
| 97 | 0 | 0 | 0 | 8,6 |

3.5.2. Abundancia y diversidad de esporas

Los suelos rizosféricos analizados mostraron un total de 15 morfotipos diferentes de esporas de HMA, con valores mínimos de seis morfotipos en muestras de la rizósfera de *P.dilatatum* extraídas del tratamiento de PA y máximos de 11 en la rizosfera de *C. selloana* correspondientes a CN. El promedio general de número de biotipos fue de $5,5 \pm 1,4$. Algunos de los morfotipos de esporas más representados en los suelos rizosféricos analizados se muestran en la figura 3. El morfotipo 11 se caracterizó por presentar un tamaño grande, coloración marrón clara translúcida, las esporas presentaron una pared simple y se formaban de manera terminal en la hifa sustentora, la cual mostró un grosor homogéneo. Estas características indican que podría tratarse de esporas pertenecientes al género *Glomus* (Schüssler et al., 2001). El morfotipo 8 presentó un

tamaño mediano, esporas con pared simple coloración rojiza y en algunos casos se logró observar la hifa sustentora bulbosa que se caracteriza por un engrosamiento en la base de la espora. Estos atributos podrían corresponder al género *Gigaspora* (Schüssler et al., 2001, Redecker et al., 2007). Otro de los morfotipos mas abundantes fue el número 9, que mostró un tamaño muy pequeño, color rojizo, mostrándose en una agrupación de entre cuatro y ocho esporas, las cuales se formaban terminalmente de las hifas sustentoras rectas. Dadas las mencionadas características morfológicas este morfotipo podría tratarse de otro grupo dentro del género *Glomus* (Schüssler et al., 2001).



Figura 3. Morfotipos de esporas de HMA con mayor abundancia relativa en la rizosfera de *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana*.

La riqueza de morfotipos, así como los índices de diversidad, no fueron afectados por ninguno de los factores en estudio. Sin embargo, la abundancia de esporas mostró diferencias significativas entre especies vegetales y en la interacción especie x tratamiento (cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la especie, el tratamiento y sus interacciones sobre variables relacionadas al potencial micorrícico. Se muestran los valores de significancia utilizando MLGM.

| Factores | Variables | | | |
|----------|------------|----------|------------------------|------------------------|
| | Abundancia | Riqueza | Índice de Shannon (H') | Índice de equidad (J') |
| E | p= 0,008* | p= 0,619 | p= 0,543 | p= 0,898 |
| T | p= 0,209 | p= 0,723 | p= 0,522 | p= 0,435 |
| ExT | p= 0,001* | p= 0,616 | p= 0,814 | p= 0,924 |

Factores: E= especie, T= tratamiento, EXT= interacción especie X tratamiento. *: factores con efecto significativo. (DGC, p= 0,05).

La abundancia de esporas en 100 g de suelo presentó un promedio de $29,41 \pm 1,12$. La especie *C. selloana* mostró un número de esporas significativamente mayor al de *P. dilatatum*. En *C. selloana* existió un efecto del tratamiento, observándose una mayor abundancia de esporas en las rizósferas de plantas provenientes del tratamiento PA en comparación con las de CN, mientras que en *P. dilatatum* no se registraron diferencias entre los tratamientos de fertilización fosfatada (cuadro 6).

Cuadro 6. Abundancia de esporas en *Paspalum dilatatum* y *Coelorhaquis selloana* en parcelas de campo natural sin fertilizar (CN) y en parcelas con fertilización fosfatada alta (PA)

| Especie | Abundancia de esporas (en 100 g de suelo) | | |
|---------------------|---|--------------|--------------|
| | CN | PA | Promedio |
| <i>C. selloana</i> | 26 ± 1 a | 38 ± 2 b | 32 ± 1 A |
| <i>P. dilatatum</i> | 27 ± 2 a | 25 ± 2 a | 26 ± 1 B |

Se muestran promedios (n=3) \pm error estándar. CN: tratamiento de campo natural, PA: tratamiento de fertilización alta. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias entre niveles del factor tratamiento dentro de una misma especie. Letras mayúsculas diferentes muestran diferencias entre especie (DGC, $p=0,05$).

3.6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron rechazar la hipótesis planteada, ya que la fertilización fosfatada no afectó negativamente la diversidad de las comunidades de HMA ni en las raíces ni en la rizósfera de las gramíneas estudiadas. Esto resulta sorprendente teniendo en cuenta por un lado que el aumento en la disponibilidad de P provocó cambios en la composición florística (Jaurena et al., 2015), lo que podría redundar en cambios en las comunidades de HMA (Mummey et al., 2005, Johnson et al., 2003, Vandenkoornhuysen et al., 2003, van der Heijden., 1998) y por otro, los numerosos antecedentes que reportan efectos negativos del aumento del P

disponible sobre la diversidad de HMA (Lin et al., 2012, Liu et al., 2012, Alguacil et al., 2010).

Alguacil et al. (2010) estudiaron mediante técnicas moleculares la diversidad micorrícica arbuscular en una leguminosa, observando que a altas dosis de P la diversidad de HMA resultó negativamente afectada. Por otro lado, Lin et al. (2012) y Liu et al. (2012) realizaron estudios en gramíneas, empleando técnicas moleculares y morfológicas y reportaron efectos negativos de la fertilización fosfatada a largo plazo sobre la diversidad de las comunidades de HMA.

Nuestros resultados podrían indicar que los aumentos en la disponibilidad de P debido a los tratamientos de fertilización fosfatada no serían suficientes para afectar negativamente las comunidades de HMA. Los contenidos de P disponible en suelo en parcelas con tratamiento PM triplicaron al de las parcelas de CN, mientras que las parcelas correspondientes al tratamiento PA mostraron valores 6 veces mayor de P disponible que el registrado en CN (García et al., 2016). Nuestros resultados coinciden con los encontrados por Beauregard et al. (2010) quienes tampoco hallaron respuesta de la diversidad de las comunidades de HMA a los tratamientos de fertilización fosfatada incluso con incrementos de entre 8 y 12 veces de disponibilidad de P.

Otra posible explicación a los resultados obtenidos en el presente trabajo podría estar relacionada con una mayor resiliencia a los cambios de las comunidades de HMA en relación a los cambios de la comunidad vegetal. Como se mencionó previamente la fertilización fosfatada provocó cambios en la composición florística, promoviendo el crecimiento de especies invasoras y reduciendo la presencia de nativas (Jaurena et al., 2015). Dado que existen alrededor de 244 especies de HMA (Schüssler, 2014) que colonizan a 200.000 especies de plantas (Brundrett, 2009), se trata de una interacción muy poco específica, por lo cual las especies invasoras de la comunidad vegetal que proliferaron en las parcelas fertilizadas podrían mantener la interacción con las mismas especies de HMA presentes en las plantas nativas o podrían no ser colonizadas por HMA. En ambos casos no existiría un recambio de especies o una proliferación de nuevas especies de HMA en el ambiente que compitieran con la comunidad nativa. Sin embargo, este hecho no concuerda con antecedentes previos en los que se ha observado que las especies vegetales invasoras provocan alteraciones de las

comunidades de HMA de las especies nativas, lo que se ha propuesto como un posible mecanismo que contribuya al éxito de la invasión (Mummey y Rillig 2006, Mummey et al., 2005).

Por otro lado, la falta de respuesta en la diversidad de HMA a los incrementos de P podría deberse al sesgo de la técnica de T-RFLP empleada para evaluar la diversidad. La técnica de T-RFLP es ampliamente utilizada y de gran utilidad ya que la misma permite obtener el perfil de la comunidad en estudio sin necesidad de recurrir a métodos costosos y mas laboriosos como la clonación y la pirosecuenciación (Colombo et al., 2014, Dickie y FitzJohn 2007). La técnica de T-RFLP cuenta con la ventaja de una mayor sensibilidad para detectar todas las especies de la comunidad en estudio (Hurston et al., 2007). Sin embargo, varios trabajos han reportado que dicha técnica muestra sesgos y limitaciones, causando por ejemplo una subestimación de la diversidad de las comunidades lo que está explicado porque un mismo fragmento terminal o T-RF puede estar representando más de una especie que presentan el mismo sitio de restricción en dicha secuencia (Hurston et al., 2007, Liu et al., 1997). Una alternativa que permitiría ajustar la resolución de esta técnica sería la utilización de más de una enzima de restricción, así como también el uso de ambos primers marcados (Dickie y FitzJohn 2007, Vandenkoornhuyse et al., 2003), de manera de obtener mayor información sobre la variación de las secuencias obtenidas.

