



Tesis doctoral

Rol de los hongos micorrícicos arbusculares en el crecimiento e interacciones intra e interespecíficas entre especies forrajeras ante fertilización fosforada.

Ing. Agr. Tomás Chippano

Laboratorio de Nutrición Vegetal y Micorrizas Arbusculares
Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia – CONICET

Directora: Dra. Ileana García

Co-Director: Ing. Agr. Rodolfo Mendoza

Asesora académica: Dra. Marcela Ruscitti

Índice

I –Resumen.....	5
II- Abstract.....	8
III- Agradecimientos.....	11
IV- Trabajos publicados.....	12
1- Introducción.....	13
1.1- Cuenca del Río Salado.....	14
1.2- Dinámica del fósforo en el suelo.....	22
1.3- Simbiosis micorrícica arbuscular.....	24
1.4- Fertilización fosforada.....	26
1.5- Interacciones planta-planta.....	29
2- Objetivo general.....	33
3- Capítulo 1: Efecto del incremento de la disponibilidad de P en el suelo sobre el crecimiento, la colonización micorrícica arbuscular en las raíces de especies forrajeras y la infectividad micorrícica del suelo.	
3.1- Resumen.....	34
3.2- Introducción.....	36
3.3- Objetivos.....	43
3.4- Hipótesis.....	44
3.5- Materiales y métodos.....	45
3.6- Resultados.....	53
3.7- Discusión.....	65
3.8- Conclusiones.....	76

4- Capítulo 2: Rol de los hongos MA en el crecimiento y absorción de P de especies forrajeras con diferente metabolismo carbonado ante fertilización fosforada.

4.1- Resumen.....	78
4.2- Introducción.....	79
4.3- Objetivos.....	82
4.4- Hipótesis.....	82
4.5- Materiales y métodos.....	83
4.6- Resultados.....	87
4.7- Discusión.....	99
4.8- Conclusiones.....	107

5- Capítulo 3: Los hongos micorrícicos arbusculares nativos mejoran el crecimiento de plántulas de *L. tenuis* en la medida que disminuye la competencia con plantas adultas conespecíficas.

5.1- Resumen.....	109
5.2- Introducción.....	111
5.3- Objetivos.....	114
5.4- Hipótesis.....	114
5.5- Materiales y métodos.....	116
5.6- Resultados.....	122
5.7- Discusión.....	132
5.8- Conclusiones.....	140

6- Capítulo 4: Rol de los hongos micorrícicos arbusculares en las interacciones de competencia y/o facilitación entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* ante fertilización fosforada.

6.1- Resumen.....	141
6.2- Introducción.....	143
6.3- Objetivos.....	148
6.4- Hipótesis.....	148
6.5- Materiales y métodos.....	149
6.6- Resultados.....	153
6.7- Discusión.....	165
6.8- Conclusiones.....	173
7- Conclusiones.....	174
8- Consideraciones finales.....	176
9- Bibliografía.....	178

I- Resumen

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar el rol que cumplen los hongos micorrícicos arbusculares (MA) nativos de un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado sobre la absorción de P y el crecimiento de especies forrajeras con diferente metabolismo carbonado ante fertilización fosforada, como así también sobre las interacciones de competencia y/o facilitación intra e interespecíficas. Para ello se llevaron a cabo 5 ensayos ante condiciones controladas de invernáculo utilizando un suelo deficiente en P de un pastizal natural de la Cuenca del Río Salado. En primer lugar se estudió el efecto del incremento de la disponibilidad de P en el suelo sobre el crecimiento, morfología radical y colonización por hongos MA nativos en tres especies: una leguminosa, *L. tenuis* y dos gramíneas con diferente metabolismo carbonado, *S. arundinaceus* (C3) y *P. coloratum* (C4). En forma conjunta al mencionado objetivo se analizó el efecto de una dosis baja de fertilizante fosforado sobre la infectividad micorrícica del suelo. También se analizó el efecto de una dosis baja y alta de fertilizante fosforado en combinación con la comunidad nativa de hongos MA sobre el crecimiento y absorción de P para dichas especies forrajeras. En cuanto a la interacción entre especies y la comunidad MA se estudió el efecto de la defoliación y el rol de los hongos MA sobre las interacciones de competencia y/o facilitación entre plantas adultas de *L. tenuis* y plántulas conespecíficas. Además se analizó el efecto del agregado de una dosis baja de fertilizante fosforado sobre el rol de la comunidad de hongos MA, la calidad y cantidad de biomasa producida por la consociación de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* y las interacciones de competencia y/o facilitación entre ambas especies.

La fertilización fosforada es necesaria para incrementar la producción de biomasa en los suelos deficientes en P de la Cuenca del Río Salado, pero las dosis altas de P disminuyeron la colonización MA y los beneficios de la simbiosis en las tres especies estudiadas. Disminuir las dosis de P aplicadas que sitúen al P disponible en el suelo dentro de un rango de 10-20 mgP kg⁻¹ permite incrementar la producción de biomasa y disminuir el efecto negativo sobre la colonización MA y los beneficios de la simbiosis, principalmente en *L. tenuis*, mientras que para las gramíneas es más difícil alcanzar el equilibrio, especialmente para *S. arundinaceus*. Además, la dosis baja a moderada ensayada (15 mgP kg⁻¹) permitió mantener la infectividad de la comunidad de hongos MA en el suelo. En relación a las estrategias que presentan las especies estudiadas para absorber P ante condiciones limitantes del nutriente, se determinó que la principal estrategia de *L. tenuis* es la simbiosis MA, mientras que la de *S. arundinaceus* es la alta capacidad de su sistema radical para explorar el suelo. La estrategia de *P. coloratum* no pudo ser explicada por los cambios en el largo radical específico o la asociación MA.

La comunidad de hongos MA favoreció el crecimiento de las plantas adultas de *L. tenuis* y disminuyó la habilidad competitiva de las plántulas conespecíficas, observándose un aumento del beneficio de los hongos MA sobre el crecimiento y nutrición fosforada de las plántulas en la medida que incrementó la intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas. El beneficio de la asociación con hongos MA fue máximo en el caso de las plántulas crecidas en ausencia de competencia. Los hongos MA contribuirían a regular el crecimiento de las plántulas, y la defoliación intensa de plantas vecinas podría incrementar la habilidad competitiva en los primeros estadios de

crecimiento y de esta manera aumentar la presencia de la leguminosa en los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado.

En el caso del cultivo consociado entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus*, los hongos MA y la fertilización fosforada modificaron la interacción interespecífica entre ambas en favor de la gramínea. La simbiosis con hongos MA nativos incrementó la biomasa producida por *L. tenuis* tanto en cultivos puros como consociados, independientemente del agregado de fertilizante fosforado. Mientras que *S. arundinaceus* produjo la mayor cantidad de biomasa forrajera ante el agregado de fertilizante fosforado y en consociación con *L. tenuis*, independientemente de los hongos MA. La consociación de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* resultó una mejor alternativa en comparación con ambos cultivos puros ya que permitió incrementar la cantidad de biomasa producida en comparación con el cultivo puro de *L. tenuis* y aumentar la calidad del recurso forrajero en comparación con el cultivo puro de *S. arundinaceus*.

Los estudios realizados en la presente tesis podrían ser un primer paso para promover un manejo más sustentable de los pastizales y pasturas, logrando un incremento de la producción de biomasa junto con la preservación y aprovechamiento de los efectos benéficos de la simbiosis MA en la Cuenca del Río Salado.

II- Abstract

The general aim of this thesis was to investigate the role of native AM fungi of a P deficient soil of the Salado River Basin on plant growth and P uptake of forage species with different C metabolic pathway under P fertilization, as well also on competition and/or facilitation interactions between plants. Five greenhouse experiments were conducted with a P deficient soil of a natural grassland of the Salado River Basin. Firstly, it has been studied the effect of the increase of soil P availability on plant growth, root morphology and AM root colonization on three species: a legume, *Lotus tenuis* and two grasses with different C metabolic pathway, *Schedonorus arundinaceus* (C3) and *Panicum coloratum* (C4). Along with the aim, the effect of a low P doses on mycorrhizal soil infectivity was analyzed. Particularly, the combined effect of a low and high P dose and association with native AM fungi on plant growth and P uptake of the three mentioned species was also analyzed. Regarding the interactions between species and association with AM fungi, the effect of plant defoliation and association with AM fungi on plant interactions between *L. tenuis* adult plants and conspecific seedlings was studied. In addition, the combined effect of a low P doses and the association with AM fungi on quantity and quality forage production of *L. tenuis* and *S. arundinaceus* in mixed stands and the competition and/or facilitation interactions between both species was analyzed.

Phosphorus fertilization is needed to increase biomass production in P deficient soils of the Salado River Basin, but high P doses decrease AM root colonization and the benefits of AM symbiosis on the three studied species, mainly on grasses. The decrease of P doses applied allowed soil P availability

of 10-20 mgP kg⁻¹ and simultaneously increased biomass production and decreased the negative effects on AM root colonization and mycorrhizal benefits, mainly on *L. tenuis*, while for grasses it is difficult, especially for *S. arundinaceus*. In addition, the low P doses evaluated (15 mgP kg⁻¹) allow maintaining the AM soil infectivity. Regarding the strategies for P uptake of the three studied species under P limiting conditions, it was determined that the main strategy of *L. tenuis* was the AM symbiosis, whereas that of *S. arundinaceus* was the highest ability of the root system to explore the soil. The strategy of *P. coloratum* could not be explained by changes in specific root length or AM association.

AM fungal community favored the growth of *L. tenuis* adult plants and decreased the competitive ability of conspecific seedlings, showing an increase of AM benefits on plant growth and P nutrition of seedlings as the defoliation intensity of adult plants increases. The mycorrhizal benefits were highest on seedlings grown without competition. Competition between *L. tenuis* adult plants and seedlings for P mediated by AM fungi could be an important factor that may contribute to regulating the seedling growth of this legume in the Salado River Basin.

In the case of *L. tenuis* and *S. arundinaceus* mixed stands, AM fungi and P fertilization modified interspecific interactions in favor of the grass. The association with native AM fungi increased the biomass production of *L. tenuis* grown in pure and mixed stands, despite P fertilization. Whereas, *S. arundinaceus* showed the highest biomass production under P fertilization and mixed stands, despite AM association. *Lotus tenuis* and *S. arundinaceus* mixed stands was a better alternative than pure stands, since it allows increasing

quantity biomass production compared to *L. tenuis* pure stands and increase the quality biomass production compared to *S. arundinaceus* pure stands.

The studies of the present thesis would be an advantageous first step to promote better management of forage land sustainably while increasing forage production and preserve the beneficial effects of native AM communities in the Salado River Basin.

III- Agradecimientos

Eternamente agradecido con la vida, con la educación pública, gratuita y de calidad, y con todas aquellas personas que formaron parte de este camino de formación y crecimiento, tanto personal como profesional.

Simplemente: ¡GRACIAS!

IV- Trabajos publicados

-Chippano, T., García, I., Cofré, N., & Mendoza, R. (2020). Forage biomass yield and arbuscular mycorrhizal symbiosis in a legume and C3 and C4 grasses under increasing soil phosphorus availability. *Crop and Pasture Science*, 71(10), 907-915. <https://doi.org/10.1071/CP20030>

-Chippano, T., Mendoza, R., Cofré, N., & García, I. (2021). Divergent root P uptake strategies of three temperate grassland forage species. *Rhizosphere*, 17, 100312. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100312>

-Chippano, T., & García, I. (2022). El uso racional del fertilizante fosforado permite conservar la infectividad micorrícica de un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado. *Agronomía & Ambiente*, 42(1).

-Chippano, T., Mendoza, R., Cofré, N., & García, I. Arbuscular mycorrhizal fungi improve legume seedling performance as the competition with conspecific neighbouring adult plants decreases. *Rhizosphere*. Aceptado para su publicación (30-3-2022), en prensa. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100509>

1. Introducción

El fósforo (P) es uno de los nutrientes que se encuentra en mayor deficiencia en los pastizales templados del mundo y representa uno de los principales factores que limitan la producción forrajera (Muir y col., 2011). Además, la baja presencia de leguminosas en las comunidades vegetales que conforman los pastizales es otro factor importante que contribuye a disminuir la calidad y cantidad de biomasa producida (Muir y col., 2011; Vecchio y col., 2019). En la actualidad, la aplicación de fertilizantes fosforados inorgánicos es la herramienta más utilizada para incrementar la producción de forraje. Pero el incremento de la disponibilidad de fósforo actúa en detrimento de las comunidades fúngicas del suelo involucradas en la nutrición vegetal, como es el caso de los hongos micorrícicos arbusculares (MA) (Smith y Read, 2008).

Esta situación coincide con el escenario que se presenta en los pastizales de la Cuenca del Río Salado (República Argentina), donde la marcada deficiencia de P (Mendoza y col., 1983; Ginzo y col., 1986; Alvarez y col., 2018; 2019) y la baja presencia de leguminosas (Cahuépe, 2004) son dos de los principales factores que limitan la producción forrajera en la zona. Los hongos MA se asocian con más del 80% de las plantas terrestres y le confieren beneficios entre los cuales se destaca el incremento de la absorción de nutrientes poco móviles en el suelo como el P (Smith y Read, 2008). Varios estudios han reportado que la aplicación de fertilizante fosforado en suelos deficientes en fósforo de la región incrementa la biomasa producida pero disminuye la colonización por hongos MA nativos en las raíces de especies forrajeras (Mendoza y Pagani, 1997; Mendoza et al., 2009; Mendoza y col., 2016a, b). Por ello resulta interesante estudiar si disminuir la dosis de fósforo

aplicada permitiría incrementar la producción de biomasa y al mismo tiempo aprovechar los beneficios de la simbiosis MA sobre el crecimiento vegetal. Además evaluar el rol que cumplen los hongos MA en las interacciones intra e interespecíficas ante deficiencia de P como otro factor capaz de regular la presencia de leguminosas en los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado, y si la disminución de la dosis de P agregada modifica las interacciones de competencia y/o facilitación.

1.1 Cuenca del Río Salado

Ubicación y clima

La Cuenca del Río Salado es una de las regiones ganaderas más importantes de nuestro país, basada principalmente en el pastoreo de pastizales naturales y en menor medida de pasturas implantadas (Rearte, 2010). Está comprendida en las inmediaciones del Río Salado, situada principalmente sobre el sector septentrional de la Provincia de Buenos Aires (Fig. 1) (SSRH, 2002) y abarca una superficie aproximada de 170.000 km². El clima es templado subhúmedo con una precipitación media anual de 980 milímetros. En los meses estivales la evapotranspiración es mayor a la cantidad precipitada y en los meses invernales la relación es inversa (Vázquez y col., 2009). Esta situación, sumada a la escasa pendiente de la zona (menor a 0,1 %), la baja capacidad de infiltración de los suelos y la baja profundidad de la napa freática conduce a períodos de déficit y exceso hídrico moldeando a las comunidades vegetales (Damario y Pascale, 1988; Escudero y Mendoza, 2005; Vázquez y col., 2009; Di Bella y col., 2016).



Fig. 1 Ubicación de la Cuenca del Río Salado, (modificación Atlas Digital de Recursos Hídricos Superficiales de la República Argentina 2002).

Por motivos socioeconómicos, la agregación territorial entre agricultura y ganadería ocurrida en las últimas décadas en la Región Pampeana ha puesto en riesgo la sustentabilidad de los sistemas productivos. Esto se debe principalmente al avance de la actividad agrícola hacia las zonas con mayor aptitud de uso del suelo que provocó un desplazamiento de la actividad ganadera hacia los suelos con menor aptitud (Delvenne y col., 2013; García y col., 2018). Estos cambios implicaron aumentos significativos de la dotación de animales por unidad de superficie, no sustentados por la capacidad de carga actual, debido a la menor producción de forraje de esos ambientes (Agnusdei y Castaño, 2011; Jacobo y col., 2016). El aumento de la presión de pastoreo sobre los pastizales naturales de la Cuenca del Río Salado provoca el deterioro del recurso forrajero (Rearte, 2010) y del ambiente pastizal en su conjunto. Por lo tanto, el estudio de nuevas alternativas que permitan incrementar la producción y calidad forrajera para equilibrar los sistemas ganaderos de

manera sustentable es indispensable para la consolidación y viabilidad productiva de los agroecosistemas de la región.

Suelos y vegetación

El clima y los diferentes niveles topográficos presentes en la Cuenca del Río Salado determinan un mosaico de suelos entre los cuales han sido descritos: Argiudoles, Hapludoles, Natracuoles, Natralboles, Hapludoles taptó nátricos, Alfisoles, Pelluderts típicos, Cromuderts ácuicos, Argiacuoles y Argialboles (Panigatti, 2010). Estos suelos poseen diferentes tipos de drenaje y velocidad de infiltración del agua, presencia o ausencia de salinidad y/o sodicidad y un generalizado déficit nutricional para el crecimiento vegetal (García y Mendoza, 2008; Mendoza y col., 1983; Ginzo y col., 1986; Alvarez y col., 2018; 2019). La gran heterogeneidad geomorfológica y edafológica define ambientes en los cuales se desarrollan diferentes comunidades vegetales con una gran diversidad florística (Batista y col., 2005). Las comunidades vegetales que conforman los pastizales de la Cuenca del Río Salado han sido descritas por Burkart y col., (2005): Pradera de Mesófitas, Pradera húmeda de Mesófitas, Estepa de Halófitas y Pradera de Hidrófitas (Burkart y col., 2005). Estas comunidades están formadas casi en su totalidad por gramíneas C3 y C4 que permiten obtener una producción de forraje durante todo el año pero presentan una escasa presencia de leguminosas que limita la calidad del recurso forrajero (Cahuépe, 2004).

Las distintas comunidades que conforman los pastizales de la Cuenca del Río Salado también presentan especies exóticas y naturalizadas (Chaneton y col., 2002). Algunas de las especies naturalizadas son: *Lotus tenuis* Waldst. &

Kit, *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort, *Hordeum murinum* L., *Lolium multiflorum* Lam., *Lolium perenne* L., *Trifolium repens* L., entre otras (Roitman y Preliasco, 2012). Es importante destacar la relevancia que ha cobrado en la región la leguminosa *L. tenuis* debido a su elevada productividad, calidad y plasticidad (Cauhépé, 2004). Esta leguminosa es frecuentemente sembrada en consociación con *S. arundinaceus*, debido a su adaptación para crecer bajo condiciones de estrés abiótico comúnmente presentes en la Cuenca (Vignolio y col., 2010; Campestre y col., 2021; García 2021).

Por otra parte, existen especies que han sido introducidas en la región pero que aún no ha sido reportada su naturalización, como es el caso de *Panicum coloratum* L., *Chloris gayana* K., *Brachiaria spp.*, *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth y D.R.Dewey, entre otras (Roitman y Preliasco, 2012). En este sentido, es importante destacar la gran relevancia que han cobrado en los últimos años las especies megatérmicas (C4), en particular *P. coloratum*, debido a su elevada producción de biomasa y buena adaptación a los diferentes ambientes de la Cuenca, incluso en suelos salinos, salino-sódicos y deficientes en fósforo (Otondo 2011; Otondo y col., 2019).

Si bien existen trabajos que han evaluado la relación entre leguminosas, gramíneas C3 y C4 con hongos MA (Mendoza y Pagani, 1997; García y Mendoza, 2008; Cavagnaro y col., 2014; Mendoza y col., 2016a, b), aún no ha sido estudiado el rol de los hongos MA nativos de la Cuenca del Río Salado en el comportamiento de estas especies, en particular sobre gramíneas C3 naturalizadas como es *S. arundinaceus* o gramíneas C4 exóticas como es *P. coloratum*. Como así tampoco en las interacciones competitivas de leguminosas como *L. tenuis* crecidas en cultivos puros y consociados con una

gramínea C3 como *S. arundinaceus*. Por ello resulta interesante evaluar el rol de los hongos MA nativos sobre la nutrición y crecimiento vegetal a fin de indagar si existe algún efecto de facilitación por parte de la simbiosis MA en la adaptación de estas especies a los suelos de la Cuenca. Como así también la posible relación entre la simbiosis MA y la nodulación por bacterias fijadoras de nitrógeno.

Lotus tenuis Waldst & Kit.

Lotus tenuis fue introducida en Argentina desde Europa en la década de 1950 y se expandió naturalmente en la Cuenca del Río Salado favorecida por las inundaciones (Vignolio y col., 1995; Cauhépé, 2004; Frame 2005). En la década de 1980 ya estaba establecida en gran parte de la región (Vignolio y Fernández, 2006). Es una especie muy apreciada por los productores ganaderos debido a que es una de las pocas leguminosas presentes en la Cuenca que proporciona una producción de biomasa de buena calidad y palatabilidad (Cauhépé, 2004; Vignolio y col., 2010; Campestre y col., 2021). Además previene el meteorismo en rumiantes evitando que los gases queden retenidos en el rumen (McMahon y col. 2000). *Lotus tenuis* posee una gran plasticidad ya que se encuentra presente en los diferentes ambientes de la Cuenca (García y Mendoza, 2008; Escaray y col., 2012; Campestre y col., 2021). Esto se debe a que se adapta a diferentes condiciones de estrés tales como inundación (Vignolio y col., 1999; Mendoza y col., 2005; Striker y col., 2005), sequía (García y col., 2008; Clua y col., 2009; Escaray y col., 2012), salinidad y/o sodicidad (Rogers y col., 1997; Mendoza y col., 2005; Teakle y col., 2007; García y col., 2008), deficiencia de P (Mendoza y Pagani, 1997;

Mendoza y col., 2016a, b), defoliación intensa (García y Mendoza, 2012; García 2021) y a la combinación de varios factores (Mendoza y col., 2005; García y col., 2008; Teakle y col., 2010; García 2021), incluso desde el estadio de plántula (García y Mendoza, 2014).

Lotus tenuis es la única leguminosa perenne de crecimiento primavero-estivo-otoñal que define en muchos casos la calidad forrajera de los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado (Miñón y col., 1990; Refi y Escuder, 1998) y resulta determinante en la ganancia de peso del ganado (Rosso y Gomez, 1995). Es considerada una especie clave en los pastizales de la Cuenca debido, entre otros factores, a que es capaz de fijar N atmosférico a través de la simbiosis con rizobios y de esta manera incrementar el ingreso de N al sistema (Hidalgo y Rimoldi, 1992; Estrella y col., 2009; Campestre y col., 2021). Incluso ha sido reportado que mejora la nutrición nitrogenada y el crecimiento de gramíneas cercanas como *S. arundinaceus* (Mendoza y col., 2016b). Además permite mantener el inóculo de hongos MA en el suelo a lo largo del tiempo (García y Mendoza, 2008). En este sentido, trabajos previos han reportado la gran afinidad que presenta *L. tenuis* con este grupo fúngico para crecer ante deficiencia de P, mostrando elevados valores de colonización en sus raíces (Escudero y Mendoza 2005; García y Mendoza, 2008,2012; Mendoza y col., 2016a, b) e incrementos en el crecimiento vegetal debido a la inoculación con hongos MA (Mendoza y Pagani, 1997; Mendoza y García 2019).

Un período crítico para *L. tenuis* es el de las primeras semanas después de la germinación, ya que el N mineralizado en el suelo puede ser suficiente, pero el P deficiente. La deficiencia de P, su escasa movilidad en el suelo y un

mayor requerimiento con respecto a las gramíneas, someten a *L. tenuis* a estrés nutricional y la sitúa en desventaja frente a las plantas adultas vecinas. Esto sumado a un pastoreo poco controlado y a su alta palatabilidad, determinan una baja frecuencia de la leguminosa en la Cuenca (Vecchio y col., 2019). Existen pocos trabajos que contemplen el estudio, desde una perspectiva integral de la parte aérea y subterránea de las plantas, incluida la interacción entre la disponibilidad de nutrientes y microorganismos involucrados en la nutrición vegetal. Esto genera un gran interés en investigar el período de implantación y crecimiento de *L. tenuis* ante deficiencia de fósforo con el fin de contribuir al conocimiento de nuevas estrategias que permitan incrementar la presencia de la leguminosa en los pastizales y pasturas de la región, a través del uso sustentable del fertilizante fosforado y el aprovechamiento de los beneficios de la simbiosis con hongos MA nativos. Como así también la relación con bacterias fijadoras de N en plantas crecidas en un suelo deficiente en P y ante fertilización fosforada.

Schedonorus arundinaceus (Schreb) Dumort.

Schedonorus arundinaceus es una gramínea C3 (mesotérmica) introducida desde Europa en la década de 1950 (Scheneiter y col., 2016) y que actualmente se encuentra naturalizada en la región. Es perenne, de crecimiento otoño-inverno-primaveral y produce una excelente calidad y cantidad de forraje (Frame, 1990). Su amplia difusión en los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado se debe a la siembra en consociación con la leguminosa *L. tenuis* y a su adaptación a los diferentes ambientes de la región (Bañuelos y Beuselinck, 2003; Cauhépé, 2004). *Schedonorus*

arundinaceus es tolerante a exceso hídrico prolongado, defoliación intensa (García 2021), salinidad en el suelo y ha mostrado cierto grado de resistencia a la sequía (Bañuelos y Beuselinck, 2003; García, 2021). Además se adapta a crecer en suelos con marcada deficiencia de fósforo (Mendoza y col., 2016a, b; García, 2021).

Varios autores han demostrado que las gramíneas C3 presentan una menor respuesta a los hongos MA en comparación con leguminosas y gramíneas C4 (Hetrick y col., 1989; Cavagnaro y col., 2014; Řezáčová y col., 2018; Tran y col., 2019). Pero aún no ha sido reportada la respuesta del crecimiento y absorción de P de *S. arundinaceus* a la inoculación con hongos MA (respuesta MA) nativos de la Cuenca del Río Salado ante deficiencia de P y/o fertilización fosforada. *Schedonorus arundinaceus* es una especie que por su adaptación a las características desfavorables de la Cuenca resulta interesante para su estudio, ya sea en cultivo puro y/o consociado con *L. tenuis* ante deficiencia de P, fertilización fosforada y presencia de hongos MA nativos.

Panicum coloratum L.

Panicum coloratum es una gramínea C4 (megatérmica), perenne, nativa de Sudáfrica que fue introducida en la Cuenca del Río Salado en las últimas décadas. Se adapta a un gran rango de condiciones edafoclimáticas y constituye un buen recurso forrajero para zonas con restricciones ambientales a las cuales se desplaza la actividad de cría de ganado vacuno (Armando y col., 2013; Bredan y col., 2016). *Panicum coloratum* es tolerante a la inundación y resiste prolongados períodos de hipoxia en la rizósfera (Imaz y col., 2015). Posee una alta tolerancia a la salinidad (Pittaro y col., 2015;

Cardamone y col., 2018) y a defoliaciones intensas (Jacobs y Schloeder, 2003). Es conocido que para la implantación del cultivo, el P cumple un rol esencial en el rápido desarrollo radical (Petruzzi y col., 2003). Pero es escasa la información existente acerca del rol de los hongos MA nativos en la adaptación y establecimiento de esta especie en los suelos deficientes en P de la Cuenca del Río Salado y el efecto combinado de diferentes dosis de fertilizante fosforado.

1.2 Dinámica del fósforo en el suelo

El P es el principal factor limitante del crecimiento para los ecosistemas porque su ciclo está principalmente relacionado con el movimiento del P entre los continentes y los océanos (Heredía, 2016). Las plantas toman el P de la solución del suelo, que está en equilibrio con la fracción de P orgánico (Po) e inorgánico (Pi). El Po constituye entre el 25 y 75 % del P total del suelo, y por actividad microbiana pasa a formas inorgánicas (Heredía, 2016). A su vez el Pi presente en la fracción mineral del suelo o el aportado a través de la fertilización fosforada, es solubilizado para pasar a la fracción P soluble (Heredía, 2016). Existe un equilibrio entre esta fracción y los compuestos coloidales del suelo, por el que el P soluble pasa a formas no disponibles por fijación, adsorción, precipitación y oclusión (Heredía, 2016). El Pi puede encontrarse precipitado como fosfatos de Fe y Al en suelos ácidos y como fosfatos de Ca y Mg en suelos alcalinos y calcáreos. Aunque el Pi de la solución del suelo constituye solo una pequeña proporción del P total (<1%), las plantas cubren la mayor parte de sus requerimientos de P inmediatos desde esta fuente.

Las plantas absorben el P que se encuentra en la solución del suelo en forma de fosfatos cuya concentración es muy baja y varía en función del pH, la temperatura y la humedad del suelo, entre otros factores (Heredia 2016). La principal forma en que el P llega a las raíces de las plantas es a través del mecanismo de difusión, el cual involucra el movimiento de iones a través de un gradiente de concentración (Mutti, 2018). Los fosfatos se mueven desde las zonas de mayor concentración, como es la matriz del suelo, hacia las de menor concentración, como es la rizósfera de las plantas, y se encuentra íntimamente relacionado con los mecanismos de adsorción y desorción que se producen en la materia orgánica y partículas del suelo (Barrow 1983). La menor concentración de P en la rizósfera está dada por la propia extracción del nutriente desde la solución del suelo por parte de las plantas, región conocida como zona de depresión del P. Si bien la mayor parte del P absorbido es obtenido a través de mecanismo de difusión, los fosfatos poseen un bajo coeficiente de difusión ya que son fuertemente adsorbidos por el suelo, provocando que solo los iones que se encuentren en la zona próxima a la raíz puedan ser absorbidos por las plantas (zona de difusión) (Heredia, 2016).

Los iones de P también pueden moverse hacia las raíces por flujo masal o directamente ser interceptados por las raíces (intercepción radical). El flujo masal es generado por la absorción de agua por parte de la planta (Heredia 2016). Pero es ampliamente aceptado que para los nutrientes que son mayormente retenidos por el suelo, como es el caso de los fosfatos en comparación con iones como nitrato, cloruro, sulfato, calcio y magnesio, este mecanismo tiene muy poca representatividad (Mutti, 2018). Por otro lado, la intercepción radical es el mecanismo por el cual las plantas absorben los iones

fosfatos que entran en contacto directamente con su sistema radical. Este mecanismo puede cobrar mayor o menor relevancia en la nutrición fosforada dependiendo de la morfología y fisiología del sistema radical de cada especie vegetal, como así también por la presencia de hongos MA. En este sentido, la asociación con hongos MA ocupa un rol central en la absorción de P principalmente en aquellas especies que poseen sistemas radicales menos eficientes, ya que los hongos MA incrementan el volumen de suelo explorado a través del micelio extrarradical (Tawaraya, 2003; Smith y Read, 2008).

1.3 Simbiosis micorrízica arbuscular

El suelo contiene una amplia diversidad de microorganismos asociados a la nutrición vegetal, entre los cuales se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (MA) (Smith y Read, 2008). Los hongos MA pertenecen al filo Glomeromycota (Redecker y col., 2013), se asocian simbióticamente con más del 80 % de las plantas terrestres y le facilitan a las plantas la absorción de nutrientes, especialmente aquellos con baja movilidad como el P (van der Heijden y col., 2015). Los hongos MA son biótrosos obligados y colonizan las células radicales desarrollando estructuras típicas como vesículas y arbusculos. Las vesículas son formadas a partir de las hifas intra o intercelulares en la corteza radical y constituyen estructuras de reserva que contienen lípidos y una numerosa cantidad de núcleos (Barker y col., 1998). Las hifas penetran en las células ubicándose en el espacio periplasmático y se diferencian en estructuras terminales altamente ramificadas denominadas arbusculos. Los arbusculos constituyen el sitio donde se realiza la transferencia de nutrientes minerales y agua a partir de transportadores específicos (Smith y

Read, 2008). Los hongos MA dependen del carbono provisto por las plantas hospedantes para completar su ciclo de desarrollo (Smith y Read, 2008). Una parte de su ciclo de vida lo llevan a cabo en el suelo donde desarrollan las esporas, las cuales germinan dando lugar a las hifas que en su conjunto forman el micelio. El micelio cumple la función de explorar el perfil edáfico para absorber agua y nutrientes y es capaz de interconectar plantas de diferentes especies y estadíos de crecimiento (Smith y Read, 2008; Leake y col., 2004). Se ha puesto en evidencia que la asociación entre las plantas y hongos MA representa un factor altamente relevante para la nutrición vegetal (Marschner y Dell, 1994; Smith y Read 2008) y además brinda otros beneficios como la resistencia a diferentes condiciones de estrés (Abbott y col., 1984; Entry y col., 2002), mejora la defensa ante patógenos (Gehring y Whitham, 1994; Sikes y col., 2009) e incrementa la agregación del suelo a través de la liberación de glomalina (Rillig y Mummey, 2006). En consecuencia, resulta clave estudiar el rol de los hongos MA sobre la nutrición y crecimiento de especies forrajeras a fin de determinar las condiciones edafoclimáticas que permitan el aprovechamiento de los beneficios de la simbiosis MA y la conservación de la comunidad MA en el suelo.

El incremento del crecimiento vegetal provocado por la simbiosis con hongos MA se debe al aumento de la absorción de nutrientes desde la solución del suelo, principalmente aquellos con poca movilidad como el P, Zinc (Zn) y Cobre (Cu) (Ruiz-Lozano y col., 1996). Este aumento puede ser causado por una mayor exploración física del suelo a través del micelio extrarradical, modificación de la rizósfera a través de la liberación de exudados y mayor eficiencia en la utilización del P dentro de la planta (Smith y Read, 2008). Es

por ello que la simbiosis con hongos MA puede ser vista como un equivalente funcional a finas raíces y pelos radicales (Brundrett, 2002) siendo las plantas, en algunos casos, altamente dependientes de la simbiosis MA para lograr la absorción de P en suelos deficientes (Remy y col., 1994; Mendoza y Pagani, 1997).

Además, se conoce que la simbiosis MA imparte cambios en el crecimiento y morfología radical tales como la disminución de la tasa de crecimiento de los ápices radicales (Berta y col., 1990; 1991) y el incremento de la formación de raíces laterales (Barker y col., 1998). Estos cambios se ven reflejados en la morfología de las raíces como el largo y diámetro radical y se encuentran negativamente correlacionados con la simbiosis MA (Tawaraya, 2003). Por ello resulta interesante evaluar comparativamente aspectos de la morfología radical y su relación con los hongos MA en una leguminosa, una gramínea C3 y una gramínea C4 (*L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum*, respectivamente), como representantes de los principales grupos de especies forrajeras. Además, la comparación de las tres especies, crecidas ante deficiencia de P, presencia de hongos MA nativos y la combinación con diferentes dosis de fertilizante fosforado podría permitir dilucidar cuál es la principal estrategia que presenta cada una de estas especies para absorber P ante condiciones limitantes.

1.4 Fertilización fosforada

La fertilización fosforada es la práctica más utilizada para incrementar la producción de forraje en los suelos deficientes de todo el mundo. A diferencia de otros nutrientes, la reposición del P extraído por la actividad agrícola y/o

ganadera puede realizarse únicamente a través de la aplicación de fertilizantes inorgánicos o enmiendas orgánicas, ya que las entradas de P desde la atmósfera se consideran despreciables (Heredia, 2016). Numerosos trabajos han reportado la baja disponibilidad de nutrientes para el crecimiento vegetal en los suelos de la Cuenca del Río Salado y la utilización de fertilizantes para aumentar la producción forrajera. En este sentido, existe una amplia bibliografía coincidente referida al aumento del rendimiento de las pasturas ante el agregado de P (Mendoza, 1980; Rubio y col., 2010; Mendoza y col., 2016a), y de N+P (Mendoza y col., 1983; Ginzo y col., 1986; Mendoza y col., 2016b). También coinciden en que el P más que el N, es el principal limitante del crecimiento vegetal en los pastizales de la región (Ginzo y col., 1986; Lavado y col., 1992; Rubio y col., 2010; Alvarez y col., 2018; 2019). En la actualidad, la toma de decisiones acerca de la necesidad de fertilización, el tipo de fertilizante y la dosis empleada están principalmente basados en las características edáficas, climáticas, historia previa del lote, especies vegetales presentes y nivel de productividad del sistema agropecuario (Rubio y col., 2012). En este sentido, el nivel de P disponible en el suelo al momento de la siembra es un pilar fundamental a la hora de seleccionar el tipo de fertilizante y la dosis a emplear. Por ejemplo, los fertilizantes fosforados comúnmente utilizados generan diferentes respuestas al crecimiento vegetal, principalmente asociado a su grado de solubilidad (Mendoza y col., 2009) y afectan de forma diferente la colonización MA, los propágulos en el suelo y la infectividad micorrícica del suelo (Covacevich y col., 2006).

Sería propicio, para la toma de decisiones relacionadas a la fertilización fosforada, incluir entre las variables antes mencionadas aquellas que

contemplan a la comunidad de hongos MA nativos en el suelo, como pueden ser el recuento de esporas en el suelo, su viabilidad, la relación entre arbusculos y vesículas en las raíces de las plantas, la infectividad micorrícica del suelo, entre otros. Esto permitiría aprovechar los beneficios de la simbiosis MA en la nutrición fosforada y crecimiento vegetal, reducir las dosis de fertilizante fosforado y conservar la comunidad de hongos MA en el suelo. Pero en la actualidad existen pocos trabajos que hayan evaluado el impacto de diferentes dosis de fósforo sobre la colonización de hongos MA y su relación con la respuesta MA, a fin de incrementar la producción de forraje y mantener funcional la simbiosis MA para aprovechar sus beneficios en leguminosas, y gramíneas C3 y C4.

Se sabe que la colonización por hongos MA disminuye en respuesta a la adición de P tanto en raíces de leguminosas (Smith y Read, 2008; Blanke y col., 2012; Mai, 2013; Mendoza y col., 2016a) como de gramíneas C3 y C4 (Blanke y col., 2012; Cavagnaro y col., 2014; Mendoza y col., 2016a). Por ello es necesario tener en cuenta que las dosis de P aplicadas en suelos deficientes deben seleccionarse de forma tal que aumenten el crecimiento de las plantas y la colonización MA pueda desarrollarse (Hetrick y col., 1990; Mendoza y Pagani 1997; Mendoza y col., 2009), siendo clave el estudio de la relación entre la dosis de fertilizante, la colonización de hongos MA y la respuesta del crecimiento vegetal. Ante la necesidad de aumentar la cantidad y calidad del forraje, es de gran importancia seleccionar un rango de dosis de P aplicado que permita incrementar el rendimiento de biomasa y que conjuntamente permita aprovechar los beneficios de la simbiosis con hongos MA nativos.

1.5 Interacciones planta-planta

Las interacciones que ocurren entre plantas en pastizales y pasturas pueden ser de competencia, neutras y/o facilitación y operan simultáneamente entre plantas de la misma o diferente especie. El balance competitivo puede abordarse como un continuo complejo entre competencia y facilitación que varía ampliamente como resultado de la intensidad de las prácticas de manejo, condiciones ambientales, estadíos de desarrollo de las plantas y composición florística de la comunidad (Callaway y col., 1997; Valladares et al., 2015; Rehling et al., 2021). Además es sabido que las interacciones entre plantas están mediadas por la simbiosis MA a través de la red hifal que conecta individuos de la misma y/o diferente especie y estadíos de crecimiento (Smith y Read, 2008; van Der Heijden y Horton, 2009). La red hifal regula el flujo de nutrientes entre las plantas y de esta manera es capaz de modificar las interacciones de competencia y/o facilitación entre ellas (Hart y col., 2003; van der Heijden y col., 2003). Ha sido reportado que plántulas crecidas en la vecindad de plantas adultas accedieron a nutrientes usando la red hifal existente soportada por las plantas ya establecidas, como así también que la red hifal favoreció a la planta adulta más que a la plántula (Nakano-Hylander y Olsson, 2007; Smith y Read, 2008; Höpfner, 2014).

En particular, las interacciones intraespecíficas entre plantas adultas y plántulas constituyen un escenario interesante para investigar la prevalencia de las especies en el tiempo. Varios autores han indicado que la presencia de plantas adultas puede proveer micrositios adecuados para el establecimiento de plántulas (interacciones de facilitación) o disminuir el crecimiento de las

plántulas ante deficiencia de P (interacciones de competencia) (Aguilera y Lauenroth, 1993; Dyer y Rice 1997). En este sentido, uno de los factores que contribuyen a la baja presencia de *L. tenuis* en los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado es su lento crecimiento durante el período de implantación (Vignolio y col., 2018). Por otro lado, se ha puesto en evidencia que *L. tenuis* se encuentra colonizada por hongos MA desde un estadio temprano de crecimiento (entre 7 y 10 días después de la siembra) en suelos de la Cuenca y ante estrés hídrico (García y col., 2014). Esto indica que los hongos MA nativos cumplirían un rol central en el período de implantación de esta especie. Pero se requiere de mayor investigación para conocer la implicancia de la simbiosis con las comunidades de hongos MA nativos en la interacción entre plántulas de *L. tenuis* estableciéndose en la vecindad de plantas adultas conespecíficas en suelos de la Cuenca del Río Salado.

Además, existen otros factores que pueden modificar las interacciones entre plantas adultas y plántulas vecinas, como por ejemplo la defoliación. La defoliación de una planta adulta podría disminuir la competencia aérea al incrementar la penetración de la luz favoreciendo el crecimiento de plántulas vecinas (Song y col., 2020). Se conoce que al defoliar una baja proporción de biomasa aérea, las plantas pueden responder con un crecimiento compensatorio (Barto y Rilling y col., 2010), y se estima que en condiciones de limitación de P, los hongos MA pueden promover la recuperación del tejido fotosintético asociada con una mejora en la nutrición vegetal (Hartnett y Wilson, 2002). Sin embargo, bajo intensas o repetidas defoliaciones se esperarían respuestas diferentes, ya que los fotoasimilados de las plantas podrían llegar a ser limitantes, por lo cual el proceso de rebrote y el mantenimiento de la

simbiosis competirían por dichos recursos y los hongos MA podrían causar una respuesta negativa en la planta (van der Heyde et al., 2019). Por otro lado, plántulas crecidas en la vecindad de plantas adultas podrían acceder a mayor cantidad de nutrientes al conectarse a la red hifal previamente establecida (Tedersoo y col., 2020).

Una situación diferente podría esperarse en las relaciones de competencia y/o facilitación entre diferentes especies como puede ser la consociación de gramíneas y leguminosas. Varios autores han reportado que bajo condiciones deficientes de nutrientes, las gramíneas pueden crecer mejor cuando son cultivadas en consociación con leguminosas (Nyfeler y col., 2011; Mendoza y col., 2016b). En particular Mendoza y col., (2016b) reportaron que el rendimiento de *S. arundinaceus* fue mayor cuando creció consociada con *L. tenuis* que cuando creció en cultivo puro. Pero se desconoce si los hongos MA cumplen un rol significativo en la mejora del crecimiento y nutrición de la gramínea acompañante. Por ello resulta interesante estudiar el rol de los hongos MA nativos sobre las relaciones de competencia y/o facilitación entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado y cómo la aplicación de fertilizante fosforado podría modificar el balance competitivo entre dichas especies.

En la Cuenca del Río Salado son escasos los trabajos en los cuales se evalúa el rol de los hongos MA nativos en el crecimiento de leguminosas, gramíneas C3 y gramíneas C4 ante diferentes dosis de fertilizante fosforado. Además, no existen trabajos que hayan evaluado la interacción entre plántulas de *L. tenuis* y plantas adultas vecinas conespecíficas defoliadas a diferentes intensidades, crecidas en un suelo deficiente en P y mediadas por los hongos

MA nativos. Tampoco ha sido reportado el rol de los hongos MA nativos en las interacciones de competencia y/o facilitación de plantas de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en consociación ante fertilización fosforada. La presente tesis pretende en primera instancia contribuir al conocimiento del rol que cumplen los hongos MA nativos de la Cuenca del Río Salado sobre el crecimiento, la nutrición fosforada y relación planta-planta de especies forrajeras, en particular *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum*. En segunda instancia, resaltar el valor de la simbiosis MA y cómo es afectada ante el incremento de la disponibilidad de fósforo, a fin de contribuir a la generación de un marco teórico que permita diseñar futuras prácticas de manejo sustentables que aprovechen sus beneficios y conserven la funcionalidad de la comunidad de hongos MA.

2. Objetivo general

Estudiar el rol que cumplen los hongos MA nativos de un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado sobre la absorción de P y el crecimiento de especies forrajeras con diferente metabolismo carbonado y ante fertilización fosforada, como así también sobre las interacciones entre plantas de competencia y/o facilitación.

3-Capítulo 1

Efecto del incremento de la disponibilidad de P en el suelo sobre el crecimiento, la colonización micorrícica arbuscular en las raíces de especies forrajeras y la infectividad micorrícica del suelo.

3.1 - Resumen

La marcada deficiencia de P y la baja presencia de leguminosas son dos de los principales factores que limitan la cantidad y calidad de forraje en los pastizales de la Cuenca del Río Salado. La fertilización fosforada y la utilización de especies adaptadas a crecer en suelos deficientes en P son las principales estrategias implementadas para aumentar la cantidad y calidad de biomasa producida. Pero el incremento del P disponible en el suelo a través de la fertilización fosforada disminuye la colonización radical, así como el desarrollo fúngico en el suelo y por lo tanto la infectividad del inóculo de hongos MA. Se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar el efecto del incremento del P disponible en el suelo sobre el crecimiento, colonización radical e infectividad del inóculo de hongos MA ante condiciones controladas. En el experimento 1 se investigó el efecto del incremento de la disponibilidad de P (5,52 – 74,34 mgP kg⁻¹) sobre la producción de biomasa, morfología radical, simbiosis micorrícica arbuscular (MA) y la absorción de P en la leguminosa *L. tenuis* y las gramíneas *S. arundinaceus* (C3) y *P. coloratum* (C4) crecidas en un suelo deficiente en P. En el experimento 2 se realizó un bioensayo con el objetivo de estimar la infectividad micorrícica arbuscular del suelo empleado en el experimento 1, en el cual se utilizó a *L. tenuis* como planta test. Se ensayaron 6 concentraciones de suelo como inóculo de hongos MA: 1, 5, 10, 20, 30 y 100

g/100g SS. El sustrato diluyente fue el mismo suelo esterilizado. A un grupo de macetas de cada dilución se le agregó una dosis baja de P (15 mgP kg⁻¹) como KH₂PO₄ seleccionada a partir del experimento 1. Se calculó el porcentaje de plantas colonizadas con al menos una unidad de colonización MA y la unidad de infectividad micorrícica del suelo (IMS₅₀) como la cantidad de suelo mínima necesaria para colonizar el 50% de las plantas. Los resultados del experimento 1 mostraron que las tres especies forrajeras respondieron fuertemente al agregado de P y alcanzaron el 90% del máximo rendimiento de forraje con 24,28 mgP kg⁻¹ para *L. tenuis*, 14,44 mgP kg⁻¹ para *P. coloratum* y 11,18 mgP kg⁻¹ disponible para *S. arundinaceus*. *Lotus tenuis* y *P. coloratum* produjeron más biomasa aérea que *S. arundinaceus*. La biomasa radical fue mayor en la leguminosa comparada con las gramíneas y la fracción de biomasa radical fue menor para *P. coloratum*. La colonización MA fue mayor en la leguminosa que en las gramíneas, y estos valores disminuyeron ante el incremento del P disponible. Las dosis de P dentro del rango de bajas a moderadas no afectaron la colonización MA o incluso la incrementaron en las raíces de *L. tenuis*. Para *L. tenuis* es posible maximizar el rendimiento de forraje y mantener altos niveles de colonización MA simultáneamente dentro del rango de 10 a 20 mgP kg⁻¹ disponible, pero resulta difícil lograr ambos objetivos en las gramíneas, especialmente para *S. arundinaceus*. Los resultados del experimento 2 mostraron que la biomasa seca del vástago disminuyó ante el incremento de la concentración de suelo y +P, y no hubo diferencias entre las diluciones -P. El IMS₅₀ fue 16,87g y 19,23g ante -/+P, respectivamente. La dosis de P aplicada resultó conservativa de la colonización MA, ya que solo afectó la infectividad cuando la concentración de suelo disminuyó hasta 10%, mientras que ante

concentraciones mayores la colonización no fue afectada. A partir de los resultados obtenidos se puede establecer que la aplicación de dosis consideradas bajas a moderadas en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado podría aumentar la producción de biomasa vegetal sin disminuir la infectividad micorrícica arbuscular.

3.2 - Introducción

La marcada deficiencia de P (Mendoza y col., 1983; Ginzo y col., 1986; Alvarez y col., 2018; 2019) y la baja presencia de leguminosas (Cahuépe 2004) son dos de los principales factores que afectan la cantidad y calidad de forraje en los pastizales de la Cuenca del Río Salado, al igual que ocurre en la mayoría de los pastizales templados del mundo (Muir y col., 2011). La utilización de especies forrajeras adaptadas a crecer ante condiciones de deficiencia de P y la fertilización fosforada son las principales alternativas implementadas para aumentar la producción de biomasa forrajera en la Cuenca. Pero es sabido que el incremento del P disponible en el suelo a través de la fertilización fosforada actúa en detrimento de la comunidad de hongos micorrícicos arbusculares (MA) (Smith y Read, 2008). Por tal motivo es necesario seleccionar dosis de fertilizante fosforado que permitan incrementar en forma simultánea la producción de forraje y conservar la simbiosis MA.

Las especies vegetales adaptadas a crecer ante condiciones de deficiencia de P poseen estrategias para incrementar la absorción de P relacionadas con cambios en la morfología radical (Lynch, 2011), tales como el incremento del largo radical específico y la disminución del diámetro radical (Hill y col., 2010; Pang y col., 2010). Estos cambios en la morfología radical

permiten incrementar la superficie de contacto entre las raíces y el suelo, y de esta manera aumentar la absorción de nutrientes poco móviles como es el caso del P. Además, los estudios antes citados mostraron que las características morfológicas de las raíces varían en respuesta a la disponibilidad de P en el suelo y las especies vegetales. Por ejemplo, la fracción de biomasa radical y el largo radical específico pueden incrementar en respuesta a la baja disponibilidad de P en el suelo para un amplio rango de especies forrajeras (Hill y col., 2010; Pang y col., 2010). Como así también, ha sido reportado en algunas especies que una alta fracción de biomasa radical puede contribuir a una mayor eficiencia en la absorción de P (Fort y col., 2015; Pang y col., 2010).

Otra estrategia que presentan las plantas para aumentar la absorción de P es la asociación con hongos MA. Los hongos MA pueden aumentar el crecimiento vegetal a través del incremento de la absorción de nutrientes con baja movilidad en el suelo como es el caso del P (Ruiz-Lozano y col. 1996; Johnson y col., 2010). El aumento del crecimiento y absorción de P es causado por una mayor exploración física del suelo a través del micelio extrarradical, modificación de la rizósfera a través de la liberación de exudados radicales y mayor eficiencia en la utilización del P dentro de la planta (Smith y Read, 2008). Las condiciones ambientales de los pastizales, especialmente la deficiencia de P, promueve el desarrollo de la simbiosis MA (Hartnett y Wilson, 2002) mientras que la fertilización fosforada disminuye la colonización MA en las raíces de especies forrajeras (Covacevich y col., 2006; Hill y col. 2010; Cavagnaro y col., 2014; Mendoza y col 2016 a; b; Fornara y col., 2020).

Algunos autores han reportado que la concentración de P en la planta es el parámetro que controla el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis

MA (Abbott y col., 1984; Covacevich y col., 2006). Esto se debe a que la fertilización mejora la nutrición de las plantas y genera un mecanismo de represión de la colonización MA en sus raíces. Pero aún no se ha determinado si el incremento de P disponible en el suelo, la concentración de P en el tejido vegetal o ambos factores regulan la colonización MA en el sistema radical (Mendoza y Pagani 1997; Cornwell y col. 2001). Además, el efecto negativo de la fertilización fosforada sobre la colonización MA depende de la especie vegetal, del metabolismo carbonado, de la morfología radical, de la disponibilidad de P en el suelo y de la interacción de estos factores.

En este sentido, los principales grupos de especies forrajeras (leguminosas, gramíneas C3 y gramíneas C4) muestran distinto grado de afinidad con los hongos MA (Hetrick y col., 1989; Tran y col., 2019). Las gramíneas C3 muestran una respuesta débil a la simbiosis MA, independientemente del nivel de P disponible en el suelo. Esto se debe a que presentan sistemas radicales en cabellera que se caracterizan por ser finos y muy ramificados, que pueden explorar gran volumen de suelo para absorber P (Walker y King 2009; Muir y col., 2011). Mientras que las gramíneas C4 muestran una mayor afinidad con los hongos MA en relación a las gramíneas C3, pero el motivo aún no se conoce completamente (Hetrick y col., 1989; Lugo y col., 2003; Cavagnaro y col., 2014; Řezáčová y col., 2018). Por otro lado, las leguminosas poseen una raíz pivotante que les permite alcanzar una mayor profundidad en el perfil del suelo pero tienen una menor capacidad de exploración en comparación con las gramíneas. Es por ello que las leguminosas asociadas con hongos MA y bacterias fijadoras de nitrógeno

muestran una mejora en el crecimiento y mayores rendimientos que plantas no simbióticas (Biró y col. 2000; Kaschuk y col. 2009).

Ha sido demostrado que los hongos MA pueden mejorar la sustentabilidad de los agroecosistemas al reducir la necesidad de dosis extra de fertilizante fosforado bajo ciertas condiciones (Jakobsen 1995; Fornara y col., 2020). Es necesario destacar la importancia de incrementar la producción forrajera de manera sustentable a fin de preservar la simbiosis MA a través de la selección de dosis de P adecuadas para cada combinación de suelo y planta. En este sentido, Mendoza (2001) ha reportado que la aplicación de dosis bajas de fertilizante fosforado logró incrementar la producción de forraje y preservar la colonización MA en especies del género *Lotus*. Sin embargo, es necesario evaluar si existe un rango de P disponible en el suelo que también lo permita en especies con menor afinidad con los hongos MA como son las gramíneas C3 y C4.

Lotus tenuis es una especie muy importante en los pastizales de la Cuenca del Río Salado ya que es la única leguminosa co-dominante en las principales comunidades vegetales de la región durante la primavera y verano (Collantes y col., 1988; Campestre y col., 2021) y resulta determinante en la ganancia de peso del ganado, especialmente en invierno (Rosso y Gomez, 1995). Esta leguminosa responde fuertemente al agregado de fertilizante fosforado en suelos deficientes en P (Mendoza y Pagani, 1997; Kade y col., 2003). Varios trabajos han mostrado que el aumento de la disponibilidad de P incrementa la presencia, cobertura y crecimiento de la leguminosa en los pastizales de la región (Ginzo y col., 1982; Mendoza 2001; Rodriguez y col., 2007). *Lotus tenuis* es dependiente de la simbiosis MA para crecer en suelos

deficientes en P (Mendoza y Pagani, 1997; Mendoza 2001) sin embargo elevadas dosis de fertilizante fosforado disminuyen el porcentaje de colonización MA en sus raíces (Mendoza y Pagani, 1997; Mendoza 2001; Mendoza y col., 2009) y consecuentemente los beneficios de la simbiosis MA (Mendoza 2001).

Schedonorus arundinaceus es una gramínea C3 que se encuentra ampliamente difundida en los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado debido a la siembra en consociación con *L. tenuis* y a su adaptación a los diferentes ambientes de la región (Bañuelos y Beuselinck, 2003; Cauhépé, 2004). En particular, *S. arundinaceus* se adapta a crecer en suelos con marcada deficiencia de fósforo y responde positivamente a la fertilización fosforada (Mendoza y col. 2016a; b). *Schedonorus arundinaceus* muestra niveles menores de colonización en sus raíces que *L. tenuis* (Mendoza y col., 2016a, b) y que *Panicum coloratum* (Cavagnaro y col., 2014) y disminuye marcadamente ante el agregado de fertilizante fosforado dependiendo de la dosis y del recurso fosforado utilizado (Covacevich y col., 2006; Mendoza y col., 2016a, b). Además, ha sido reportado que *S. arundinaceus* es menos dependiente de la simbiosis MA que leguminosas y gramíneas C4 para crecer en suelos deficientes en P debido a que presenta un sistema radical altamente eficiente para explorar el perfil del suelo y absorber P (Wilson y Harnett 1998; Cavagnaro y col., 2014).

Panicum coloratum es una gramínea C4 que en las últimas décadas ha sido introducida en la Cuenca del Río Salado como especie forrajera debido a su alta productividad y adaptabilidad a las condiciones ambientales de la región (Otondo y col., 2019). Particularmente se adapta a la deficiencia de P en el

suelo (Ferri, 2011; Otondo y col., 2019) y responde positivamente al agregado de fertilizante fosforado (Otondo y col., 2019). *Panicum coloratum* muestra mayor porcentaje de colonización MA que *S. arundinaceus* (Cavagnaro y col., 2014) pero aún se desconoce por qué las especies C4 presentan mayor afinidad con los hongos MA que las especies C3. Esto podría estar relacionado con un mayor requerimiento de P por parte de las especies C4 en comparación con las C3 según reportaron Ghannoum y Conroy (2007). Si bien existen trabajos que han mostrado elevados porcentajes de colonización MA en raíces de *P. coloratum* (Wallace, 1981; Cavagnaro y col., 2014), la presente tesis constituye el primer trabajo que evalúa la interacción de esta gramínea con la comunidad de hongos MA nativos de la Cuenca del Río Salado, a fin de determinar la participación de este grupo fúngico en el crecimiento nutrición fosforada de *P. coloratum*.

Por otro lado, la infectividad micorrícica arbuscular de un suelo puede ser afectada por las especies presentes, condiciones edafoclimáticas y prácticas agronómicas. La principal estructura de resistencia de los hongos MA en el suelo son las esporas que contienen en su interior grandes cantidades de lípidos y azúcares, y pueden llegar a contener entre 800 a 35000 núcleos, dependiendo de la especie (Smith y Read, 2008). Cuando las condiciones ambientales son adecuadas (humedad, pH, temperatura y fertilidad del suelo), las esporas germinan dando lugar al desarrollo de un tubo germinativo y posteriormente hifas en el suelo. Luego, a través de un intercambio de señales químicas, las hifas de los hongos MA toman contacto con las raíces de las plantas hospedantes y desarrollan una estructura llamada apesorio la cual les permite anclarse a la raíz de las plantas (Smith y Read, 2008). A partir de allí,

las hifas penetran la raíz a través de los espacios intercelulares de las células corticales dando inicio a una nueva colonización (Smith y Read, 2008; Parihar y col., 2020).

El recuento de esporas y el estudio de su viabilidad pueden ser usados como indicadores del impacto de las prácticas agronómicas sobre las comunidades de hongos MA, entre otras variables de este grupo fúngico (Castillo y col, 2006; Druille y col., 2013; Fornara y col., 2020). El inóculo de hongos MA en el suelo también está conformado por fragmentos de raíces colonizadas y micelio capaces de iniciar nuevas unidades de colonización (Scullion y col., 1998; Hart y Reader, 2005). Es por ello que el recuento de esporas totales no es suficiente para evaluar la infectividad del inóculo MA en el suelo debido a que no tiene en cuenta la capacidad infectiva de los fragmentos de raíces colonizadas y el micelio. En este sentido, Ohtomo y col., (2018) destacan al recuento de unidades de inicio de colonización como un mejor indicador para evaluar la infectividad de una comunidad de hongos MA. Plenchette (1989) adaptó el concepto de infectividad, ampliamente utilizado para el estudio de microorganismos patógenos, con el objetivo de evaluar la infectividad de un inóculo de hongos MA a través de un bioensayo. Además esta técnica puede ser utilizada para comparar la infectividad MA de distintos suelos o bien, ante distintos factores que puedan afectarlo, como es el caso de las prácticas agrícolas.

Ha sido reportado que las prácticas agrícolas disminuyen la biodiversidad y el nivel de colonización de hongos MA (Sanaullah y col., 2020), como así también el nivel de propágulos en el suelo, su capacidad de colonización (Powell, 1980; Castillo y col., 2006; Druille y col., 2013) y su

abundancia en el suelo (Fornara y col., 2020). La fertilización fosforada es una de las principales prácticas que afecta el nivel de propágulos de hongos MA en el suelo (Scullion y col., 1998; Covacevich y col., 2006). Esto se debe a que el agregado de P puede provocar la inhibición de la germinación de las esporas, de la extensión del micelio en el suelo, de la colonización en las raíces de las plantas y su posterior esporulación (Grant y col., 2005; Gryndler y col., 2006; Smith y Read, 2008). Por otro lado, algunos autores han reportado que el agregado de fertilizante fosforado no produjo un efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas (Tawaraya y col., 1996; Rubio y col., 2003) pero sí un retraso del inicio de la colonización radical (Thompson 1987). Aunque estos autores concuerdan en que la fertilización fosforada disminuye la colonización MA; la magnitud depende del P disponible en el suelo, de la dosis de P agregada y del metabolismo carbonado de la especie hospedante (Hill y col., 2010). Es por ello que el estudio de dosis de P reducidas que permitan incrementar la producción de biomasa sin afectar la colonización MA y la infectividad micorrícica del suelo es clave para la sustentabilidad de los sistemas productivos.

3.3 – Objetivos

Objetivo general

Estudiar el efecto del incremento de la disponibilidad de P en el suelo sobre el crecimiento, morfología radical y colonización por hongos MA en tres especies: una leguminosa, *L. tenuis* y dos gramíneas con diferente metabolismo carbonado, *S. arundinaceus* (C3) y *P. coloratum* (C4) como así también sobre la infectividad micorrícica del suelo.

Objetivos específicos

- 1) Estudiar el efecto del incremento del P disponible en el suelo sobre la producción de biomasa, la morfología radical, la colonización MA y la absorción de P en tres especies forrajeras con diferente metabolismo carbonado.
- 2) Seleccionar una dosis baja de P que permita incrementar la producción de biomasa y conservar la colonización MA y una dosis alta que permita maximizar la producción de biomasa de acuerdo a las características particulares del suelo y de las tres especies estudiadas a fin de continuar evaluándolas en los ensayos siguientes.
- 3) Evaluar el efecto de la dosis baja de P seleccionada en el experimento 1 sobre la infectividad micorrícica del suelo.

3.4 - Hipótesis:

1) *Lotus tenuis* presenta una elevada colonización MA y *S. arundinaceus* y *P. coloratum* modifican la morfología radical ante un rango medio de P disponible en el suelo, mientras que ante niveles altos de P disponible en el suelo las tres especies se comportan de manera similar.

2) *Lotus tenuis* y *P. coloratum* alcanzan simultáneamente un rendimiento relativamente alto y una alta proporción de colonización MA en sus raíces ante disponibilidades de P bajas en el suelo, y *S. arundinaceus* maximiza la producción de biomasa aérea con una disminución abrupta de la colonización radical por hongos MA.

3) La aplicación de una dosis baja de fertilizante fosforado seleccionada previamente permite incrementar la producción de biomasa y mantener la infectividad micorrícica arbuscular del suelo.

3.5 - Materiales y métodos

Experimento 1

Diseño experimental

Se diseñó un experimento en el cual plantas de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* fueron cultivadas puras en un Natracuoll típico deficiente en fósforo (5,68 mgP kg⁻¹ disponible) de la Cuenca del Río Salado. El ensayo se llevó a cabo en invernáculo con macetas de 2 L que se llenaron con 1,13 kg de suelo secado al aire, previamente tamizado por una malla de 2 mm y homogeneizado. Las muestras fueron recolectadas de un pastizal natural ubicado en Chascomús (35°37'S, 58°50'O), provincia de Buenos Aires, Argentina. La comunidad vegetal del pastizal estaba dominada por *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *L. tenuis*, *Lolium multiflorum* Lam., *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze, *Paspalum dilatatum* Poir. y *Trifolium repens* L. Las características químicas del suelo fueron evaluadas en un estudio previo (Mendoza y col., 2016b): pH 5,9 (1 : 2,5 suelo:agua), conductividad eléctrica 1,5 dS m⁻¹, materia orgánica 3,9%, N total 0,26 %, porcentaje de sodio intercambiable 7,1, contenido de arcilla 33%, contenido de limo 51%, contenido de arena 16%, y capacidad de campo 36% (p/p).

Inmediatamente antes de la siembra se fertilizó el suelo con P como KH₂PO₄, en concentraciones ascendentes desde 0 hasta 160 mgP kg⁻¹. Las dosis fueron 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140 y 160

mgP kg⁻¹. Cada combinación de dosis-especie contó con una repetición. El P fue aplicado al suelo en una solución diluida en 20 ml de agua destilada y luego fue homogeneizado. Las semillas fueron superficialmente esterilizadas y pre-germinadas en condiciones estériles. Se sembraron 6 semillas pre-germinadas de cada especie por maceta, luego fueron cubiertas por una fina capa de suelo y finalmente por una capa de arena de 1 cm de espesor para reducir la evaporación de agua. Las macetas fueron regadas diariamente con agua destilada a fin de mantener una humedad cercana al 80% de la capacidad de campo. Las macetas fueron colocadas en mesadas móviles y rotadas diariamente a fin de minimizar gradientes lumínicos. La temperatura media diurna fue 30±4°C, la nocturna fue 19±3°C, la humedad relativa promedio fue 65±15%, el foto-período fue 10–12 h y la intensidad lumínica fue 900–1300 μmol m⁻² s⁻¹ (días soleados) y 400–700 μmol m⁻² s⁻¹ (días nublados) durante el período experimental.

Producción de biomasa, P en tejido vegetal y colonización MA

Cuarenta y cinco días después de la siembra se cosechó el material vegetal en forma separada (raíces y vástago) de las tres especies estudiadas. El material vegetal estuvo conformado por la biomasa producida por las 6 plantas presentes en la maceta. La biomasa aérea se secó en estufa a fin de determinar la producción de biomasa seca aérea y la concentración de P en tejido. Se midió P en tejido vegetal a través de una digestión ácida con una solución de ácido nítrico y ácido perclórico en una relación 3:2 respectivamente y posterior método del ácido vanadomolibdofosfórico (Jackson, 1964). El sistema radical de cada especie fue separado del suelo, lavado y pesado. Las

raíces de las 6 plantas presentes por maceta fueron cortadas en segmentos de 1 cm de largo, homogeneizadas y separadas en dos sub-muestras: una sub-muestra fue secada en estufa a fin de realizar las mismas determinaciones que se hicieron en vástago y otra fue usada para medir el largo radical y el total colonizado por hongos MA previa tinción. La tinción se realizó según una modificación de la técnica de Phillips y Hayman (1970). Las raíces se clarificaron con una solución de KOH 10% durante 10 min a 90°C y luego se sumergieron en una solución de HCl 10% durante 5 min. Se colorearon con una solución de azul de Tripán 0,05% en láctico-glicerol durante 20 min a 90°C. Treinta y cinco fragmentos de raíces teñidas fueron montadas en un portaobjeto a fin de medir el largo radical colonizado de la muestra bajo microscopio óptico con un aumento de x200. La colonización MA fue descrita a través de la medición de arbusculos, vesículas e hifa solamente (McGonigle y col., 1990).

Se calculó la fracción de biomasa radical como el peso seco radical dividido el peso seco de la planta, la absorción específica de P como el P total dividido el peso seco radical y la fracción de P contenida en raíz como el contenido de P en raíz dividido el contenido de P total. Se midió el largo radical a través de imágenes escaneadas y procesadas con el programa ImagenJ y se calculó el largo radical específico como los metros de raíz por gramo de peso seco radical.

Propiedades del suelo

Se tomaron muestras de suelo del centro de cada maceta de aproximadamente 200 g cada una. Las muestras se tamizaron por una malla

de 2 mm y se midió el pH (agua, 1:2,5 p/p) y el P disponible (Bray y Kurtz, 1945).

Ajuste de curvas

Las relaciones entre las diferentes variables y el P disponible en el suelo de cada especie fueron descritas a través de regresiones no-lineales simples con 16 observaciones para cada una. La ecuación de Mitscherlich fue usada para ajustar la curva de respuesta de cada especie forrajera al P disponible en el suelo:

$$Y=A - B \exp(-CX) \quad \text{Ec. 1}$$

donde Y es el rendimiento por maceta de cada especie para cada nivel de P disponible en el suelo (X), A es el máximo rendimiento obtenido cuando las dosis de P no limitaron el crecimiento, A-B es el rendimiento sin agregado de P, y C es la constante de la curvatura.

El efecto del P disponible sobre la colonización MA en las raíces de *L. tenuis* fue descrito por una ecuación usada en experimentos previos (Mendoza 2001):

$$R= Z / 1 + ((X^n - D) / E)^2 \quad \text{Ec. 2}$$

donde el coeficiente Z representa el valor máximo de la colonización total y R la colonización obtenida, cuando los niveles de P disponible (X) elevados a la n potencia es igual a D. Al incrementar el P disponible en el suelo, el valor de R incrementa a tasas controladas por el coeficiente E.

Las relaciones entre variables fueron consideradas significativas cuando el valor de P del coeficiente de correlación fue $<0,05$. Además de la significancia de la relación entre las variables, se evaluó la significancia en la desviación de la pendiente de cero a través del software GraphPad Prism 8.

Las relaciones entre la colonización MA, la concentración de P en vástago y raíz, y el P disponible en el suelo de las tres especies estudiadas fueron evaluadas a través de un análisis de componentes principales (ACP) con el programa PCORD (McCune 1991). Los valores P fueron obtenidos luego de 1000 corridas de simulación.

Experimento 2

Diseño experimental

Se llevó a cabo un bioensayo según una modificación de la técnica de Plenchette (1989), a fin de evaluar la infectividad micorrícica arbuscular del suelo utilizado como inóculo en los ensayos siguientes ante una dosis de fertilizante fosforado seleccionada a partir del experimento 1. Se recolectaron muestras de suelo del pastizal mencionado en el experimento 1 del presente capítulo.

El suelo fue tamizado por una malla de 2 mm y homogeneizado. Una fracción de suelo fue utilizado para mantener el inóculo de hongos MA activo a través de la siembra en macetas de *L. tenuis* y *L. perenne* sobre el cual se estimó la infectividad micorrícica. Otra fracción de suelo fue esterilizado en microondas durante 10 minutos a potencia máxima (6.27 mgP kg⁻¹) utilizado como sustrato diluyente. Las macetas (150 cm³ de capacidad) fueron llenadas con 130 g de suelo. Se ensayaron 6 diluciones: 1, 5, 10, 20, 30 y 100 % de

suelo como inóculo de hongos MA. Cuatro macetas de cada dilución fueron fertilizadas previamente a la siembra con una dosis de 15 mgP kg⁻¹ como KH₂PO₄. El P fue aplicado al suelo en 5 ml de una solución y luego fue homogeneizado. El grupo sin fertilizar consistió en 4 macetas de cada dilución sin el agregado de P, en las cuales se adicionaron 5 ml de agua destilada de igual forma que en el tratamiento con P. Cada tratamiento (combinación de dilución de suelo y fertilización P) contó con 4 repeticiones.

Se sembraron 6 semillas por maceta de la leguminosa *Lotus tenuis* como planta test. Las semillas fueron previamente esterilizadas superficialmente y pre-germinadas en condiciones estériles. Las macetas fueron regadas diariamente con agua desionizada a fin de mantener la humedad cercana al 80% de la capacidad de campo. Las macetas fueron ubicadas en mesadas móviles y rotadas diariamente a fin de disminuir el gradiente lumínico.

Caracterización del suelo como inóculo

Para la caracterización del suelo utilizado como inóculo de hongos MA se realizó el aislamiento, recuento y viabilidad de esporas de este grupo fúngico. El aislamiento de esporas se llevó a cabo a través de una modificación de la técnica de Daniels y Skipper (1982). Las esporas de hongos MA fueron aisladas de muestras de suelo de 50 g. Las muestras fueron tamizadas primero con una malla de 500 µm y luego con una de 35 µm y centrifugadas en una solución de sacarosa al 80 %. Luego se procedió al recuento de esporas bajo lupa con un aumento de 35x y se expresó la densidad de esporas como la cantidad aislada por gramo de suelo seco.

La viabilidad de las esporas se estimó a través de la metodología propuesta por An y Hendrix (1988). Se utilizó una solución de 0,5 mg/ml de 3-(4,5-dimetilthiazol-yl)-2,5-difenil-2H-bromuro tetrazolio (MTT) como colorante. Se colocaron volúmenes iguales de la solución de MTT y una suspensión acuosa de esporas de hongos MA en un tubo eppendorf. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 40 hs en oscuridad y luego se observaron las esporas bajo lupa. Las esporas que presentaron un color rojo brillante fueron consideradas esporas vivas mientras que las que conservaron su color original se consideraron muertas. Se realizó un tratamiento control con esporas previamente sumergidas en una solución de etanol 70 % durante 30 min. Se hizo un recuento bajo lupa con un aumento de 35x de esporas vivas y se calculó el porcentaje de viabilidad como las esporas vivas sobre el total de esporas incubadas multiplicado por 100.

Producción de biomasa y colonización MA

Veinte días después de la siembra se procedió a cosechar el material vegetal. La finalización del bioensayo se determinó por la aparición de unidades primarias de colonización MA. Para ello, se realizaron cosechas destructivas cada 3 días de plantas de *L. tenuis* crecidas en suelo sin diluir a fin de observar la aparición de unidades primarias de colonización MA. La biomasa aérea se secó en estufa a 70°C durante 48 horas y luego se pesó a fin de obtener el peso seco aéreo. Se cuantificó el peso fresco de cada sistema radical y luego se tiñeron con azul de Tripán (Phillips y Hayman, 1970) a fin de observar la colonización micorrícica arbuscular. Se determinó el porcentaje de plantas colonizadas por hongos MA como la cantidad de plantas positivas

sobre el total de plantas en la maceta multiplicado por 100. Las plantas positivas fueron aquellas en las que se observó el inicio de al menos una unidad de colonización MA. El porcentaje de plantas colonizadas por maceta se graficó en función del logaritmo₁₀ de la concentración de suelo como inóculo para cada tratamiento con y sin agregado de P. Se calculó la unidad de infectividad micorrícica del suelo (IMS₅₀) como la cantidad de suelo mínima necesaria para colonizar el 50% de las plantas (Plenchette y col., 1989). Dicho parámetro fue determinado a partir de las curvas de regresión no lineal. Se calculó la respuesta al P (RP%) según Fontanetto y col., (2016):

$$RP\% = \frac{PS \text{ aéreo } +P - \text{promedio } (PS \text{ aéreo } -P)}{\text{promedio } (PS \text{ aéreo } -P)} \text{ (Ec. 3)}$$

Análisis estadístico

Se realizaron regresiones no lineales simples a fin de describir las relaciones entre el porcentaje de plantas colonizadas con y sin agregado de fertilizante fosforado y la respuesta al agregado de P en función de la dilución del suelo como inóculo MA. Cada punto de las curvas corresponde al promedio de 4 repeticiones para cada tratamiento. La relación entre el porcentaje de plantas colonizadas ante el agregado de P y la respuesta del vástago al agregado de P fue descrita a través de la ecuación de Mitscherlich (Ec. 1). Mientras que la relación entre el porcentaje de plantas colonizadas sin agregado de P fue descrita a través de la ecuación usada en un experimento previo (Mendoza 2001) (Ec. 2).

El peso seco del vástago y el peso fresco radical fueron analizados a través de ANOVA de dos vías con la dilución del suelo y la fertilización P como

primer y segundo factor, respectivamente. Las medias fueron comparadas a través del test de Tukey. La normalidad y homogeneidad de la varianza fueron previamente verificadas. El PS del vástago fue transformado con la función \log_{10} a fin de comparar las medias de los tratamientos. Se utilizó el programa Infostat 2018 y GraphPad Prism 8.

3.6 - Resultados

Experimento 1

El P disponible en el suelo incrementó ante el aumento de las dosis de P agregadas en las muestras recolectadas de los cultivos de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* (Fig. 1, Tabla 1). Antes de sembrar y luego de agregar la solución de P el pH del suelo fue 5,54. Al final del experimento, el pH varió 0,32 unidades entre 0 y 160 mgP kg⁻¹ agregados para *L. tenuis*, 0,48 unidades para *S. arundinaceus* y 0,46 unidades para *P. coloratum*.

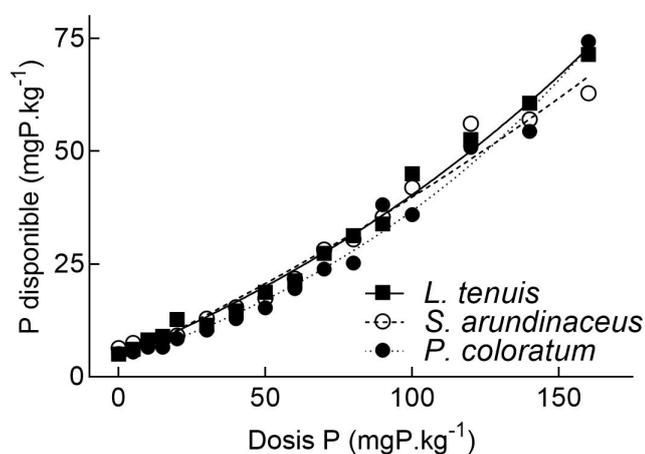


Fig. 1. Las curvas describen el ajuste entre 16 dosis de P agregadas y el P disponible en el suelo de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* crecidas durante 45 días en un suelo deficiente en P. Todas las curvas fueron ajustadas con la Ec. 1 y significativas a $P < 0,001$.