Por otra parte, el incremento de los niveles de P provocó un aumento en la abundancia de esporas en la rizosfera de *C. selloana*, lo cual no se observó en *P. dilatatum*. Estos resultados se contradicen con algunos trabajos que reportaron efectos negativos de la fertilización fosfatada a largo plazo sobre la densidad de esporas (Kahiluoto et al., 2001, Martensson y Carlgren 1994). Aunque, teniendo en cuenta la reducción de la micorrización en las raíces de plantas creciendo en parcelas fertilizadas, el aumento en el número de esporas debido al P podría deberse a que la fertilización fosfatada opera como una fuerza selectiva que modifica la partición de recursos desde las hifas (estructuras funcionales que proveen de nutrientes a las plantas) hacia estructuras de dispersión como lo son las esporas (Sheng et al., 2013). Estos autores sugieren que ante condiciones de escasez de P, las plantas destinarían mayor cantidad de carbohidratos hacia la raíz y exudados radiculares favoreciendo así el crecimiento

hifal. Al aumentar los niveles de P en suelo, el C y la energía se destinarían a las esporas o se seleccionarían especies de HMA con tasas de esporulación mayores. Cabe recordar que *C. selloana* mostró una reducción de su frecuencia en el pastizal fertilizado. Si bien en este trabajo no analizamos variables del desempeño de las plantas, sería esperable que las plantas de *C. selloana* dispongan de menor cantidad de carbono disponible para asignarle a las raíces, lo que desencadenaría una partición de recursos por parte de los HMA hacia estructuras de resistencia. En *P. dilatatum*, aunque los niveles de colonización se vieron perjudicados debido al incremento de P en suelo, no se constató un cambio en el número de esporas de HMA en su rizosfera, lo que podría sugerir que no ocurrió un cambio en la asignación de los recursos. La fertilización fosfatada sería capaz de inducir un cambio en la partición de recursos de los HMA en algunas especies vegetales, como ocurrió en *C. selloana*, lo que se estaría evidenciando a través del aumento en el número de esporas asociado a su rizósfera.

Algunas de las variables relacionadas a la diversidad de las comunidades de HMA mostraron diferencias entre las dos especies de gramíneas. La riqueza de biotipos de HMA que se encontró colonizando las raíces fue superior en *C. selloana* que en *P. dilatatum*, lo que muestra que en *C. selloana* estarían presentes especies de hongos micorrizógenos que no encontraríamos en *P. dilatatum*. Estos resultados concuerdan con varios estudios sobre diversidad de las comunidades micorrícicas empleando técnicas moleculares que mostraron diferencias en la composición de las comunidades (Mummey et al., 2005) y en el número de biotipos de HMA al comparar entre plantas hospedadoras (Vandenkoornhuyse et al., 2003, Husband et al., 2002, Helgason et al., 2002). En cuanto al potencial micorrícico de las comunidades de HMA asociadas a estas gramíneas, la densidad de esporas también mostró diferencias entre las dos especies de gramíneas hospedadoras, encontrándose en la rizosfera de *C. selloana* un número significativamente mayor de esporas que en *P. dilatatum*. Se ha comprobado que existe un efecto de la combinación hongo-planta sobre el crecimiento de las plantas (Klironomos 2003, van der Heijden et al., 1998, Sanders y Fitter 1992) así como también sobre la tasa de crecimiento de las poblaciones fúngicas, las cuales podrían presentar diferentes tasas de esporulación (Bever 2002, Bever et al., 1996).

La estructura de la comunidad de HMA y el número de biotipos dentro de las raíces de *P. dilatatum* y *C. selloana* fueron diferentes en los dos momentos del año estudiados. De acuerdo al análisis de PCA existieron diferencias en las comunidades entre las dos estaciones de muestreo, encontrándose además una mayor riqueza de biotipos de HMA en agosto que en febrero en las raíces de ambas especies. Si bien el efecto estacional sobre la diversidad de las comunidades de HMA dentro de las raíces ha sido poco estudiado, varios antecedentes muestran cómo varían la intensidad de colonización (Bowen, 1987) y la diversidad de esporas (Guadarrama et al., 2014) con los distintos factores ambientales (Guadarrama et al., 2014, Bowen 1987,) y con la fenología de la planta hospedadora (Bentivenga y Hetrick 1992, Daft et al., 1980).

P. dilatatum y *C. selloana* presentaron comunidades de HMA con alta diversidad mostrando índices de Shannon entre 1,8 y 2,7, valores similares a los máximos reportados en la bibliografía, obtenidos a través métodos moleculares, que emplearon secuencias de ADN ribosomal (Wubet et al., 2004). La técnica de T-RFLP en nuestro trabajo mostró que estas plantas pueden estar colonizadas con entre 6 y 25 biotipos, lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía (Verbruggen et al., 2010, Oehl et al., 2010).

Los valores de riqueza de biotipos de HMA encontrados en las raíces de *P. dilatatum* y de *C. selloana* superaron ampliamente a los de morfotipos de esporas de la rizósfera de ambas gramíneas para todas las situaciones de fertilización fosfatada lo que podría explicarse por los sesgos de las metodologías empleadas. Por un lado si bien es conocido que la técnica de T-RFLP tiende a subestimar la diversidad (Hurston et al., 2007), podría estar sobreestimando la riqueza de las comunidades de HMA en las raíces de las gramíneas estudiadas dado que se ha reportado que una sola especie puede mostrar múltiples picos (Avis et al., 2006) así como también se han detectado errores en la especificidad de los primers que podrían estar amplificando otros grupos diferentes a *Glomeromycota* (Douhan et al., 2005). Por otro lado, las técnicas de identificación de especies de hongos micorrizógenos basadas en la morfología de esporas, requieren de un profundo conocimiento de los caracteres morfológicos de estas estructuras, por lo que también pueden existir errores en la identificación y clasificación de los morfotipos. Además, hay que tener en cuenta que podría estar ocurriendo un recambio de especies

con diferentes funciones, pero idéntica morfología de esporas, como sugiere Kahiluoto et al. (2001).

El presente estudio constituye el primer trabajo de investigación sobre diversidad de micorrizas arbusculares en suelo y planta utilizando técnicas moleculares en Uruguay. El mismo representa un primer aporte al conocimiento sobre cómo se comportan las comunidades de HMA en gramíneas nativas del campo natural de Uruguay ante una situación agronómica extendida en la actividad ganadera como lo es la fertilización fosfatada.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- Alguacil M, Lozano Z, Campoy M, Roldán A.** 2010. Phosphorus fertilisation management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (7): 1114–1122.
- Alguacil M, Lumini E, Roldán A, Salinas-García J, Bonfante P, Bianciotto V.** 2008. The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in crop fields in subtropical conditions. *Ecological Applications*, 18 (2): 527-536.
- Alkan N, Gadkar V, Yarden O, Kapulnik Y.** 2006. Analysis of quantitative interactions between two species of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6): 4192–4199.
- Avis P, Dickie I, Mueller G.** 2006. A “dirty” business: testing the limitations of TRFLP analysis of soil fungi. *Molecular Ecology*, 15 (3): 873– 882.
- Baeza S, Baldassini P, Bagnato Camilo, Pinto P, Paruelo J.** 2014. Caracterización del uso/cobertura del suelo en Uruguay a partir de series temporales de imágenes MODIS. *Agrociencia Uruguay*, 18(2), 95–105.
- Beauregard M, Hamel C, Nayyar A, St-Arnaud M.** 2010. Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. *Microbial Ecology*, 59 (2): 379–89.
- Bentivenga S, Hetrick B.** 1992. Seasonal and temperature effects on mycorrhizal activity and dependence of cool-season and warm-season tallgrass prairie grasses. *Canadian Journal of Botany*, 70 (8): 1596–1602.
- Berretta E, Risso D, Levratto J, Zamit W.** 1998. Mejoramiento de campo natural de basalto fertilizado con nitrógeno y fósforo. En: Berretta, E. [Ed.]. Seminario de Actualización en tecnologías para Basalto. Montevideo. INIA Tacuarembó Serie Técnica Nro. 102. 63-73.
- Bethlenfalvay G, Thomas R, Dakkessian S, Brown M, Ames R.** 1988. Mycorrhizae in stressed environments: effects on plant growth, endophyte development, soil stability and soil water. En: Whitehead E, Hutchinson C, Timmermann B, Varady R. [Eds.]. *Arid Lands: Today and Tomorrow*. Boulder: Westview Press. 1015-1035.

- Bever J.** 2002. Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. *Plant and Soil*, 244 (1): 281–290.
- Bever J, Schultz P, Pringle A, Morton J.** 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience*, 51 (11): 923–931.
- Bever J, Morton J, Antonovics J, Schultz P.** 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *The Journal of Ecology*, 84 (5): 71–82.
- Bowen G.** 1987. The biology and physiology of infection and its development. En: Safi G. [Ed.]. *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Florida: CRC Press. 27–70.
- Brundrett M.** 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320 (1): 37–77
- Colombo R, Fernández Bidondo L, Silvani V, Carbonetto M, Rascovan N, Bompadre M, Pérgola M, Cuenca G, Godeas A.** 2014. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in soil from the Pampa Ondulada, Argentina, assessed by pyrosequencing and morphological techniques. *Canadian Journal of Microbiology*, 60 (12): 819-827
- Culman S, Bukowski R, Gauch H, Cadillo-Quiroz H, Buckley D.** 2009. T-REX: Software for the Processing and Analysis of T-RFLP data. *BioMed Central Bioinformatics*, 10 (1): 171.
- Daft M, Chilvers M, Nicolson T.** 1980. Mycorrhizas of the Lilliflorae. I. Morphogenesis of *Endymion non-scriptus* L. Garcke and its mycorrhizas in nature. *New phytologist*, 85 (2): 181–189.
- Daniels B, Skipper H.** 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. En: Schenck N. [Ed.]. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. St Paul: American Phytopathological Society, 29-37.

- Davison J, Öpik M, Zobel M, Vasar M, Metsis M, Moora M.** 2012. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary through- out the growing season. *PLoS One*, 7 (8): e41938.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C.** 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dickie I, FitzJohn R.** 2007. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 17 (4): 259–270.
- Dong Y, Zhu H.** 2005. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods in Molecular Medicine*, 108: 149-57
- Douhan G, Petersen C, Bledsoe C, Rizzo D.** 2005. Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza*, 15 (5): 365–372.
- Endresz G, Somodi I, Kalapos T.** 2013. Arbuscular mycorrhizal colonization of roots of grass species differing in invasiveness. *Community Ecology*, 14 (1): 67-76.
- Faber B, Zasoski R, Munns D, Shackel K.** 1991. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Canadian Journal of Botany*, 69 (1): 87–94.
- Fitter A.** 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology*, 93 (2): 231–243.
- García S, Pezzani F, Rodríguez A, del Pino A.** 2016. Micorrizas en gramíneas nativas: efecto de la fertilización fosfatada a largo plazo. *Agrociencia Uruguay*, 20 (1): 7-16.
- Gemma J, Koske R, Carreiro M.** 1989. Seasonal dynamics of selected species of V-A mycorrhizal fungi in a sand dune. *Mycological Research*, 92 (3): 317-321.
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D.** 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, 14 (2): 111–117.

- Guadarrama P, Castillo S, Ramos-Zapata J, Hernández-Cuevas L, Camargo-Ricalde S.** 2014. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: The effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. *Pedobiologia*, 57(2): 87–95.
- Hammer O, Harper D, Ryan P.** 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9.
- Hartnett D, Wilson G.** 2002. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and soil*, 244 (1): 319-331.
- Hartnett D, Wilson G.** 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology*, 80 (4): 1187-1195.
- Helgason T, Merryweather J, Denison J, Wilson P, Young J, Fitter A.** 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, 90 (2): 371–384.
- Hernández J, Otegui O, Zamalvide J.** 1995. Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos de Uruguay. En: Hernández J. ed. Boletín de Investigaciones N°43. Montevideo. Facultad de Agronomía. 32p.
- Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mader P, Wiemken A, Redecker D.** 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular ecology*, 15 (8): 2277–2289.
- Hoeksema J.** 1999. Investigating the disparity in host specificity between AM and EM fungi: lessons from theory and better- studied systems. *Oikos*, 84 (2): 327–332.
- Hurston C, Crawford R, Garland J, Lipson D, Mills A, Stetzenbach L.** 2007. Manual of environmental microbiology. Washington D.C.: ASM Press. 1293 p.
- Husband R, Herre A, Turner S, Gallery R, Young J.** 2002. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology*, 11 (12): 2669–2678.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria).** 2015. Banco de Información Agroclimática. [En línea]. 23 Febrero 2015. Disponible en: <http://www.inia.uy/investigaci%C3%B3n-einnovaci%C3%B3n/unidades/GRAS/Clima/Banco-datos-agroclimatico>.

- Jaurena M, Lezama F, Salvo L, Cardozo G, Ayala W, Terra J, Nabinger C.** 2015. The dilemma of improving native grasslands by overseeding legumes: production intensification or diversity conservation. *Rangeland Ecology and Management*, 69 (1):35-42
- Jayachandran K, Shetty K.** 2003. Growth response and phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizae of wet prairie sawgrass. *Aquatic Botany*, 76 (4): 281-290.
- Johnson D, Vandenkoornhuyse P, Leake J, Gilbert L, Booth R, Grime J, Young J, Read D.** 2003. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New phytologist*, 161 (2): 503–515.
- Kahiluoto H, Ketoja E, Vestberg M, Saarela I.** 2001. Promotion of AM utilization through reduced P fertilization 2. Field studies. *Plant and Soil*, 231 (1): 65–79.
- Karanika E, Mamolos A, Alifragis D, Kalburtji K, Veresoglou D.** 2008. Arbuscular mycorrhizas contribution to nutrition, productivity, structure and diversity of plant community in mountainous herbaceous grassland of northern Greece. *Plant Ecology*, 199 (2): 225–234.
- Klironomos J.** 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84 (9): 2292–2301.
- Koljalg U, Nilsson R, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor A, Bahram M, Bates S, Bruns T, Bengtsson-Palme J, Callaghan T.** 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22 (21): 5271–5277.
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H.** 2012. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north china revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science and Technology*, 46 (11): 5764–5771.
- Liu Y, Shi G, Mao L, Cheng G, Jiang S, Ma X, An L, Du G, Collins N, Feng H.** 2012. Direct and indirect influences of 8 yr of nitrogen and phosphorus fertilization on *Glomeromycota* in an alpine meadow ecosystem. *New Phytologist*, 194 (2): 523–535.

- Liu W, Marsh T, Cheng H, Forney L.** 1997. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (11): 4516–4522.
- Lugo González D, Aguilar V, Casotto M, Laurentin A, Gómez A.** 2013. Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales: bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63 (3): 232-239.
- Martensson A, Carlgren K.** 1994. Impact of phosphorus fertilization on VAM diaspores in two Swedish long-term field experiment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 47 (4): 327–334.
- Martínez L, Pugnaire F.** 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi host preference and site effects in two plant species in a semiarid environment. *Applied Soil Ecology*, 48 (3):313–317.
- Martínez L, Pugnaire F.** 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Revista Ecosistemas*, 18 (2):44–54.
- Marulanda A, Azcón R, Ruiz-Lozano J.** 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119 (4):526–533.
- Millot J, Risso D, Methol R.** 1987. Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. Informe técnico para la Comisión Honoraria del Plan Agropecuario. Montevideo, Uruguay. 199p.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca).** 2011. Censo General Agropecuario. [En línea]. 30 octubre 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-censo-2011-resultados-definitivos>.
- Mueller-Dombois D, Ellenberg H.** 1974. Aims and methods of vegetation ecology. New York: Wiley. 547 pp.

- Mummey D, Rillig M.** 2006. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil*, 288 (1): 81–90.
- Mummey D, Rillig M, Holben W.** 2005. Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. *Plant and Soil*, 271 (1): 83-90.
- Newsham K, Fitter A, Watkinson A.** 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution*, 10 (10): 407–411.
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bosch R, van der Heijden M, Sieverding E.** 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (85): 724–738.
- Öpik M, Zobel M, Cantero J, Davison J, Facelli J, Hiiesalu I, Jairus T, Kalwij J, Koorem K, Leal M.** 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 23 (5): 411–430.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel, M.** 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of ecology*, 94 (4): 778–790.
- Parodi G, Pezzani F.** 2011. Micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas de Uruguay en áreas con y sin pastoreo. *Agrociencia Uruguay*, 15 (2): 1-10.
- Pearson J, Abbott L, Jasper D.** 1993. Mediation of competition between two colonizing VA mycorrhizal fungi by the host plant. *New Phytologist*, 123 (1): 93-98.
- Pezzani F, Montaña C, Guevara R.** 2006. Associations between arbuscular mycorrhizal fungi and grasses in the successional context of a two-phase mosaic in the Chihuahuan Desert. *Mycorrhiza*, 16 (4): 285-295.
- Pielou E.** 1975. *Ecological diversity*. New York: Wiley InterScience. 165p
- Pielou E.** 1969. *An introduction to mathematical ecology*. New York: Wiley. 286p.
- Redecker D, Raab P, Oehl F, Camacho F, Courtecuisse R.** 2007. A novel clade of sporocarp-forming species of glomeromycotan fungi in the *Diversisporales* lineage. *Mycological Progress* 6: 35–44.