Las tres especies forrajeras respondieron al agregado de P y alcanzaron el máximo rendimiento a diferentes niveles de P disponible (Fig. 2, Tabla 1). El 90% del máximo rendimiento fue alcanzado a 24,28 mgP kg⁻¹ disponible para *L. tenuis* (Fig. 2a), mientras que las gramíneas requirieron 14,44 y 11,18 mgP kg⁻¹ disponible en el caso de *P. coloratum* y *S. arundinaceus* respectivamente (Fig. 2a). Dentro del rango de P disponible 20-75 mgP kg⁻¹, el peso seco radical de *L. tenuis* registró valores cercanos a 1,4 g maceta⁻¹, mientras que las gramíneas registraron valores cercanos a 0,75 g maceta⁻¹ (Fig. 2b, Tabla 1).

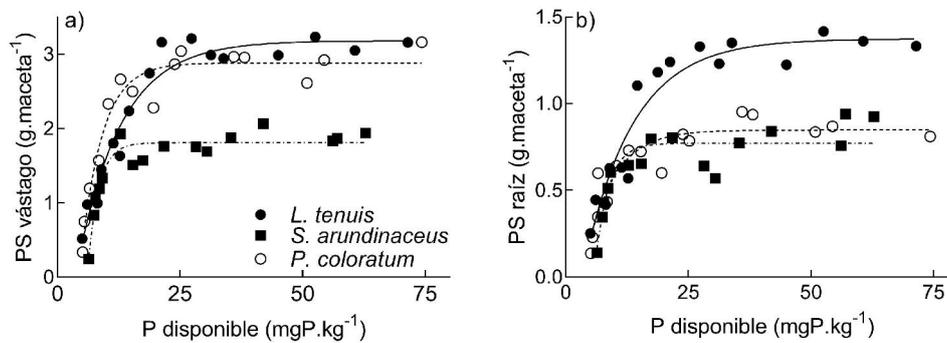


Fig. 2. PS del vástago (a) y PS de la raíz (b) en función del P disponible en el suelo de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* crecidas durante 45 días en un suelo deficiente en P. Todas las curvas graficadas fueron ajustadas con la Ec. 1 y significativas a $P < 0,001$.

La fracción de biomasa radical fue mayor en *L. tenuis* y *S. arundinaceus* en comparación con *P. coloratum* (Fig. 3a, Tabla 1). El largo radical específico de *L. tenuis* no fue afectado ante el agregado de P. A partir de aproximadamente 10 mgP kg⁻¹ disponible en el suelo, el largo radical específico de las gramíneas se mantuvo constante ante el incremento de las dosis de P agregadas (Fig. 3b).

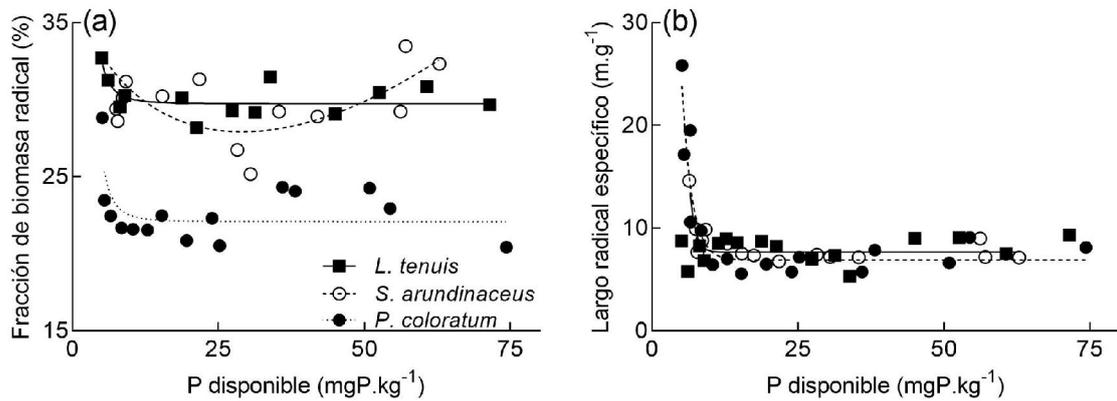


Fig. 3. Fracción de biomasa radical (a) y largo radical específico (b) en función del P disponible en el suelo para *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* crecidas durante 45 días en un suelo deficiente en P. Todas las curvas graficadas fueron ajustadas con la Ec. 1 y significativas a $P < 0,001$.

La concentración de P en el vástago aumentó en las tres especies ante el incremento del P disponible (Fig. 4a, Tabla 1). La concentración de P crítica en el vástago necesaria para alcanzar el 90% del máximo rendimiento forrajero fue 0,31% para *L. tenuis* y *P. coloratum*, y 0,41% para *S. arundinaceus*. La concentración de P en tejido radical de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* aumentó ante el incremento de P disponible en el suelo, y se mantuvo constante en las raíces de *P. coloratum* (Fig. 4b, Tabla 1).

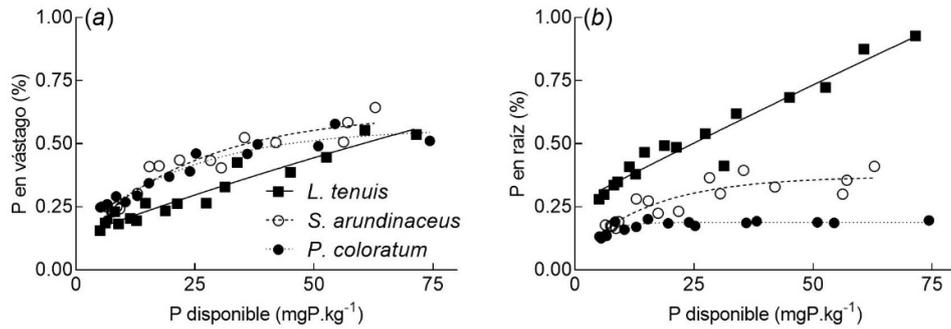


Fig. 4. Concentración de P en vástago (a) y en raíz (b) en función del P disponible en el suelo de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* crecidas en un suelo deficiente en P. Todas las curvas fueron ajustadas a la Ec. 1 y significativas a $P < 0,001$.

La partición del contenido de P entre las raíces y el vástago en *L. tenuis* fue de 40%, en *S. arundinaceus* fue de 22% y en *P. coloratum* fue de 10% aproximadamente, en todos los casos se mantuvo relativamente constante ante el incremento de P disponible (Fig. 5a, Tabla 1). A partir de un nivel de P disponible de 20 mgP kg⁻¹, la absorción específica de P en *P. coloratum* fue cercana a 0,3 mgP g⁻¹ mientras que en *L. tenuis* y *S. arundinaceus* fue cercana a 0,2 mgP g⁻¹ (Fig. 5b, Tabla 1).

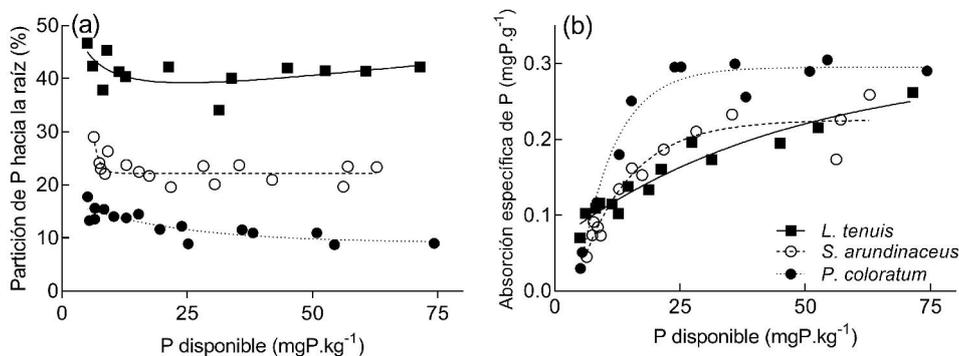


Fig. 5. Partición de P hacia la raíz (a) y absorción específica de P (b) en función del P disponible en el suelo de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* crecidas en un suelo deficiente en P. Todas las curvas fueron ajustadas a la Ec. 1, excepto *L. tenuis* en las figuras a y b que fue ajustada por la Ec. 2. Las curvas ajustadas fueron todas significativas a $P < 0.001$, excepto *L. tenuis* en la figura a que fue significativa a $P < 0,05$.

La colonización MA y la biomasa del vástago de las tres especies estudiadas fueron graficadas en función del P disponible en el suelo (Fig. 6). La leguminosa mostró mayores niveles de colonización que las gramíneas en todo el rango de P disponible. Además, la colonización MA en las raíces de *L. tenuis* incrementó de 81,34% a 93,08% cuando el P disponible aumentó de 5,04 a 12,72 mgP kg⁻¹, y luego disminuyó lentamente ante el incremento del P disponible en el suelo (Fig. 6a, Tabla 1). La colonización MA en las raíces de las gramíneas disminuyó abruptamente de 5 a 15 mgP kg⁻¹ disponible, y luego se mantuvo constante en valores cercanos a cero (Fig. 6b, c; Tabla 1). La colonización MA en las raíces de *S. arundinaceus* disminuyó de 45,25 a 4,87% ante 6,38 a 12,89 mgP kg⁻¹ disponibles respectivamente (Fig. 6b). La colonización MA en las raíces de *P. coloratum* disminuyó de 50,64 a 7,97% ante 5,13 a 10,37 mgP kg⁻¹ disponible respectivamente (Fig. 6c). En *S. arundinaceus*, el 80-90% del máximo rendimiento del vástago y 4,74-3,85% de colonización MA estuvieron asociados con una disponibilidad de P en el suelo de 9,63 a 11,67 mgP kg⁻¹. En *P. coloratum*, el 80-90% del máximo rendimiento del vástago y el 9,12-4,67% de colonización MA estuvieron asociados a una disponibilidad de P en el suelo de 11,41 a 14,44 mgP kg⁻¹. Mientras que en *L. tenuis* el 80-90% del máximo rendimiento del vástago y el 80,78-72,76% de colonización MA estuvieron asociados a una disponibilidad de P en el suelo de 18,06 a 24,27 mgP kg⁻¹.

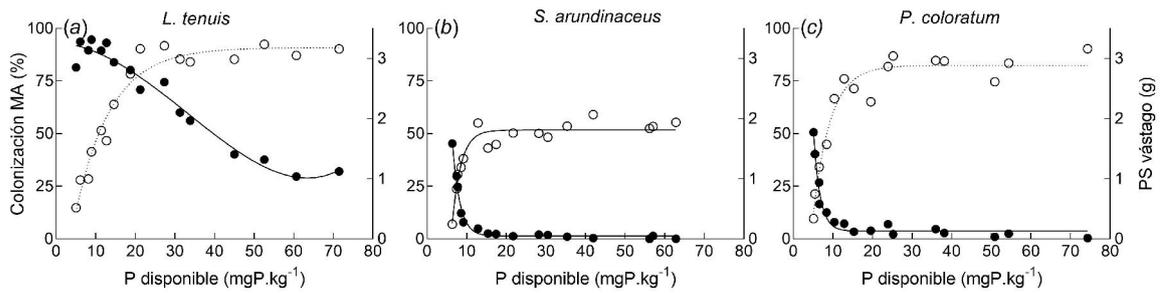


Fig. 6. Colonización MA (círculos llenos), PS del vástago (círculos vacíos) en función del P disponible en el suelo de *L. tenuis* (a), *S. arundinaceus* (b) y *P. coloratum* (c) crecidas durante 45 días en un suelo deficiente de P. Todas las curvas fueron ajustadas con la Ec. 1, excepto la colonización en *L. tenuis* que fue ajustada con la Ec. 2. Las curvas fueron todas significativas a $P < 0,001$.

Las tres especies estudiadas registraron una alta proporción de arbusculos en sus raíces (Fig. 7, Tabla 1). El porcentaje de colonización por arbusculos fue mayor en *L. tenuis* en comparación con las gramíneas para todas las disponibilidades de P estudiadas. En las tres especies, el porcentaje de colonización por arbusculos disminuyó ante el incremento del P disponible.

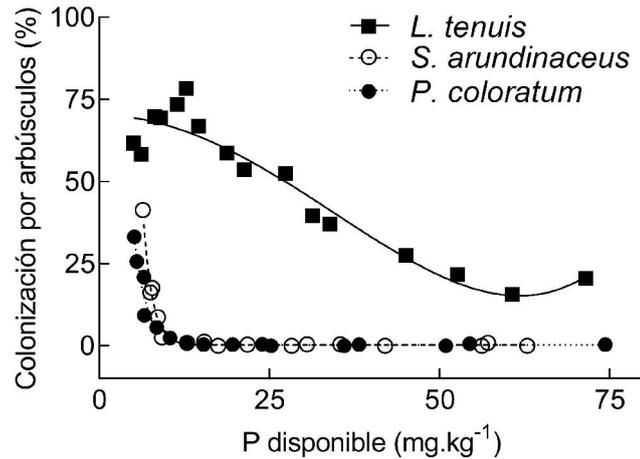


Fig. 7. Colonización por arbusculos en función del P disponible en el suelo de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* crecidas durante 45 días en un suelo deficiente en P. Todas las curvas fueron ajustadas con la Ec. 1, excepto *L. tenuis* que fue ajustada con la Ec. 2. Las curvas ajustadas fueron todas significativas a $P < 0,001$.

El análisis de componentes principales (ACP) explicó el 93,71% de la varianza acumulada (Fig. 8). El eje I explicó el 58,89% de la varianza y el eje II el 34,82%. El análisis mostró que la colonización MA estuvo más asociada con la concentración de P en la raíz que con el P disponible en el suelo y la concentración de P en el vástago. El eje I separó a la leguminosa de las gramíneas y el eje II separó la baja disponibilidad de P de la alta. La figura 8 muestra que los puntos correspondientes a *L. tenuis* pueden ser agrupados de 0 a 30 mgP kg⁻¹, de 40 a 80 mgP kg⁻¹, de 90 a 120 mgP kg⁻¹ y de 140 a 160 mgP kg⁻¹ agregados. La colonización MA estuvo asociada a dosis de P bajas y moderadas y a *L. tenuis*. Por otra parte, la concentración de P en vástago estuvo asociada a dosis de P altas y a las gramíneas (Fig. 8). Los valores de los autovectores se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1: Resultados estadísticos de las curvas ajustadas para describir las relaciones entre la producción de biomasa, variables morfológicas, P en tejido vegetal, colonización MA y P disponible. ns, no significativo.

P disponible	R²	Ecuación	P
<i>L. tenuis</i>	0,99	$Y=(-47,62) - (-52,05) \exp(-0,0053X)$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,98	$Y=(-111,5) - (-115,4) \exp(-0,0027X)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,99	$Y=(-24,48) - (-28,19) \exp(-0,0078X)$	<0,001
Peso seco del vástago			
<i>L. tenuis</i>	0,95	$Y=(3,180) - (4,775) \exp(0,1116)$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,92	$Y=(1,809) - (27,13) \exp(0,4483)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,94	$Y=(2,881) - (7,865) \exp(0,2290)$	<0,001
Peso seco radical			
<i>L. tenuis</i>	0,94	$Y=(1,374) - (1,896) \exp(0,0988X)$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,83	$Y=(0,771) - (6,713) \exp(0,3745X)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,90	$Y=(0,848) - (1,516) \exp(0,1752X)$	<0,001
Fracción de biomasa radical			
<i>L. tenuis</i>	0,48	$R= (-109,3) / 1 + ((X(-3,178) - (-0,595)) / (-0,0505))^2$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,38	$R= (27,92) / 1 + ((X(0,661) - (9,290)) / (2,8530))^2$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,42	$R= (-429,0) / 1 + ((X(-3,522) - (-0,687)) / (0,0323))^2$	<0,001
Largo radical específico			
<i>L. tenuis</i>	0,01	-	ns
<i>S. arundinaceus</i>	0,82	$Y=(7,652) - (-8489) \exp(1,1160X)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,91	$Y=(6,877) - (-358,5) \exp(0,5935X)$	<0,001
Concentración P en vástago			
<i>L. tenuis</i>	0,93	$Y=(1,788) - (1,655) \exp(0,0042X)$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,94	$Y=(0,642) - (0,509) \exp(0,0395X)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,91	$Y=(0,562) - (0,420) \exp(0,0427X)$	<0,001
Concentración P en raíz			
<i>L. tenuis</i>	0,93	$Y=(7,109) - (6,845) \exp(0,0014X)$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,78	$Y=(0,371) - (0,308) \exp(0,0614X)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,76	$Y=(0,188) - (0,282) \exp(0,2877X)$	<0,001
Partición de P hacia la raíz			
<i>L. tenuis</i>	0,08	$R= (39,21) / 1 + ((X(0,093) - (1,350)) / (0,0769))^2$	<0,05
<i>S. arundinaceus</i>	0,49	$Y=(22,15) - (-2594) \exp(0,9356X)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,76	$Y=(9,080) - (-8,261) \exp(0,0481X)$	<0,001
Absorción específica de P			
<i>L. tenuis</i>	0,93	$Y=(0,299) - (0,236) \exp(0,0218X)$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,92	$Y=(0,226) - (0,327) \exp(0,0979X)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,97	$Y=(0,295) - (0,545) \exp(0,1398X)$	<0,001
Colonización MA			
<i>L. tenuis</i>	0,96	$R= (28,89) / 1 + ((X(1,820) - (1909)) / (238,10))^2$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,98	$Y=(1,260) - (-1420) \exp(0,5396)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,97	$Y=(3,685) - (-1006) \exp(0,6008)$	<0,001
Colonización por arbusculos			
<i>L. tenuis</i>	0,92	$R= (15,24) / 1 + ((X(1,944) - (3026)) / (408,00))^2$	<0,001
<i>S. arundinaceus</i>	0,99	$Y=(0,306) - (-5137) \exp(0,7566)$	<0,001
<i>P. coloratum</i>	0,96	$Y=(0,344) - (-550,6) \exp(0,5526)$	<0,001

Tabla 2: Autovectores obtenidos del análisis de componentes principales

Variables	Eje 1	Eje 2
MA	0,3998	0,6287
P vast	-0,6346	-0,0866
P raíz	-0,2519	0,7484
P disp	-0,6115	0,1926

MA, colonización MA; P vast, concentración de P en vástago; P raíz, concentración de P en raíz; P disp, disponibilidad de P en el suelo.

Experimento 2

La densidad de esporas del suelo utilizado como inóculo de hongos MA fue 25 esporas por gramo de suelo seco y la viabilidad fue 15,96%. El porcentaje de esporas viables en el suelo esterilizado fue cero.

El porcentaje de plantas colonizadas incrementó ante el aumento de la concentración de suelo como inóculo independientemente del agregado de fertilizante fosforado. En las diluciones 1 y 5 % no se encontraron plantas colonizadas con o sin agregado de P. En la dilución del 10 % se observó un 38,5 % y un 12,5 % de plantas colonizadas en el tratamiento sin fertilizar y fertilizado, respectivamente (Fig. 9, Tabla 3). El IMS₅₀ fue 16,87 g y 19,23 g para los tratamientos sin y con agregado de fertilizante fosforado, respectivamente.

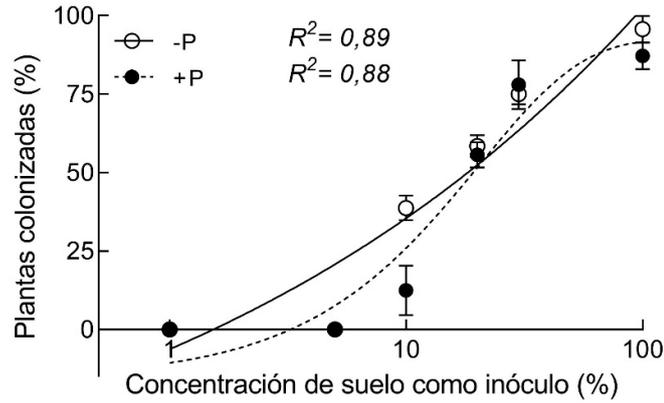


Fig. 9. Porcentaje de plantas colonizadas en función de la concentración de suelo como inóculo de hongos MA nativos, en plantas de *L. tenuis* crecidas durante 20 días sin (círculo vacío) y con (círculo lleno) agregado de P.

La biomasa seca del vástago fue afectada por la dilución del suelo como inóculo, el agregado de P y por la interacción de ambos factores. Para el rango de diluciones de 1 a 10 %, el agregado de P incrementó el peso seco del vástago, mientras que de 20 a 100 % no se observaron cambios ante el agregado del fertilizante en comparación con el tratamiento control sin fertilizar (Fig. 10a, Tabla 4). El peso fresco de las raíces fue afectado por el agregado de P y por la interacción entre la dilución del inóculo y el agregado de P. La producción de biomasa radical mostró el mismo comportamiento que el peso seco del vástago, con un efecto positivo del P sobre las diluciones más altas, mientras que no se registraron efectos en las diluciones más bajas (Fig. 10b, Tabla 4).

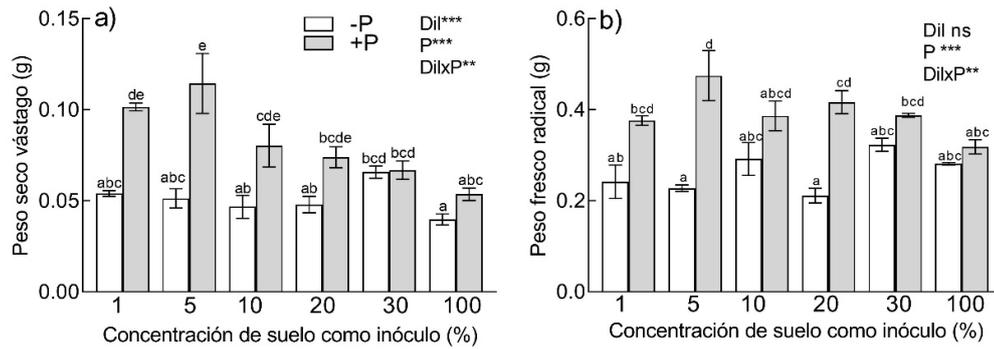


Fig. 10. Producción de biomasa seca del vástago (a) y biomasa fresca de la raíz (b) en función de la concentración de suelo como inóculo de hongos MA nativos, en plantas de *L. tenuis* crecidas durante 20 días sin (blanco) y con (gris) agregado de 15 mgP kg⁻¹. Los valores representan la media \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) acordes con el test de Tukey. Los efectos estadísticamente significativos se muestran en el gráfico, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ns no significativo.

La respuesta al agregado de P disminuyó ante el incremento de la concentración del inóculo en el suelo. A partir de la dilución 30 % de inóculo la respuesta fue cercana a cero (Fig. 11, Tabla 3).

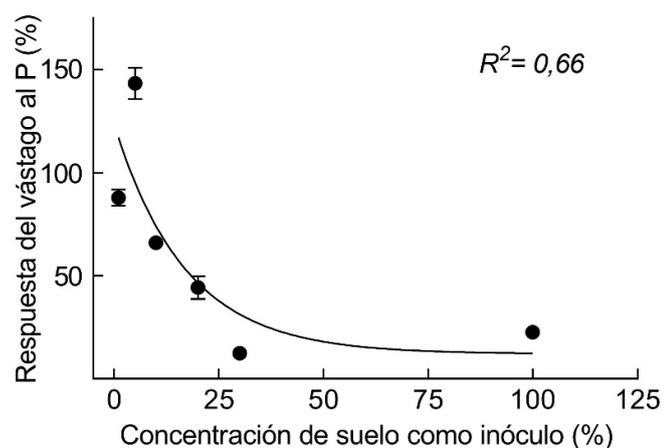


Fig. 11. Respuesta del vástago al agregado de P en función de la concentración de suelo como inóculo de hongos MA nativos, en plantas de *L. tenuis* crecidas durante 20 días.

Tabla 3. Resultados estadísticos de las ecuaciones ajustadas para describir las relaciones de la dilución del suelo como inóculo de hongos MA nativos con el porcentaje de plantas colonizadas y la respuesta del vástago al agregado de P en plantas de *L. tenuis*.

		R ²	Ecuación	P
Plantas colonizadas	-P	0,89	$R = (-9758) / 1 + ((X^{(0,2044)} - (-280)) / (2,846))^2$	<0,0001
	+P	0,88	$Y = (92,56) - (108,4) \exp(-0,0486X)$	<0,0001
Respuesta al P		0,66	$Y = (0,119) - (-1,115) \exp(-0,0586X)$	<0,0001

Tabla 4. Resultados del ANOVA de dos vías (valores de *F* y *P*) para la dilución del suelo como inóculo de hongos MA nativos (Dil), el agregado de fertilizante fosforado (P) y la interacción de ambos factores (DilxP) para el PS del vástago y PF de la raíz de *L. tenuis*.

	PS vástago			PF raíz		
	Dil	P	Dil*P	Dil	P	Dil*P
F	7,01	64,44	3,89	1,37	56,21	4,93
P	0,0001	<0,0001	0,0064	0,2601	<0,0001	0,0016

3.7 - Discusión

Los resultados del experimento 1 muestran que *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* crecidas en un suelo deficiente en P respondieron fuertemente al incremento del P disponible en el suelo dado por el agregado de fertilizante fosforado. *Lotus tenuis* y *P. coloratum* produjeron mayor biomasa del vástago que *S. arundinaceus* mientras que ambas gramíneas produjeron

menor biomasa radical que *L. tenuis* con valores similares de largo radical específico ante un rango de disponibilidad de P en el suelo de bajo a moderado. Estos resultados confirman que la leguminosa requirió mayor cantidad de biomasa radical que la gramínea C4 para producir la misma cantidad de biomasa aérea; debido principalmente a que su sistema radical es menos eficiente para absorber P en comparación con la gramínea C4 (Pang y col., 2010; Fort y col., 2015). Además esto es consistente con estudios previos que reportaron un incremento de la fracción de biomasa radical y del largo radical específico en respuesta a la baja disponibilidad de P para un amplio rango de especies forrajeras (Hill y col., 2010; Pang y col., 2010). Los cambios en la morfología radical en respuesta a la fertilización fosforada son importantes para incrementar la eficiencia de absorción de P (Lambers y col., 2006). En este sentido, ha sido reportado que una alta fracción de biomasa radical contribuye a una mayor eficiencia en la absorción de P en algunas especies (Fort y col., 2015; Pang y col., 2010).

La concentración de P en el vástago de las tres especies estudiadas incrementó ante el aumento del P disponible en el suelo y la partición de P hacia la raíz fue la mayor en *L. tenuis* y la menor en *P. coloratum*. Es importante remarcar que *P. coloratum* produjo una alta cantidad de biomasa aérea con una baja proporción de biomasa radical comparado con las demás especies estudiadas. Esto puede ser atribuido a una baja cantidad de P contenido en las raíces combinado con una alta absorción específica de P, la cual incrementó ante una elevada disponibilidad de P en el suelo. Estos resultados indican que *P. coloratum* destina mayor cantidad de recursos energéticos para producir biomasa aérea comparado con *L. tenuis* y *S.*

arundinaceus, lo cual constituye una característica apreciable entre las especies forrajeras. Además, *L. tenuis* y *P. coloratum* tienen una menor concentración crítica de P la cual puede contribuir a un mejor comportamiento en suelos deficientes en P comparado con *S. arundinaceus*.

El incremento del P disponible en el suelo disminuye la colonización radical por hongos MA (Hill y col., 2010; Mendoza y col. 2016a; b). En el presente estudio, el incremento del P disponible aumentó la absorción de P en las tres especies estudiadas y las plantas tuvieron menor necesidad de asociarse con hongos MA, ya que la colonización MA disminuyó marcadamente. Sin embargo, a pesar del incremento del P disponible se observó una alta proporción de raíces colonizadas por arbuscúlos. Los arbuscúlos son las principales estructuras de intercambio de nutrientes y C entre ambos simbioses (Smith y Read 2008). La alta proporción de raíces colonizadas por arbuscúlos sugiere que las tres especies estudiadas y los hongos MA establecerían una simbiosis funcional independientemente del nivel de P en el suelo.

Las plantas de diferentes especies combinan distintas estrategias en relación a las características de sus sistemas radicales y de la colonización MA para responder al incremento del P en el suelo (Lambers y col., 2006). En particular, la colonización MA en el sistema radical de *L. tenuis* mostró dos efectos: por un lado, el agregado de una dosis baja de P no afectó la colonización MA e incluso mostró un leve aumento de la misma, mientras que el agregado de dosis altas de P disminuyó el porcentaje de colonización MA. Estos resultados son consistentes con estudios previos en los cuales se han registrado aumentos de la colonización MA en las raíces de *L. tenuis* ante la

aplicación de dosis bajas de P (Mendoza y Gigli 1995; Mendoza 2001). Por otro lado, según los estudios antes mencionados, la colonización MA no es la mejor estrategia para absorber P a niveles bajos de P disponible ($<5 \text{ mgP kg}^{-1}$), y en estas condiciones es donde la modificación de las características radicales cobra mayor importancia (Lambers y col., 2015). En el presente estudio, la menor colonización MA sin agregado de P ($5,04 \text{ mgP kg}^{-1}$ disponible) comparada con la obtenida ante $6,12\text{-}14,61 \text{ mgP kg}^{-1}$ disponible implica que una baja disponibilidad de P limitó la colonización MA y que la incorporación de pequeñas cantidades de P ($5\text{-}40 \text{ mgP kg}^{-1}$ aplicado) incrementaron los niveles de colonización en *L. tenuis*. De acuerdo con Jeffery y col., (2017), aún no se sabe si esto es un efecto directo de la deficiencia de P sobre los hongos MA o indirectamente causado por una planta improvista de P.

Experimentos previos mostraron que un incremento en la concentración de P en el suelo o en el tejido vegetal estuvo asociado a una disminución en la colonización MA (Mendoza y Pagani 1997; Cornwell y col. 2001). Los autores sugirieron que el incremento de la concentración de P en las plantas incrementó la resistencia a la penetración de hongos MA en las raíces, contribuyendo a disminuir el porcentaje de colonización (Mendoza y Pagani 1997). En este sentido, el diagrama de ACP mostró que la colonización en las raíces de la leguminosa y las gramíneas estuvo mayormente relacionada con la concentración de P en las raíces. Esta podría ser otra evidencia para explicar los cambios en la colonización MA ante el incremento del P disponible en el suelo. Por otro lado, las variables edáficas y las características de las plantas influyen la colonización MA en las raíces directa o indirectamente (Baylis 1975). Las raíces de *L. tenuis* mostraron valores más elevados de colonización

MA que las gramíneas. Las especies con raíces gruesas como *L. tenuis* no son muy eficientes para absorber nutrientes y es esperable que preferencialmente inviertan compuestos carbonados en la simbiosis MA para satisfacer los requerimientos nutricionales (Baylis 1975; Hetrick 1991).

La aplicación de fertilizante fosforado en suelos deficientes es esencial para incrementar la cantidad y calidad de forraje producido, pero actúa en detrimento de la simbiosis MA, principalmente en gramíneas. La morfología y arquitectura de las raíces son factores importantes que determinan la colonización MA. Las gramíneas poseen raíces relativamente finas y altamente ramificadas. Estas características constituyen una estrategia para la absorción de nutrientes del suelo, por lo cual resultan en una menor respuesta a la colonización MA que las leguminosas. De acuerdo a un estudio previo (García y Mendoza 2008), la colonización MA fue consistentemente mayor en *L. tenuis* que en gramíneas C4 en todos los pastizales estudiados. Además, ha sido reportado que las gramíneas C4 presentan mayores porcentajes de colonización MA que las gramíneas C3 (Hetrick y col., 1989; Wilson y Hartnett 1997; Cavagnaro y col., 2014). Pero en el presente ensayo *P. coloratum* (C4) y *S. arundinaceus* (C3) mostraron niveles similares de colonización MA en sus raíces. Esto puede deberse a que los hongos MA influyen diferentes estadios del desarrollo de las gramíneas, dependiendo del tipo de hospedante (Wilson y Hartnett, 1997). En este sentido, ha sido reportado que las gramíneas C4 podrían alcanzar mayores valores de colonización MA en estadios más avanzados del desarrollo como por ejemplo en floración, asociado a un incremento de los requerimientos nutricionales (Cavagnaro y col. 2014). Es importante destacar que al momento de la cosecha del presente experimento,

las tres especies se encontraban en estadio vegetativo. Por lo tanto el período de duración del presente ensayo podría afectar el largo radical colonizado en las plantas de *P. coloratum* y el porcentaje de colonización MA podría alcanzar valores mayores en estadios del desarrollo más avanzados. El mantenimiento de niveles bajos de colonización MA en las raíces de gramíneas podría garantizar una rápida proliferación de la simbiosis ya establecida cuando se suscita un período de mayor absorción de nutrientes. Esta es una posible explicación de la persistencia de bajos niveles de colonización MA en las raíces de las gramíneas estudiadas incluso cuando la disponibilidad de P en el suelo fue suficiente para disminuir los beneficios de la simbiosis MA en el crecimiento de las plantas. Los resultados del presente estudio están parcialmente de acuerdo con la primera hipótesis.

La disponibilidad de P es baja ($<10 \text{ mgP kg}^{-1}$) en la mayoría de los suelos de pastizales y pasturas del mundo, y la asociación con hongos MA brinda mayores beneficios a bajos niveles de P disponible, cuando el rendimiento forrajero es menor al rendimiento máximo (Harnett y Wilson, 2002). La fertilización fosforada en suelos deficientes en P es necesaria para incrementar el rendimiento forrajero, sin embargo el agregado de P impacta negativamente sobre la simbiosis MA. Una estrategia para mantener la colonización MA y preservar el inóculo nativo de hongos MA en el suelo es disminuir la dosis de fertilizante fosforado (Beggi y col., 2016; Mai y col., 2018). Seleccionar una dosis de P óptima podría estimular la actividad potencial de los hongos MA nativos en el suelo e incrementar la eficiencia de absorción de P de especies agrícolas y forrajeras (Gosling y col., 2013; Liu y col., 2016; Mai y col., 2018).

Para *L. tenuis*, fue posible incrementar el rendimiento forrajero (80-90 % del máximo rendimiento) y simultáneamente mantener niveles altos de colonización MA (~70%) en sus raíces con dosis bajas a moderadas de fertilizante fosforado (30-60 mgP kg⁻¹). En el presente ensayo, dosis bajas a moderadas de fertilizante fosforado incrementaron el P disponible en el rango de 10-20 mgP kg⁻¹. A pesar de que cuando la disponibilidad de P en el suelo aumenta, tanto la colonización MA como los beneficios de la simbiosis disminuyen (Janos 2007; Jeffery y col., 2018), los hongos MA pueden contribuir en forma activa a la absorción de P (Smith y col., 2004). Ante altos niveles de P disponible (>45 mgP kg⁻¹), *L. tenuis* mostró niveles de colonización MA relativamente altos en sus raíces (y de colonización por arbusculos), y esto podría estar asociado con la absorción de otros nutrientes con baja movilidad en el suelo como el Zn o Cu (Ruiz-Lozano y col., 1996).

Lotus tenuis es la única leguminosa co-dominante en la mayoría de las comunidades de pastizales presentes en la Cuenca del Río Salado. La capacidad de esta leguminosa de presentar altos niveles de colonización MA es un factor importante en la nutrición de la planta porque indica que la simbiosis MA puede persistir en sus raíces bajo un amplio rango de condiciones edáficas y a lo largo del tiempo (Escudero y Mendoza 2008; García y Mendoza 2008). A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y trabajos previos (Escudero y Mendoza 2005; García y Mendoza 2008), se propone que *L. tenuis* podría ser capaz de mantener el inoculo nativo de hongos MA, tanto en sus raíces como en el suelo, ante un amplio rango de P disponible en el suelo.

Para las gramíneas es difícil obtener un alto rendimiento forrajero y simultáneamente mantener la colonización MA en sus raíces. Si el objetivo es mantener la simbiosis MA, entonces la producción de forraje será menor al máximo rendimiento, especialmente para *S. arundinaceus*. Para *P. coloratum*, se requieren más investigaciones para determinar cuál es el principal factor que regula la colonización MA en sus raíces (la disponibilidad de P en el suelo, la concentración de P en tejido o la combinación de ambos factores). Los resultados de este ensayo aceptan la segunda hipótesis y son los primeros en reportar la interacción de *S. arundinaceus* y *P. coloratum* con la comunidad de hongos MA nativa de la Cuenca del Río Salado y los cambios en la morfología radical ante un incremento gradual de P disponible en el suelo.

La presencia de *L. tenuis* en los pastizales de la región es crucial para el incremento de la calidad y cantidad de forraje producido (Cahuépe 2004). Incluso, la presencia de leguminosas en pastizales y pasturas puede ser un método efectivo para incrementar la colonización MA en las raíces de plantas vecinas y aliviar el estrés por deficiencia de P (Xiao y col., 2019) (Capítulos 3 y 4). Por eso resulta interesante estudiar el rol de los hongos MA en combinación con una dosis baja de fertilizante fosforado sobre el comportamiento de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en consociación (Capítulo 4). Además podría esperarse que ante una baja disponibilidad de P en el suelo la presencia de *L. tenuis* incremente la colonización MA en las raíces de *S. arundinaceus*. Como así también que la fertilización fosforada modifique las interacciones competitivas entre las plantas en favor de la leguminosa.

Con fines prácticos de poder evaluar el efecto de una dosis baja de fertilizante fosforado en los siguientes ensayos que conforman la presente

tesis, se seleccionó la dosis de 15 mgP kg⁻¹ como aquella capaz de aumentar la producción de biomasa y simultáneamente disminuir el impacto sobre la colonización MA. Además se seleccionó la dosis de 75 mgP kg⁻¹ como aquella capaz de maximizar el rendimiento forrajero y minimizar la colonización MA en las raíces de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* (Capítulo 2).

Por otro lado, los resultados del experimento 2 muestran que el porcentaje de plantas colonizadas aumentó ante el incremento de la proporción de suelo como inóculo independientemente del agregado de la dosis baja (15 mgP kg⁻¹) de fertilizante fosforado seleccionada a partir del experimento 1. Esto se debe a un aumento de la cantidad de esporas, fragmentos de raíces colonizadas y micelio extrarradical que pueden actuar como propágulos capaces de iniciar una nueva colonización. Las raíces de *L. tenuis* no presentaron colonización ante 1 % y 5 % de suelo con y sin agregado de P. Esto se debe a que la baja presencia de propágulos de hongos MA y el tiempo ensayado minimizaron las posibilidades de tomar contacto con las raíces de *L. tenuis* a fin de iniciar la colonización.