- Rosendahl S, Stukenbrock E.** 2004. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology*, 13 (10): 3179–3186.
- Salvo L, Terra J, Ayala W, Bermudez R, Correa J, Avila P, Hernández J.** 2008. Long-term phosphorous fertilization and perennials legumes addition impacts on a temperate natural grassland: II. Total and particulate soil organic carbon. En: XXI International Grassland and VIII International Rangeland Congress (28 y 29 junio 2008; Hohhot, Inner Mongolia, China). Hohhot: Guangdong People's Publishing House. pp. 382; v. I.
- Sanders F, Fitter A.** 1992. Evidence for differential responses between host–fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. *Mycological Research*, 96 (6): 415–419.
- Sanders F, Tinker P.** 1971. Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizas. *Nature* (43), 233: 278-279.
- Sanjurjo L.** 2009. Actividad y diversidad microbiana del suelo bajo distintas intensidad de uso. Tesis Mag. Cs. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 115p.
- Santos-González J, Finlay R, Tehler A.** 2007. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (17): 5613–23.
- Schüssler A.** 2014. Glomeromycota: species list. [En línea]. 07 diciembre 2015. Disponible en: <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo>.
- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C.** 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105 (12): 1413–1421.
- Shannon C, Weaver W.** 1949. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press. 125p.

- Sheng M, Lalande R, Hamel C, Ziadi N.** 2013. Effect of long-term tillage and mineral phosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal fungi in a humid continental zone of Eastern Canada. *Plant and Soil*, 369 (1-2): 599–613.
- Smith S, Smith F.** 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 227–250
- Smith S, Read D.** 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. New York: Academic Press. 787 pp.
- Stearn S.** 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press. New York.
- Trouvelot S, Tuinen D, Gianinazzi-pearson M.** 1999. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza*, 8 (4): 203–206.
- Tuomi J, Kytöviita M, Härdling R.** 2001. Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos*, 92 (1): 62-70.
- van der Gast C, Gosling P, Tiwari B, Bending G.** 2011. Spatial scaling of arbuscularmycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice. *Environmental Microbiology*, 13 (1): 241-249.
- van der Heijden M, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller K, Wiemken K, Sanders I.** 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172 (4): 739–752.
- van der Heijden M, Boller T, Wiemken A, Sanders I.** 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*, 79 (6): 2082–2091.
- Vandenkoornhuyse P, Ridgway K, Watson I, Fitter A, Young J.** 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, 12 (11): 3085–3095.

Verbruggen E, Roling W, Gamper H, Kowalchuk G, Verhoef H, van der Heijden M.

2010. Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist*, 186 (4): 968–979.

Wubet T, Weiss M, Kottke I, Teketay D, Oberwinkler F. 2004. Molecular diversity of

arbuscular mycorrhizal fungi in *Prunus africana*, an endangered medicinal tree species in dry Afromontane forests of Ethiopia. *New Phytologist*, 161 (2): 517–528.

4. DISCUSIÓN GENERAL

El presente estudio representa uno de los primeros aportes al conocimiento de las interacciones micorrícicas arbusculares en Uruguay, siendo el primer trabajo que aborda el estudio de la diversidad de las comunidades de los hongos que participan en estas interacciones en suelo y planta de forma conjunta en nuestro país. El mismo permitió generar conocimiento acerca de las comunidades de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) como importantes componentes de los pastizales, lo que puede contribuir a comprender mejor el funcionamiento del campo natural (CN), principal ecosistema de Uruguay. Resulta de suma importancia conocer cómo responden las comunidades de HMA ante determinadas prácticas agronómicas y cómo dichas respuestas pueden afectar el desempeño de las plantas, teniendo en cuenta el papel de las micorrizas arbusculares en la absorción de nutrientes y agua.

La colonización por HMA, así como también la diversidad de las comunidades fúngicas en *Paspalum dilatatum* y *Coelorhachis selloana* mostraron altos valores. De acuerdo a los antecedentes, los elevados niveles de colonización por micorrizas arbusculares de estas gramíneas podrían relacionarse con el metabolismo fotosintético C₄ de las mismas y con características de su sistema radicular, ya que presentan raíces gruesas que requieren del micelio fúngico que actuaría como raíces finas participando en la absorción de nutrientes y agua (García 2012, Parodi y Pezzani 2011, Lugo et al., 2003, Wilson y Hartnett 1998). En cuanto a la diversidad de las comunidades de HMA presentes en las raíces de estas gramíneas, los valores de los índices de diversidad de Shannon resultaron ser comparables a los máximos reportados en la bibliografía, los cuales corresponden a un estudio que utilizó secuencias de ADN ribosomal (Wubet et al., 2004). La alta presencia de micorrizas arbusculares, así como la gran diversidad de las comunidades de hongos micorrizógenos en las gramíneas estudiadas, que representan dos especies muy frecuentes y abundantes del CN en todo el país, muestran la importancia que estas interacciones podrían tener en la estructuración y funcionamiento de las comunidades de pastizal de Uruguay.

La fertilización fosfatada provocó la reducción de la intensidad de colonización (total y por estructuras) de HMA tanto en *P. dilatatum* como en *C. selloana*. La diversidad

de las comunidades de HMA en suelo y en planta, en cambio, no fue afectada por el aumento de fósforo (P) disponible. Estos resultados permitieron rechazar las hipótesis planteadas en nuestro trabajo ya que se planteó que la fertilización fosfatada tendría un efecto negativo sobre la diversidad micorrícica para ambas especies de gramíneas, pero la intensidad de colonización en cambio, respondería de manera diferente para cada especie vegetal. En *C. selloana* (especie que redujo su frecuencia en respuesta al aumento en la disponibilidad de P) se verían reducidos los niveles de colonización micorrícica, mientras que en *P. dilatatum* (especie que no varió su frecuencia debido a la fertilización fosfatada) no serían afectados debido al incremento de P disponible en el suelo. Estas hipótesis se basan en que las interacciones micorrícicas arbusculares tendrían efectos positivos sobre el desempeño de las plantas, confiriéndoles ventajas, por ejemplo, a la hora de competir con especies invasoras, lo que explicaría en parte la persistencia de *P. dilatatum* en el pastizal fertilizado.

Dado que la interacción micorrícica arbuscular se trata de una simbiosis obligada para el hongo se sugiere que la misma es regulada por la planta (Smith y Smith 2011, Smith y Read 2008), por lo que ésta, ejerciendo un control fitocéntrico permitiría que la interacción solo se establezca en situaciones de escasez de nutrientes en las que la relación costo/beneficio es menor para la planta (Chen et al., 2014, Tuomi et al., 2001, Covacevich et al., 1995, Anderson et al., 1994). En este sentido Bethlenfalvay y Dakessian (1984) y Bethlenfalvay et al. (1983) y demostraron experimentalmente que los beneficios de las micorizas arbusculares se observaron en rangos estrechos de concentración de P disponible (4 -12 mg kg⁻¹). En nuestro trabajo, los niveles de P en las parcelas con tratamientos de fertilización alta superan este rango.

Trabajos previos en el experimento de Palo a Pique encontraron que la fertilización fosfatada a largo plazo causó importantes cambios en la composición florística del pastizal, incrementándose la cobertura de algunas especies exóticas como *Cynodon dactylon* y *Lolium multiflorum* y reduciendo la diversidad vegetal, afectando principalmente de forma negativa la presencia de gramíneas nativas (Jaurena et al., 2015). Dado que la colonización por HMA se vio negativamente afectada debido a la fertilización fosfatada en ambas gramíneas, los distintos comportamientos de las especies vegetales ante las situaciones de fertilización fosfatada podrían sugerir una

respuesta diferencial frente a la micorrización. *C. selloana* podría requerir en mayor medida de dichas interacciones para poder competir en el pastizal fertilizado, lo que podría estar explicando la reducción de su frecuencia en dichas situaciones. Existen varios estudios previos que muestran dependencia diferencial de distintas especies vegetales de las micorrizas y cómo esta relación puede estructurar las comunidades vegetales (Hartnett y Wilson 1999, van der Heijden et al., 1998, Hartnett et al., 1993). Con el fin de estudiar esta respuesta diferencial hacia los HMA sería interesante evaluar el efecto de las micorrizas arbusculares sobre el desempeño de las especies en estudio en las diferentes situaciones de fertilización fosfatada. Dicho efecto podría medirse a través de algunos parámetros vinculados al crecimiento de las plantas que son afectados por las micorrizas, como la producción de biomasa (Pezzani et al., 2006) y la asignación de biomasa a diferentes estructuras (Pezzani et al., 2006, Anderson et al., 1994). La reducción de la presencia de HMA en las plantas estudiadas en situaciones de fertilización fosfatada, estaría evidenciando la existencia de un control fitocéntrico de la simbiosis micorríca arbuscular.

La fertilización fosfatada causó importantes aumentos en el contenido de P disponible, pero la diversidad de las comunidades de HMA en la rizósfera y raíces de *P. dilatatum* y *C. selloana* no fue afectada en respuesta a esta variable. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Beauregard et al. (2010). Sin embargo se contradicen con lo reportado en otros estudios, en los cuales incrementos en el P disponible provocaron reducciones en la diversidad (Lin et al., 2012, Liu et al., 2012, Alguacil et al., 2010, Kahiluoto et al., 2001). El hecho de no hallarse efectos sobre la diversidad micorríca debido a la fertilización fosfatada muestra que los mismos biotipos podrían estar colonizando las raíces de estas gramíneas en las diferentes situaciones de disponibilidad de P, pero con diferentes niveles de actividad.