El agregado de P disminuyó 3 veces el porcentaje de plantas colonizadas ante 10% de suelo, y no hubo diferencias ante 20%, 30% y 100% en comparación con el tratamiento sin fertilizar. Posiblemente la disminución de la germinación de esporas de hongos MA y de la extensión del micelio fúngico en el suelo provocada por el agregado de P (Grant y col., 2005; Gryndler y col., 2006) sumado a una disminución de la presencia de propágulos de hongos MA minimizó la probabilidad de que los hongos MA tomen contacto con el sistema radical de *L. tenuis* y den inicio a una nueva colonización. Pero cuando la proporción de inóculo fue 20% o mayor, el fertilizante fosforado no afectó la

infectividad micorrícica ya que no se produjo una disminución en el porcentaje de plantas colonizadas.

La cantidad de suelo como inóculo mínima necesaria para colonizar al menos el 50% de las plantas presentes (IMS_{50}) fue de 16,87% y 19,23% para los tratamientos -P y +P, respectivamente. Estos resultados indican que el agregado de 15 mgP kg⁻¹ no afectó la infectividad micorrícica y están de acuerdo con el trabajo publicado por De Miranda y Harris (1994) quienes informaron que una dosis baja de P (12,5 mgP kg⁻¹) en un suelo deficiente (2,2 mgP kg⁻¹ disponible) no afectó la germinación de esporas e incluso la incrementó.

El peso seco del vástago y el peso fresco de la raíz de las plantas sin fertilizar no fueron afectadas ante el incremento de la proporción de suelo como inóculo. En este sentido, la duración del bioensayo puede haber sido el motivo por el cual no se haya logrado un gran desarrollo de la simbiosis MA a fin de observar diferencias en el crecimiento de las plantas. Por otra parte, la biomasa de las plantas fertilizadas disminuyó ante el incremento de la proporción de suelo como inóculo, y en comparación con las plantas sin fertilizar fue mayor en las concentraciones menores (1 – 20%) y similar en las concentraciones mayores (30 – 100%). Esto podría atribuirse a que ante la baja presencia de microorganismos en el suelo relacionado con la menor concentración de suelo, las plantas de *L. tenuis* tendrían disponible la mayor parte del P agregado de forma inmediata pudiendo así incrementar su crecimiento. Pero cuando la presencia de microorganismos en el suelo aumentó, correspondiente a las concentraciones de suelo mayores, gran parte del P agregado podría haber sido inmovilizado por los microorganismos y por lo tanto haber estado menos

disponible para las plantas. En este sentido, Bünemann y col., (2012) encontraron que en suelos de pastizales deficientes en P ($0,4 \text{ mgP kg}^{-1}$ disponible extractable en agua), el P agregado ($17 \text{ kgP.ha}^{-1}\text{año}^{-1}$) fue inmovilizado rápidamente por los microorganismos (32 días). Además, Heuck y col. (2015) mostraron que la comunidad microbiana fue más susceptible al agregado de fertilizante en suelos deficientes en comparación con suelos bien provistos de P. Si bien, luego del período de inmovilización del P por los microorganismos, éste comienza a ser mineralizado, en general este proceso implica un período de tiempo mayor a la duración del presente ensayo (Bünemann y col., 2012), por lo cual podría no haberse visto reflejado en el crecimiento de las plantas. La tercera hipótesis es parcialmente aceptada.

La cantidad de esporas de hongos MA por gramo de suelo seco varía de acuerdo a características edáficas y a la estación climática, entre otros factores (Escudero y Mendoza, 2005; García y col., 2017). La cantidad de esporas de hongos MA por gramo de suelo seco registradas en el suelo evaluado en el presente capítulo fue relativamente alta en relación a los resultados reportados por García y col., (2017) para el mismo sitio de muestreo. Esto puede deberse a la diferente estación climática en la que se realizaron los muestreos y a un efecto potenciador de la comunidad de hongos MA debido al mantenimiento del inóculo en macetas. Por otra parte, la viabilidad de esporas reportada en el presente capítulo también resultó relativamente elevada en comparación con datos previos para el mismo sitio de muestreo (García, 2022; Comunicación personal). Lo antes mencionado permite concluir que el suelo utilizado como inóculo de hongos MA en los ensayos presentados en los capítulos siguientes de la presente tesis estuvo bien provisto de esporas viables de hongos MA.

3.8 - Conclusiones

Para *L. tenuis* es posible incrementar el rendimiento forrajero y simultáneamente mantener altos niveles de colonización MA en sus raíces bajo un rango de P disponible de 10-20 mgP kg⁻¹. Pero es difícil cumplir ambos objetivos con las gramíneas, especialmente con *S. arundinaceus*. La presencia de *L. tenuis* contribuye a mantener la simbiosis MA bajo un amplio rango de disponibilidad de P en suelos de la Cuenca del Río Salado. Promover la presencia de *L. tenuis* a través de la aplicación de dosis bajas de fertilizante fosforado podría mejorar el rendimiento forrajero y el ciclado de nutrientes con el mantenimiento de la colonización MA en pasturas y pastizales. Por otro lado, la dosis de P seleccionada en el experimento 1 resultó conservativa de la capacidad de los hongos MA para iniciar la colonización radical de *L. tenuis*, ya que solo afectó la infectividad micorrícica cuando la concentración de suelo disminuyó hasta 10 %, mientras que ante concentraciones mayores la colonización no fue afectada. A partir de los resultados obtenidos se puede establecer que la aplicación de dosis consideradas bajas a moderadas (~15 mgP kg⁻¹) en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado (<10 mgP kg⁻¹ disponible) podría aumentar la producción de biomasa vegetal sin disminuir significativamente la infectividad micorrícica. Estos resultados son los primeros en reportar la interacción entre los hongos MA nativos de la cuenca del Río Salado con las gramíneas *S. arundinaceus* y *P. coloratum* y los cambios en la morfología radical ante un aumento gradual de la disponibilidad de P en el suelo. Además son un punto de partida importante para el diseño de futuros ensayos a campo que permitan seleccionar dosis de fertilizante fosforado que

logren aumentar la producción forrajera y simultáneamente conservar la simbiosis MA en pastizales y pasturas de la región.

4-Capítulo 2

Rol de los hongos MA en el crecimiento y absorción de P en especies forrajeras con diferente metabolismo carbonado ante fertilización fosforada

4.1 - Resumen

Se llevó a cabo un ensayo en macetas con *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum*, crecidas en cultivos puros en un suelo con condiciones limitantes de P de la Cuenca del Río Salado, fertilizadas con una dosis de P baja y una alta (15 y 75 mgP kg⁻¹, respectivamente, seleccionadas a partir del capítulo 1 de la presente tesis) y ante la presencia y ausencia de hongos MA nativos. La dosis baja de P en combinación con los hongos MA incrementó el crecimiento solo de *L. tenuis* (25,85%) y permitió mantener una colonización MA relativamente alta en *L. tenuis* (42,68%) y *P. coloratum* (32,88%) pero no en *S. arundinaceus* (11,14%). La dosis alta de P maximizó la producción de biomasa y provocó una respuesta MA negativa en las gramíneas. La absorción específica de P de las plantas de *L. tenuis* no fertilizadas incrementó 97% debido a la presencia de los hongos MA y registró el valor más alto entre las tres especies no fertilizadas. Mientras que la absorción específica de P de las gramíneas no fertilizadas fue similar, independientemente del metabolismo carbonado y la presencia de hongos MA, pero el largo radical específico fue 70,88% menor en *P. coloratum* en comparación con *S. arundinaceus*. La principal estrategia para absorber P ante condiciones limitantes del nutriente de *L. tenuis* fue la simbiosis MA, de *S. arundinaceus* la alta eficiencia de su sistema radical y de *P. coloratum* no podría ser explicada por las características

del sistema radical o la simbiosis MA. La aplicación de una dosis baja de fertilizante fosforado es una alternativa que permite incrementar la producción de forraje y aprovechar los beneficios de la simbiosis MA en *L. tenuis* y conservar la colonización MA en las raíces *L. tenuis* y *P. coloratum* pero no en *S. arundinaceus*. Se destaca a *P. coloratum* por la alta productividad de biomasa forrajera y por los niveles de colonización MA relativamente altos, incluso ante fertilización fosforada.

4.2 - Introducción

Incrementar la producción forrajera y ganadera en forma sustentable es uno de los desafíos más importantes al cual nos enfrentamos. En la actualidad las herramientas utilizadas para incrementar la producción son la fertilización fosforada y la siembra y promoción de especies adaptadas a crecer ante deficiencia de P. En este sentido, incorporar a los hongos MA como herramienta para incrementar la producción forrajera y la eficiencia de utilización del P es clave para la sustentabilidad de los sistemas productivos. Si bien es sabido que la fertilización fosforada disminuye la colonización MA en las raíces de diferentes especies forrajeras (Capítulo 1), poco se sabe sobre cómo afecta los beneficios de la simbiosis MA. Para ello es necesario estudiar el rol que cumplen los hongos MA nativos y el efecto de diferentes dosis de fertilizante fosforado sobre el crecimiento y absorción de P de una leguminosa, una gramínea C3 y una gramínea C4 crecidas en un suelo deficiente en P de la región.

Las plantas adaptadas a crecer bajo condiciones limitantes de P presentan estrategias para aumentar la absorción de P tales como el

incremento de la proporción de biomasa radical, el largo radical específico y la eficiencia de absorción de P (Pang y col., 2010; Jeffery y col., 2018). Otra estrategia es la asociación con hongos MA que reducen el impacto de la zona de depresión de P cercana a las raíces y mejora la nutrición fosforada (Smith et al., 2011). Ha sido estimado que la inoculación con hongos MA podría resultar en la reducción de aproximadamente el 80% de la aplicación de P recomendada bajo ciertas condiciones (Jakobsen 1995).

La fertilización fosforada es necesaria para obtener rendimientos máximos de forraje en la mayoría de los pastizales y pasturas del mundo (Muir y col., 2011). Pero la colonización MA y los beneficios provistos por esta simbiosis disminuyen cuando el P disponible en el suelo aumenta debido a la fertilización (Covacevich y col., 2006; Cavagnaro y col., 2014; Jeffery y col. 2018). Conservar altos niveles de colonización MA es importante porque los fragmentos de raíces colonizadas actúan como reservorio del inóculo de hongos MA para las plantas vecinas (Smilauer et al., 2020). Por otra parte, los fertilizantes fosforados modifican los resultados netos de la respuesta micorrícica y puede tornar de positiva a neutra o negativa dependiendo de la dosis de P aplicada (Smith et al., 2004; Johnson, 2010). El estudio de dosis de fertilizante fosforado que permitan incrementar la producción forrajera, sostener altos niveles de colonización MA, conservar la infectividad micorrícica del suelo y obtener respuestas micorrícicas positivas es esencial. En este sentido, la respuesta micorrícica depende de la especie de planta hospedante, su metabolismo carbonado, la dosis de P agregada, la comunidad de hongos MA y las condiciones edafoclimáticas (Hetrick et al., 1989; Klironomos 2003; Konvalinková et al., 2017).

Lotus tenuis es altamente dependiente de los hongos MA y muestra altos porcentajes de colonización en sus raíces bajo un amplio rango de P disponible en el suelo, desde deficiencia a suficiencia (Mendoza y Pagani 1997; Mendoza y col., 2009). Esto se debe en parte a que presenta un sistema radical poco eficiente para explorar el perfil del suelo y a sus altos requerimientos de P, si se la compara con una gramínea (Mendoza y col., 2016a). En este sentido, resulta interesante poder evaluar en forma comparativa el rol de los hongos MA en el crecimiento y absorción de P en una especie altamente dependiente de los hongos MA como es *L. tenuis* y dos gramíneas de diferente metabolismo carbonado como son *S. arundinaceus* (C3) y *P. coloratum* (C4).

Schedonorus arundinaceus es probablemente la gramínea forrajera C3 más importante de los pastizales naturales del mundo (Titei et al., 2019). Actualmente se encuentra naturalizada en la Cuenca del Río Salado, produce forraje de alta calidad y tolera condiciones de deficiencia de P (Mendoza et al., 2016), además posee un sistema radical altamente eficiente para absorber P y bajos requerimientos de P para su crecimiento (Tawaraya, 2003). *Schedonorus arundinaceus* muestra de bajos a moderados porcentajes de colonización MA en sus raíces y baja respuesta y dependencia micorrícica (Tawaraya, 2003; Cavagnaro y col., 2014; Cheeke y col., 2019), sobre todo ante fertilización fosforada (Covacevich y col., 2009; Tshewang y col., 2020)

Panicum coloratum responde a la fertilización fosforada y presenta una moderada colonización MA ante condiciones de deficiencia de P (Wallace, 1981). Además presenta una mayor respuesta micorrícica que gramíneas C3 como *S. arundinaceus* inoculadas con hongos MA y crecidas en un sustrato

artificial (Cavagnaro y col., 2014). Pero no se conoce el rol de los hongos MA nativos de la Cuenca en el crecimiento y absorción de P de esta especie y si la asociación con este grupo fúngico representa una estrategia adaptativa para crecer en los suelos deficientes en P de la región.

El estudio de la simbiosis MA y los factores que la regulan son claves para diseñar futuras herramientas que permitan incrementar la producción de forraje aprovechando los beneficios de los hongos MA y garantizando la conservación de la funcionalidad de esta comunidad fúngica. A partir del capítulo 1 de la presente tesis, se seleccionó una dosis baja de fertilizante fosforado (15 mgP kg^{-1}) la cual permite incrementar la producción de forraje y simultáneamente conservar la colonización MA como así también conservar la infectividad micorrícica en el suelo. En el presente capítulo se postula que con esta misma dosis de fertilizante fosforado podrían obtenerse respuestas micorrícicas positivas en cuanto al crecimiento y absorción de P pero de diferentes magnitudes dependiendo de la especie hospedante y su metabolismo carbonado.

4.3 - Objetivo

Estudiar el rol de los hongos MA nativos y las estrategias para absorber P de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* ante una dosis baja y alta de fertilizante fosforado crecidas en un suelo limitante en P de la Cuenca del Río Salado.

4.4 - Hipótesis

1. El crecimiento y absorción de P de *L. tenuis* incrementa debido a la interacción de la dosis baja de fertilizante fosforado y la presencia de hongos MA nativos, mientras que el desarrollo de *S. arundinaceus* (C3) y *P. coloratum* (C4) mejora solo por el agregado de P, independientemente de la dosis.
2. *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* presentan estrategias diferentes para incrementar la absorción de P ante condiciones limitantes de P, principalmente relacionadas a la asociación con hongos MA en *L. tenuis*, a los cambios en la morfología radical (largo radical específico y proporción de biomasa radical) en *S. arundinaceus* y a una combinación de ambas estrategias en *P. coloratum*.

4.5 - Materiales y métodos

Diseño del ensayo

Se diseñó un ensayo en macetas con *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum*, crecidas en cultivos puros en un suelo con condiciones limitantes de P previamente esterilizado, fertilizadas con dos dosis de P (una baja y una alta) e inoculadas con hongos MA nativos.

El ensayo fue conducido usando un arreglo factorial con un diseño completamente aleatorizado. Los principales factores fueron la fertilización fosforada (tres niveles: 0, 15 y 75 mgP kg⁻¹) y la inoculación con hongos MA nativos (dos niveles: con (M) y sin (NM) hongos MA). Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones. Las muestras de suelo fueron recolectadas de la capa superficial (15 cm) de un Natracuoll típico de un pastizal natural de la Cuenca del Río Salado y tamizadas por 2 mm. El suelo fue esterilizado a través de la

técnica de solarización propuesta por Raj y Sharma (2008). El P disponible luego de la esterilización fue de 14,67 mgP kg⁻¹ (Bray I).

Macetas de 2 L de capacidad fueron llenadas con 1700 g de suelo esterilizado y secado al aire. El suelo fue previamente fertilizado con una dosis baja (15 mgP kg⁻¹) y una dosis alta (75 mgP kg⁻¹) seleccionadas a partir de un ensayo previo (Ver Capítulo 1). El P fue agregado como una solución de KH₂PO₄ diluido en 20 ml de agua destilada y posteriormente homogeneizado. Al tratamiento control sin agregado de P se le agregaron 20 ml de agua destilada.

Las macetas fertilizadas y no fertilizadas se combinaron con (M) y sin (NM) agregado de suelo como inóculo de hongos MA nativos. El inóculo de hongos MA nativos de la Cuenca del Río Salado consistió en suelo previamente muestreado y multiplicado en macetas durante 6 meses con *L. tenuis* y *Lolium perenne*. Además contenía todos los microorganismos de suelo, incluso patógenos y bacterias fijadoras de nitrógeno. Las macetas fueron armadas siguiendo una modificación de la técnica propuesta por Pérez y Urcerlay (2009). El inóculo de hongos MA fue agregado como una fina capa, a 4 cm de profundidad desde la superficie de la maceta y en una relación de 5 % del peso seco total. Las macetas control no inoculadas, recibieron la misma proporción de suelo como inóculo pero previamente esterilizado en microondas durante 10 min a potencia máxima y 30 ml de filtrado de inóculo. El filtrado de inóculo fue preparado con una dilución de inóculo en agua destilada en relación 1:3 suelo-agua a través de un tamiz de 35 µm, a fin de retener las esporas de los hongos MA pero permitir el paso de todos los demás microorganismos de suelo. Las macetas inoculadas también recibieron 30 ml de filtrado de inóculo

pero previamente esterilizado a baño maría durante 15 minutos a fin de equilibrar los nutrientes agregados en todos los tratamientos.

Semillas de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* fueron superficialmente esterilizadas y pre-germinadas en condiciones estériles. Seis semillas pre-germinadas de cada especie fueron sembradas en cada maceta por separado a fin de obtener cultivos puros de las tres especies. Las semillas fueron cubiertas por una fina capa de suelo y luego por una capa de arena de 1 cm de espesor a fin de minimizar la evaporación de agua desde la superficie. Las plantas fueron regadas diariamente a fin de mantener una humedad cercana al 80 % de la capacidad de campo. Las macetas fueron ubicadas en el invernáculo sobre mesadas móviles a fin de poder girarlas diariamente y minimizar el gradiente lumínico. Las temperaturas medias diurnas y nocturnas fueron $33\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ respectivamente. La humedad relativa media fue de $68\pm 9\%$, la longitud del fotoperíodo fue 10–12 h, y la intensidad lumínica fue $900\text{--}1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (días soleados) y $400\text{--}700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (días nublados) durante el período del experimento.

Sesenta y ocho días después de la siembra se cosechó el material vegetal y se separó la biomasa del vástago y la raíz de cada especie.

Biomasa vegetal y P en planta

Se determinó el PS y la concentración de P en vástago y raíz, y el largo radical de cada especie siguiendo las técnicas descritas en el Capítulo 1. Se calculó la absorción específica de P como el contenido de P de la planta/PS de la raíz, y el largo radical específico como el largo radical total/PS de la raíz.

Colonización micorrícica arbuscular y respuesta micorrícica

La colonización MA fue medida en las raíces de las tres especies siguiendo la técnica descrita en el Capítulo 1. La biomasa total de las plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (NM) de cada planta se usó para estimar la respuesta micorrícica (RM) del crecimiento acorde a la ecuación presentada por Cavagnaro y col., (2003),

$$\text{RMC} = 100 \times ((\text{M PS} - \text{media NM PS}) / \text{media NM PS}) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{RMP} = 100 \times ((\text{M P} - \text{media NM P}) / \text{media NM P}) \quad (\text{Ec. 2})$$

donde, M PS es el peso seco total de las plantas micorrizadas por maceta y M P es el contenido de P total de las plantas micorrizadas por maceta, y NM PS es la media del peso seco total de las plantas no micorrizadas y NM P es la media del contenido de P total de las plantas no micorrizadas del tratamiento correspondiente.

Análisis estadísticos

Las variables de las plantas y los hongos MA fueron analizadas a través de ANOVA de dos vías con la fertilización fosforada y la inoculación con hongos MA como primer y segundo factor, respectivamente. La diferenciación de las medias fue realizada a través del test de Tukey. La normalidad y homogeneidad de las varianzas fueron previamente verificadas. Los datos que presentaron una distribución no normal fueron transformados con logaritmo₁₀ (P en vástago y raíz de *L. tenuis*, P en raíz de *S. arundinaceus* y, P en vástago y LRE de *P. coloratum*). Las relaciones entre el PS del vástago, la absorción

específica de P, el largo radical específico, la proporción de biomasa radical y el contenido de P en el vástago de cada especie fueron evaluados a través de un análisis de componentes principales (ACP). Se utilizó el software Infostat 2018.

4.6 - Resultados

Biomasa y P en planta

El peso seco (PS) del vástago de *L. tenuis* y *P. coloratum* fueron afectados por el agregado de P, la inoculación MA y por la interacción entre ambos factores (Fig. 1 a, c; Tabla 2), pero el peso seco del vástago de *S. arundinaceus* fue afectado solo por el agregado de P (Fig. 1b, Tabla 2). La fertilización fosforada y los hongos MA incrementaron el PS del vástago de *L. tenuis* en todos los niveles de P. El peso seco del vástago de *L. tenuis* sin agregado de P fue 1,97 g.maceta⁻¹ y 5,57 g.maceta⁻¹ para las plantas no micorrizadas y micorrizadas, respectivamente, mientras que la mayor producción del vástago se obtuvo con el agregado de la dosis alta de P y los hongos MA. El PS del vástago de *L. tenuis* sin agregado de P y con hongos MA fue similar al obtenido por las plantas crecidas con una dosis baja de P pero sin hongos MA (Fig. 1a). El mayor PS del vástago de *S. arundinaceus* se obtuvo con el agregado de la dosis alta de P (Fig. 1b). El PS del vástago de *P. coloratum* incrementó con el agregado de la dosis baja y alta de P pero ambas mostraron la misma producción de biomasa (Fig. 1c), mientras que el PS del vástago de las plantas micorrizadas crecidas ante la dosis alta de P fue menor que las plantas no micorrizadas (Fig. 1c).

El PS de la raíz de *L. tenuis* fue afectado por el agregado de P y hongos MA (Fig. 1d; Tabla 2). El PS de la raíz de *L. tenuis* crecida sin agregado de P incrementó 64,78 % (de 0,71 g.maceta⁻¹ a 1,17 g.maceta⁻¹) debido a la presencia de hongos MA (Fig. 1d). El PS de la raíz de las gramíneas solo fue afectado por el agregado de P (Fig. 1 e, f; Tabla 2). El PS radical de *S. arundinaceus* solo incrementó con el agregado de la dosis alta de P (Fig. 1e) y no hubo diferencias en el PS radical de *P. coloratum* con el agregado de la dosis baja y alta de P (Fig. 1f).

La proporción de biomasa radical de *L. tenuis* fue afectada por el agregado de P, hongos MA y la interacción de ambos factores (Fig. 1g; Tabla 2). La mayor fracción de biomasa radical de *L. tenuis* se registró en el tratamiento sin fertilización fosforada y sin hongos MA, y disminuyó de 26,52 % a 17,28 % debido a la presencia de hongos MA. La fracción de biomasa radical de *S. arundinaceus* fue afectada por el agregado de P y hongos MA (Fig. 1h; Tabla 2). La fracción de biomasa radical de *P. coloratum* fue afectada por el agregado de P y la interacción de la fertilización P y hongos MA (Fig. 1i; Tabla 2). La fracción de biomasa radical de *P. coloratum* crecida ante la dosis alta de P fue mayor en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas (Fig. 1i; Tabla 2).

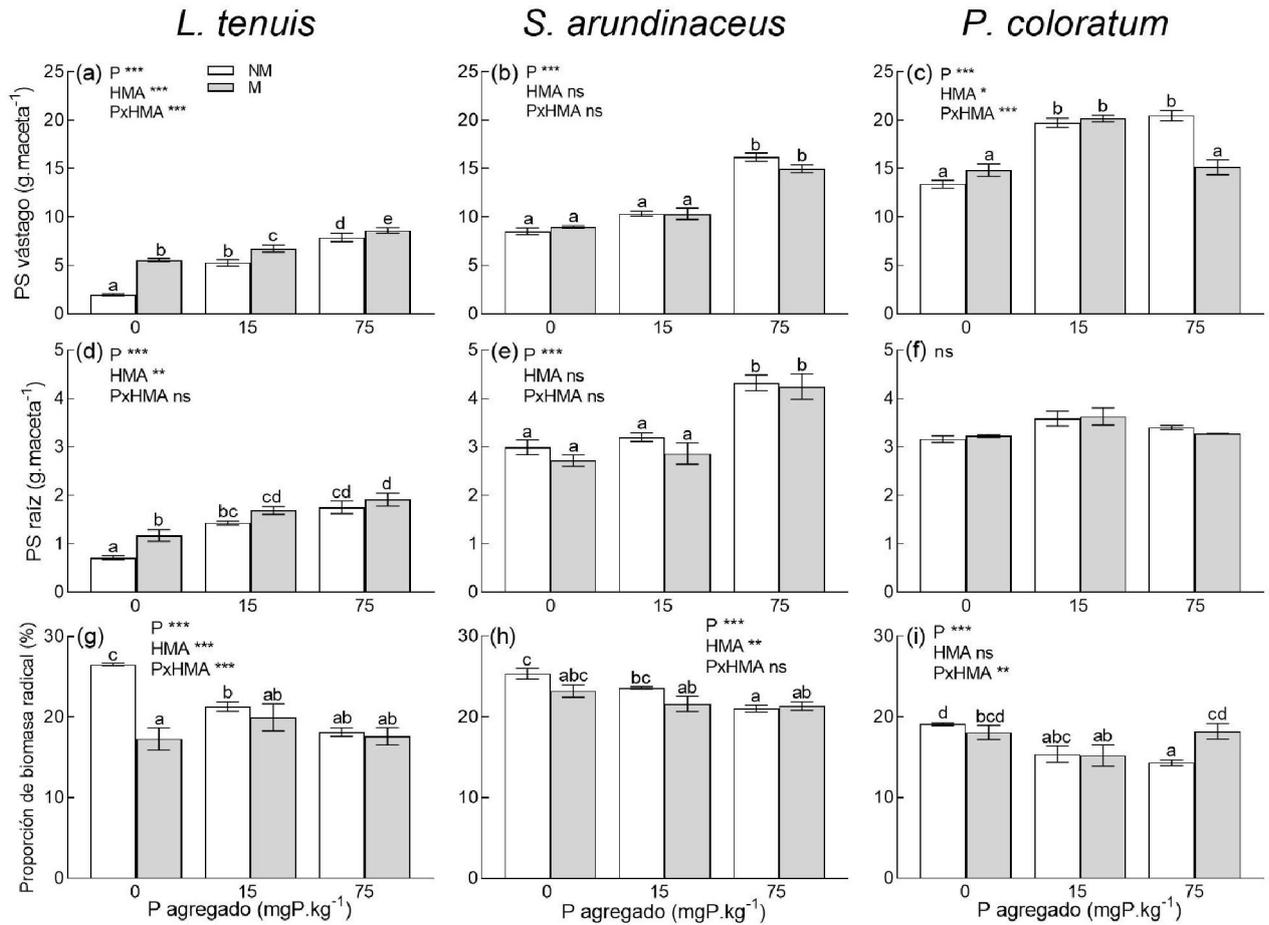


Fig. 1: Peso seco del vástago, de la raíz y la fracción de biomasa radical de *L. tenuis* (a, d, g), *S. arundinaceus* (b, e, h) y *P. coloratum* (c, f, i) crecidas durante 68 días bajo tres dosis de fertilizante fosforado (0, 15 y 75 mgP.kg⁻¹), con (M) y sin (NM) inoculación de hongos micorrícicos arbusculares. Los valores graficados corresponden a las medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) según el test de Tukey. Los tratamientos estadísticamente significativos se muestran en el gráfico, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns no significativo.

La concentración de P en vástago de las tres especies estudiadas fue afectada por el agregado de P y hongos MA (Fig. 2; Tabla 2). La mayor concentración de P en vástago de las tres especies fue registrada en las plantas micorrizadas y no micorrizadas ante la dosis alta de fertilizante P (Fig. 2 a, b, c). Los hongos MA solo incrementaron la concentración de P en el vástago de *S. arundinaceus* fertilizada con la dosis alta de P y no registró efecto de los hongos MA en el tratamiento sin fertilizar y fertilizado con la dosis baja de P.

La concentración de P en raíz de las tres especies estudiadas fue afectada por el agregado de P, hongos MA y solo hubo un efecto significativo en la interacción entre ambos factores en *L. tenuis* (Fig. 2d; Tabla 2). La concentración de P en la raíz de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* fue mayor en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas crecidas sin agregado de P (Fig. 2 d, e). La concentración de P en las raíces de las tres especies estudiadas no mostró diferencias entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas bajo la fertilización fosforada con ambas dosis aplicadas.

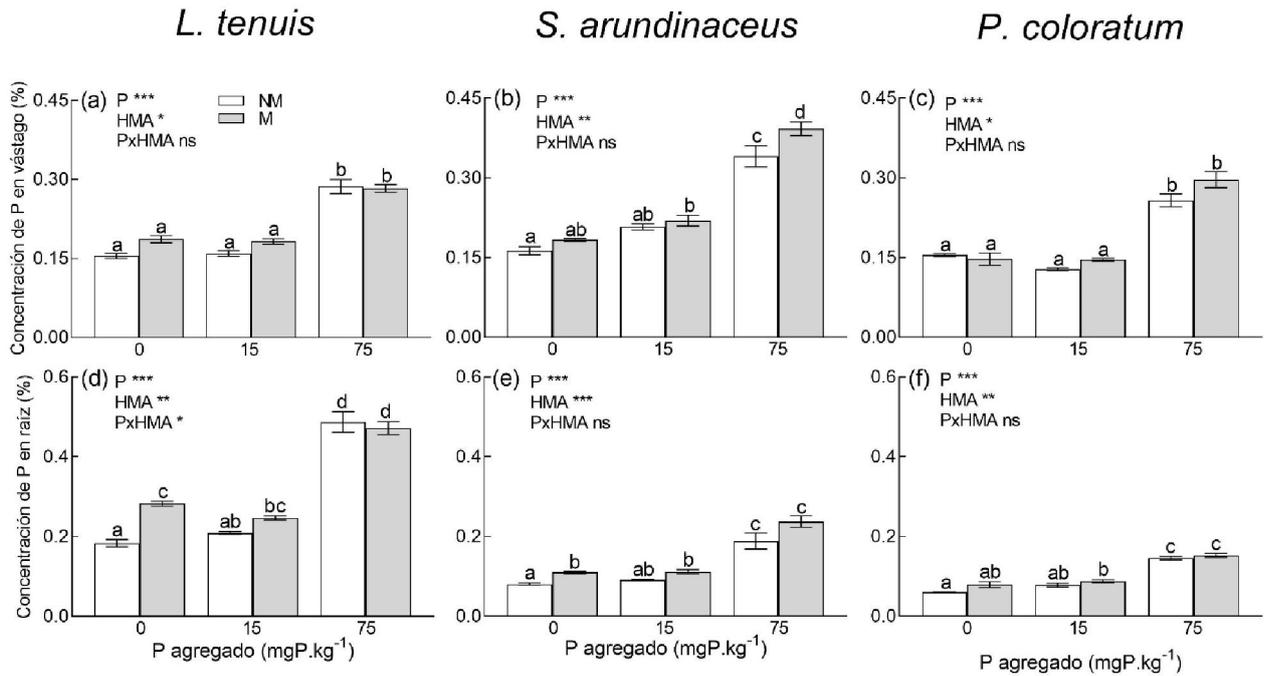


Fig. 2: Concentración de P en vástago y raíz de *L. tenuis* (a, d), *S. arundinaceus* (b, e) y *P. coloratum* (c, f) crecidas durante 68 días bajo tres dosis de fertilización fosforada (0, 15 y 75 mgP.kg⁻¹), con (M) y sin (NM) inoculación de hongos micorrícicos arbusculares. Los valores graficados corresponden a las medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) según el test de Tukey. Los tratamientos estadísticamente significativos se muestran en el gráfico, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns no significativo.

Largo radical específico y absorción específica de P

El largo radical específico (LRE) de *L. tenuis* fue afectado únicamente por los hongos MA (Fig. 3a; Tabla 2). El LRE de *L. tenuis* sin agregado de P disminuyó de 7,1 m.g⁻¹ a 5,29 m.g⁻¹ para las plantas no micorrizadas y micorrizadas, respectivamente. El LRE de *S. arundinaceus* fue afectado por el agregado de P y hongos MA (Fig. 3b; Tabla 2). El menor LRE de *S. arundinaceus* se obtuvo con el agregado de la dosis alta de fertilizante P en las

plantas micorrizadas y el mayor valor se obtuvo sin agregado de P y en ausencia de hongos MA. El LRE de *P. coloratum* fue afectado únicamente por la fertilización fosforada y el valor más bajo se obtuvo con el agregado de la dosis alta de P (Fig. 3c; Tabla 2).

La absorción específica de P (AEP) de *L. tenuis* fue afectada por el agregado de P, hongos MA y la interacción entre ambos factores (Fig. 3d; Tabla 2). La AEP de *L. tenuis* sin agregado de P fue 6,12 mgP.gPSradical⁻¹ y 12,10 mgP.gPSradical⁻¹, para las plantas no micorrizadas y micorrizadas, respectivamente (Fig. 3d). La AEP de *S. arundinaceus* fue afectada por el agregado de P y hongos MA (Fig. 3e; Tabla 2) y la de *P. coloratum* solo fue afectada por el agregado de P (Fig. 3f; Tabla 2). La AEP de las tres especies estudiadas alcanzó el valor máximo ante la dosis alta de P agregado.

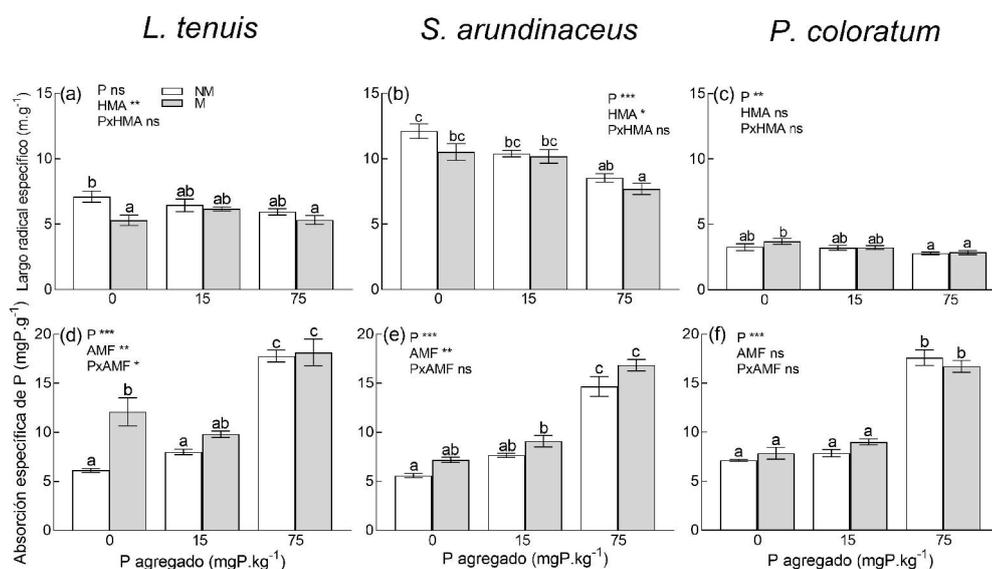


Fig. 3: Largo radical específico y absorción específica de P de *L. tenuis* (a, d), *S. arundinaceus* (b, e) y *P. coloratum* (c, f) crecidas durante 68 días bajo tres dosis de fertilización fosforada (0, 15 y 75 mgP kg⁻¹), con (M) y sin (NM) inoculación de hongos

micorrícicos arbusculares. Los valores graficados corresponden a las medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) según el test de Tukey. Los tratamientos estadísticamente significativos se muestran en el gráfico, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns no significativo.

Colonización MA y respuesta MA

La colonización MA de las tres especies estudiadas fue afectada por la fertilización fosforada (Fig. 4; Tabla 3). El valor de colonización MA más alto de las tres especies se obtuvo sin fertilización fosforada. La colonización MA de *L. tenuis* disminuyó de 59,85 % a 42,68 % y 2,90 con la dosis baja y alta, respectivamente (Fig. 4a). La colonización MA de *S. arundinaceus* disminuyó de 16,40 % a 11,14 % y 3,47 % con la dosis baja y alta, respectivamente (Fig. 4b). La colonización MA de *P. coloratum* mostró valores similares sin agregado de P que con la aplicación de la dosis baja y disminuyó de 32,78 % a 13 % debido a la dosis alta (Fig. 4c).

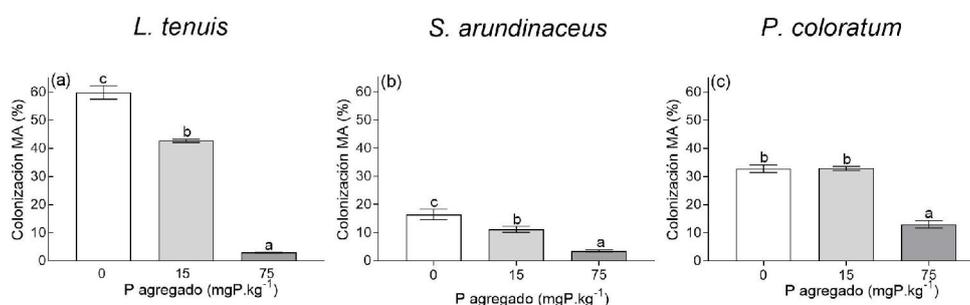


Fig. 4: Colonización micorrícica arbuscular de *L. tenuis* (a), *S. arundinaceus* (b) y *P. coloratum* (c) crecidas durante 68 días bajo tres dosis de fertilización fosforada (0, 15 y 75 mgP.kg⁻¹). Los valores graficados corresponden a las medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) según el test de Tukey.

La respuesta micorrícica del crecimiento (RMC) de las tres especies estudiadas fue afectada por la fertilización fosforada (Fig. 5; Tabla 3). La mayor respuesta MA de *L. tenuis* se alcanzó sin agregado de P (150,8 %) y disminuyó a 25,85 % y 12,48 % con la dosis baja y alta, respectivamente (Fig. 5a). La respuesta MA de *S. arundinaceus* fue 2,4 % sin agregado de P y obtuvo valores negativos con el agregado de ambas dosis de P (Fig. 5b). La respuesta MA de *P. coloratum* disminuyó de 12,97 % sin agregado de P a 2,09 % y -23,71 % con el agregado de la dosis baja y alta, respectivamente (Fig. 5c). La respuesta MA estuvo correlacionada positivamente con el porcentaje de colonización MA de *L. tenuis* ($r=0,74$; $P= <0,01$), *S. arundinaceus* $r=0,71$; $P= <0,01$) y *P. coloratum* ($r=0,91$; $P= <0,0001$).

La respuesta micorrícica de la absorción de P (RMP) de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* fue mayor sin agregado de P y disminuyó con el agregado de las dos dosis de P (Fig. 5d, e; Tabla 3). La RMP de ambas especies fue positiva independientemente de la dosis de P agregada, mientras que la RMP de *P. coloratum* fue positiva sin agregado de P y con la dosis baja de P, pero fue negativa con el agregado de la dosis alta de P (Fig. 5f; Tabla 3). La RMP correlacionó positivamente con el porcentaje de colonización MA en las raíces de *L. tenuis* ($r=0,79$; $P=0,002$) y *P. coloratum* ($r=0,92$; $P<0,0001$). Para *S. arundinaceus* la correlación no fue significativa.

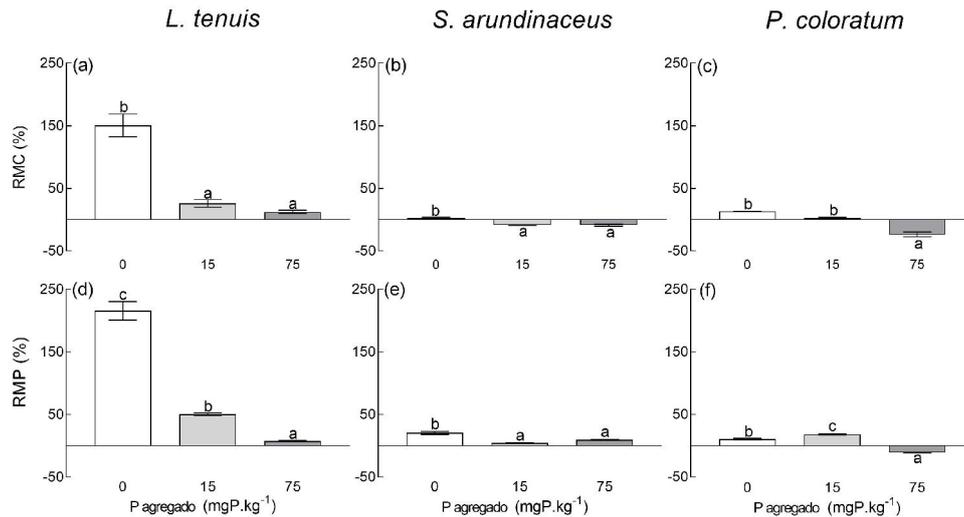


Fig. 5: Respuesta micorrícica del crecimiento (RMC) y de la absorción de P (RMP) de *L. tenuis* (a, d), *S. arundinaceus* (b, e) y *P. coloratum* (c, f) crecidas durante 68 días bajo tres dosis de fertilización fosforada (0, 15 y 75 mgP kg⁻¹). Los valores graficados corresponden a las medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) según el test de Tukey.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) explicó el 91,7% de la varianza acumulada (Fig. 6; Tabla 4). El componente principal 1 (CP1) explicó el 54,1 de la varianza y el componente principal 2 (CP2) explicó el 37,6%. El análisis mostró que las plantas de *L. tenuis* no micorrizadas y las plantas de *S. arundinaceus* micorrizadas y no micorrizadas estuvieron asociadas con los vectores correspondientes a las características radicales (LRE y PBR), mientras que las plantas de *L. tenuis* micorrizadas estuvieron asociadas al vector correspondiente a la AEP. Por otro lado, las plantas de *P. coloratum* se asociaron con un incremento del PS del vástago independientemente de los hongos MA. LRE, PBR y PS del vástago contribuyeron al CP1, y la AEP y el

contenido de P en el vástago fueron las variables que más contribuyeron al CP2. El ACP separó a las tres especies crecidas sin agregado de P. Los autovectores se presentan en la Tabla 4.

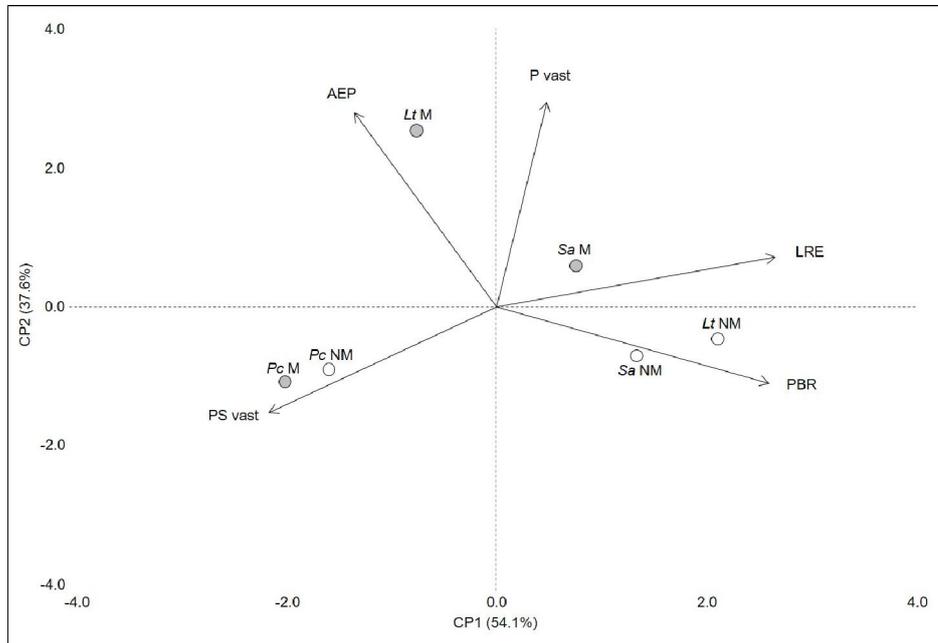


Fig. 6: Análisis de componentes principales para el PS del vástago, contenido de P en vástago, el largo radical específico (LRE), la absorción específica de P (AEP) y la proporción de biomasa radical (PBR) de *L. tenuis* (*Lt*), *S. arundinaceus* (*Sa*) y *P. coloratum* (*Pc*) crecidas durante 68 días ante condiciones limitantes de P, con (M) y sin (NM) inoculación de hongos micorrícicos arbusculares. Las variables son presentadas por vectores.

Identificación taxonómica de las esporas de hongos MA nativos

La identificación taxonómica se basó en la clasificación actual de especies (http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html) y fue descrita en Chippano y col., (2021). Se identificaron un total de 21 morfoespecies (Tabla 1) pertenecientes a las familias Acauloesporaceae (5 morfoespecies), Archaeosporaceae (1 morfoespecie), Claroideoglomeraceae (3

morfoespecies), Entrophosporaceae (2 morfoespecies), Gigasporaceae (2 morfoespecies), Glomeraceae (6 morfoespecies), Paraglomeraceae (1 morfoespecies). Entre las especies aisladas, 18 fueron identificadas a nivel de especie, mientras que las demás fueron identificadas a nivel de género. La densidad de esporas fue de 25 esporas por gramo de suelo seco.

Tabla 1: Identificación taxonómica de las esporas de hongos MA extraído de Chippano y col., (2021).

Familia	Especies
Acaulosporaceae	<i>Acaulospora bireticulata</i>
	<i>A. cavernata</i>
	<i>A. kentinensis</i>
	<i>A. mellea</i>
	<i>A. scrobiculata</i>
Archaeosporaceae	<i>Archaeospora trappei</i>
Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus claroideum</i>
	<i>C. etunicatum</i>
	<i>C. luteum</i>
Diversisporaceae	<i>Diversispora spurca</i>
Entrophosporaceae	<i>Entrophospora infrequens (incertae sedis)</i>
	<i>Entrophospora nevadensis</i>
Glomeraceae	<i>Funneliformis geosporus</i>
	<i>Funneliformis mosseae</i>
	<i>Glomus brohultii</i>
	<i>Glomus</i> sp.
	<i>Rhizophagus clarus</i>
	<i>Septoglomus constrictum</i>
Gigasporaceae	<i>Gigaspora margarita</i>
	<i>Scutellospora</i> sp.
Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i> sp.

Tabla 2: Resultados del ANOVA de dos vías (valores de F y P) para la fertilización fosforada (P), hongos MA (HMA) y la interacción entre P y HMA en las variables de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum*.

		<i>L. tenuis</i>			<i>S. arundinaceus</i>			<i>P. coloratum</i>		
		P	HMA	P x HMA	P	HMA	P x HMA	P	HMA	P x HMA
Ps vástago	F	212,67	122,23	18,29	98,65	0,01	0,43	58,41	6,51	22,42
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9416	0,6585	<0,0001	0,0200	<0,0001
PS raíz	F	42,81	13,05	1,14	38,19	2,51	0,29			
	P	<0,0001	0,0020	0,3423	<0,0001	0,1308	0,7511			
Proporción de biomasa radical	F	12,35	29,76	16,96	17,11	8,70	3,31	13,89	2,97	8,29
	P	0,0004	<0,0001	0,0001	0,0001	0,0086	0,0595	0,0002	0,1018	0,0028
P vástago	F	145,42	7,50	2,84	162,89	9,24	1,76	133,78	4,59	3,02
	P	<0,0001	0,0135	0,0848	<0,0001	0,0071	0,2005	<0,0001	0,0461	0,074
P Raíz	F	146,83	13,72	4,34	109,74	25,89	0,43	169,58	9,71	0,97
	P	<0,0001	0,0016	0,0290	<0,0001	0,0001	0,6541	<0,0001	0,0060	0,3965
Largo radical específico	F	27,78	111,12	10,58	153,88	15,60	0,94	11,63	0,03	0,03
	P	<0,0001	<0,0001	0,0009	<0,0001	0,0009	0,4091	0,0006	0,8722	0,9676
Absorción Específica de P	F	71,83	14,84	5,69	157,21	14,53	0,23	210,14	0,63	2,11
	P	<0,0001	0,0012	0,0122	<0,0001	0,0013	0,7974	<0,0001	0,4374	0,1500

Tabla 3: Resultados del ANOVA de dos vías (valores de F y P) para las especies forrajeras (Sp), hongos MA (HMA) y la interacción entre Sp y HMA en el largo radical específico y en la absorción específica de P de las plantas no fertilizadas de *L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum*.

	Largo radical específico			Absorción específica de P		
	Sp	HMA	Sp x HMA	Sp	HMA	Sp x HMA
F	521,38	58,52	32,1	12,56	47,07	12,39
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	<0,0001	0,0004

Tabla 4. Autovectores obtenidos del análisis de componentes principales de las variables de las plantas (*L. tenuis*, *S. arundinaceus* y *P. coloratum* con y sin hongos MA crecidas sin agregado de P durante 68 días).

Variables	Componente 1	Componente 2
PS vástago	-0,48	-0,34
P vástago	0,11	0,65
LRE	0,59	0,16
AEP	-0,30	0,61
PBR	0,57	-0,24

PS, peso seco; P, fósforo; LRE, largo radical específico; AEP, absorción específica de P; PBR, proporción de biomasa radical.

4.7 - Discusión

Rendimiento de las plantas y respuesta micorrícica

La fertilización fosforada, el uso de especies adaptadas a crecer ante condiciones limitantes de P y la simbiosis con hongos MA son alternativas que individualmente o combinadas permiten incrementar la producción de forraje en regiones templadas. Para *L. tenuis*, los hongos MA causaron un incremento del rendimiento de biomasa similar al obtenido solo con la aplicación de la dosis baja de fertilizante fosforado. La capacidad de los hongos MA para explorar mayor volumen de suelo que el sistema radical y absorber P más allá de los límites de la zona de depresión de P (Smith y Read, 2008) permitieron reemplazar el efecto neto de una dosis baja de P en el crecimiento de *L. tenuis*. El efecto positivo de la interacción entre una dosis baja de P y los hongos MA en la producción de biomasa de *L. tenuis* está asociado a un incremento en la absorción específica de P y en el P en tejido vegetal. Estos resultados concuerdan con los publicados por Hack y col., (2019), quienes encontraron que la simbiosis MA mostró efectos positivos en la acumulación de P, nutrición nitrogenada y producción de biomasa de la leguminosa *Melilotus alba* ante una relativamente alta provisión de P relativamente alta.

Ante la dosis de P alta, la producción de biomasa de *L. tenuis* alcanzó el 90% del rendimiento máximo de acuerdo a un estudio previo (Mendoza y Pagani, 1997) y a los resultados obtenidos en el capítulo 1 de la presente tesis. Como se esperaba, la colonización MA disminuyó ante el agregado de la dosis baja de P comparado con el tratamiento sin agregado de P, pero la disminución ante la dosis alta fue más abrupta. Estos resultados podrían ser explicados por la interacción del incremento de P en tejido ya que es uno de los factores

principales que regulan el crecimiento de los hongos MA en las raíces (Mendoza y Pagani, 1997; Smith y Read, 2008) y por el incremento del crecimiento radical y el largo radical, los cuales causaron un efecto dilutorio de la colonización MA (Smith y Read, 2008). Además, la disminución de la colonización MA estuvo acompañada de una disminución de la respuesta micorrícica del crecimiento aunque mantuvo valores positivos. Sin embargo, las plantas micorrizadas mostraron un pequeño incremento de la producción de biomasa en relación a las plantas no micorrizadas. Es aceptado que la RM positiva es consecuencia de una absorción de nutrientes mayor por parte de las plantas micorrizadas (Smith y Smith, 2011) y que el rol de los hongos MA en la absorción de P cobra una mayor importancia ante condiciones limitantes de P que ante fertilización fosforada. Es importante destacar que en el presente estudio se evaluó el efecto de los hongos MA nativos del mismo suelo utilizado en el ensayo y que la actividad de los hongos MA es modulada por todos los microorganismos del suelo como ocurre típicamente ante condiciones de campo. Estos resultados muestran que *L. tenuis* podría aprovechar los beneficios provistos por la comunidad de hongos MA con y sin agregado de fertilizante fosforado. Otro punto a destacar es que las raíces de *L. tenuis* micorrizadas y no micorrizadas presentaron nódulos en todos los tratamientos de fertilización y el número de nódulos incrementó significativamente con la fertilización fosforada (44% y 53% correspondiente a las dosis de 15 y 75 mgP kg⁻¹, respectivamente). El incremento de la nodulación podría aumentar la disponibilidad de N inorgánico en el suelo como fue reportado por Mendoza y col., (2016b).

Respecto a las gramíneas, en general, las que tienen metabolismo carbonado C4 presentan una mayor RM del crecimiento que las de metabolismo carbonado C3 (Hetrick y col., 1989). Sin embargo, Smith y Smith (2011) reportaron que incluso en plantas que presentan bajos valores de RM del crecimiento, la simbiosis MA podría estar activa en la absorción de nutrientes minerales porque la absorción de P por la vía micorrícica podría estar activa. En el presente estudio, la producción de biomasa de *S. arundinaceus* incrementó solo ante la dosis alta de fertilizante fosforado, y este resultado estuvo asociado con un incremento en el contenido de P en tejido y en la absorción específica de P. La RM del crecimiento mostró valores desde cercanos a cero hasta negativos para el tratamiento no fertilizado y fertilizado con la dosis baja y alta, respectivamente. La RM cercana a cero o levemente positiva es convencionalmente atribuida a la extensión del sistema radical, raíces finamente ramificadas y densas, y pelos radicales largos que permiten absorber P de manera eficiente (Baylis, 1972). *Schedonorus arundinaceus* presenta un sistema radical fibroso que le provee una ventaja competitiva por los nutrientes del suelo, en línea con una baja colonización MA e independientemente de la disponibilidad de P en el suelo (según lo reportado en el capítulo 2). Un bajo porcentaje de colonización MA le podría permitir transportar P y otros nutrientes a través de la vía micorrícica (Smith y col., 2004). En el presente estudio se propone que la colonización MA no impacta directamente en el crecimiento de *S. arundinaceus* pero sí en la nutrición fosforada. Resultados similares en la RM del crecimiento fueron reportados por Cheeke y col., (2019) incluso ante condiciones limitantes de P más extremas (6 mgP kg⁻¹). Por otro lado, Hetrick y col., (1990) sugirió que las gramíneas C3

podrían mantener bajos niveles de colonización MA a pesar de la aplicación de una dosis alta de fertilizante. El mantenimiento de niveles bajos de colonización podría garantizar un rápido desarrollo de la simbiosis cuando aparece un período de alta demanda de nutrientes por parte de la planta. Esta es una posible explicación de la persistencia de bajos niveles de colonización MA en las raíces de *S. arundinaceus*, incluso cuando los niveles de P en el suelo son capaces de disminuir los efectos positivos de la simbiosis MA sobre el crecimiento de las plantas.

Panicum coloratum alcanzó un alto rendimiento ante todos los niveles de P ensayados. La respuesta micorrícica del crecimiento y absorción de P cambió de valores bajos positivos en las plantas de *P. coloratum* no fertilizadas y fertilizadas con la dosis baja de P a valores negativos en las plantas fertilizadas con la dosis alta de P. Incluso, la respuesta micorrícica estuvo positivamente asociada con el porcentaje de colonización MA. La ausencia de un efecto inhibitorio de la dosis baja de P en la colonización MA podría estar asociada con un efecto beneficioso de los hongos MA en la nutrición fosforada (respuesta micorrícica de la absorción de P positiva). Contrariamente, ante la dosis alta de fertilizante fosforado, la colonización MA podría causar un desbalance entre el C y P, resultando en una respuesta micorrícica negativa tanto del crecimiento como de la absorción de P, la cual se asociaría directamente con una disminución en el rendimiento de biomasa de las plantas micorrizadas. La primera hipótesis es aceptada.

Estrategias de absorción de P ante condiciones limitantes de P

Estudios previos han reportado que el grado de asociación con los hongos MA es mayor en leguminosas que en gramíneas C4 y gramíneas C3 (Hetrick y col., 1989; Tawaraya, 2003; Tran y col., 2019). En concordancia con estos reportes, la colonización MA y la respuesta micorrícica del crecimiento y absorción de P de las plantas no fertilizadas fue mayor en *L. tenuis* que en *P. coloratum* y *S. arundinaceus*. El incremento en el grado de asociación de *L. tenuis* con los hongos MA ante condiciones limitantes de P se debe al mayor requerimiento de P para el crecimiento y la menor capacidad del sistema radical para absorber P en comparación con las gramíneas (Mendoza y col., 2016a). El elevado requerimiento de P podría estar asociado a la simbiosis con rizobios ya que todas las plantas de *L. tenuis* mostraron nódulos en sus raíces. La absorción específica de P de las plantas de *L. tenuis* no fertilizadas aumentó un 97% debido a la presencia de los hongos MA y fue el mayor valor registrado por las 3 especies. En este sentido, el ACP mostró una mejora de la absorción específica de P en las plantas micorrizadas y un incremento del largo radical específico y de la proporción de biomasa radical en las plantas no micorrizadas. Estos resultados confirman que la estrategia de *L. tenuis* para crecer ante condiciones limitantes de P está principalmente relacionada con un incremento de la absorción de P debido a la simbiosis con hongos MA nativos.

El sistema radical relativamente fino y ramificado de *S. arundinaceus* maximiza el volumen de suelo explorado y por lo tanto su capacidad para absorber P (Ayala Torales y col., 1998; Mendoza y col., 2016a; Wang y Lambers, 2020). Estos conceptos concuerdan con el valor máximo registrado del largo radical específico de *S. arundinaceus* entre las 3 especies estudiadas, independientemente de la presencia de hongos MA. Las características

radicales de *S. arundinaceus* y el bajo requerimiento de P para el crecimiento (Ayala Torales y col., 1998; Mendoza y col., 2016a) en parte explican el menor grado de asociación con los hongos MA indicando que la estrategia para crecer ante condiciones limitantes de P está relacionada principalmente con la alta capacidad del sistema radical para explorar el suelo.

Las gramíneas C4 tienen un grado de asociación intermedio con los hongos MA entre las leguminosas y las gramíneas C3 debido a que presentan raíces gruesas con un bajo porcentaje de pelos radicales y bajos requerimientos de P para el crecimiento (Hetrick y col., 1990). En el presente ensayo, la cantidad de biomasa radical producida por las plantas de *P. coloratum* no fertilizadas fue similar a la producida por *S. arundinaceus*. *Panicum coloratum* mostró valores intermedios de colonización MA y de respuesta micorrícica del crecimiento y absorción de P, y el menor valor registrado de largo radical específico entre las 3 especies estudiadas. Además, la absorción específica de P de las gramíneas no fertilizadas fue similar, independientemente del metabolismo carbonado y de la presencia de hongos MA, pero el largo radical específico fue 70,88% menor en *P. coloratum* que en *S. arundinaceus*. Las diferencias de las características radicales de ambas gramíneas indican estrategias diferentes para aumentar la cantidad de volumen de suelo explorado y por ende de la absorción de nutrientes. De acuerdo al ACP, la estrategia de *P. coloratum* para incrementar la absorción de P no podría ser explicada por cambios en el largo radical específico o por la asociación con los hongos MA. Ha sido reportado que las gramíneas C4 crecidas ante condiciones limitantes de P mejoran la nutrición fosforada a través de la secreción de enzimas desde las raíces hacia la rizósfera para

solubilizar P (Li y col., 1997; Clark y col., 1999) En este sentido, podría postularse que la absorción de P de *P. coloratum* podría estar asociada a un incremento de la disponibilidad de P a través de la actividad enzimática. Pero más estudios son necesarios para conocer otras estrategias de *P. coloratum* para incrementar la absorción de P como por ejemplo la actividad fosfatasa y/o los transportadores de P (Javot y col., 2007; Hasan y col., 2016) y la posible relación con los hongos MA. A pesar de que las especies estudiadas están adaptadas a crecer ante condiciones limitantes de P, presentan estrategias diferentes para incrementar la absorción de P en suelos de la Cuenca del Río Salado. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con la segunda hipótesis.

Identificación taxonómica de las esporas de hongos MA nativos

La identificación de morfoespecies de hongos MA descripta para el suelo utilizado como inóculo (Chippano y col., 2021) coincide mayoritariamente con resultados previos descriptos para el mismo sitio de muestro (García y col., 2017). En total se registraron especies pertenecientes a 9 familias, de las cuales 5 fueron identificadas en ambos trabajos, mientras que a diferencia de Chippano y col., (2021), García y col., (2017) identificaron especies de la familia *Ambisporaceae*. Por otro lado, a diferencia de García y col., (2017), Chippano y col., (2021) identificaron especies pertenecientes a las familias *Archaeosporaceae*, *Entrophosporaceae* y *Paraglomeraceae*. Estas diferencias pueden estar dadas por el diferente momento de muestreo y por posibles cambios asociados al mantenimiento del inóculo, ya que la descripción de especies realizada por García y col., (2017) corresponde al suelo directamente

extraído del sitio de muestro mientras que en Chippano y col., (2021) el suelo fue mantenido en macetas, sembradas con *L. tenuis* y *L. perenne*.

4.8 - Conclusiones

Los resultados del presente ensayo mostraron que la interacción entre el agregado de P y los hongos MA incrementaron la producción de biomasa de *L. tenuis* debido al mayor requerimiento de P para el crecimiento y la menor capacidad del sistema radical para absorber P que las gramíneas. La presencia de *L. tenuis* y el agregado de una dosis baja de P podría mejorar la calidad forrajera y el ciclado de nutrientes con el mantenimiento de la simbiosis MA y sus beneficios en los pastizales y pasturas de la Cuenca. Las especies estudiadas mostraron estrategias diferentes para absorber P ante condiciones limitantes de P. La principal estrategia de *L. tenuis* es la asociación con MA, mientras que la de *S. arundinaceus* es la alta capacidad de su sistema radical para explorar el suelo. La estrategia de *P. coloratum* no pudo ser explicada por los cambios en el largo radical específico y la asociación MA. Se destaca *P. coloratum* como una especie interesante por su elevada producción de biomasa ante diferentes niveles de P en el suelo. Este es el primer ensayo que muestra la interacción de *P. coloratum* y *S. arundinaceus* con las comunidades de hongos MA nativos de la Cuenca del Río Salado. Sin embargo, se requiere más información para comprender los efectos de la interacción entre los hongos MA nativos y la disponibilidad de P sobre el crecimiento y la nutrición fosforada, especialmente en las gramíneas. Este trabajo podría ser un primer paso para promover un manejo más sustentable de los pastizales y pasturas,

logrando un incremento de la producción de biomasa junto con la preservación de los efectos benéficos de la simbiosis MA en la Cuenca.

5- Capítulo 3

Los hongos micorrícicos arbusculares nativos mejoran el crecimiento de plántulas de *L. tenuis* en la medida que disminuye la competencia con plantas adultas conespecíficas

5.1 - Resumen

El balance entre las interacciones de competencia y facilitación entre plantas adultas y plántulas conespecíficas puede ser afectado por la intensidad de defoliación, deficiencia de nutrientes en el suelo y hongos micorrícicos arbusculares (MA). En un experimento en macetas, se evaluó el rol de los hongos MA sobre las interacciones entre plántulas de *Lotus tenuis* crecidas en ausencia y presencia de plantas adultas conespecíficas defoliadas a diferentes intensidades en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado. Las plántulas micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas adultas defoliadas y sin defoliar produjeron menos biomasa del vástago que las plántulas no micorrizadas, mientras que las plántulas micorrizadas crecidas sin competencia mostraron 258 % y 504 % más biomasa del vástago y contenido de P en vástago, respectivamente, que las plántulas no micorrizadas. Estos resultados se asociaron con un crecimiento y absorción de P mayores en las plantas adultas micorrizadas que las no micorrizadas, a pesar de que la respuesta MA mostraron una tendencia a disminuir en la medida que incrementó la intensidad de defoliación. El índice de competencia entre las plántulas y las plantas adultas mostró una interacción de competencia en los sistemas micorrizados (de -2,6 a -1,9) y una interacción neutra en los sistemas no micorrizados (valores cercanos a cero), independientemente de la intensidad de defoliación. Se propone que intensidades de defoliación moderadas (50 %) permiten

obtener beneficios micorrícicos elevados en plantas adultas de *L. tenuis* (110,1% y 168,8% respuesta MA del crecimiento y absorción de P, respectivamente), en contraposición con intensidades altas de defoliación (75%) que disminuyen la respuesta MA (27,18% y 80,21% respuesta MA del crecimiento y absorción de P, respectivamente). Además, este estudio destaca a la simbiosis MA como una estrategia importante de las plantas adultas de *L. tenuis* para regular el crecimiento de plántulas conespecíficas vecinas en suelo deficiente de P de la Cuenca del Río Salado.

5.2 - Introducción

Las interacciones de competencia y facilitación operan simultáneamente entre plantas de la misma o diferente especie en la mayoría de los pastizales del mundo. Este balance varía ampliamente como resultado de la intensidad de las prácticas de manejo, condiciones ambientales, estadíos de crecimiento de las plantas y composición de la comunidad vegetal (Valladares y col., 2015; Rehling y col., 2021). En particular, las interacciones intraespecíficas entre plantas adultas y plántulas constituyen un escenario interesante para investigar la supervivencia de especies en el tiempo. En este sentido, las plantas adultas pueden proveer micrositios adecuados, mejorando las condiciones edáficas para el establecimiento de las plántulas o disminuir el crecimiento de las plántulas en suelos de pastizales deficientes en nutrientes (Aguilera y Lauenroth 1993; Dyer y Rice 1997).

El balance entre las interacciones de competencia y facilitación entre plantas adultas y plántulas conespecíficas también puede ser afectado por la asociación con hongos MA (Smith y Read 2008; Tedersoo y col., 2020). Las plantas pueden aumentar o reducir la colonización MA en plantas vecinas, condicionando los resultados de las interacciones entre ellas (Klironomos 2002; van der Heijden y Horton 2009). En este sentido, estudios previos han mostrado que pueden existir interacciones de facilitación entre plántulas y plantas adultas a través de la simbiosis MA, como así también efectos opuestos de los hongos MA en el crecimiento de plántulas dependiendo del ambiente particular en el que crecen (Nakano-Hylander y Olsson 2007; Höpfner 2014).

En la Cuenca del Río Salado existe una baja presencia o incluso ausencia de leguminosas perennes nativas, en parte como consecuencia de un pastoreo poco controlado (Vecchio y col., 2019). La promoción de leguminosas nativas o naturalizadas es una alternativa para aumentar la producción de forraje en esta región. En este sentido, *L. tenuis* ocupa un rol central en los pastizales y pasturas de la Cuenca debido a su adaptación a diferentes condiciones edáficas, la capacidad para fijar N₂ a través de la simbiosis con rizobios (Estrella y col., 2009) y mantener el inóculo de hongos MA nativos en el suelo a lo largo del tiempo (García y Mendoza 2008). Sin embargo, la implantación de esta leguminosa en pastizales y pasturas es usualmente restringida por su baja tasa de crecimiento durante estadíos tempranos del crecimiento disminuyendo fuertemente su capacidad para competir con plantas vecinas (Blumenthal y McGraw 1999). Por ello es necesario implementar prácticas de manejo que permitan incrementar la presencia de *L. tenuis* en la región, promoviendo el crecimiento de las plántulas junto con un manejo racional del ganado.

Lotus tenuis posee una importante habilidad para crecer y sobrevivir en suelos con baja fertilidad de pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado (García y Mendoza 2014). La capacidad de la leguminosa para establecer asociaciones simbióticas tempranas con microorganismos del suelo como los hongos MA y las bacterias fijadoras de N₂ podría ser importante para aumentar el acceso a nutrientes en suelos con baja fertilidad, como así también aliviar el estrés abiótico (García and Mendoza 2014). En general, los hongos MA tienen un alto valor en el funcionamiento y sustentabilidad de los pastizales templados. En este sentido, podría esperarse que los hongos MA cambien el

balance competitivo entre plantas adultas de *L. tenuis* y plántulas conespecíficas en favor de las plántulas y por ende, modificar la producción de forraje. Llamativamente, a pesar de la importancia de *L. tenuis* en la productividad de pasturas y pastizales, y el rol clave de los hongos MA en su desarrollo, hasta donde se conoce, no hay información disponible acerca del efecto de la simbiosis MA en el crecimiento y absorción de P de plántulas de *L. tenuis* crecidas en la vecindad de plantas adultas conespecíficas en un suelo deficiente en P de la Cuenca.

En sistemas sustentables de producción forrajera, la interacción entre plántulas y plantas adultas es un factor muy importante para el establecimiento y mantenimiento de *L. tenuis* en pastizales y pasturas bajo diferentes condiciones de manejo. Otro factor que afecta la persistencia y el crecimiento de esta leguminosa es el pastoreo (Vecchio y col., 2019) y la defoliación (García y Mendoza 2012; Vignolio y col., 2016). La respuesta de las plantas a la defoliación depende de la intensidad y la frecuencia con la que se remueve el tejido fotosintético y la disponibilidad de nutrientes en el suelo para sostener el rebrote del vástago (Faghihinia y col., 2020). La pérdida de tejido radical en respuesta a la defoliación está relacionada a una disminución en la producción de fotosintatos y a la redistribución de compuestos carbonados para el rebrote del tejido aéreo (Iqbal y col., 2012; van der Heyde y col., 2019). Los factores que reducen la capacidad fotosintética de las plantas podrían también afectar negativamente la función de la simbiosis MA ya que este grupo fúngico es completamente dependiente de C provisto por las plantas (van der Heyde y col., 2019). Además, la presión de defoliación puede alterar la simbiosis MA y sus beneficios en el crecimiento de la planta dependiendo de la intensidad y la

disponibilidad de nutrientes en el suelo (van der Heyde y col., 2019; Faghihinia y col., 2020). La defoliación remueve parte del canopy y permite aumentar la penetración de la luz hacia los estratos más bajos (Song y col., 2020). Por lo tanto, una presión de defoliación controlada puede disminuir la competencia aérea entre plántulas y plantas adultas vecinas, favoreciendo el crecimiento de las plántulas. Además, las plántulas crecidas en la cercanía de plantas adultas conespecíficas pueden acceder a nutrientes usando la red hifal preexistente en el suelo y de esta manera aprovechar los beneficios de la simbiosis MA (Tederloo y col., 2020). A pesar de que la defoliación podría cambiar los beneficios de la simbiosis MA en el crecimiento y la nutrición fosforada de *L. tenuis*, poco se sabe sobre cómo la presencia de una planta vecina podría afectar el desarrollo de plántulas conespecíficas en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado.

5.3 - Objetivo

Estudiar el efecto de la defoliación y el rol de los hongos MA sobre las relaciones competitivas entre plantas adultas de *L. tenuis* y plántulas conespecíficas crecidas en un suelo deficiente en P.

5.4 - Hipótesis:

1. La simbiosis MA modifica el balance competitivo entre plántulas de *L. tenuis* y plantas adultas conespecíficas en beneficio de las plántulas.
2. Las plántulas de *L. tenuis* aumentan la producción de biomasa a medida que incrementa la intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas y el efecto es mayor ante la presencia de hongos MA, asociado

principalmente a una disminución de la competencia y a un incremento de la absorción de P.

3. Una alta intensidad de defoliación disminuye la capacidad de las plantas adultas micorrizadas para recuperar la biomasa cortada en comparación con las plantas no micorrizadas.

5.5 - Materiales y métodos

Diseño experimental

Se llevó a cabo un ensayo en invernáculo en el cual plántulas de *L. tenuis* crecieron en ausencia y presencia de plantas adultas conespecíficas con y sin hongos MA nativos de la Cuenca del Río Salado. Las plantas adultas fueron defoliadas 0, 50 y 75 % de intensidad. El experimento fue conducido usando un arreglo factorial con un diseño completamente aleatorizado y cada tratamiento contó con 5 repeticiones. Se asumió que el efecto competitivo de las plántulas sobre las plantas adultas es despreciable.

Las muestras de suelo fueron recolectadas en el mismo sitio correspondiente a un pastizal natural de la Cuenca del Río Salado, descrito en el capítulo 1. Las muestras de suelo fueron tamizadas con una malla de 2 mm y luego esterilizadas por solarización según la técnica de Raj y Sharma (2008). El P disponible del suelo luego de ser esterilizado fue de 10,46 mgP kg⁻¹ (Bray I).

Las macetas de 1,6 L de capacidad fueron llenadas con 1000 g de suelo esterilizado y secado al aire. El grupo total de macetas se dividió en dos sub grupos, a uno se le agregó suelo como inóculo de hongos MA nativos y el otro sin hongos MA. Las características del inóculo de hongos MA y la técnica de inoculación utilizada fueron descritas en el capítulo 2. Se sembraron cuatro semillas pre-germinadas en condiciones estériles de *L. tenuis* por maceta y se cubrieron con una fina capa de suelo. Luego se cubrió la superficie con una capa de arena de 1 cm de espesor a fin de minimizar la pérdida de agua por evaporación. Las plantas fueron regadas diariamente a fin de mantener un contenido de humedad cercano al 80 % de la capacidad de campo. Las macetas fueron dispuestas en mesadas móviles y rotadas diariamente a fin de

disminuir efectos de gradiente lumínico dentro del invernáculo. Las temperaturas medias diurnas y nocturnas fueron $30\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ respectivamente. La humedad relativa media fue de $65\pm 9\%$, la longitud del fotoperíodo fue 10–12 h, y la intensidad lumínica fue $900\text{--}1300\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (días soleados) y $400\text{--}700\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (días nublados) durante el período del experimento.

Defoliación y establecimiento de las plántulas

Luego de 62 días después de la siembra, cinco macetas con plantas micorrizadas y no-micorrizadas fueron cosechadas (tiempo inicial) mientras que las macetas restantes fueron sometidas a diferentes intensidades de defoliación. El tratamiento de defoliación consistió en remover el 50 y el 75 % de la biomasa aérea con respecto a las macetas cosechadas en el tiempo inicial. Un grupo de plantas no fue defoliado (0 % de intensidad de defoliación) y utilizado como control.

Inmediatamente después de la defoliación de las plantas adultas se sembraron 10 semillas pre-germinadas en condiciones estériles de *L. tenuis* por maceta. Las semillas fueron distribuidas homogéneamente alrededor de las plantas adultas y 10 semillas solas (plántulas solas) fueron sembradas para evaluar el efecto de la ausencia de competencia con plantas adultas. Las macetas con plántulas solas fueron preparadas por remoción completa de la biomasa aérea de plantas adultas micorrizadas y no-micorrizadas (100% de defoliación) de la misma manera que fueron preparados los tratamientos de defoliación ya descritos. Esto permitió que el nivel de nutrientes y el desarrollo de las comunidades microbianas sean las mismas en todas las macetas en las

cuales las plántulas crecieron en presencia y ausencia de plantas adultas. Después de la siembra de las plántulas, los sistemas micorrizados y no micorrizados crecieron durante 34 días adicionales (período de recuperación de las plantas adultas defoliadas) y luego las plántulas y plantas adultas fueron cosechadas (tiempo final). El diseño experimental se muestra en el siguiente diagrama esquemático (Fig. Diagrama esquemático).

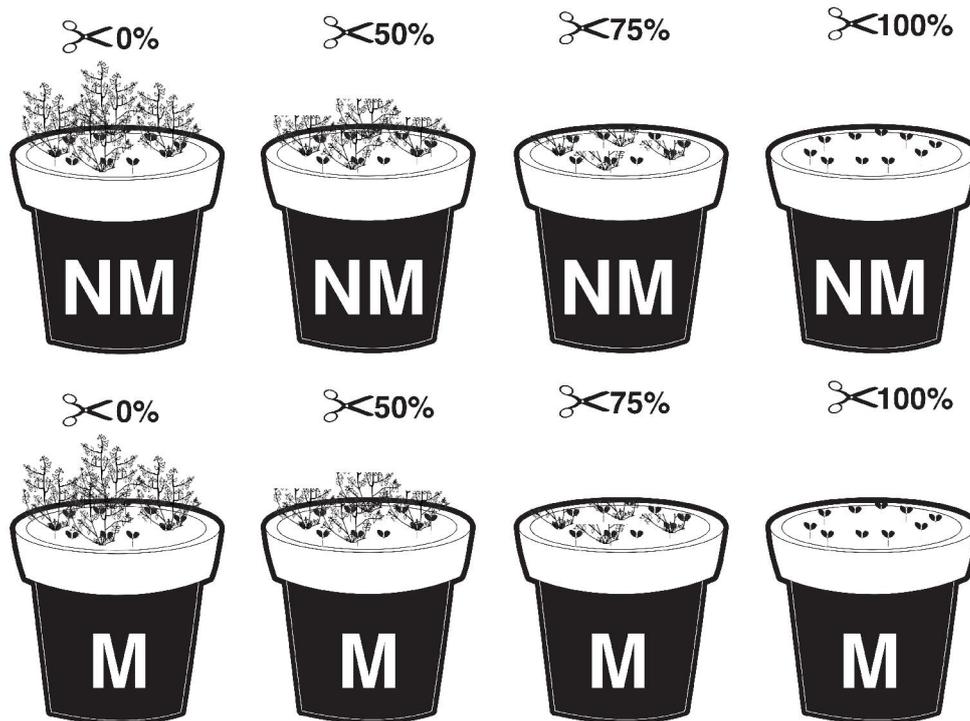


Figura Diagrama esquemático: Diseño experimental: Plantas adultas de *L. tenuis* no micorrizadas (NM) y micorrizadas (M) fueron defoliadas con diferentes intensidades (0, 50 y 75%) luego de 62 días de crecimiento. Inmediatamente después de la defoliación, diez plántulas de *L. tenuis* fueron trasplantadas en cada maceta. Las plantas adultas y plántulas NM y M crecieron durante un período de 34 días adicionales (período de recuperación) y luego las plantas adultas y plántulas fueron cosechadas (tiempo final).