La fertilización fosfatada a largo plazo causó aumentos en la cobertura de algunas especies exóticas y redujo la presencia de gramíneas nativas (Jaurena et al., 2015). La ausencia de efectos del incremento de P sobre la diversidad micorríca observados en el presente estudio no concuerda con antecedentes previos en los que se ha observado que las especies vegetales invasoras, provocan alteraciones de las comunidades de HMA de las especies nativas, lo que se ha propuesto como un posible

mecanismo que contribuya al éxito de la invasión (Mummey y Rillig 2006, Mummey et al., 2005). Nuestros resultados podrían estar reflejando una alta resiliencia de las comunidades de HMA a los cambios ambientales en comparación con la comunidad vegetal, lo que estaría explicado por la baja especificidad de los simbioses que conforman la interacción micorrícica (Brundrett 2009, Hoeksema 1999, Law 1985). Las especies invasoras de la comunidad vegetal que proliferaron en las parcelas fertilizadas podrían mantener la interacción con las mismas especies de HMA presentes en las especies nativas, o podrían no ser colonizadas por HMA. En este sentido, sería interesante analizar qué niveles de colonización por micorrizas arbusculares y qué especies de HMA se encuentran colonizando las raíces de dichas gramíneas exóticas. La falta de respuesta en la diversidad de las comunidades de HMA ante incrementos del P disponible podría indicar una alta estabilidad de las comunidades fúngicas ante ciertos cambios en la disponibilidad de nutrientes del ambiente. La abundancia de esporas no fue afectada en *P. dilatatum*, mientras que se vio aumentada en *C. selloana* debido al incremento del P disponible. Teniendo en cuenta que esta gramínea, redujo su frecuencia en situaciones de fertilización fosfatada, esto podría estar reflejando un menor crecimiento para la planta. El aumento en la abundancia de esporas en la rizósfera de *C. selloana*, podría deberse a que existe un cambio en la asignación de recursos carbonados inducido por la fertilización fosfatada. Ante situaciones de aumento de P disponible, las plantas, destinarían recursos carbonados hacia estructuras de supervivencia como lo son las esporas, en desmedro de la producción de hifas, tal como proponen Sheng et al. (2013).

Las comunidades de micorrizas arbusculares fueron diferentes al comparar entre ambas especies hospedadoras. *C. selloana* presentó una mayor riqueza de biotipos dentro de sus raíces, así como también una mayor abundancia de esporas asociadas a su rizosfera en comparación con *P. dilatatum*. Estos resultados muestran que en las raíces de *C. selloana* estarían presente especies de HMA que no se encontrarían colonizando las raíces de *P. dilatatum*. Si bien ha sido reportada la baja especificidad de la interacción micorrícica arbuscular (Hoeksema 1999, Law 1985), nuestros resultados concuerdan con varios estudios que reportan diferencias en la diversidad de las comunidades micorrícicas dentro de las raíces (Mummey et al., 2005, Vandenkoornhuyse

et al., 2003, Helgason et al., 2002, Husband et al., 2002), así como en el número de esporas en la rizósfera de diferentes especies vegetales de una misma comunidad (Bever 2002, Bever et al., 1996). Las diferencias encontradas en la diversidad de HMA presentes tanto en la rizósfera como en las raíces de las gramíneas estudiadas podrían estar indicando una cierta especificidad hongo-planta en esta simbiosis

Tanto la colonización micorrícica arbuscular como la diversidad de las comunidades fúngicas fueron afectadas por la estación del año. Los mayores valores de colonización micorrícica total y por estructuras de intercambio (arbúsculos y ovillos) se detectaron en febrero (verano) y los menores en noviembre y agosto. Las gramíneas estudiadas son especies estivales que muestran mayor crecimiento y desarrollo foliar que les permite una mayor producción de carbohidratos en verano (Carámbula 2004, Millot et al., 1987) lo que explicaría la mayor colonización en esta estación. Por otro lado, la estructura de las comunidades de HMA fue diferente entre invierno y verano, al tiempo que la riqueza de biotipos dentro de las raíces de ambas gramíneas fue menor en verano. En verano encontramos un menor número de especies de HMA dentro de las raíces, pero capaces de desarrollar altos niveles de colonización en ambas especies, mientras que en invierno el número de biotipos de HMA fue mayor, pero presentaron menores porcentajes de colonización. Con respecto al potencial micorrícico (esporas de HMA en el suelo), sería interesante en futuros trabajos evaluar cómo varían la abundancia y la riqueza de esporas con respecto a la estación del año, para conocer por un lado cómo se ven afectadas por este factor y por otro, si existe una correlación con la diversidad encontrada a nivel de raíz.

El presente trabajo deja planteadas interrogantes sobre la implicancia de las interacciones micorrícicas en las respuestas de las especies vegetales frente a uno de las principales prácticas agronómicas de nuestro país como es el agregado de P, ya que una reducción de la micorrización podría alterar las relaciones de competencia, perjudicando el desempeño de algunas especies vegetales y favoreciendo el crecimiento de otras.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar C, Casanova O, Bordoli J. 2004. Evaluación de la micorrización y la fertilización fosfatada en Lotus Rincón. En: Memorias de la XX Reunión del grupo Técnico Regional del Cono Sur en el Mejoramiento y Utilización de los Recursos Forrajeros del Área Subtropical y Tropical – Grupo Campos; Salto, Uruguay. Salto: UR. pp. 281 - 282.
- Alguacil M, Lozano Z, Campoy M, Roldán A. 2010. Phosphorus fertilisation management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (7): 1114–1122.
- Alguacil M, Lumini E, Roldán A, Salinas-García J, Bonfante P, Bianciotto V. 2008. The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in crop fields in subtropical conditions. *Ecological Applications*, 18 (2): 527-536.
- Alkan N, Gadkar V, Yarden O, Kapulnik Y. 2006. Analysis of quantitative interactions between two species of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6): 4192–4199.
- Avis P, Dickie I, Mueller G. 2006. A “dirty” business: testing the limitations of TRFLP analysis of soil fungi. *Molecular Ecology*, 15 (3): 873– 882
- Anderson R, Hetrick B, Wilson G. 1994. Mycorrhizal dependence of *Andropogon gerardii* and *Schizachyrium scoparium* in two prairie soils. *American Midland Naturalist*, 132: 366–376.
- Baeza S, Baldassini P, Bagnato C, Pinto P, Paruelo J. 2014. Caracterización del uso / cobertura del suelo en Uruguay a partir de series temporales de imágenes MODIS. *Agrociencia Uruguay*, 18(2), 95–105.
- Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124 (3): 949–958.

- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y. 1998. Branched adsorbing structures BAS: a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 139 (139): 375–388.
- Baon J. 1994. Phosphorus uptake and growth of barley as affected by soil temperature and mycorrhizal infection. *Journal of plant nutrition*, 17(2): 2–3.
- Beauregard M, Gauthier P, Hamel, Zhang, Welacky, Tan S, St-Arnaud M. 2013. Various forms of organic and inorganic P fertilizers did not negatively affect soil- and root-inhabiting AM fungi in a maize-soybean rotation system. *Mycorrhiza*, 23(2): 143–54.
- Beauregard M, Hamel C, Nayyar A, St-Arnaud M. 2010. Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. *Microbial Ecology*, 59 (2): 379–89.
- Bender S, Conen F, van der Heijden M. 2015. Mycorrhizal effects on nutrient cycling, nutrient leaching and N₂O production in experimental grassland. *Soil biology and biochemistry*, 80 (2015): 283–292.
- Benech E. 1975. Estudios sobre producción y calidad del forraje en dos biotipos de *Paspalum dilatatum* Poir. Tesis de Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 84p.
- Bentivenga S, Hetrick B. 1992. Seasonal and temperature effects on mycorrhizal activity and dependence of cool-season and warm-season tallgrass prairie grasses. *Canadian Journal of Botany*, 70 (8): 1596–1602.
- Berretta E, Risso D, Levratto J, Zamit W. 1998. Mejoramiento de campo natural de basalto fertilizado con nitrógeno y fósforo. En: Berretta, E.J. (Ed.). Seminario de Actualización en tecnologías para Basalto. Montevideo. INIA Tacuarembó Serie Técnica Nro. 102. 63-73.
- Berretta E. 1997. Producción de pasturas naturales en el basalto. Características de las principales especies de estos suelos. En: Gómez Miller R, Albicette M. (Eds.). Seminario de Actualización en tecnologías para Basalto. (INIA Tacuarembó Serie Técnica Nro. 151). 24-26.