Rendimiento, tasa relativa de crecimiento y fósforo en tejido

Luego de cada cosecha (tiempo inicial y final), la biomasa de las plantas adultas y plántulas fue separada en vástago y raíz. La biomasa del vástago de las plantas adultas y plántulas fue secada en forma separada a 70 °C por 48 hs y pesadas para la determinación del peso seco (PS) aéreo y concentración de P en tejido. La biomasa del vástago defoliado fue secada y pesada, y luego incluida en la fracción de la biomasa final correspondiente a cada planta para determinar el PS acumulado del vástago. La biomasa radical de las plantas adultas y plántulas fueron separadas del suelo a través de reiterados lavados con agua de red, luego fueron lavadas con agua destilada y pesadas para determinar el peso fresco (PF) radical. La biomasa radical fue utilizada para determinar los mismos parámetros de la biomasa del vástago, la colonización MA y el recuento de nódulos de rizobios como fue descrito en el capítulo 1. Se calculó la respuesta MA según la fórmula presentada en el capítulo 2.

Se calculó la tasa relativa de crecimiento del vástago (TRCv) y de la raíz (TRCr) de las plantas defoliadas y no defoliadas durante el período de recuperación (34 días) como fue descrita por Kingsbury y col., (1984),

$$TRCx = (\ln PS_f - \ln PS_i) / (t_f - t_i) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde TRC es la tasa relativa de crecimiento (día⁻¹) y x es vástago o raíz, t_f es el período de crecimiento total (96 días) desde que fueron sembradas, t_i es el período de crecimiento inicial (62 días), PS_f es el peso seco del vástago o radical en el período de crecimiento final (96 días), PS_i es el peso seco del vástago o radical en el período de crecimiento inicial (62 días) y (t_f-t_i) es la diferencia entre el período de crecimiento final e inicial (34 días). Para cada tratamiento de defoliación, PS_i del vástago es el PS remanente en cada maceta

luego de la defoliación. Para comparar los tratamientos se asume que la tasa de crecimiento diaria fue constante en los 34 días del período de recuperación.

Índice de intensidad de competencia

Se calculó la tasa relativa logarítmica (TRL) como índice de intensidad de la competencia entre las plantas adultas y plántulas crecidas con y sin hongos MA de acuerdo a la ecuación presentada por Choler (2001),

$$\text{TRL} = \ln (X_d / X_c) \quad (\text{Ec. 4})$$

donde, X_d es el peso seco del vástago de las plántulas crecidas en la vecindad de plantas adultas no defoliadas y defoliadas (50 y 75 %) y X_c es el peso seco del vástago de las plántulas crecidas solas.

Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos fue analizado a través de ANOVA de dos vías. Para testear las variables de las plantas adultas, los factores fueron intensidad de defoliación (Def) (tres niveles: 0, 50 y 75 %) y hongos MA (HMA) (dos niveles: con y sin hongos MA), como primer y segundo factor, respectivamente. Para testear las variables de las plántulas, los factores fueron intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas (DefAd) (cuatro niveles: plántulas solas, con 0, 50 y 75 % de intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas) y hongos MA (HMA) (dos niveles: con y sin hongos MA), como primer y segundo factor, respectivamente. La colonización MA, RMC, RMP de las plantas adultas y plántulas fueron analizadas a través de ANOVA de una vía. La separación de las medias se realizó a través del test de Tukey. Los datos que presentaron una distribución no normal fueron transformados con

logaritmo neperiano (PS del vástago, PF radical, concentración de P en vástago y RMP de las plántulas) para comparar las medias de los tratamientos. Las relaciones entre el PS del vástago y raíz, el contenido de P en vástago y raíz y el largo radical específico de las plantas adultas, y la TRL del vástago de las plántulas fueron evaluados a través de un análisis de componentes principales (ACP). Se utilizó el software Infostat 2018.

5.6 - Resultados

Rendimiento y P en tejido

El PS acumulado del vástago de las plantas adultas de *L. tenuis* fue afectado por los hongos MA y por la interacción entre la intensidad de defoliación y los hongos MA (Fig. 1a; Tabla 1). El PS radical fue afectado por la intensidad de defoliación, los hongos MA y por la interacción entre ambos factores (Fig. 1b; Tabla 1). La biomasa acumulada del vástago y la biomasa radical de las plantas micorrizadas disminuyó en la medida que incrementó la intensidad de defoliación y fue mayor que las plantas no micorrizadas. Las plantas no defoliadas y defoliadas sin hongos MA mostraron similar PS acumulado del vástago y PS radical.

La concentración de P en el vástago y raíz de las plantas adultas fue afectada por la intensidad de defoliación y los hongos MA, y la concentración de P en el vástago también fue afectada por la interacción de ambos factores (Fig. 1c, d; Tabla1). La concentración de P en el vástago de las plantas micorrizadas fue mayor en las plantas defoliadas que en las no defoliadas. Las plantas micorrizadas y defoliadas mostraron mayor concentración de P en el vástago que las no micorrizadas.

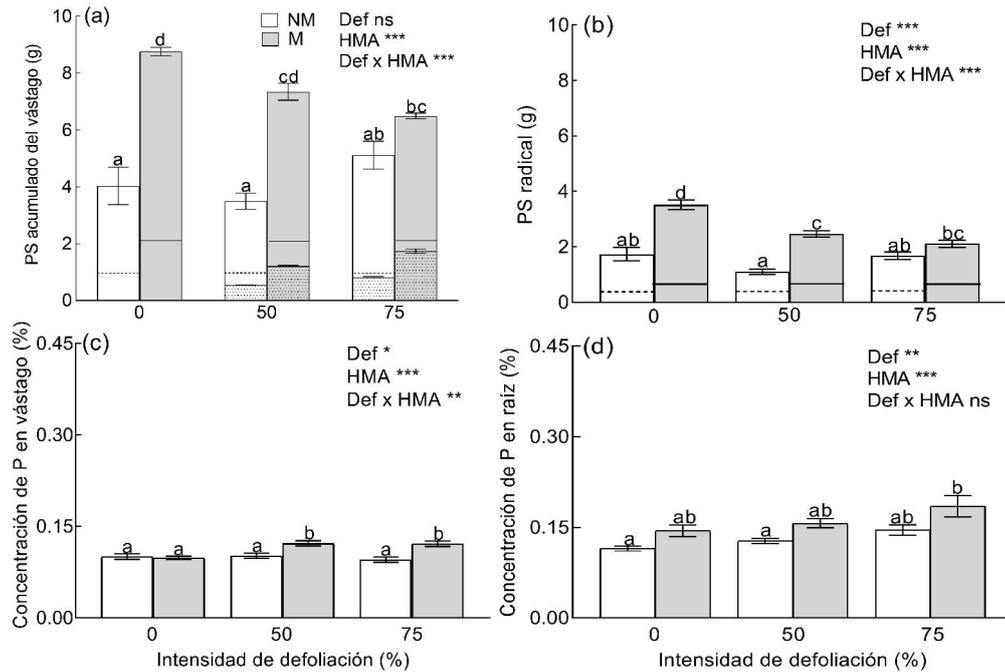


Fig. 1: El PS acumulado del vástago (a), PS radical (b), concentración de P en el vástago (c) y raíz (d) de plantas adultas de *L. tenuis* bajo diferentes intensidades de defoliación (0, 50 y 75 %) con (M) y sin (NM) hongos MA. Líneas continuas y punteadas en las figuras a y b representan el PS al tiempo inicial (62 días) de las plantas M y NM, respectivamente cuando los tratamientos de defoliación fueron aplicados. Columnas punteadas en la figura a representan el PS del vástago removido a diferentes intensidades de defoliación. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns no significativo.

El PS del vástago y el PF de la raíz de las plántulas fueron afectados por la intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas, los hongos MA y la interacción de ambos factores (Fig. 2a, b; Tabla 2). El PS del vástago de las plántulas no micorrizadas fue similar cuando crecieron en presencia de plantas no defoliadas, defoliadas e incluso sin competencia con plantas adultas vecinas

(plántulas solas) (Fig. 2a). El valor de PS del vástago de las plántulas micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas adultas no defoliadas fue el más bajo y similar al registrado por las plántulas crecidas en la vecindad de plantas defoliadas al 50 % (0,03 g). Mientras que las plántulas micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas adultas defoliadas al 75 % fue mayor (0,06 g) que aquellas crecidas en la vecindad de las defoliadas a 0 y 50 % de intensidad. Las plántulas micorrizadas crecidas solas mostraron el valor máximo (0,41 g) de PS del vástago registrado en el ensayo. El PF radical de las plántulas micorrizadas y no micorrizadas mostraron un patrón similar que el PS del vástago (Fig. 2b).

La concentración de P en el vástago de las plántulas de *L. tenuis* fue afectado por la intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas, los hongos MA y la interacción de ambos factores (Fig. 2c; Tabla 2). La concentración de P en el vástago de las plántulas no micorrizadas fue similar en todas las condiciones de crecimiento, mientras que mostró un marcado aumento en las plántulas micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas adultas defoliadas al 75 % (Fig. 2c).

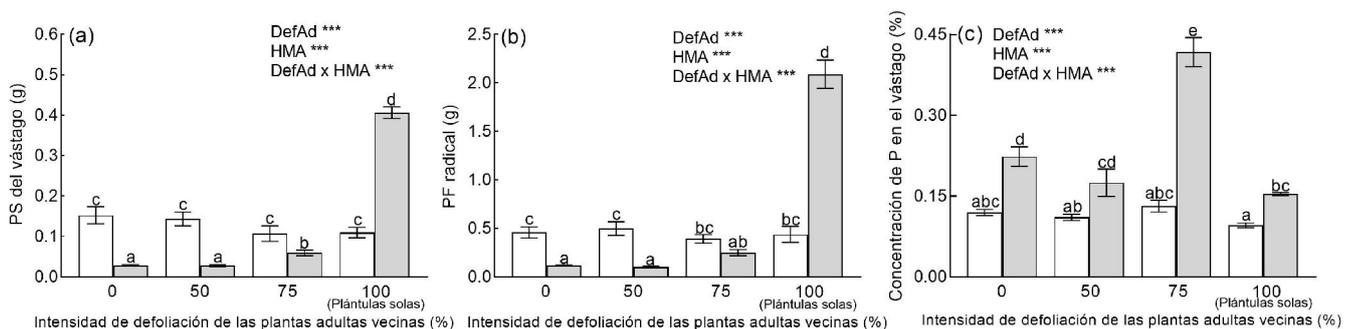


Fig. 2: PS del vástago (a), PF radical (b) y concentración de P en el vástago (c) de plántulas de *L. tenuis* crecidas en la vecindad de plantas adultas conespecíficas con

(M) y sin (NM) hongos MA, defoliadas a diferentes intensidades (0, 50, 75 y 100 %). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. *** $P < 0,001$.

Tasa relativa de crecimiento

La tasa relativa de crecimiento del vástago (TRCv) y de la raíz (TRCr) fueron afectadas por la intensidad de defoliación y la interacción de ambos factores (Fig. 3a, b; Tabla 1). La TRCv de las plantas micorrizadas y no micorrizadas aumentó en la medida que incrementó la intensidad de defoliación (Fig. 3a). La TRCv de las plantas defoliadas al 75 % incrementó en las no micorrizadas (250 %) y en las micorrizadas (175 %) en comparación con las plantas no defoliadas. La TRCr mostró un comportamiento similar entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas (Fig. 3b).

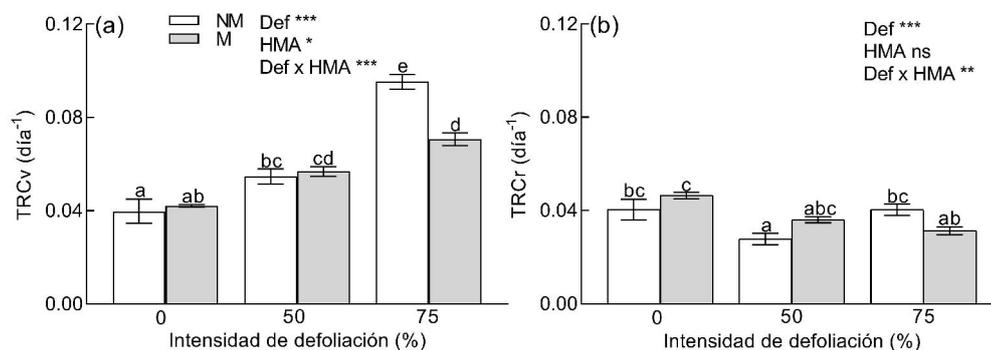


Fig. 3: La tasa relativa de crecimiento del vástago (TRCv) (a) y de la raíz (TRCr) (b) de plantas adultas de *L. tenuis* sujetas a diferentes intensidades de defoliación (0, 50 y 75 %) con (M) y sin (NM) hongos MA. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns no significativo.

Respuesta micorrícica del crecimiento y del contenido de P del vástago

La respuesta micorrícica del crecimiento (RMC) y del contenido de P (RMP) del vástago disminuyeron en las plantas defoliadas al 75 % comparadas con las defoliadas al 50 % (Fig. 4a, c). La RMC de las plántulas crecidas en la vecindad de plantas adultas no defoliadas y defoliadas mostró un valor negativo e incrementó 258 % en las plántulas crecidas solas (Fig. 4b). La RMP de las plántulas crecidas en la vecindad de plantas adultas no defoliadas y defoliadas al 50 % mostró un valor negativo e incrementó 71 % en las plántulas crecidas en la vecindad de plantas adultas defoliadas al 75 % y 504 % en las plántulas crecidas solas (Fig. 4d).

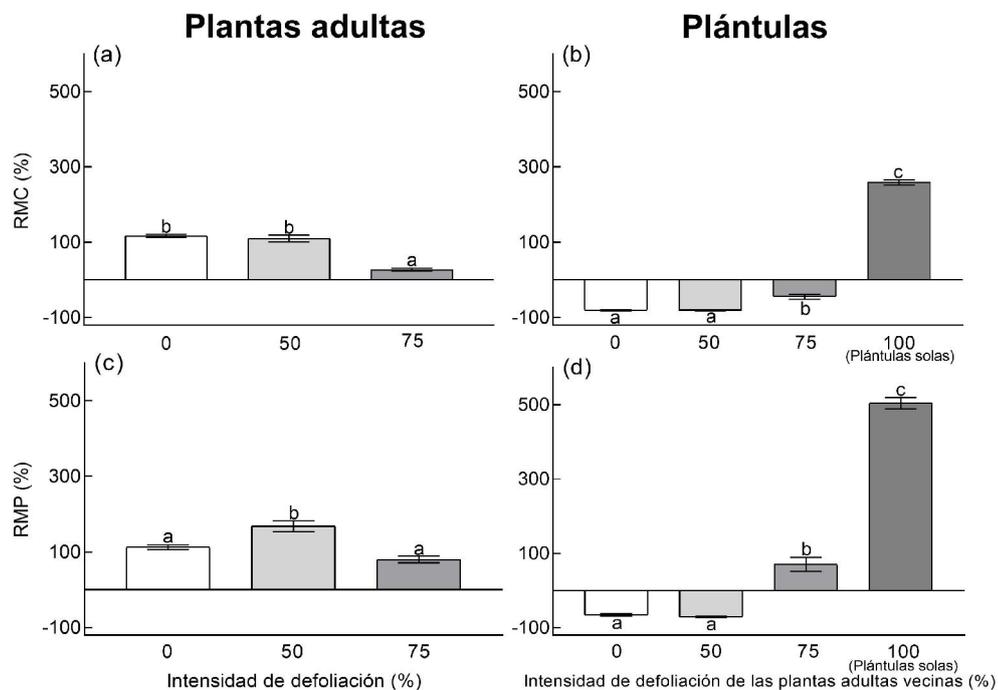


Fig. 4: Respuesta micorrícica del crecimiento (RMC) y de contenido de P (RMP) del vástago de plantas adultas (a, c) y plántulas (b, d) de *L. tenuis*. Las plantas adultas fueron defoliadas a diferentes intensidades (0, 50 y 75 %), y las plántulas crecieron con y sin hongos MA en la vecindad de plantas adultas defoliadas o solas. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey ($P < 0,05$).

Colonización micorrícica arbuscular y nodulación

No se observó colonización de hongos MA en las raíces de las plantas adultas y plántulas de todos los tratamientos no micorrizados. La intensidad de defoliación no modificó el porcentaje de colonización MA en las plantas adultas (Fig. 5a) mientras que en las plántulas mostró un valor similar en todos los tratamientos (Fig. 5b).

La cantidad de nódulos por gramo de raíz en las plantas adultas y las plántulas fue afectado por la intensidad de defoliación y hongos MA, y en las raíces de las plántulas también fue afectado por la interacción de ambos factores (Fig. c, d; Tabla 1, 2). Los nódulos de rizobios mostraron un patrón similar entre plantas adultas micorrizadas y no micorrizadas (Fig. 5c). Las plántulas micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas adultas defoliadas y no defoliadas mostraron un mayor número de nódulos por gramo de PF radical que el mismo tratamiento no micorrizado, mientras que las plántulas crecidas solas mostraron el valor más bajo, independientemente de la presencia de hongos MA (30 y 70 nódulos por gramo de PF radical en las plántulas no micorrizadas y micorrizadas, respectivamente) (Fig. 5d).

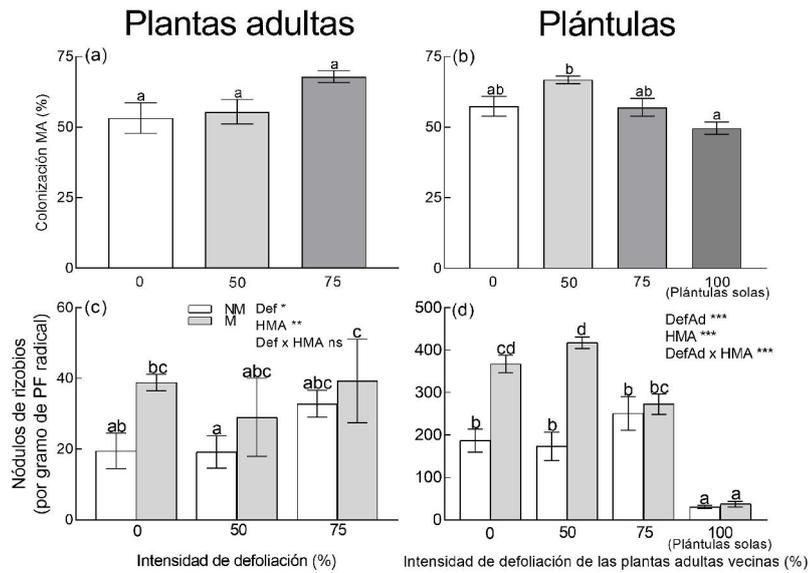


Fig. 5: Porcentaje de colonización MA en raíces de plantas adultas (a) y plántulas (b); y nódulos de rizobios por gramo de PF radical de plantas adultas (c) y plántulas (d) de *L. tenuis*. Las plantas adultas crecieron con (M) y sin (NM) hongos MA y fueron de defoliadas con diferentes intensidades (0, 50 y 75 %), las plántulas crecieron en la vecindad de las plantas adultas defoliadas y solas. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey ($P < 0,05$).

Índice de competencia

La tasa relativa logarítmica (TRL) del PS del vástago de las plántulas fue afectada por los hongos MA y la interacción de ambos factores (Fig. 6; Tabla 1). La TRL de las plántulas no micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas defoliadas y no defoliadas fue similar y cercana a cero (interacción neutra). La TRL de las plántulas micorrizadas fue negativa independientemente de la intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas, pero fue menor en las plántulas crecidas en la cercanía de las plantas adultas no defoliadas y

defoliadas al 50 % en comparación con las defoliadas a 75 % (interacción de competencia).

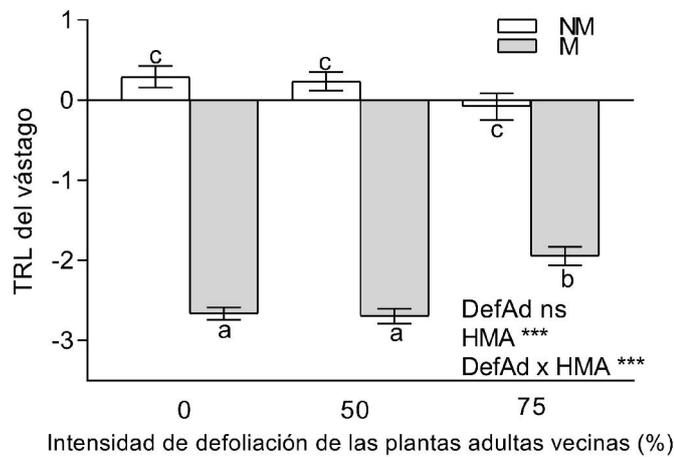


Fig. 6: Tasa relativa logarítmica (TRL) del vástago de plántulas de *L. tenuis* crecidas en la vecindad de plantas adultas conespecíficas defoliadas a diferentes intensidades (0, 50 y 75 %) con (M) y sin (NM) hongos MA. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. *** $P < 0,001$; ns no significativo.

Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de componentes principales explicó el 98,4 % de la varianza acumulada (Fig. 7; Tabla 3). El primer componente (CP1) del ACP explicó el 92,3 % de la varianza y el segundo componente (CP2) explicó el 6,1 %. El ACP mostró que los vectores de las plantas adultas micorrizadas estuvieron asociadas con un incremento en la biomasa aérea y radical y el contenido de P, independientemente de la intensidad de defoliación. Por otro lado, las plantas adultas no micorrizadas estuvieron asociadas a un incremento en el largo radical específico y la TRL del vástago de las plántulas (Fig. 7). El gráfico

separó los tratamientos micorrizados y no micorrizados. Los autovectores se presentan en la tabla 3.

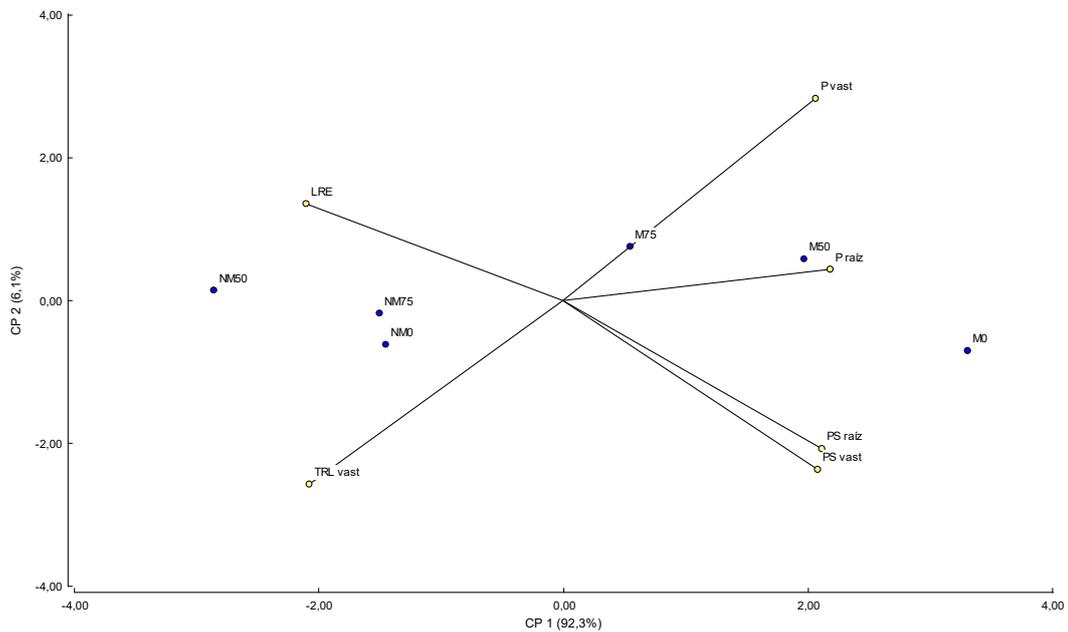


Fig. 7: Análisis de componentes principales para el PS del vástago y raíz, contenido de P en vástago y raíz, y el largo radical específico (LRE) de plantas adultas de *L. tenuis* defoliadas a 0, 50 y 75 % de intensidad; y la tasa relativa logarítmica (TRL) del vástago de las plántulas conespecíficas crecidas en la vecindad de las plantas adultas, con (M) y sin (NM) hongos MA. Las variables son presentadas por vectores.

Tabla 1. Resultado del ANOVA de dos vías (valores de *F* y *P*) para la intensidad de defoliación (Def), hongos MA (HMA) y la interacción entre Def y HMA en plantas adultas de *L. tenuis*.

		Def	HMA	Def x HMA
PS acumulado	F	3,18	109,75	9,92
	P	0,0595	<0,0001	0,0007
PS raíz	F	17,4	88,86	10,01
	P	<0,0001	<0,0001	0,0007
Concentración P vástago	F	4,89	18,64	6,35
	P	0,0165	0,0002	0,0061
Concentración P raíz	F	6,73	16,65	0,16
	P	0,0048	0,0004	0,8502
TRCv	F	90,96	6,88	12,09
	P	<0,0001	0,0149	0,0002
TRCr	F	10,65	0,73	6,93
	P	0,0005	0,4025	0,0042
Nódulos de rizobios	F	3,63	10,68	1,13
	P	0,042	0,0033	0,3384

Tabla 2. Resultados del ANOVA de dos vías (valores de *F* y *P*) para la intensidad de defoliación de las plantas adultas vecinas (DefAd), hongos MA (HMA) y la interacción entre DefAd y HMA en plántulas de *L. tenuis*.

		DefAd	HMA	DefAd x HMA
PS vástago	F	51,97	62,21	77,8
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
PF raíz	F	65,98	28,15	75,18
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Concentración de P vástago	F	26,15	145,39	9,32
	P	<0,0001	<0,0001	0,0001
Nódulos de rizobios	F	51,41	43,78	11,77
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TRL vástago	F	1,76	683,15	13,22
	P	0,1943	<0,0001	0,0001

Tabla 3. Autovectores obtenidos del análisis de componentes principales del PS del vástago y raíz, contenido de P en vástago y raíz y el largo radical específico de plantas adultas de *L. tenuis* defoliadas a 0, 50 y 75% de intensidad; y la TRL del vástago de plántulas conespecíficas crecidas en la

vecindad de plantas adultas no defoliadas y defoliadas a 0, 50 y 75% de intensidad, con y sin hongos MA.

Variables	Componente 1	Componente 2
PS vástago	0,40	-0,46
PS raíz	0,41	-0,40
Contenido P vástago	0,40	0,55
Contenido P raíz	0,42	0,08
LRS	-0,41	0,26
TRL vástago	-0,40	-0,50

PS, peso seco; P, fósforo; LRS, largo radical específico; TRL, tasa relativa logarítmica.

5.6 - Discusión

Los resultados del presente ensayo indicaron que la asociación con hongos MA fue benéfica para el crecimiento y absorción de P de las plántulas de *L. tenuis* crecidas en ausencia de plantas adultas conespecíficas en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado. Las plántulas micorrizadas en ausencia de competencia produjeron 258 % más de PS del vástago y mostraron un 504 % más de contenido de P en el vástago que las plántulas solas no micorrizadas (RMC y RMP, respectivamente). La capacidad de los hongos MA para explorar un volumen de suelo mayor que el sistema radical de las plantas y absorber P más allá de los límites de la zona de depresión del P (Smith y Read 2008) permitieron reducir el impacto de la deficiencia de P y mejoraron la nutrición fosforada de las plántulas. Sin embargo, el crecimiento de las plántulas micorrizadas de *L. tenuis* disminuyó por la presencia de plantas adultas defoliadas y sin defoliar. Esto podría estar asociado a un incremento del estrés por deficiencia de P producido por la zona de depresión de P debido a la presencia de las plantas adultas (Janoušková y col., 2011). Además, las

plantas adultas generan un sombreado sobre las plántulas que reduce la luz recibida y por ende puede conducir a una limitación de los compuestos carbonados y de esta manera disminuir el crecimiento de las plántulas (van der Heyde y col., 2019). Estos resultados están en línea con Moora y Zobel (1998) y Kytöviita y col., (2003) quienes concluyeron que los beneficios de la simbiosis con hongos MA son menores en plántulas compitiendo con plantas adultas que en plántulas crecidas solas.

La defoliación modifica los beneficios micorrícicos en las plantas adultas y plántulas vecinas dependiendo de la intensidad y frecuencia de la defoliación de las plantas adultas, su capacidad para recuperar el tejido aéreo removido y la disponibilidad de nutrientes en el suelo (van der Heyde y col., 2019; Faghihinia y col., 2020). En el presente ensayo, la biomasa de las plántulas micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas adultas no defoliadas y defoliadas al 50 % alcanzó los valores más bajos pero mostró un pequeño incremento en la vecindad de las plantas adultas defoliadas al 75 %. Además, la TRL fue negativa en todos los sistemas micorrizados. En particular, las plántulas micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas adultas defoliadas al 75 % mostraron una RMP positiva (70,77 %), el valor más alto de concentración de P en vástago y una mejora en la TRL. El rebrote del vástago luego de una defoliación intensa (75 %) requiere grandes cantidades de energía, la cual proviene principalmente de la removilización de las reservas del tejido radical y depende de la capacidad de las plantas defoliadas para incrementar la absorción de P del suelo. A pesar de que el incremento de la intensidad de defoliación de las plantas vecinas podría incrementar la luz recibida por las plántulas, y por lo tanto mejorar su crecimiento, la interacción

de competencia entre plantas adultas y plántulas podría estar también asociada a la deficiencia de P en el suelo. Este escenario conduce a disminuir la presión competitiva entre plántulas y plantas adultas defoliadas al 75 % de intensidad comparado con la interacción entre plántulas y plantas adultas no defoliadas y defoliadas al 50 % en los sistemas micorrizados.

El micelio extrarradical asociado al sistema radical de una planta absorbe nutrientes del suelo e induce la colonización radical de las plantas vecinas, contribuyendo a la formación de una red hifal (Smith y Read 2008). La presencia de una red hifal no fue directamente demostrada en este ensayo, sin embargo la colonización MA en las raíces de las plántulas posiblemente fue resultado del contacto con el micelio extrarradical desarrollado a partir de las raíces micorrizadas de las plantas adultas. Además, el incremento del crecimiento de las plántulas micorrizadas crecidas solas en comparación con las no micorrizadas constituye un indicador de la preexistencia de la red hifal, la cual estuvo involucrada en la absorción de P. Por otro lado, la asociación con hongos MA tiende a intensificar la competencia intraespecífica, a través del incremento de la disponibilidad de P en el suelo (Facelli y col., 1999; Tedersoo y col., 2020). Sin embargo, los beneficios de la asociación con hongos MA pueden ser distribuidos de forma inequitativa si las plantas difieren en el aporte de recursos carbonados a la red hifal (Kytöviita y col., 2003). En el presente ensayo, las plantas adultas de *L. tenuis* obtuvieron un mayor beneficio de la asociación con hongos MA que las plántulas y modificaron el balance competitivo con las plántulas a su favor. Por lo tanto, el efecto negativo de la competencia en las plántulas fue más fuerte que el efecto positivo de la simbiosis MA. Una posible explicación podría ser que la colonización MA puede

favorecer a las plantas adultas (valores de RMC y RMP positivos) más que a las plántulas (valores de RMC y RMP negativos, a excepción de la RMP en las plántulas crecidas en la vecindad de plantas adultas defoliadas 75%), posiblemente porque las plantas adultas estaban menos limitadas de compuestos carbonados que las plántulas (Moora y Zobel 1996). Además, las plántulas de *L. tenuis* micorrizadas crecidas en la vecindad de plantas defoliadas y no defoliadas produjeron menos biomasa que las plántulas no micorrizadas. Esto se debe en parte a que las plantas adultas micorrizadas absorbieron más P y produjeron más biomasa que las no micorrizadas (Ver Fig. 7) y este hecho podría afectar la eficiencia fotosintética de las plántulas micorrizadas y por lo tanto su crecimiento. Además, las plantas adultas no micorrizadas no afectaron el crecimiento de las plántulas ya que las plántulas crecidas solas y en la vecindad de plantas adultas produjeron la misma cantidad de biomasa y la TRL fue cercana a cero independientemente de la intensidad de defoliación. En este sentido, el análisis de componentes principales (Fig. 7) confirmó una correlación positiva entre la TRL y las plantas adultas no micorrizadas, en contraposición con las plantas adultas micorrizadas. Se destaca a la simbiosis MA como una estrategia importante de las plantas adultas de *L. tenuis* para regular el crecimiento de plántulas conespecíficas vecinas en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado.

Los resultados registrados en el presente ensayo concuerdan con los publicados por Sevilla y col., (1996), quienes encontraron que *L. tenuis* tuvo una mayor tasa de emergencia y supervivencia en áreas intensamente pastoreadas que en áreas levemente pastoreadas en pastizales de la Cuenca

del Río Salado. Y que las áreas intensamente pastoreadas proveyeron de micrositos que mejoraron la supervivencia de la leguminosa, asociado a una disminución de la competencia (Sevilla y col., 1996). En la Cuenca, la “promoción de una especie” es una práctica agronómica comúnmente utilizada, que consiste en minimizar la biomasa aérea para favorecer el establecimiento y crecimiento de especies con alto valor forrajero como es el caso de *L. tenuis*. Hasta donde se conoce, este es el primer estudio que reporta el rol de los hongos MA en la mejora del crecimiento de plántulas de *L. tenuis* a través de un incremento de la absorción de P cuando crecen sin competencia y que el efecto de los hongos MA en el crecimiento de las plántulas crecidas en presencia de plantas adultas conespecíficas es negativo ante condiciones de deficiencia de P. La primera hipótesis no es aceptada y la segunda hipótesis es aceptada.

La interacción de la intensidad de defoliación y los hongos MA afecta el crecimiento y absorción de P de *L. tenuis*. Las plantas micorrizadas defoliadas y no defoliadas mostraron cantidades similares de biomasa aérea con una tendencia a disminuir en las plantas defoliadas. Este resultado fue consecuencia de dos factores, por un lado una TRCv mayor en las plantas defoliadas en comparación con las no defoliadas, y por el otro una disponibilidad de P suficiente para sostener el rebrote del vástago, destacando que los hongos MA afectaron ambos factores y por lo tanto ocuparon un rol central en la absorción de P. En este sentido, el análisis de componentes principales mostró que la mejora en el contenido de P en vástago está asociado a las plantas micorrizadas y defoliadas. Esto se debe a que los

hongos MA maximizan el volumen de suelo explorado y por lo tanto la capacidad de las plantas para absorber P (Smith y Read 2008).

La defoliación generalmente resulta en una reducción del crecimiento radical (Iqbal y col., 2012; van der Heyde y col., 2019). En el presente ensayo, la pérdida de biomasa radical en las plantas micorrizadas en respuesta a la defoliación podría ser atribuida a una disminución en el crecimiento radical (disminución de la TRCr), una reasignación de sustancias asimiladas y una movilización de nutrientes desde las raíces hacia el rebrote del tejido aéreo como ha sido reportado previamente (García y Mendoza 2012; García 2021). En leguminosas el rebrote también depende de las reservas carbonadas y nitrogenadas alojadas en la corona (Ourry y col., 1994; Striker y col., 2011), permitiéndole a *L. tenuis* rebrotar luego de una defoliación intensa.

Las plantas adultas no defoliadas y no micorrizadas produjeron una cantidad de biomasa del vástago y raíz similar que las defoliadas. En este sentido, el análisis de componentes principales mostró que las plantas no micorrizadas estuvieron asociadas a una disminución de la biomasa y contenido de P, y a un incremento del largo radical específico. El largo radical específico incrementó posiblemente como estrategia para aumentar la superficie radical en contacto con el suelo para absorber más P debido a la falta de hongos MA. En particular, las plantas no micorrizadas defoliadas al 75 % mostraron similar producción de biomasa aérea y radical, y mayor TRCv y TRCr que las plantas micorrizadas. Estos resultados podrían ser explicados en parte por la hipótesis de la limitación por C, la cual predice que la defoliación disminuye la disponibilidad de C para los hongos MA, reduciendo la colonización y beneficios de la simbiosis MA en algunas situaciones (van der

Heyde y col., 2019). En este ensayo, la intensidad de defoliación del 75% no modificó la colonización MA pero disminuyó la respuesta MA (RMC y RMP) con respecto a las plantas no defoliadas. Podría postularse que los compuestos carbonados transferidos desde las raíces hacia el vástago luego de una defoliación drástica estuvieron principalmente destinados a recuperar la biomasa defoliada en las plantas no micorrizadas. Mientras que los recursos carbonados también estuvieron destinados a mantener la simbiosis MA en las plantas micorrizadas, mostrando una disminución neta del tejido aéreo del rebrote comparado con las plantas no micorrizadas. Es importante remarcar que los nódulos de rizobios estuvieron presentes tanto en las plantas micorrizadas como no micorrizadas independientemente de la intensidad de defoliación. Existen evidencias que el costo carbonado de la simbiosis con rizobios y hongos MA es aditivo (Smith y Read 2008). Por lo tanto, el alto requerimiento de P de *L. tenuis* podría estar en parte relacionado a una mayor demanda de P por parte de la simbiosis con bacterias fijadoras de N₂ (Robson y col., 1981), especialmente ante defoliación. En un estudio previo, plantas de *L. tenuis* defoliadas por encima del 75 % de la biomasa aérea fueron capaces de compensar el P y N total absorbido por las plantas no defoliadas. Estos resultados estuvieron asociados a un reciclado interno de nutrientes y una cantidad adicional de P y N absorbido del suelo y biológicamente fijado, respectivamente (García y Mendoza 2012). La tercera hipótesis es aceptada.

En base a los presentes resultados, se propone que una intensidad de defoliación moderada como 50 % permite mantener una alta respuesta MA (RMC y RMP) en plantas de *L. tenuis*, mientras que una alta intensidad de

defoliación como 75 % disminuye los beneficios de la simbiosis MA en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado.

5.7 - Conclusiones

Este capítulo marca un aspecto importante del rol de los hongos MA en la coexistencia de plantas adultas y plántulas conespecíficas en un suelo deficiente en P, especialmente relacionado a la nutrición fosforada. Las plántulas de *L. tenuis* podrían aprovechar los beneficios provistos por los hongos MA dependiendo del grado de competencia con las plantas adultas vecinas. La asociación temprana entre raíces de plántulas con hongos MA y rizobios es un factor clave para el crecimiento y absorción de nutrientes de las plántulas crecidas sin competencia. Este beneficio de los hongos MA sobre las plántulas disminuye en la medida que la competencia con plantas adultas conespecíficas aumenta. Sin embargo, una defoliación intensa puede disminuir el efecto competitivo de las plantas adultas con las plántulas. A partir de este ensayo también se plantea la necesidad de desarrollar nuevos estudios que permitan investigar si una disminución del periodo de recuperación posterior a la defoliación podría mejorar el crecimiento de las plántulas micorrizadas. Además el presente ensayo muestra que la competencia por P entre plantas adultas de *L. tenuis* y plántulas conespecíficas mediadas por hongos MA podría ser un factor importante que contribuye a regular el crecimiento de las plántulas en la Cuenca del Río Salado.

6- Capítulo 4

Rol de los hongos micorrícicos arbusculares en las interacciones de competencia y/o facilitación entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* ante fertilización fosforada

6.1- Resumen

La consociación entre gramíneas y leguminosas y la fertilización fosforada son alternativas ampliamente utilizadas en todo el mundo para incrementar la producción y calidad de los pastizales y pasturas. Sin embargo se desconoce el rol de los hongos MA nativos en combinación con la fertilización fosforada en las interacciones interespecíficas entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en consociación en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado. El objetivo fue estudiar el efecto del agregado de una dosis baja de fertilizante fosforado y el rol de los hongos MA nativos sobre la calidad y cantidad de la biomasa producida por la consociación de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado. Por tal motivo se llevó a cabo un ensayo en invernáculo en el cual plantas de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecieron en cultivos puros y consociados, ante dos niveles de P (0 y 15 mg.P kg⁻¹) y ante presencia y ausencia de hongos MA nativos, en un suelo deficiente en P (10,46 mg.P kg⁻¹) de la Cuenca del Río Salado. Setenta días después de la siembra se cosechó el material vegetal, se cuantificó el PS aéreo y radical, la concentración de P en tejido, y el porcentaje de colonización MA. Además se calculó la respuesta micorrícica del crecimiento (RMC) y absorción de P (RMP) y el efecto relativo del vecino más cercano (RNE) como índice de competencia entre ambas especies. La biomasa

producida por *L. tenuis* fue mayor en cultivo puro en comparación con el cultivo consociado, mientras que la biomasa producida por *S. arundinaceus* en cultivo puro fue similar a la producida en cultivo consociado ante todos los tratamientos evaluados. La RMC y RMP registraron valores mayores en la leguminosa en comparación con la gramínea en todos los tratamientos evaluados. El índice de RNE indicó una relación de facilitación entre ambas especies únicamente sin fertilizante fosforado y ausencia de hongos MA (-0,12 y -0,21 para *L. tenuis* y *S. arundinaceus*, respectivamente). En presencia de fertilización fosforada, hongos MA y su combinación, los valores de RNE de *L. tenuis* fueron positivos (relación de competencia), mientras que los de *S. arundinaceus* fueron negativos (relación de facilitación). Estos resultados indican que tanto la fertilización fosforada como la presencia de los hongos MA disminuyeron la habilidad competitiva de *L. tenuis* en consociación mientras que la presencia de *L. tenuis* mejoró el crecimiento de *S. arundinaceus*. Se concluye que el cultivo consociado entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* es una mejor alternativa en comparación con ambos cultivos puros ya que permite incrementar la cantidad de biomasa producida en comparación con el cultivo puro de *L. tenuis* e incrementar la calidad del recurso forrajero sin modificar la cantidad producida en comparación con el cultivo puro de *S. arundinaceus*.

6.2- Introducción

La consociación entre gramíneas y leguminosas y la fertilización fosforada son alternativas ampliamente utilizadas para incrementar la producción y calidad de forraje en suelos deficientes en P en ambientes templados, comúnmente empleadas en la Cuenca del Río Salado (Díaz y col., 2005; Muir y col., 2011; Nyfeler y col., 2011; Petigrosso y col., 2020). Las gramíneas poseen sistemas radicales fibrosos y en cabellera que les permite maximizar la exploración del perfil edáfico y les confieren una ventaja para competir con otras especies por la humedad y los nutrientes del suelo (Høgh-Jensen y Schjoerring, 2010; Muir y col., 2011; Mendoza y col., 2016b). Mientras que las leguminosas presentan una mayor afinidad con los hongos micorrícicos arbusculares (MA) que las gramíneas (Hetrick y col., 1989) y esto les confiere una mayor ventaja para crecer ante condiciones de estrés como la deficiencia de nutrientes poco móviles en el suelo como es el caso del P (Smith y Read, 2008). Además, la capacidad de las leguminosas para fijar N_2 a través de la simbiosis con rizobios les confiere una ventaja adicional para crecer en suelos deficientes en N (Temperton y col., 2007; Estrella y col., 2009; Campestre y col., 2021). Es por ello que la consociación de especies con diferente arquitectura radical y requerimientos nutricionales, como son las leguminosas y las gramíneas, puede facilitar y/o complementar la absorción de nutrientes en suelos deficientes (Hinsinger y col., 2011).

Es sabido que entre individuos de diferente especie ocurren interacciones de competencia, neutras o de facilitación y que el resultado neto depende de las especies vegetales, los factores ambientales, las prácticas

agronómicas y la relación con microorganismos del suelo involucrados en la nutrición vegetal como los hongos MA (Høgh-Jensen y Schjoerring, 2010; Nyfeler y col., 2011; Mendoza y col., 2016a, b). Ha sido reportado que la fertilización fosforada puede modificar el balance competitivo entre las especies y favorecer el crecimiento de las leguminosas (Jouany y col., 2011). Por ejemplo, Høgh-Jensen y Schjoerring, (2010) reportaron que la fertilización fosforada favoreció la capacidad competitiva de la leguminosa *Trifolium repens* en consociación con la gramínea *Lolium rigidum*. Mientras que Mendoza y col., (2016b) reportaron que la fertilización fosforada incrementó la producción de biomasa de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en consociación, pero no observaron un mayor beneficio por parte de la leguminosa.

Los hongos MA son capaces de interconectar plantas de la misma o diferente especie a través de la red hifal y de esta manera modificar las interacciones entre plantas vecinas, sobre todo cuando crecen en suelos deficientes en nutrientes (Smith y Read, 2008; Unger y col., 2021). Esto se debe a que los beneficios de la simbiosis MA pueden ser distribuidos inequitativamente de acuerdo al aporte de compuestos carbonados que cada planta hace a la red hifal (Kytöviita y col. 2003). En este sentido, Unger y col., (2021) encontraron que la presencia de *Trifolium subterraneum* incrementó la habilidad competitiva de *Lolium multiflorum* asociado a un incremento en la absorción de P y a un aumento de los beneficios de la simbiosis MA sustentada por la leguminosa. Por otro lado, Scheublin y col., (2007) encontraron que los hongos MA favorecieron el crecimiento de *L. corniculatus* L. en consociación con *Festuca ovina* L debido a la mayor dependencia de los hongos MA de la leguminosa en comparación con la gramínea para crecer en suelos deficientes

en nutrientes. Dada la variabilidad de las evidencias recopiladas y la importancia de la comunidad de hongos MA en la funcionalidad de los pastizales y pasturas es necesario estudiar un aspecto aún desconocido en la Cuenca del Río Salado como es el rol de este grupo fúngico en la interacción entre leguminosas y gramíneas consociadas.

Ha sido reportado que ante deficiencia de nutrientes las gramíneas pueden incrementar su crecimiento en presencia de leguminosas (Høgh-Jensen y Schjoerring, 2010; Unger y col., 2021). Esto podría estar asociado a un efecto de facilitación de la leguminosa hacia la gramínea, particularmente en el incremento de la disponibilidad de N proveniente de la fijación biológica de N₂ a través de la simbiosis con rizobios (Quinos y col., 1998; Cox y col., 2017; Petigrosso y col., 2020). Incluso, Cox y col., (2017) reportaron que la incorporación de leguminosas incrementó el crecimiento de diferentes gramíneas en co-cultivo en mayor medida que una dosis de 134 kg N.ha⁻¹ ante diferentes densidades de siembra. Además, la presencia de leguminosas puede incrementar el porcentaje de colonización MA en las raíces de gramíneas vecinas (Mendoza y col., 2016a; Unger y col., 2021) como así también el transporte de P y de esta manera aliviar el estrés por deficiencia de este nutriente (Liu y col., 2021; Unger y col., 2021). A pesar de que Mendoza y col., (2016a) reportaron un incremento de la colonización en las raíces de *S. arundinaceus* debido a la presencia de *L. tenuis*, más estudios son necesarios para saber si este incremento se encontraría correlacionado con un aumento de los beneficios de la simbiosis MA tanto en el crecimiento como en la absorción de P de la gramínea. Por otro lado, el establecimiento de leguminosas puede verse afectado negativamente por la presencia de

gramíneas vecinas en pastizales templados (interacción de competencia) debido a una disminución de la luz interceptada por las leguminosas provocada por el sombreado de las gramíneas acompañantes (Skinner y col., 2005).

En la Cuenca del Río Salado la consociación de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* está ampliamente difundida como una alternativa capaz de incrementar la producción de forraje (Cahuépe 2004; Mendoza y col., 2016a, b; Petigrosso y col., 2020). Esto se debe a que son dos especies de alto valor forrajero que se adaptan a crecer bajo diferentes condiciones de estrés ambiental presentes en la región, particularmente en suelos deficientes en fósforo (Mendoza y col., 2016a, b; Petigrosso y col., 2020; García 2021). Pero el incremento de la disponibilidad de nutrientes a través de la fertilización es un factor que puede modificar las interacciones entre ambas especies. En este sentido, a partir de un ensayo ante condiciones controladas, Mendoza y col., (2016b) mostraron que el agregado de 100 mgP kg⁻¹ en un suelo deficiente en P y N incrementó la habilidad competitiva de *S. arundinaceus* con *L. tenuis*. Mientras que Rodríguez y col., (2007) encontraron que la fertilización fosforada (66 kgP.ha⁻¹) en un pastizal natural y en una pastura dominada por *S. arundinaceus* en la Cuenca permitió incrementar la biomasa producida sin modificar la proporción de leguminosas como *L. tenuis*.

Incrementar la presencia de *L. tenuis* en pastizales y pasturas de la Cuenca es una alternativa factible para aumentar la calidad del recurso forrajero (Cahuépe 2004; Mendoza y col., 2016a), promover la entrada de N al sistema a través de la fijación biológica de N₂ (Petigrosso y col., 2020) e incluso mantener la comunidad de hongos MA nativos en el suelo y raíces de la leguminosa a lo largo del tiempo (García y Mendoza 2008). Por otro lado se

conoce que en la medida que incrementa el P disponible en el suelo, disminuyen los beneficios de la simbiosis MA en la absorción de P y crecimiento de *L. tenuis* (Mendoza y Pagani, 1997). Por ello, disminuir las dosis de P aplicadas podría ser una alternativa sustentable que permita incrementar la producción de biomasa y aprovechar los beneficios de la simbiosis MA. En el Capítulo 1 de la presente tesis se concluyó que la aplicación de una dosis baja a moderada de fertilizante fosforado (15 mgP kg^{-1}) permitió incrementar la producción de biomasa e incluso aumentar el porcentaje de colonización MA en las raíces de *L. tenuis*. Por ello resulta necesario evaluar el efecto de la dosis de fósforo previamente seleccionada en la producción de biomasa y en la respuesta a la asociación con hongos MA en la absorción de P y crecimiento de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* consociadas. Como así también si la comunidad nativa de hongos MA modifica el balance competitivo entre ambas especies ante el incremento de la disponibilidad de P en el suelo.

Incrementar la producción de forraje de manera sustentable en suelos deficientes en P a través de la consociación de leguminosas y gramíneas adaptadas a crecer bajo condiciones limitantes de P, la disminución de las dosis de P aplicadas y el aprovechamiento de los beneficios de los hongos MA podría ser posible (Ikoyi y col, 2018; Mezeli y col., 2020). En el presente capítulo se postula que una alternativa sustentable para incrementar la producción y calidad de forraje es la consociación de leguminosas y gramíneas en combinación con una dosis reducida de fertilizante fosforado que permita aprovechar los beneficios de la simbiosis MA para el desarrollo de ambas especies.

6.3- Objetivo

Estudiar el efecto del agregado de una dosis baja de fertilizante fosforado y el rol de los hongos MA nativos sobre la calidad y cantidad de la biomasa producida por la consociación de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* en un suelo deficiente en P de la Cuenca del Río Salado.

6.4- Hipótesis:

- 1- La consociación de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* produce la mayor cantidad de biomasa seca con una mejor calidad ante fertilización fosforada y hongos MA.
- 2- La simbiosis con hongos MA nativos incrementa la biomasa producida por *L. tenuis* tanto en cultivos puros como consociados independientemente del agregado de fertilizante fosforado. Mientras que *S. arundinaceus* produce la mayor cantidad de biomasa forrajera ante el agregado de una dosis baja de fertilizante fosforado y en consociación con *L. tenuis* en presencia de los hongos MA.
- 3- La combinación de la fertilización fosforada y los hongos MA nativos modifica las interacciones entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus*, y favorece el crecimiento de *L. tenuis*.

6.5- Materiales y métodos

Diseño experimental

Se llevó a cabo un ensayo en invernáculo en el cual plantas de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecieron en cultivos puros y consociados, ante una dosis baja de fertilizante fosforado, con y sin hongos MA nativos de la Cuenca del Río Salado. El experimento fue conducido usando un arreglo factorial con un diseño completamente aleatorizado y cada combinación de tratamientos contó con 4 repeticiones. Las muestras de suelo fueron recolectadas de un pastizal natural de la Cuenca descrito en el capítulo 1, luego fueron tamizadas y esterilizadas según se detalló en el capítulo 2. El P disponible del suelo luego de ser esterilizado fue de 10,46 mgP kg⁻¹ (Bray I).

Las macetas de 1,6 L de capacidad fueron llenadas con 900 g de suelo esterilizado y secado al aire. El grupo total de macetas se dividió inicialmente en dos subgrupos, a uno se le agregó una dosis de 15 mgP kg⁻¹ como KH₂PO₄ diluidos en 20 ml de agua destilada, mientras que el grupo control recibió únicamente 20 ml de agua destilada (dosis de 0 mgP kg⁻¹). El fertilizante se distribuyó homogéneamente en el suelo. Ambos subgrupos (fertilizado y sin fertilizar) se subdividieron, a uno se le agregó suelo como inóculo de hongos MA nativos y al otro se le agregó el mismo suelo previamente esterilizado (sin hongos MA). El inóculo de hongos MA y la técnica de inoculación fueron descritos en el capítulo 2.

En los cultivos puros, se sembraron cuatro semillas pre-germinadas en condiciones estériles de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* por maceta, mientras que en los cultivos consociados se sembraron dos semillas pre-germinadas de *L. tenuis* y dos de *S. arundinaceus* dispuestas en forma cruzada. Luego se

cubrieron con una fina capa de suelo estéril y posteriormente con una capa de arena de 1 cm de espesor a fin de minimizar la pérdida de agua evaporación de agua. Las plantas fueron regadas diariamente a fin de mantener un contenido de humedad cercano al 80% de la capacidad de campo. Las macetas fueron dispuestas en mesadas móviles y rotadas diariamente a fin de disminuir efectos de gradiente lumínico dentro del invernáculo. Las temperaturas medias diurnas y nocturnas fueron $31\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ respectivamente. La humedad relativa media fue de $66\pm 9\%$, la longitud del fotoperíodo fue 10–12 h, y la intensidad lumínica fue $900\text{--}1300\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (días soleados) y $400\text{--}700\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (días nublados) durante el período del experimento.

Producción de biomasa y fósforo en tejido

Luego de 70 días después de la siembra se cosechó el material vegetal de todos los tratamientos y se separó en vástago y raíz para cada especie estudiada por separado. La biomasa del vástago fue secada en estufa a fin de determinar el peso seco (PS) aéreo y la concentración de P en tejido. La biomasa radical fue separada del suelo a través de reiterados lavados con agua de red, luego fueron lavadas con agua destilada y pesadas para determinar el peso fresco (PF) radical. La muestra de raíces de cada especie fue cortada en segmentos de 1 cm de largo, homogeneizadas y divididas en dos submuestras: una submuestra fue secada a fin de determinar los mismos parámetros de la biomasa del vástago y otra fue usada para medir la colonización MA. En un sistema radical fresco completo de *L. tenuis* se contaron los nódulos de rizobios bajo lupa binocular a x7,5 de aumento.

El PS del vástago y de la raíz fue digerido en forma separada para cada especie estudiada en una mezcla de ácido nítrico-perclórico (3:2) para determinar la concentración de P por el método del ácido molibdovanadofosfórico (Jackson 1964).

Colonización MA y respuesta micorrícica

La colonización MA fue medida en las raíces frescas previamente aclaradas con una solución de KOH al 10% durante 12 minutos a 90 °C y teñidas con láctico-glicerol-azul de tripan al 0,05% (Phillips y Hayman, 1970). Treinta y cinco fragmentos de raíces por muestra de planta fueron examinados bajo microscopio a x200 de aumento. La colonización MA fue medida según la técnica de McGonigle y col., (1990).

Se calculó la respuesta micorrícica del crecimiento del vástago (RMC) y del contenido de P en vástago (RMP) de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2 presentadas en el capítulo 2.

Índice de competencia

Se calculó el efecto relativo del vecino más cercano (RNE) como índice de competencia entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en consociación con y sin fertilizante fosforado y con y sin hongos MA de acuerdo a la ecuación presentada por Bahadur y col., (2019),

$$\text{RNE}_{\text{PS planta}} = (\text{PS puro} - \text{PS consoc.}) / x \quad (\text{Ec. 3})$$

Con $x = \text{PS puro}$, si $\text{PS puro} > \text{PS consoc.}$

$x = \text{PS consoc.}, \text{ si PS consoc.} > \text{PS puro}$

donde PS puro es el PS de la planta de *L. tenuis* o *S. arundinaceus* crecidas en cultivo puro y PS consoc. es el promedio del PS de *L. tenuis* o *S. arundinaceus* crecidas en consociación correspondiente a cada tratamiento.

$$\text{RNE}_{\text{contenido P planta}} = (\text{contenido P puro} - \text{contenido P consoc.}) / x \quad (\text{Ec. 4})$$

Con $x = \text{contenido P puro}, \text{ si contenido P puro} > \text{contenido P consoc.}$

$x = \text{contenido P consoc.}, \text{ si contenido P consoc.} > \text{contenido P puro}$

donde contenido P puro es el contenido de P de la planta de *L. tenuis* o *S. arundinaceus* crecidas en cultivo puro y contenido P consoc. es el promedio del contenido de P de *L. tenuis* o *S. arundinaceus* crecidas en consociación correspondiente a cada tratamiento. El índice RNE puede tomar valores de -1 a +1 indicando interacciones de facilitación (valores negativos) y competencia (valores positivos).

Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos fue analizado a través de ANOVA de tres vías. Los factores fueron fertilización fosforada (P) (dos niveles: 0 y 15 mgP kg⁻¹), hongos MA (HMA) (dos niveles: con y sin hongos MA) y forma de cultivo (Sp) (dos niveles: *L. tenuis* y *L. tenuis* + *S. arundinaceus* o *S. arundinaceus* y *S. arundinaceus* + *L. tenuis*) como primer, segundo y tercer factor, respectivamente. Las variables colonización MA, RMC, RMP fueron analizadas a través de ANOVA de dos vías con fertilización fosforada (P) y forma de cultivo (Sp) como primer y segundo factor, respectivamente. La separación de

las medias se realizó a través del test de Tukey. Los datos que presentaron una distribución no normal fueron transformados con logaritmo neperiano (PS raíz/planta) para comparar las medias de los tratamientos. Las relaciones entre el PS del vástago y raíz, la concentración de P en vástago y raíz, el largo radical específico, la eficiencia de absorción de P de la raíz y el P disponible fueron evaluadas a través de un análisis de componentes principales (ACP). Se utilizó el software Infostat 2018.

6.6- Resultados

Rendimiento y P en tejido

El PS del vástago y la raíz por maceta fue afectado por la fertilización fosforada (P) y por la forma de cultivo (Sp), el PS del vástago por maceta también fue afectado por los hongos MA (HMA) y por la interacción entre HMA y Sp (Fig. 1a, b; Tabla 1). El PS del vástago y de la raíz por maceta de *S. arundinaceus* fue mayor que el de *L. tenuis* crecidas en cultivo puro independientemente de la fertilización fosforada y los hongos MA (Fig. 1a, b; Tabla 1). El patrón del PS del vástago por maceta del cultivo consociado fue similar al de *S. arundinaceus* en cultivo puro (Fig. 1a). En promedio, el PS del vástago de *L. tenuis* consociada representó el 13%, mientras que *S. arundinaceus* el 87% de la biomasa total, en todos los tratamientos evaluados. El PS de la raíz por maceta en el cultivo consociado alcanzó valores mayores que en el cultivo puro de *L. tenuis* y menores que en el cultivo puro de *S. arundinaceus* (Fig. 1b).

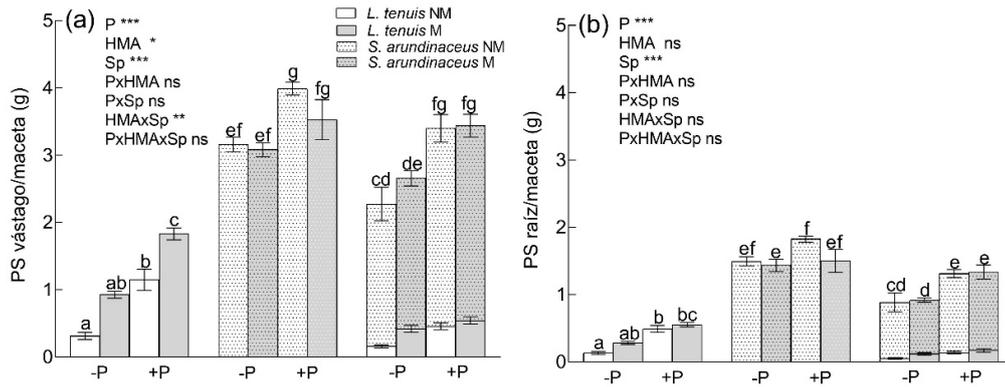


Fig. 1: PS del vástago (a) de la raíz por maceta (b) de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas sin (-P) y con (+P) fertilizante fosforado, sin (NM) y con (M) hongos MA y bajo diferentes formas de cultivo (puro y consociado) durante 70 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns $P > 0,05$.

El PS del vástago por planta de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* fue afectado por P, Sp y por la interacción de ambos factores, mientras que el PS del vástago por planta de *L. tenuis* también fue afectado por HMA y la interacción entre HMA y Sp (Fig. 2a; Tabla 1). *Lotus tenuis* alcanzó la mayor producción de biomasa aérea en cultivo puro con fertilización fosforada y en presencia de hongos MA, mientras que registró la menor producción sin fertilización fosforada y en ausencia de hongos MA, independientemente de la forma de cultivo. En consociación, *L. tenuis* produjo la misma cantidad de PS del vástago sin P y en presencia de hongos MA que los tratamientos fertilizados con y sin hongos MA. En cultivo puro, los hongos MA incrementaron el PS del vástago de *L. tenuis* tanto en ausencia como en presencia de fertilizante fosforado. Además, produjo la misma cantidad de biomasa sin fertilizante fosforado y en presencia de hongos MA que con fertilizante fosforado y en ausencia de

hongos MA. El mayor PS del vástago de *S. arundinaceus* se obtuvo ante el agregado de fertilizante fosforado y en consociación con *L. tenuis*, independientemente de la presencia de los hongos MA.

El PS de la raíz por planta de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* fue afectado por P, Sp y por la interacción de ambos factores, mientras que el PS de la raíz de *L. tenuis* también fue afectado por HMA (Fig. 2b; Tabla 1). El PS de la raíz de ambas especies no mostró cambios ante las distintas combinaciones de tratamientos.

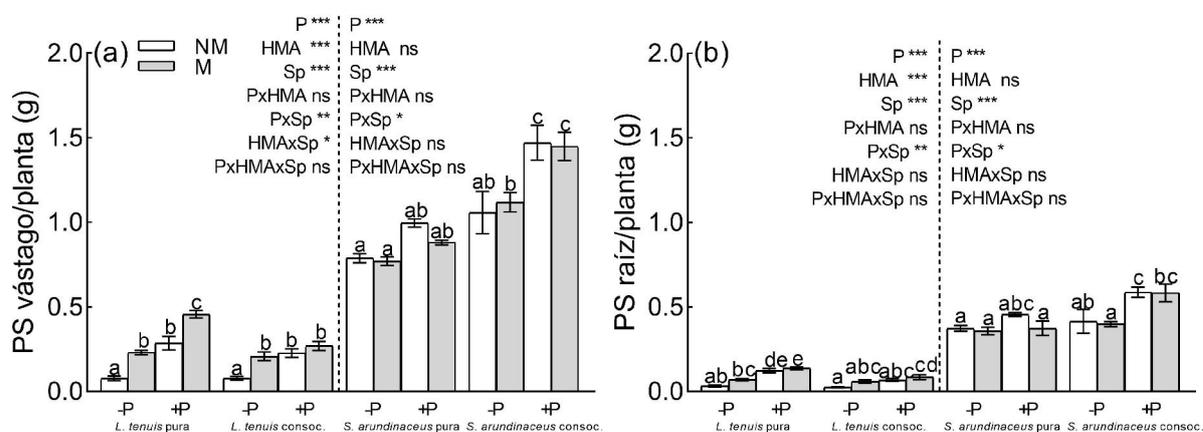


Fig. 2: PS del vástago por planta (a) y de la raíz por planta (b) de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas sin (-P) y con (+P) fertilizante fosforado, sin (NM) y con (M) hongos MA y bajo diferentes formas de cultivo (puro y consociado) durante 70 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns $P > 0,05$.

La concentración de P en el vástago de *L. tenuis* fue afectada por HMA, Sp y la interacción de P y HMA, mientras que la concentración de P en el vástago de *S. arundinaceus* fue afectada por P y Sp (Fig. 3 a, b; Tabla 1). *Lotus tenuis* en cultivo puro presentó una mayor concentración de P en vástago en

presencia de hongos MA, independientemente de la fertilización fosforada. En cultivo consociado y sin fertilizar, la concentración de P en vástago de *L. tenuis* micorrizada también fue mayor que la no micorrizada, mientras que ante fertilización fosforada no hubo diferencias entre los tratamientos con y sin hongos MA. La concentración de P en vástago de *S. arundinaceus* mostró una tendencia a incrementar debido a la fertilización fosforada y a la consociación con *L. tenuis*.

La concentración de P en raíz de *L. tenuis* fue mayor en el tratamiento micorrizado en comparación con el no micorrizado, independientemente de la fertilización fosforada y la forma de cultivo. Mientras que en *S. arundinaceus*, la concentración de P en raíz alcanzó valores similares entre los tratamientos (Fig. 3b; Tabla 1).

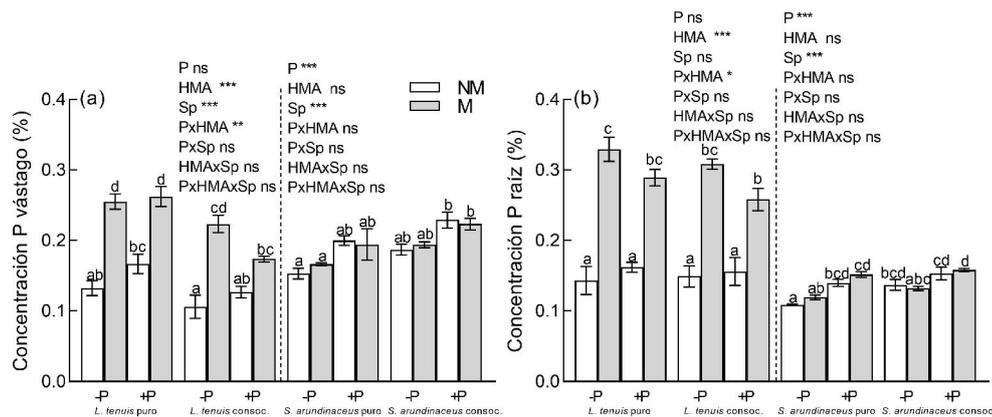


Fig. 3: Concentración de P en vástago (a) y raíz (b) de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas sin (-P) y con (+P) fertilizante fosforado, sin (NM) y con (M) hongos MA y bajo diferentes formas de cultivo (puro y consociado) durante 70 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns $P > 0,05$.

Respuesta micorrícica del crecimiento (RMC) y del contenido de P (RMP)

La RMC en *L. tenuis* fue afectada por P (Fig. 4; Tabla 2). El valor máximo se registró en el tratamiento sin fertilización fosforada mientras que el menor se obtuvo ante el agregado de fertilizante fosforado, independientemente de la forma de cultivo. La RMC en *S. arundinaceus* registró valores cercanos a cero y no hubo diferencias entre los tratamientos evaluados.

La RMP para ambas especies fue afectada por P (Fig. 4b; Tabla 2). En *L. tenuis*, los valores máximos se obtuvieron sin fertilización fosforada mientras que los menores se registraron ante el agregado de fertilizante fosforado, independientemente de la forma de cultivo. La RMP alcanzó un valor negativo ante el agregado de fertilizante fosforado en el cultivo puro de *S. arundinaceus*. En el cultivo consociado, la RMP de *S. arundinaceus* no registró diferencias.

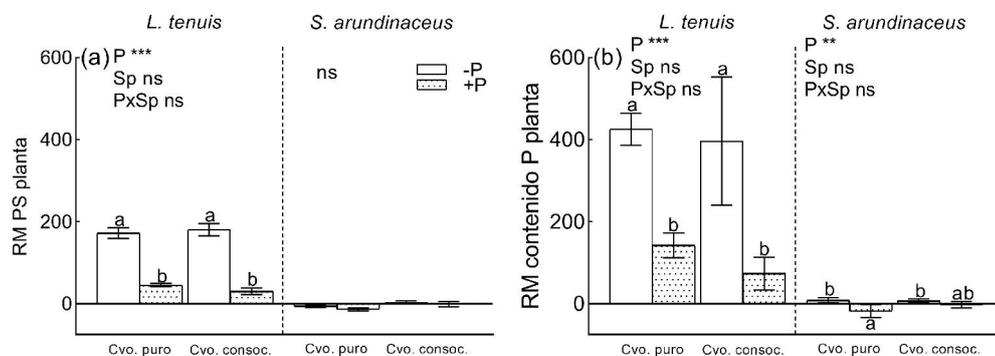


Fig. 4: Respuesta micorrícica del crecimiento (a) y contenido de P (b) en *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas sin (-P) y con (+P) fertilizante fosforado y bajo diferentes formas de cultivo (puro y consociado) durante 70 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns $P > 0,05$.

Colonización micorrícica arbuscular y nódulos de rizobios

Las plantas correspondientes a los tratamientos no micorrizados no presentaron colonización MA en sus raíces. En los tratamientos micorrizados, el porcentaje de colonización MA en las raíces de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* fue afectado por P, Sp y por la interacción de ambos factores (Fig. 5a; Tabla 2). El porcentaje de colonización MA de ambas especies, tanto en cultivo puro como consociado, disminuyó por efecto de la fertilización fosforada. Los valores más altos fueron registrados en las raíces de *L. tenuis*, tanto en cultivo puro como consociado y en ausencia de fertilizante fosforado, mientras que los más bajos fueron registrados en las raíces de *S. arundinaceus*, tanto en cultivo puro como consociado ante fertilización fosforada. El sistema radical de *L. tenuis* registró valores similares de colonización MA en ausencia de fertilizante fosforado, independientemente de la forma de cultivo, mientras que ante fertilización fosforada y en consociación con *S. arundinaceus* registró el valor más bajo (Fig. 5a). Por el contrario, en ausencia de fertilizante fosforado, el porcentaje de colonización MA en el sistema radical de *S. arundinaceus* incrementó ante la presencia de *L. tenuis* en comparación con el cultivo puro, mientras que ante fertilización fosforada se registraron valores similares, independientemente de la forma de cultivo.

Todas las plantas de *L. tenuis* correspondientes a los distintos tratamientos presentaron nódulos de rizobios en sus raíces. La cantidad de nódulos por gramo de PF radical de *L. tenuis* fue afectada por P, HMA, Sp y por la interacción entre los distintos tratamientos (Fig. 5b; Tabla 1). La cantidad de nódulos en las raíces de *L. tenuis* fue mayor en el cultivo consociado que en

el puro, para cada tratamiento evaluado, excepto en el tratamiento sin fertilización fosforada y sin hongos MA, donde se registraron valores similares a los alcanzados en el cultivo puro.

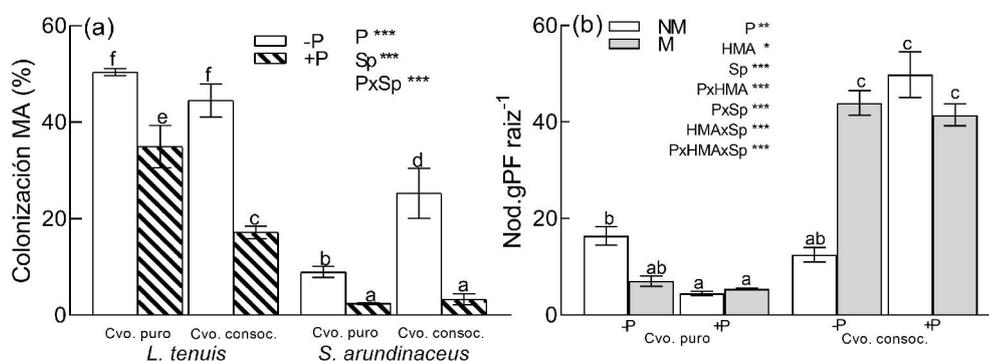


Fig. 5: Porcentaje de colonización MA (a) en las raíces de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas sin (-P) y con (+P) fertilizante fosforado y bajo diferentes formas de cultivo (puro y consociado) y cantidad de nódulos por gramo de PF radical (b) de *L. tenuis* crecida sin (-P) y con (+P) fertilizante fosforado, sin (NM) y con (M) hongos MA y bajo diferentes formas de cultivo (puro y consociado) durante 70 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns $P > 0,05$.

Índice de competencia

El índice RNE del PS de la planta fue afectado por P, HMA, Sp y por la interacción entre P y Sp y entre HMA y Sp (Fig. 6a; Tabla 1). Las plantas de *L. tenuis*, con excepción del tratamiento sin fertilización fosforada y sin hongos MA, presentaron un valor de RNE positivo el cual indica interacción de competencia. Las plantas de *L. tenuis* micorrizadas y sin fertilizante fosforado registraron un valor de RNE similar al de las plantas no micorrizadas con agregado de fertilizante fosforado. Mientras que el valor máximo de RNE se

observó en las plantas de *L. tenuis* ante fertilización fosforada y presencia de hongos MA. Por el contrario, las plantas de *L. tenuis* sin fertilizante fosforado y sin hongos MA mostraron un valor de RNE negativo, el cual indica interacción de facilitación.

El índice RNE del PS de la planta de *S. arundinaceus* registró valores negativos en todos los tratamientos evaluados, los cuales indican interacción de facilitación. Además se observó una tendencia a disminuir el valor de RNE debido al agregado de fertilizante fosforado y presencia de hongos MA, lo cual indica un incremento de la interacción de facilitación.

El valor de RNE del contenido de P de la planta fue afectado por P, HMA, Sp y por la interacción entre P y Sp y entre HMA y Sp (Fig. 6b; Tabla 1). Las plantas de *L. tenuis*, con excepción del tratamiento sin fertilización fosforada y sin hongos MA, presentaron valores de RNE positivos (competencia) y similares entre sí. Por el contrario, las plantas de *L. tenuis* sin fertilizante fosforado y en ausencia de hongos MA presentaron un valor de RNE negativo (facilitación).

Las plantas de *S. arundinaceus* presentaron valores de RNE negativos y similares entre sí (facilitación), independientemente de la fertilización fosforada y de los hongos MA.

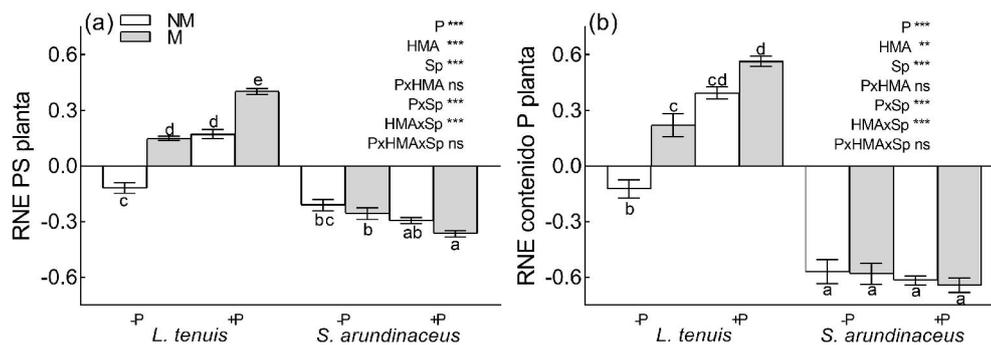


Fig. 6: El índice RNE del PS de la planta (a) y del contenido de P en planta (b) de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en consociación sin (-P) y con (+P) fertilizante fosforado y sin (NM) y con (M) hongos MA durante 70 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns $P > 0,05$.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) explicó el 81,9 % de la varianza acumulada (Fig. 7; Tabla 3). Los puntos representan las diferentes combinaciones de cada tratamiento y los vectores las diferentes variables analizadas. El primer componente (CP1) explicó el 44,6 % de la varianza y el segundo componente (CP2) explicó el 37,3 %. El ACP mostró que el PS del vástago y de la raíz estuvieron asociados a *S. arundinaceus*, independientemente de la fertilización fosforada, la presencia de hongos MA y la forma de cultivo. El largo radical específico estuvo asociado a *L. tenuis* crecidas en ausencia de hongos MA, independientemente de la fertilización fosforada y la forma de cultivo. Mientras que la concentración de P en vástago y raíz, la eficiencia de absorción de P de las raíces y la disponibilidad de P en

el suelo estuvieron asociados a las plantas de *L. tenuis* micorrizadas, independientemente de la fertilización fosforada y la forma de cultivo.