- Bethlenfalvay G, Thomas R, Dakkessian S, Brown M, Ames R. 1988. Mycorrhizae in stressed environments: effects on plant growth, endophyte development, soil stability and soil water. En: Whitehead E, Hutchinson C, Timmermann B, Varady R. (Eds.). *Arid Lands: Today and Tomorrow*. Boulder: Westview Press. 1015-1035.
- Bethlenfalvay G, Dakessian S. 1984. Grazing effects on mycorrhizal colonization and floristic composition of the vegetation on a semiarid range in northern Nevada. *Journal of Range Management*, 37 (4): 312-316.
- Bethlenfalvay G, Bayne H, Pacovsky R. 1983. Parasitic and mutualistic associations between mycorrhizal fungus and soybean: the effect of phosphorous on host plant-endophyte interactions. *Physiologia Plantarum*, 57 (4): 543-548.
- Bever J. 2002. Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. *Plant and Soil*, 244 (1): 281–290.
- Bever J, Schultz P, Pringle A, Morton J. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience*, 51 (11): 923–931.
- Bever J, Morton J, Antonovics J, Schultz P. 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *The Journal of Ecology*, 84 (5): 71–82.
- Bowen G. 1987. The biology and physiology of infection and its development. En: Safi G. (Ed.). *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Florida: CRC Press. 27–70.
- Brundrett M. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320 (1): 37–77.
- Brundrett M, Piche Y, Peterson R. 1985. A developmental study of the early stages in vesicular arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany*, 63 (1):184-194.
- Bungenstab E. 2009. Productivity, nutritive, quality and utilization of Dallis Grass (*Paspalum dilatatum*) for beef cattle production as influenced by fertilization regime

- and grazing management. Tesis Doctorado. Auburn, Alabama. Auburn University. 104p.
- Burson B. 1991. Genome relationships between tetraploid y hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. Botanical Gazette, 152 (2): 219-223
- Carámbula M. 2004. Pasturas y forrajes, manejo, persistencia y renovación de pasturas. Montevideo: Hemisferio Sur. 413 p.
- Chen Y, Zhang X, Ye J, Han H, Wan S, Chen B. 2014. Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in Inner Mongolia. Soil Biology and Biochemistry, 69 (2014): 371–381.
- Colombo R, Fernández Bidondo L, Silvani V, Carbonetto M, Rascovan N, Bompadre M, Pégola M, Cuenca G, Godeas A. 2014. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in soil from the Pampa Ondulada, Argentina, assessed by pyrosequencing and morphological techniques. Canadian Journal of Microbiology, 60 (12): 819-827
- Courtney K, Bainard L, Sikes B, Koch A, Maherali H. 2012. Determining a minimum detection threshold in terminal restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of Microbiological Methods, 88 (1): 1–10.
- Covacevich F, Echeverria H, Andreoli E. 1995. Micorrización vesículo-arbuscular espontánea en trigo en función de la disponibilidad de fósforo. Ciencia del Suelo (2), 13: 47-51.
- Culman S, Bukowski R, Gauch H, Cadillo-Quiroz H, Buckley D. 2009. T-REX: Software for the Processing and Analysis of T-RFLP data. BioMed Central Bioinformatics, 10 (1): 171.
- da Costa D, Scheffer-Basso SM. 2003. Caracterização Morfofisiológica e Agronômica de *Paspalum dilatatum* Poir. Biótipo Virasoro e *Festuca arundinacea* Schreb. 1. Desenvolvimento Morfológico. Revista Brasileira de Zootecnia, 32 (2): 1054-1060.
- Daft M, Hogarth B. 1983. Competitive interactions amongst four species of *Glomus* on maize and onion. Transactions of the British Mycological Society, 80 (3): 339–345.

- Daft M, Chilvers M, Nicolson T. 1980. Mycorrhizas of the Lilliflorae. I. Morphogenesis of *Endymion non-scriptus* L. Garcke and its mycorrhizas in nature. *New phytologist*, 85 (2): 181–189.
- Daft M, El Giahmi A. 1978. Effects of arbuscular mycorrhiza on plant growth. VIII. Effects of defoliation and light on selected hosts. *New Phytologist*, 80 (2): 365–372.
- Dai M, Bainard L, Hamel C, Gan Y, Lynch D. 2013. Impact of Land Use on Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Rural Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (21): 6719 – 6729.
- Daniels B, Skipper H. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. En: Schenck N. (Ed.). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. St Paul: American Phytopathological Society. 29-37
- Davison J, Öpik M, Zobel M, Vasar M, Metsis M, Moora M. 2012. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary through- out the growing season. *PLoS One*, 7 (8): e41938.
- Desiro A, Duckett J, Pressel S, Villarreal J, Bidartondo M. 2013. Fungal symbioses in hornworts: a chequered history. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 280 (1759): 1-8.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. 2014. *InfoStat versión 2014*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dickie I, FitzJohn R. 2007. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 17 (4): 259–270.
- Dong Y, Zhu H. 2005. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods in Molecular Medicine*, 108: 149-57.
- Douds D, Pfeffer P, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon partitioning, cost and metabolism of arbuscular mycorrhizas. En: Kapulnik Y, Douds D. (Eds.). *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 107–129.

- Douhan G, Petersen C, Bledsoe C, Rizzo D. 2005. Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza*, 15 (5): 365–372.
- Endresz G, Somodi I, Kalapos T. 2013. Arbuscular mycorrhizal colonization of roots of grass species differing in invasiveness. *Community Ecology*, 14 (1): 67-76.
- Evers G, Burson B. 2004. Dallisgrass and other *Paspalum* species. En: Moser L, Burson B, Sollenberger L. (Eds.). *Warm-Season (C4) Grasses*. Madison: Agronomy Monograph. 681- 713.
- Faber B, Zasoski R, Munns D, Shackel K. 1991. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Canadian Journal of Botany*, 69 (1): 87–94.
- Ferrando M, Mercado G, Hernández J. 2002. Dinámica del hierro y disponibilidad de fósforo durante períodos cortos de anaerobiosis en los suelos. *Agrociencia Uruguay*, 6: 1 - 9.
- Fitter A. 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology*, 93 (2): 231–243.
- Frenot Y, Bergstrom D, Gloaguen J, Tavenard R, Strullu D. 2005 The first record of mycorrhizae on sub-Antarctic Heard Island: a preliminary examination. *Antarctic Science*, 17 (2):205–210
- Friese C, Allen M. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*, 83 (3): 409–418.
- Gadkar V, Rillig M. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters*, 263 (1): 93–101.
- Gallaud I. 1905. Études sur les mycorrhizes endotrophes. *Revue Générale de Botanique*, 17: 5–48, 66–83, 123–135, 223–239, 313–325, 425–433, 479–500.
- García S, Pezzani F, Rodríguez A, del Pino A. 2016. Micorrizas en gramíneas nativas: efecto de la fertilización fosfatada a largo plazo. *Agrociencia Uruguay*, 20 (1): 7-16.

- García S. 2012. Respuestas de la colonización micorrícica a los componentes del pastoreo en *Paspalum dilatatum* (Poir). Tesis Lic. Cs. Biológicas, Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 29p.
- Gemma J, Koske R, Carreiro M. 1989. Seasonal dynamics of selected species of V-A mycorrhizal fungi in a sand dune. *Mycological Research*, 92 (3): 317-321.
- Gerdemann J. 1961. A species of endogone from corn causing vesicular arbuscular mycorrhiza. *Mycologia*, 53 (3): 254-261.
- Gerdemann J. 1955. Relation of a large soil-borne spore to phycomycetous mycorrhizal infections. *Mycologia*, 47 (5): 619-632.
- Gehring C, Whitham T. 1994. Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 9 (7): 251-255.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Strani P. 2004. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 164 (1): 175–181.
- Gobbato E. 2015. Recent developments in arbuscular mycorrhizal signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 26: 1–7.
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, 14 (2): 111–117.
- Gosling P, Hodge A, Goodlass, G, Bending G. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 113 (1-4): 17-35.
- Grime J, Mackey J, Hillier S, Read D. 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature*, 328 (6129): 420-422.
- Guadarrama P, Castillo S, Ramos-Zapata J, Hernández-Cuevas L, Camargo-Ricalde S. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: The effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. *Pedobiologia*, 57(2): 87–95.

- Hammer O, Harper D, Ryan P. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9.
- Hannula S, de Boer W, van Veen J. 2010. In situ dynamics of soil fungal communities under different genotypes of potato, including a genetically modified cultivar. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (12): 2211–2223.
- Harley J. 1991. The history of research on mycorrhiza and the part played by Professor Beniamino Peyronel. En: Fontana A. (Ed.). *Fungi, Plants and Soil. A review of forty years' research at the Soil Mycology Centre on the centenary of the birth of its founder Beniamino Peyronel*. Torino: Centro di Studio sulla Micologica del Torreno del CNR. 31–47
- Harper J, Hawksworth D. 1995. Preface. En: Hawksworth D. (Ed.). *Biodiversity: Measurement and Estimation*. London: Chapman y Hall. 5-12.
- Harrison M. 2005. Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Annual Review of Microbiology*, 59: 19–42.
- Hart M, Reader R. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153: 335–344.
- Hartnett D, Wilson G. 2002. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and soil*, 244 (1): 319-331.
- Hartnett D, Wilson G. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology*, 80 (4): 1187-1195.
- Hartnett D, Hetrick B, Wilson G, Gibson D. 1993. Mycorrhizal Influence on Intra- and Interspecific neighbour interactions among co- occurring prairie grasses. *British Ecological Society*, 81 (4): 787–795.
- Hawkes C V, Belnap J, D'Antonio C, Firestone MK. 2006. Arbuscular mycorrhizal assemblages in native plant roots change in the presence of invasive exotic grasses. *Plant and Soil*, 281: 369 – 380.
- Helgason T, Merryweather J, Denison J, Wilson P, Young J, Fitter A. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, 90 (2): 371–384.

- Helgason T, Daniell T, Husband R, Fitter A, Young J. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394 (6702): 431.
- Hempel S, Renker C, Buscot F. 2007. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology*, 9 (8):1930–1938.
- Hepper C. 1981. Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New phytologist*, 88 (4): 641–647.
- Hernández J, Meurer EJ. 2000. Phosphorus availability in six Uruguayan soils affected by alternation of the flooded-drained conditions. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 19 - 26
- Hernández J, Otegui O, Zamalvide J. 1995. Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos de Uruguay. En: Hernández J. ed. *Boletín de Investigaciones N°43*. Montevideo. Facultad de Agronomía. 32p.
- Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mader P, Wiemken A, Redecker D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular ecology*, 15 (8): 2277–2289.
- Hodge A, Storer K. 2014. Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and Soil*, 386 (1-2): 1-19.
- Hodge A, Fitter A. 2010. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (31): 13754 –13759.
- Hoeksema J, Chaudhary V, Gehring C, Johnson N, Karst J, Koide R, Pringle A, Zabinski C, Bever J, Moore J. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13: 394 – 407.
- Hoeksema J. 1999. Investigating the disparity in host specificity between AM and EM fungi: lessons from theory and better-studied systems. *Oikos*, 84 (2): 327–332.
- Hurston C, Crawford R, Garland J, Lipson D, Mills A, Stetzenbach L. 2007. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington D.C.: ASM Press. 1293 p.
- Husband R, Herre A, Turner S, Gallery R, Young J. 2002. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology*, 11 (12): 2669–2678.

- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). 2015. Banco de Información Agroclimática. [En línea]. 23 febrero 2015. Disponible en: <http://www.inia.uy/investigaci%C3%B3n-e-innovaci%C3%B3n/unidades/GRAS/Clima/Banco-datos-agroclimatico>
- Janse J. 1897. Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises. *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg*, 14: 53–201
- Jaurena M, Lezama F, Salvo L, Cardozo G, Ayala W, Terra J, Nabinger C. 2015. The dilemma of improving native grasslands by overseeding legumes: production intensification or diversity conservation. *Rangeland Ecology and Management*, 69 (1):35-42.
- Jaurena M, Ayala W, Terra J, Bermúdez R, Lagomarcino X. 2008a. Impacts of long-term phosphorus fertilization and addition of perennial legumes on a temperate natural grassland: I. Changes in species biodiversity and stability. En: XXI International Grassland and VIII International Rangeland Congress; 28 - 29 junio, 2008; Hohhot, Inner Mongolia, China. Vol. 1. Hohhot: Guangdong People's Publishing House. pp. 82.
- Jaurena M, Salvo L, Terra J, Ayala W, Bermúdez R, Barrios E, Lezama F. 2008b. Cambios en el largo plazo de características de suelo y vegetación de mejoramientos de campo natural. En: XXII Reunión del Grupo Técnico en Forrajeras del Cono Sur (Grupo Campos); 21 - 23 octubre, 2008; Minas, Uruguay. Montevideo: INIA. pp. 188.
- Jayachandran K, Shetty K. 2003. Growth response and phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizae of wet prairie sawgrass. *Aquatic Botany*, 76 (4): 281-290.
- Johnson D, Vandenkoornhuyse P, Leake J, Gilbert L, Booth R, Grime J, Young J, Read D. 2003. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New phytologist*, 161 (2): 503–515.
- Johnson N, Graham J, Smith F. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135 (4): 575-585.
- Kahiluoto H, Ketoja E, Vestberg M, Saarela I. 2001. Promotion of AM utilization through reduced P fertilization 2. Field studies. *Plant and Soil*, 231 (1): 65–79.

- Karanika E, Mamolos A, Alifragis D, Kalburtji K, Veresoglou D. 2008. Arbuscular mycorrhizas contribution to nutrition, productivity, structure and diversity of plant community in mountainous herbaceous grassland of northern Greece. *Plant Ecology*, 199 (2): 225–234.
- Klironomos J. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84 (9): 2292–2301.
- Klironomos J, Hart M. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12 (4): 181–184.
- Klironomos J, McCune J, Hart M, Neville J. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters*, 3 (2): 137–141.
- Koljalg U, Nilsson R, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor A, Bahram M, Bates S, Bruns T, Bengtsson-Palme J, Callaghan T. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22 (21): 5271–5277.
- Koske R, Gemma J. 1990 VA mycorrhizae in strand vegetation of Hawaii: evidence for long-distance codispersal of plants and fungi. *American Journal of Botany*, 77 (4): 466–474.
- Koske R, Gemma J. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, 92 (4): 486-505.
- Lambers H, Chapin S, Pons T. 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2nd edition. New York: Springer-Verlag. 604 p.
- Law R. 1985. Evolution in a mutualistic environment. En: Boucher D (Eds.). *The Biology of Mutualism*. London: Croom Helm. 145–170
- Lekberg Y, Koide RT. 2005. Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist*, 168: 189 – 204.
- Ligrone R, Carafa A, Lumini E, Bianciotto V, Bonfante P, Duckett J. 2007. Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular cellular and taxonomic analysis. *American Journal of Botany*, 94 (11): 1756–1777.

- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H. 2012. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north china revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science and Technology*, 46 (11): 5764–5771.
- Liu W, Marsh T, Cheng H, Forney L. 1997. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (11): 4516–4522.
- Liu Y, Shi G, Mao L, Cheng G, Jiang S, Ma X, An L, Du G, Collins N, Feng H. 2012. Direct and indirect influences of 8 yr of nitrogen and phosphorus fertilization on *Glomeromycota* in an alpine meadow ecosystem. *New Phytologist*, 194 (2): 523–535
- Lugo González D, Aguilar V, Casotto M, Laurentin A, Gómez A. 2013. Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales: bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63 (3): 232–239.
- Lugo M, González Maza M, Cabello M. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland II: seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycologia*, 93: 407- 415.
- Magurran A. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Malden: Blackwell Publishing. 255p.
- Margalef R. 1972. Homage to Evelyn Hutchinson, or why is there an upper limit to diversity? *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 44: 211-235.
- Martensson A, Carlgren K. 1994. Impact of phosphorus fertilization on VAM diaspores in two Swedish long-term field experiment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 47 (4): 327–334.

- Martínez L, Pugnaire F. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi host preference and site effects in two plant species in a semiarid environment. *Applied Soil Ecology*, 48 (3): 313–317.
- Martínez L, Pugnaire F. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Revista Ecosistemas*, 18 (2): 44–54.
- Marulanda A, Azcón R, Ruiz-Lozano J. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119 (4): 526–533.
- Merryweather J, Fitter A. 1998. Patterns of arbuscular mycorrhizal colonization of the roots of *Hyacinthoides non-scripta* after disruption of soil mycelium. *Mycorrhiza*, 8 (2): 87–92.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2015. División Contralor de Semovientes. [En línea]. Consultado 20 agosto 2016. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgsg,dgsg-dicose-datos-de-la-declaracion-jurada-2015,O,es,0>.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). 2011. Censo General Agropecuario. [En línea]. 30 octubre 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-censo-2011-resultados-definitivos>.
- Miller R, Jastrow J. 2002. Mycorrhizal influence on soil structure. En: Kapulnik Y, Douds D. (Eds.). *Arbuscular Mycorrhizae: Molecular Biology and Physiology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 3–18.

- Millot J, Risso D, Methol R. 1987. Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. En: Millot, J ed. Informe técnico para la Comisión Honoraria del Plan Agropecuario. Montevideo. MAP. 199p.
- Mosse B. 1953. Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. *Nature*, 171 (4371): 974.
- Mueller-Dombois D, Ellenberg H. 1974. *Aims and methods of vegetation ecology*. New York: Wiley. 547 pp.
- Mummey D, Rillig M. 2007. Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 70 (1): 200–204.
- Mummey D, Rillig M. 2006. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil*, 288 (1): 81–90.
- Mummey D, Rillig M, Holben W. 2005. Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. *Plant and Soil*, 271 (1): 83-90.
- Muyzer G, De Waal E, Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3): 695-700.
- Newman E. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, 3 (1):139–145.
- Newsham K, Fitter A, Watkinson A. 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution*, 10 (10): 407–411.
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bosch R, van der Heijden M, Sieverding E. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (85): 724–738.

- Öpik M, Zobel M, Cantero J, Davison J, Facelli J, Hiiesalu I, Jairus T, Kalwij J, Koorem K, Leal M. 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 23 (5): 411–430.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel, M. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of ecology*, 94 (4): 778–790.
- Parodi G, Pezzani F. 2011. Micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas de Uruguay en áreas con y sin pastoreo. *Agrociencia Uruguay*, 15 (2): 1-10.
- Paszkowski U. 2006. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. *New Phytologist*, 172 (1): 35–46.
- Pezzani F, del Pino A, Lezama F, Rodriguez M, Garcia S, Parodi G. 2012. Interacciones complejas: micorrizas arbusculares y fósforo en pastizales naturales de Uruguay [En línea]. En: VII Simposio Nacional y IV Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrízica; 27 - 30 mayo, 2012; Xalapa. México. Consultado 19 febrero 2016. Disponible en: <http://www.uv.mx/Simbiosis-Micorrizica/resumenes.html>.
- Pezzani F, Montaña C, Guevara R. 2006. Associations between arbuscular mycorrhizal fungi and grasses in the successional context of a two-phase mosaic in the Chihuahuan Desert. *Mycorrhiza*, 16 (4): 285-295.
- Pearson J, Abbott L, Jasper D. 1993. Mediation of competition between two colonizing VA mycorrhizal fungi by the host plant. *New Phytologist*, 123 (1): 93-98.
- Pielou E. 1975. *Ecological Diversity*. New York: Wiley InterScience. 165p
- Pielou E. 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology*. New York: Wiley. 286p.
- Purin S, Rillig M. 2007. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* (2), 51: 123-130.
- Ranjard L, Poly F, Lata J, Mougél C, Thioulouse J, Nazaret S. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10): 4479-4487.

- Redecker D, Raab P, Oehl F, Camacho F, Courtecuisse R. 2007. A novel clade of sporocarp-forming species of glomeromycotan fungi in the *Diversisporales* lineage. *Mycological Progress*, 6: 35–44.
- Rosendahl S, Stukenbrock E. 2004. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology*, 13 (10): 3179–3186.
- Rosengurt B. 1979. Tablas de comportamiento de las especies de plantas de campos naturales en el Uruguay. Montevideo: Facultad de Agronomía. 86p.
- Rosewarne G, Barker S, Smith S. 1997. Production of near-synchronous fungal colonization in tomato for developmental and molecular analyses of mycorrhiza. *Mycological Research*, 101 (8): 966–970.
- Rosier C, Piotrowski J, Hoyer A, Rillig M. 2008. Intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization. *Pedobiologia - International Journal of Soil Biology*, 52 (1): 41-50
- Salvo L, Terra J, Ayala W, Bermudez R, Correa J, Avila P, Hernández J. 2008. Long-term phosphorous fertilization and perennials legumens addition impacts on a temperate natural grassland: II. Total and particulate soil organic carbon. En: XXI International Grassland and VIII International Rangeland Congress; 28 - 29 junio 2008; Hohhot, Inner Mongolia, China. Vol. 1. Hohhot: Guangdong People's Publishing House. pp. 382.
- Sanders F, Sheikh N. 1983. The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems. *Plant and Soil*, 71 (1): 223–246.
- Sanders F, Tinker P. 1971. Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizas. *Nature*, 233 (43): 278-279.
- Sanders I, Fitter A. 1992. Evidence for differential responses between host–fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. *Mycological Research*, 96 (6): 415–419.
- Sanjurjo L. 2009. Actividad y diversidad microbiana del suelo bajo distintas intensidad de uso. Tesis Mag. Cs. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 115p.

- Santos-González J, Finlay R, Tehler A. 2007. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (17): 5613–23.
- Schausberger P, Peneder S, Jürschik S, Hoffmann D. 2012. Mycorrhiza changes plant volatiles to attract spider mite enemies. *Functional Ecology*, 26 (2), 441–449.
- Schüssler A. 2014. Glomeromycota: species list. [En línea]. 07 diciembre 2015. Disponible en: <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo>.
- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105 (12): 1413–1421.
- Shannon C, Weaver W. 1949. *The mathematical theory of communication*. Urbana, IL: University of Illinois Press. 125p.
- Sharma M, Buyer J. 2015. Comparison of biochemical and microscopic methods for quantification of arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots. *Applied Soil Ecology*, 95: 86-89.
- Sheng M, Lalande R, Hamel C, Ziadi N. 2013. Effect of long-term tillage and mineral phosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal fungi in a humid continental zone of Eastern Canada. *Plant and Soil*, 369 (1-2): 599–613.
- Simpson E. 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163 (4148): 688.
- Singh B, Munro S, Reid E, Ord B, Potts J, Paterson E, Millard P. 2006. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science*, 57 (1):72–82.
- Smith S, Smith F. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 227–250.
- Smith S, Read D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. New York: Academic Press. 787 pp.
- Smith S, Gianinazzi-Pearson V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 221—244.

- Stearn S. 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press. New York.
- Stribley DP, Tinker PB, Rayner JH. 1980. Relation of internal phosphorus concentration and plant weight in plants infected by vesicular arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, 86: 261 - 266.
- Suzuki M, Rappé M, Giovannoni S. 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11): 4522-4529.
- Torrecillas E, Alguacil M, Roldan A. 2012. Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (17): 6180–6186.
- Toth R. 1992. The quantification of arbuscules and related structures using morphometric cytology. En: JR Norris, DJ Read, Varma AK. [Eds.]. *Methods in Microbiology*. Vol. 24. London: Academic Press. pp. 275 – 299.
- Trouvelot S, Tuinen D, Gianinazzi-pearson M. 1999. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza*, 8 (4): 203–206.
- Tuomi J, Kytöviita M, Härdling R. 2001. Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos*, 92 (1): 62-70.
- van Aarle I, Cavagnaro T, Smith S, Smith F, Dickson S. 2005. Metabolic activity of *Glomus intraradices* in Arum- and Paris-type arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytologist*, 166 (2): 611–618.
- van der Gast C, Gosling P, Tiwari B, Bending G. 2011. Spatial scaling of arbuscularmycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice. *Environmental Microbiology*, 13 (1): 241-249.
- van der Heijden M, Martin F, Selosse MSI, Sanders I. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205: 1406–1423.

- van der Heijden M, Bardgett R, Van Straalen N. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11 (3): 296–310.
- van der Heijden M, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller K, Wiemken K, Sanders I. 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172 (4): 739–752.
- van der Heijden M, Wiemken A, Sanders I. 2003. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytologist*, 157 (3): 569–578.
- van der Heijden M, Boller T, Wiemken A, Sanders I. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*, 79 (6): 2082–2091.
- Vandenkoornhuyse P, Ridgway K, Watson I, Fitter A, Young J. 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, 12 (11): 3085–3095.
- Varma A. 2008. *Mycorrhiza*. Berlin: Springer-Verlag. 797p.
- Verbruggen E, Roling W, Gamper H, Kowalchuk G, Verhoef H, van der Heijden M. 2010. Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist*, 186 (4): 968–979.
- Veresoglou S, Shaw L, Hooker J, Sen R. 2012. Arbuscular mycorrhizal modulation of diazotrophic and denitrifying microbial communities in the mycorrhizosphere of *Plantago lanceolata*. *Soil Biology and Biochemistry*, 53: 78–81.
- Violi H, Barrientos-Priego A, Wright S, Escamilla-Prado E, Morton J, Menge J, Lovatt C. 2008. Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforests

- in Veracruz and Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management* 254 (2008): 276–290.
- Wilson G, Hartnett D. 1998. Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany*, 85 (12): 1732–1738
- Wilson J, Tommerup I. 1992. Interactions between fungal symbionts: VA mycorrhizae. En: Allen M. (Ed.). *Mycorrhizal Functioning*. London: Chapman and Hall. 199–248
- Wolfe B, Klironomos J. 2005. Breaking new ground: soil communities and exotic plant invasion. *Bioscience*, 55: 477 – 487.
- Wubet T, Weiss M, Kottke I, Teketay D, Oberwinkler F. 2004. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Prunus africana*, an endangered medicinal tree species in dry Afromontane forests of Ethiopia. *New Phytologist*, 161 (2): 517–528.
- Zhu Y, Miller R. 2003. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends in Plant Science*, 8 (9): 407–409.
- Zoetendal E, Akkermans A, De Vos W. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10): 3854-3859.