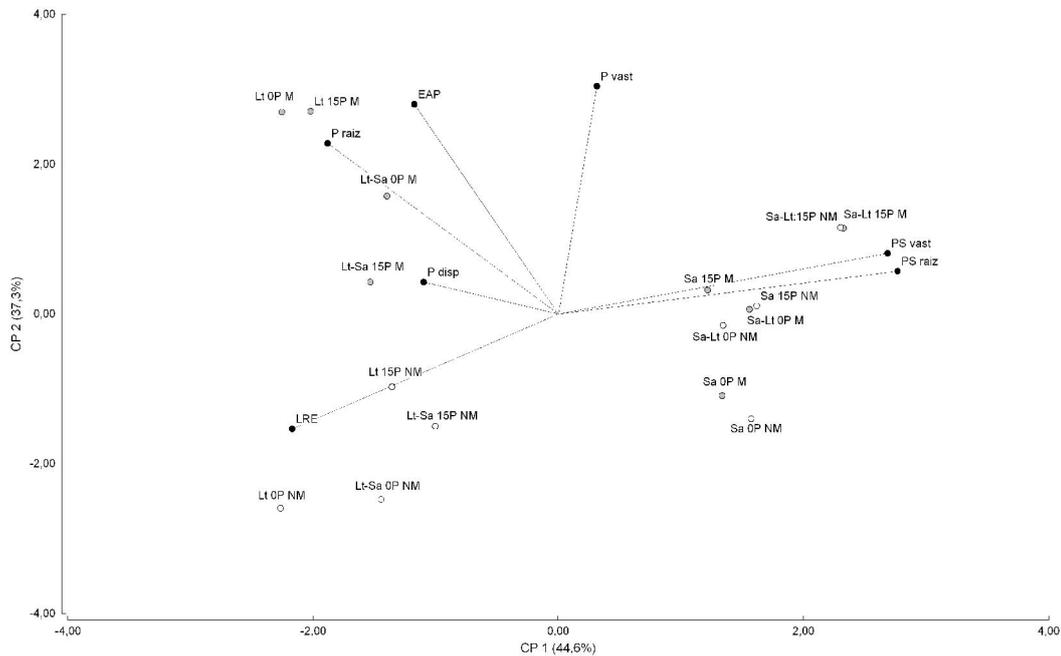


Fig. 7: Análisis de componentes principales para el PS del vástago (PS vast) y raíz (PS raíz), concentración de P en vástago (P vast) y raíz (P raíz), largo radical específico (LRE), eficiencia de absorción de P (EAP) y disponibilidad de P en el suelo (P disp) de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas con (15P) y sin (0P) fertilización fosforada, con (M) y sin (NM) hongos MA en cultivos puros (Lt, Sa) y consociados (Lt:Sa, Sa:Lt). Las variables son presentadas por vectores y los diferentes tratamientos por puntos.

Tabla 1. Resultado del ANOVA de tres vías (valores de F y P) para la fertilización fosforada (P), hongos MA (HMA), forma de cultivo (Sp) y la interacción entre P y HMA, P y Sp, HMA y Sp y P, HMA y Sp en plantas de *L. tenuis* y *S. arundinaceus*.

		P	HMA	Sp	P x HMA	P x Sp	HMA x Sp	P x HMA x Sp
PS vást/maceta	F	117,19	6,73	368,34	2,11	1,56	12,25	0,93
	P	<0,0001	0,0136	<0,0001	0,1553	0,2242	<0,0001	0,4040
PS raíz/maceta	F	64,32	0,01	294,65	0,80	1,23	2,57	0,16
	P	<0,0001	0,9205	<0,0001	0,3771	0,3050	0,0902	0,8505
PS vást/planta <i>L. tenuis</i>	F	92,26	54,51	15,79	1,11	10,99	5,13	2,51
	P	<0,0001	<0,0001	0,0006	0,3024	0,0029	0,0329	0,1260
PS vást/planta <i>S. arundinaceus</i>	F	29,16	0,24	71,06	0,84	4,66	0,79	3,70E-03
	P	<0,0001	0,6316	<0,0001	0,3675	0,0411	0,3837	0,9522
PS raíz/planta <i>L. tenuis</i>	F	77,22	16,39	24,39	2,33	15,50	4,60E-03	0,04
	P	<0,0001	0,0005	<0,0001	0,1397	0,0017	0,9467	0,8391
PS raíz/planta <i>S. arundinaceus</i>	F	22,89	0,65	14,46	0,04	4,74	0,15	0,18
	P	<0,0001	0,4283	0,0009	0,8496	0,0395	0,6981	0,6792
Conc. P vást <i>L. tenuis</i>	F	0,99	108,70	24,89	9,59	1,99	0,02	1,33
	P	0,6286	<0,0001	<0,0001	0,0049	0,1707	0,8915	0,2600
Conc. P vást <i>S. arundinaceus</i>	F	24,31	0,09	16,42	1,16	0,01	0,04	0,04
	P	<0,0001	0,7635	0,0005	0,2927	0,9149	0,8368	0,8378
Conc. P raíz <i>L. tenuis</i>	F	2,34	185,70	1,53	7,57	0,27	1,49	1,90E-03
	P	0,1395	<0,0001	0,2280	0,0111	0,6069	0,2336	0,9652
Conc. P raíz <i>S. arundinaceus</i>	F	53,19	2,38	17,09	0,59	1,98	2,44	0,36
	P	<0,0001	0,1361	0,0004	0,4510	0,1723	0,1312	0,5559
RNE PS planta	F	29,44	34,74	713,01	0,86	128,65	90,05	0,04
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3638	<0,0001	<0,0001	0,8514
RNE contenido P planta	F	32,22	12,85	683,34	1,95	53,59	17,28	1,44
	P	<0,0001	0,0015	<0,0001	0,1755	<0,0001	0,0004	0,2412
Nod./gPF raíz	F	10,97	5,22	317,01	21,09	53,57	24,15	30,84
	P	0,0029	0,0315	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001

Tabla 2. Resultado del ANOVA de dos vías (valores de *F* y *P*) para la fertilización fosforada (P), hongos MA (HMA) y la interacción entre P y HMA en plantas de *L. tenuis* y *S. arundinaceus*.

		P	Sp	P x Sp
Colonización MA	F	341,18	411,52	18,44
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
RM PS planta <i>L. tenuis</i>	F	156,17	0,10	1,08
	P	<0,0001	0,7573	0,3196
RM PS planta <i>S. arundinaceus</i>	F			
	P			
RM cont. P planta <i>L. tenuis</i>	F	43,44	4,43	2,44
	P	<0,0001	0,0571	0,1442
RM cont. P planta <i>S. arundinaceus</i>	F	16,42	2,27	3,25
	P	0,0016	0,1578	0,0966

Tabla 3. Autovectores obtenidos del análisis de componentes principales del P disponible, PS del vástago y raíz, concentración de P en vástago y raíz, el largo radical específico y P total/PS radical de plantas de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* crecidas en cultivo puro y consociado, ante fertilización fosforada, con y sin hongos MA.

Variables	Componente 1	Componente 2
P disponible	-0,21	0,08
PS vástago/planta	0,52	0,18
PS raíz/planta	0,54	0,13
Concentración P vást.	0,04	0,55
Concentración P raíz	-0,38	0,44
LRS	-0,41	-0,31
EAP	-0,25	0,54

PS, peso seco; P, fósforo; LRS, largo radical específico; EAP, eficiencia de absorción de fósforo

6.7- Discusión

Trabajos previos han reportado el beneficio de promover el crecimiento y la presencia de *L. tenuis* en pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado, principalmente dado por el incremento de la calidad del recurso forrajero con el objetivo de mejorar la nutrición del ganado (Cahuépe, 2004; Mendoza y col., 2016a; Campestre y col., 2021). Los resultados del presente capítulo destacan el beneficio de consociar ambas especies ya que incrementa la producción de biomasa en comparación con el cultivo puro de *L. tenuis* e incrementa la calidad del recurso forrajero sin afectar la cantidad, en comparación con el cultivo puro de *S. arundinaceus*. Además, el marcado incremento de la concentración de P en vástago de *L. tenuis* ante la presencia de hongos MA como así también una elevada respuesta micorrícica del contenido de P en comparación con *S. arundinaceus*, confirman que el cultivo consociado presenta mayor calidad que el cultivo puro de *S. arundinaceus*, asociado a un mayor contenido de P en la biomasa forrajera obtenida. La primera hipótesis es parcialmente aceptada.

La fertilización fosforada y los hongos MA incrementaron la producción de biomasa de las plantas de *L. tenuis*, independientemente de la forma de cultivo, mientras que la producción de biomasa de *S. arundinaceus* incrementó ante fertilización fosforada y en cultivo consociado, independientemente de los hongos MA. Al igual que los resultados obtenidos en el capítulo 2 de la presente tesis, el PS del vástago de *L. tenuis* en cultivo puro y consociado permite equiparar el efecto de la dosis de fertilizante fosforado aplicada con el rol de los hongos MA en el crecimiento y absorción de P. Esto se debe a que el micelio edáfico permite explorar un volumen de suelo mayor y por lo tanto

incrementar la absorción de P lo cual se traduce en un incremento de la producción de biomasa vegetal (Smith y Read, 2008). Por tal motivo, la simbiosis con hongos MA puede ser considerada como un equivalente funcional a finas raíces y pelos radicales (Brundrett, 2002). Mientras que el incremento de la producción de biomasa de las plantas de *L. tenuis* no micorrizadas ante fertilización fosforada se debió exclusivamente al incremento de la disponibilidad de P en el suelo y a los cambios en la morfología radical asociados. Por un lado, el incremento de la disponibilidad de P en el suelo aumenta el gradiente de concentración entre la solución del suelo y las raíces y por lo tanto la absorción de P por parte de las plantas (Heredia 2016). Por otro lado, se registró un incremento de la biomasa radical (74,78%) de las plantas de *L. tenuis* crecidas en cultivo puro ante fertilización fosforada y en ausencia de hongos MA en comparación con aquellas crecidas sin fertilizante fosforado y presencia de hongos MA. Además, el diagrama del ACP mostró una asociación entre las plantas de *L. tenuis* no micorrizadas y un incremento del largo radical específico. Estos cambios en la morfología radical conllevan a un aumento de la superficie de contacto del sistema radical con el suelo y por lo tanto a un incremento de la absorción de P (Tawaraya, 2003; Mendoza y col., 2016b).

En el presente ensayo, la fertilización fosforada incrementó 216,9% el PS del vástago por maceta de *L. tenuis* crecida en cultivo puro y presencia de hongos MA. Mientras que en *S. arundinaceus* incrementó 26,3% ante las mismas condiciones de crecimiento. Estos resultados están asociados con una menor capacidad de absorber P por parte del sistema radical y un mayor requerimiento de P para el crecimiento de *L. tenuis* en comparación con *S. arundinaceus* como fue registrado en el capítulo 2 de la presente tesis. Además

estos resultados se encuentran en concordancia con los reportados por Mendoza y Pagani, (1997), Mendoza y col., (2009) y Mendoza y col., (2016a, b). Por otra parte, en el caso de *L. tenuis* en cultivo puro ante el agregado de fertilizante fosforado y hongos MA, el PS del vástago incrementó 59,79% comparado con las plantas fertilizadas y sin hongos MA y un 97,8% comparado con las plantas no fertilizadas y con hongos MA mostrando un efecto sinérgico entre la dosis de fertilizante fosforado aplicada y la simbiosis MA. En línea con estos resultados, el ACP mostró una asociación entre la presencia de los hongos MA y el incremento de la eficiencia del sistema radical para absorber P independientemente de la fertilización fosforada y forma de cultivo. Al igual que se reportó en el capítulo 2 de la presente tesis, estos resultados permiten destacar a *L. tenuis* como una especie capaz de aprovechar los beneficios de la simbiosis MA incluso ante el incremento de P disponible en el suelo.

La respuesta micorrícica del crecimiento y contenido de P de *L. tenuis*, tanto en cultivo puro como consociado, registró valores positivos en todos los tratamientos. Esto se debe al alto requerimiento de P para el crecimiento, en parte asociado a la fijación biológica de N₂ (Temperton y col., 2007) y a la baja eficiencia de su sistema radical para explorar el perfil del suelo y absorber P. Estas características convierten a *L. tenuis* en una especie altamente dependiente de los hongos MA para crecer en suelos deficientes en P (Mendoza y Pagani 1997). Es necesario destacar que la RM del crecimiento y absorción de P de *L. tenuis* en cultivo puro y consociado fue la misma para los dos niveles de P ensayados. Estos resultados no solo confirman la alta dependencia de esta especie por la asociación con hongos MA sino también la

habilidad para aprovechar los beneficios que le confiere la simbiosis MA ante competencia con una gramínea y deficiencia de P o fertilización.

Ha sido ampliamente reportado que la fertilización fosforada disminuye la colonización MA en las raíces de especies forrajeras (Covacevich y col., 2006; Hill y col. 2010; Cavagnaro y col., 2014; Mendoza y col 2016 a; b; Fornara y col., 2020). Pero la relación entre el porcentaje de colonización MA y la funcionalidad de la simbiosis están a veces, pero no siempre, relacionados entre sí (Smith y col., 2004). Los resultados del presente ensayo registraron una correlación positiva entre el porcentaje de colonización MA y la RM del crecimiento y absorción de P del cultivo puro de *L. tenuis* ($r= 0,93$ y $r=0,95$; sin y con agregado de P, respectivamente; $P<0,01$) y del cultivo consociado ($r= 0,88$ y $r=0,83$; sin y con agregado de P, respectivamente; $P<0,01$). Además, están en concordancia con los reportados en el capítulo 2 de la presente tesis y permitirían concluir que el porcentaje de colonización MA en las raíces de *L. tenuis* podría actuar como un indicador de la funcionalidad de la simbiosis con hongos MA ante las condiciones estudiadas.

Por otro lado, las plantas de *S. arundinaceus* produjeron mayor biomasa ante fertilización fosforada en consociación con *L. tenuis* e independientemente de los hongos MA. Estos resultados están en concordancia con trabajos previos en los cuales se reportó que las gramíneas son capaces de crecer mejor en consociación con leguminosas (Mendoza y col., 2016b; Cox y col., 2017; Petigrosso y col., 2018). El beneficio provisto por la presencia de la leguminosa está asociado principalmente a una mejora en la nutrición nitrogenada debido al incremento de N en el medio edáfico producto de la fijación biológica de N_2 a través de la simbiosis con rizobios, como ha sido

demostrado a través de diversos estudios (Høgh-Jensen y Schjoerring, 2010; Cox y col., 2017). En este sentido, las plantas de *L. tenuis* crecidas en consociación presentaron una mayor cantidad de nódulos en su sistema radical debido al incremento de la disponibilidad de P dada por la fertilización y la presencia de los hongos MA, en comparación con los mismos tratamientos del cultivo puro. Además, los resultados del presente capítulo están en desacuerdo con Høgh-Jensen y Schjoerring, (2010) y en concordancia con Mendoza y col., (2016a) ya que en el cultivo consociado y en presencia de hongos MA, la fertilización fosforada favoreció el crecimiento de la gramínea en mayor medida que el de la leguminosa.

En resumen, la simbiosis con hongos MA nativos incrementó la biomasa producida por *L. tenuis* tanto en cultivo puro como consociado independientemente del agregado de fertilizante fosforado y asociado principalmente a un incremento de la absorción de P y de la eficiencia de absorción del sistema radical. Mientras que *S. arundinaceus* produjo la mayor cantidad de biomasa forrajera ante el agregado de fertilizante fosforado y en consociación con *L. tenuis*, independientemente de los hongos MA. La segunda hipótesis es aceptada.

En el cultivo consociado, el PS del vástago por maceta de *L. tenuis* aumentó 49,68% y 29,28% ante fertilización fosforada y en ausencia y presencia de hongos MA, respectivamente. La menor respuesta al agregado de fertilizante fosforado del cultivo consociado en comparación con el cultivo puro de la leguminosa se asociaría a la menor contribución de *L. tenuis* (13%) en comparación con *S. arundinaceus* (87%) a la biomasa total producida consociación, a pesar de que ambas fueron sembradas en igual proporción

(2:2). La menor contribución de *L. tenuis* a la consociación generó un efecto dilutorio de la respuesta al P y presencia de hongos MA registrada en el cultivo puro de la leguminosa. En este sentido, Petigrosso y col., (2020) reportaron que en condiciones de campo, el crecimiento y cobertura de *S. arundinaceus* fue marcadamente mayor que el de *L. tenuis* consociadas, independientemente de la proporción sembrada de cada una. La dominancia de la gramínea frente a la leguminosa está asociada a la alta habilidad competitiva de *S. arundinaceus* (Refi y Escuder, 1998; Petigrosso y col., 2020) combinado con la lenta tasa de crecimiento de *L. tenuis* durante estadíos tempranos del crecimiento que la sitúa en desventaja para competir con plantas vecinas (Blumenthal y McGraw 1999). La habilidad competitiva de *S. arundinaceus* está en parte asociada a la mayor producción de biomasa radical en comparación con *L. tenuis* y a la eficiencia de su sistema radical para absorber P ante condiciones limitantes como fue reportado en el capítulo 2.

Las plantas de *S. arundinaceus* y *L. tenuis* en consociación, sin fertilizante fosforado y sin hongos MA registraron una interacción de facilitación (valores de RNE del PS de la planta y el contenido de P negativos). Estos resultados se encuentran en concordancia con trabajos previos, en los cuales se han reportado que las interacciones interespecíficas de facilitación ocurren principalmente ante estrés, particularmente bajo deficiencia de P (Li y col., 2007; Hinsinger y col., 2011; Di Bella y col., 2019). Además, ha sido reportado que entre las leguminosas y las gramíneas en consociación puede suceder una facilitación y/o complementación de la absorción de nutrientes ya que poseen diferente morfología radical y requerimientos nutricionales (Hinsinger y col., 2011). En este sentido, las diferencias en la morfología radical entre *L. tenuis* y

S. arundinaceus (como fueron reportadas en el capítulo 2) permitirían complementar la absorción de nutrientes y por ende el crecimiento ante estrés por deficiencia de P, el cual podría haberse incrementado por la ausencia de hongos MA en el caso de *L. tenuis*. Además, Hinsinger y col., (2011) propusieron que las interacciones de facilitación entre leguminosas y gramíneas se deben a mecanismos directos como el incremento de la disponibilidad de P o indirectos como cambios benéficos asociados a la comunidad de hongos MA.

Es necesario destacar que los valores de RNE de las plantas de *L. tenuis* crecidas sin P y en presencia de hongos MA fueron similares a los observados en las plantas crecidas con P y en ausencia de hongos MA. Esto indica que no solo se podría asemejar el rol de los hongos MA en la producción de biomasa de *L. tenuis* con el efecto de la dosis de P aplicada, sino que además ambos factores incrementaron la competencia entre la leguminosa y la gramínea y alcanzaron el mismo valor de RNE. Incluso, al igual que en la producción de biomasa de *L. tenuis* en cultivo puro, se observó también un efecto sinérgico entre la fertilización fosforada y los hongos MA en el incremento de la competencia con *S. arundinaceus* ya que las plantas de *L. tenuis* crecidas ante fertilización fosforada y hongos MA mostraron el valor más elevado de RNE del crecimiento.

Los resultados del presente ensayo mostraron que tanto el agregado de fertilizante fosforado como la presencia de hongos MA incrementaron la interacción de competencia de *L. tenuis* (valores de RNE del crecimiento y absorción de P positivos) y se mantuvieron constantes en la interacción de facilitación de *S. arundinaceus* (valores de RNE negativos). Estos resultados

indican que ambos factores incrementaron la nutrición fosforada y el crecimiento de *L. tenuis* y por lo tanto incrementaron la presión competitiva entre ambas especies.

Schedonorus arundinaceus en consociación con *L. tenuis* mostró interacciones de facilitación independientemente de la fertilización fosforada y la presencia de hongos MA, asociado principalmente a un incremento en la absorción de P. Estos resultados están en concordancia con diferentes autores quienes han reportado un beneficio en el crecimiento de la gramínea debido a la presencia de una leguminosa (Li y col., 2007; Høgh-Jensen y Schjoerring, 2010; Cox y col., 2017; Unger y col., 2021). En particular, Li y col., (2007) reportaron un incremento del crecimiento de plantas de *Zea mays* L. asociado a un aumento de la absorción de P causado por una acidificación de la rizósfera debido a la presencia de *Vicia faba* L. Los resultados del presente capítulo muestran que tanto la fertilización fosforada como la presencia de hongos MA modificaron el balance competitivo entre ambas especies, en favor de la gramínea, pero no se registraron cambios en el pH de la rizósfera entre los diferentes tratamientos. Además están en concordancia con Unger y col., (2021) quienes reportaron que tanto la fertilización fosforada como la simbiosis MA modificaron la competencia entre *L. multiflorum* y *T. subterraneum* en favor de la gramínea, asociado a un incremento de la colonización MA y de los beneficios de dicha simbiosis por parte de la gramínea sostenido por la presencia de la leguminosa. Los resultados del presente capítulo también indican que *S. arundinaceus* fue capaz de crecer mejor en presencia de *L. tenuis*, independientemente de la fertilización fosforada y la presencia de hongos MA, mientras que *L. tenuis* fue capaz de crecer mejor en cultivo puro

ante una dosis baja de fertilizante fosforado y en presencia de los hongos MA. Este ensayo es el primero en dilucidar que el rol de los hongos MA en el crecimiento y absorción de P de *L. tenuis* es similar en cultivo puro que en cultivo consociado con *S. arundinaceus*. La tercera hipótesis no es aceptada.

6.8- Conclusiones

La fertilización fosforada y los hongos MA mejoraron el crecimiento de *L. tenuis* en cultivo puro en mayor medida que en cultivo consociado debido principalmente a una disminución de la habilidad competitiva de la leguminosa en consociación, la cual se asocia con el incremento de la disponibilidad de P en el suelo y la presencia de hongos MA. Mientras que *S. arundinaceus* mejoró el crecimiento en mayor medida en el cultivo consociado que en el cultivo puro, asociado a una mejora en la nutrición fosforada debido a la presencia de la leguminosa.

El cultivo consociado entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* es una mejor alternativa en comparación con ambos cultivos puros ya que permite incrementar la cantidad de biomasa producida en comparación con el cultivo puro de *L. tenuis* y también permite incrementar la calidad del recurso forrajero sin modificar la cantidad producida en comparación que el cultivo puro de *S. arundinaceus*.

El presente ensayo indica que la simbiosis MA puede influenciar marcadamente la co-ocurrencia de diferentes especies, las interacciones planta-planta y en consecuencia podría modificar la biodiversidad de los ecosistemas.

7- Conclusiones

- La presencia de *L. tenuis* en los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado es de suma importancia ya que contribuye a mantener la simbiosis MA y por lo tanto conservar la comunidad de hongos bajo un amplio rango de disponibilidad de P en el suelo (5-30 mgP kg⁻¹) de la Cuenca del Río Salado. Por otro lado, se destaca *P. coloratum* como una especie interesante por su elevada producción de biomasa ante diferentes niveles de P en el suelo y se resalta la importancia de estos estudios, ya que son los primeros que muestran la interacción de *P. coloratum* y *S. arundinaceus* con la comunidad nativa de hongos MA de la Cuenca del Río Salado.

- Para *L. tenuis* fue posible incrementar el rendimiento forrajero y simultáneamente mantener altos niveles de colonización MA en sus raíces bajo el rango de P disponible de 10-20 mgP kg⁻¹, mientras que para las gramíneas estudiadas no fue posible, especialmente para *S. arundinaceus*. Dicho rango de disponibilidad de P en el suelo, el cual corresponde a una dosis baja a moderada de P aplicado, no afecta de manera significativa la infectividad de la comunidad nativa de hongos MA en el suelo. A partir de los hallazgos obtenidos en la presente tesis se plantea como una estrategia factible para la Cuenca del Río Salado la selección de dosis adecuadas que permitan simultáneamente incrementar la producción de biomasa, conservar la infectividad MA y aprovechar los beneficios que la asociación con los hongos MA nativos le confiere a las plantas, lo cual constituye un paso fundamental para obtener sistemas productivos más sustentables.

- Las tres especies forrajeras estudiadas mostraron estrategias diferentes para absorber P ante condiciones limitantes de P. La principal estrategia de *L.*

tenuis es la simbiosis MA, mientras que la de *S. arundinaceus* es la alta capacidad de su sistema radical para explorar el suelo. La estrategia de *P. coloratum* no pudo ser explicada por los cambios en el largo radical específico o la asociación MA, por lo tanto más estudios son necesarios para determinar cuál es la principal estrategia de esta especie.

- La defoliación intensa de plantas vecinas conespecíficas puede mejorar la habilidad competitiva de las plántulas de *L. tenuis* a fin de incrementar o mantener la presencia de esta leguminosa en los pastizales y pasturas de la Cuenca del Río Salado. La competencia por P entre plantas adultas y plántulas de *L. tenuis* mediadas por hongos MA podría ser un factor importante que contribuye a regular el crecimiento de las plántulas ante las condiciones de deficiencia generalizada de P en la Cuenca.

- La interacción interespecífica entre plantas de *L. tenuis* y *S. arundinaceus* fue modificada por la presencia de hongos MA nativos y la fertilización fosforada favoreciendo el desarrollo de la gramínea (especie dominante con mayor habilidad competitiva) y en detrimento de la habilidad competitiva de la leguminosa. El cultivo consociado entre *L. tenuis* y *S. arundinaceus* es una mejor alternativa en comparación con ambos cultivos puros ya que permite incrementar la cantidad de biomasa producida en comparación con el cultivo puro de *L. tenuis* y mejora la calidad del recurso forrajero sin modificar la cantidad producida en comparación con el cultivo puro de *S. arundinaceus*.

- Los estudios realizados en la presente tesis podrían ser un primer paso para promover un manejo más sustentable de los pastizales y pasturas, a través de un enfoque integral que contemple la selección de dosis adecuadas

de P, la intensidad de defoliación y la consociación de especies, que permita lograr un incremento de la producción y calidad de la biomasa junto con la preservación y aprovechamiento de los efectos benéficos de la simbiosis con la comunidad nativa de hongos MA de la Cuenca del Río Salado.

8- Consideraciones finales

Los resultados hallados en la presente tesis contribuyen al conocimiento y entendimiento de la funcionalidad de la simbiosis entre especies forrajeras con diferente metabolismo carbonado y la comunidad nativa de hongos MA de la Cuenca del Río Salado ante fertilización fosforada. Comprender la magnitud con la que los hongos MA contribuyen a la absorción de P y al crecimiento de especies forrajeras y cómo esta simbiosis resulta afectada por la fertilización fosforada y la competencia intra e interespecífica es clave para el diseño de nuevas prácticas de manejo que permitan incrementar la producción de forraje aprovechando los beneficios de la simbiosis MA. Para ello, resulta necesario realizar futuros ensayos a campo que permitan dilucidar si los niveles de P disponible en el suelo que permiten incrementar la producción de forraje y conservar la comunidad de hongos MA hallados en la presente tesis ante condiciones controladas de invernáculo se corresponden con los mismos valores a campo, como así también qué otros factores contribuyen a regular la simbiosis MA tales como la humedad y las características edáficas, diferentes prácticas de manejo, etc.

Futuras investigaciones son necesarias para ampliar el conocimiento acerca de aquellos factores que afectan y regulan la simbiosis MA. Un aspecto importante a estudiar es si todas las especies de hongos MA que se

encuentran presentes en el suelo muestran la misma tolerancia a altos niveles de P disponible a fin de averiguar si las especies de hongos MA que colonizan plantas a bajos niveles de P disponible son las mismas que las colonizan a altos niveles de P disponible, como así también si las especies de hongos MA que colonizan gramíneas son las mismas que colonizan leguminosas. Esto permitiría conocer de qué manera se ve afectada la comunidad de hongos MA de acuerdo a las especies cultivadas y a las dosis de P aplicadas, como así también avanzar en la generación de inóculos específicos que se adapten a cada cultivo y nivel de P disponible en particular a partir de especies nativas de hongos MA.

Otro aspecto importante que resalta la presente tesis es la gran importancia que posee *L. tenuis* respecto al mantenimiento y aprovechamiento de la simbiosis MA ante un amplio rango de P disponible en el suelo, como así también la importancia del cultivo de *P. coloratum* en suelos deficientes en P de la Cuenca del Río Salado. Futuras investigaciones podrían dilucidar el rol de los hongos MA ante otros factores de estrés presentes comúnmente en la región como son la sequía, la inundación, la presencia de salinidad y/o sodicidad sobre el crecimiento de ambas especies. Además sería interesante estudiar si la presencia de *P. coloratum* podría incrementar la tolerancia de la leguminosa a las condiciones de estrés mencionadas, como así también si la presencia de una especie altamente micotrófica como es *L. tenuis* podría incrementar el crecimiento de *P. coloratum*.

9- Bibliografía

- Abbott, L.; Robson, A.; Boer, G. 1984. The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal, *Glomus Fasciculatum*. *New Phytologist* 97:437-446.
- Agnusdei, M.; Castaño, J. 2011. Manejo de pasturas templadas para suelos no agrícolas - Estación Experimental Agropecuaria Balcarce – Jornada Las Flores.
- Akdeniz H, Hosaflioglu I, Koç A, Hossain A, Islam M, Iqbal M, Imtiaz H, Gharib H, El Sabagh A . 2019. Evaluation of herbage yield and nutritive value of eight forage crop species. *Applied Ecology and Environmental Research* 17, 5571-5581.
- Alvarez, R., Gimenez, A., Caffaro, M. M., Pagnanini, F., Recondo, V., Molina, C. D., & Cantet, R. J. (2018). Land use affected nutrient mass with minor impact on stoichiometry ratios in Pampean soils. *Nutrient cycling in agroecosystems*, 110(2), 257-276.
- Alvarez, R., Gangi, D., Caffaro, M., Molina, C., & Berhongaray, G. (2019). Cultivation affected the level of inorganic phosphorus more than the organic pool of the Pampas soils in Argentina. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(7), 1022-1033.
- Amijee, F.; Tinker, P.; Stribley, D. 1989. The development of endomycorrhizal systems. VII. A detailed study of the effects of soil phosphorus on colonization. *New Phytologist* 111: 435-446.
- An, Z-Q; Hendrix, J. 1988. Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia*. 80: 259-261.

- Armando, L.; Carrera, A.; Tomas, M. 2013. Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Ayala-Torales, A. A., Deregibus, V. A., & Moauro, P. R. 1998. Phosphorus absorption capacity of *Lotus corniculatus* and *Festuca arundinacea* during sward establishment. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 41(3), 307-312.
- Bahadur, A., Jin, Z., Long, X., Jiang, S., Zhang, Q., Pan, J., & Feng, H. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi alter plant interspecific interaction under nitrogen fertilization. *European Journal of Soil Biology*, 93, 103094.
- Bañuelos, G.; Beuselinck, P. 2003. Growth of three forage species in saline conditions. *Arid Land Research Management* 17: 13–22.
- Bardin, S., Dan, S., Osteras, M., & Finan, T. M. 1996. A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 178(15), 4540-4547.
- Barker, S.; Tagu, D.; Delp, G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiologist* 116: 1201-1207.
- Barto, E.; Rilling, M. 2010. Does herbivory really suppress mycorrhiza? A meta-analysis. *Journal of Ecology*, 98, pp. 745–753.
- Batista, W.; Taboada, M.; Lavado, R.; Perelman, S.; León, R. 2005. Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida - Editorial Facultad de Agronomía UBA, Buenos Aires.

- Baylis G. 1975. The Magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In Endomycorrhizas. (Eds FE Sander, B Mosse, PB Tinker) pp 373–389 (Academic Press: London).
- Berta, G.; Fusconi, A.; Trotta, A.; Scannerini, S. 1990. Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root system of *Allium porrum* L. *New Phytologist* 114, 207–215.
- Berta, G.; Tagliasacchi, A.M.; Fusconi, A.; Gerlero, D.; Trotta, A.; Scannerini, S. 1991. The mitotic cycle in root apical meristems of *Allium porrum* L. is controlled by the endomycorrhizal fungus *Glomus* sp. strain E3. *Protoplasma* 161, 12–16.
- Biró B, Köves-Péchy K, Vörös I, Takács T, Eggenberger P, Strasser R. 2000. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Applied Soil Ecology* 15, 159-168.
- Blanke, V.; Bassin, S.; Volk, M.; Fuhrer, J. 2012. Nitrogen deposition effects on subalpine grassland: The role of nutrient limitations and changes in mycorrhizal abundance. Elsevier, Volume 45, November, Pages 57–65.
- Blaszkowski, J. 2010. AMF site. <http://www.agro.ar.szczecin.pl/jblaszkowski/>.
- Blumenthal, M. J., & McGraw, R. L. 1999. *Lotus* adaptation, use, and management. *Trefoil: The Science and Technology of the Lotus*, 28, 97-119.
- Bray, R.; Kurtz, L. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59: 39-45.

- Bremner, J.; Mulvaney, C. 1982. Nitrogen Total. En: *Methods in Soil Analysis: Agronomy*. Black CA (ed.). - American Society of Agronomy. Inc. Madison, Wisconsin, USA, pp. 595-624.
- Brundrett, M. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants - Tansley review no. 134. *New Phytologist*, 154: 275–304.
- Bünemann, E. K., Oberson, A., Liebisch, F., Keller, F., Annaheim, K. E., Huguenin-Elie, O., & Frossard, E. 2012. Rapid microbial phosphorus immobilization dominates gross phosphorus fluxes in a grassland soil with low inorganic phosphorus availability. *Soil Biology and Biochemistry*, 51, 84-95.
- Burkart, S.; Garbulsky, M.; Ghersa, C.; Guerschman, J. P.; León, R.; Oesterheld, M.; Paruelo, J.; Perelman, S. 2005. Las comunidades potenciales del pastizal pampeano bonaerense. La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas: Un homenaje a Rolando León.
- Cahill, J.; Casper, B. 2000. Investigating the relationship between neighbor root biomass and belowground competition: field evidence for symmetric competition belowground. *Oikos*, 90: 311-320.
- Callaway, R. M., & Walker, L. R. 1997. Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology*, 78(7), 1958-1965.
- Campestre, M. P., Antonelli, C. J., Bailleres, M. A., Maguire, V. G., Taboada, M. A., & Ruiz, O. A. 2021. Biological Nitrogen Fixation, Carbon assimilation and plant performance of *Lotus tenuis*, contribute to define a strategic role in the lowlands in the Salado River Basin (Argentina).

- Caradus, J. R. 1980. Distinguishing between grass and legume species for efficiency of phosphorus use. *New Zealand Journal of Agricultural Research* p23:1, 75-81.
- Cauhépé, M. 2004. Does *Lotus glaber* improve beef production at the Flooding Pampas?. *Lotus Newsletter* 34: 38–43.
- Cavagnaro, T. R., Smith, F. A., Ayling, S. M., & Smith, S. E. (2003). Growth and phosphorus nutrition of a Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 157(1), 127-134.
- Cavagnaro, R.; Oyarzabal, M.; Oesterheld, M.; Grimaldi, A. 2014. Screening of biomass production of cultivated forage grasses in response to mycorrhizal symbiosis under nutritional deficit conditions. *Japanese Society of Grassland Science, Grassland Science*, 60, 178–184.
- Chalk, P.; Souza, R.; Urquiaga, S.; Alves, B.; Boddey, R. 2006. The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. *Soil Biology & Biochemistry* 38 2944–2951.
- Cheeke, T. E., Zheng, C., Koziol, L., Gurholt, C. R., & Bever, J. D. 2019. Sensitivity to AMF species is greater in late-successional than early-successional native or nonnative grassland plants. *Ecology*, 100(12), e02855.
- Choler, P.; Michalet, R.; Callaway, R. 2001. Facilitation and competition on gradients in Alpine plant communities. *Ecology*, Volume 82, Issue 12 December Pages 3295–3308.
- Collantes M, Kade M, Myacszynski C, Santanatoglia O. 1988. Distribución de especies en función de factores edáficos en un pastizal

natural de la Depresión del Río Salado (Provincia de Buenos Aires).
Studia Oecologica 5, 77–93.

- Cornwell W, Bedford B, Chapin C. 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus-poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany* 88, 1824-1829.
- Covacevich, F.; Marino, M.; Echeverría, H. 2006. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass. *European Journal of Soil Biology*, 42:127-138.
- Covacevich, F., & Echeverría, H. E. 2009. Mycorrhizal occurrence and responsiveness of tall fescue and wheatgrass are affected by the source of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *Journal of Plant Interactions*, 4(2), 101-112.
- Cox, S., Peel, M. D., Creech, J. E., Waldron, B. L., Eun, J. S., Zobell, D. R., & Snyder, D. L. 2017. Forage production of grass–legume binary mixtures on intermountain western USA irrigated pastures. *Crop Science*, 57(3), 1742-1753.
- Damario, E.; Pascale, A. 1988. Características Agroclimáticas de la Región Pampeana Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 9(1-2):41—64.
- Daniels, N.; Skipper, H. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. En: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Schenck NC (ed.). American Phytopathology Society. St. Paul, MI, USA, pp. 29-35.

- Danila, F.; Quick, W.; White, R.; Furbank, R.; Von Caemmerer, S. 2016. The Metabolite Pathway between Bundle Sheath and Mesophyll: Quantification of Plasmodesmata in Leaves of C3 and C4 Monocots. American Society of Plant Biologists.
- Di Bella, C. E., García-Parisi, P. A., Lattanzi, F. A., Druille, M., Schnyder, H., & Grimoldi, A. A. 2019. Grass to legume facilitation in saline-sodic steppes: influence of vegetation seasonality and root symbionts. *Plant and Soil*, 443(1-2), 509-523.
- Díaz, P., Borsani, O., & Monza, J. 2005. *Lotus*-related species and their agronomic importance. *Lotus japonicus* handbook, 25-37.
- Druille, M., Cabello, M. N., Omacini, M., & Golluscio, R. A. 2013. Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 64, 99-103.
- Entry, J.; Rygielwicz, P.; Watrud, L.; Donnelly, P. 2002. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. *Ad Environ Res.* 7: 123-138.
- Escudero V, Mendoza R. 2005. Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. *Mycorrhiza* 15, 291-299.
- Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., & Sanjuán, J. 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and environmental microbiology*, 75(4), 1088-1098.

- Fay, P.; Mitchell, D. 1996. Photosynthesis and nutrient-use efficiency of barley in response to low arbuscular mycorrhizal colonization and addition of phosphorus. *Osborne BA New Phytologist*, 132:425-433.
- Ferri, C. M. 2011. The seasonal and inter-annual patterns of biomass accumulation and crude protein in kleingrass (*Panicum coloratum*) in the semiarid Pampean region of Argentina. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 38(2), 191-198.
- Fontanetto, H., Keller, O., & Vivas, H. S. 2006. La fertilización de la alfalfa en el área central de Santa Fe. *Revista técnica de la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa.*, 84-95.
- Fornara, D. A., Flynn, D., & Caruso, T. 2020. Improving phosphorus sustainability in intensively managed grasslands: The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi. *Science of The Total Environment*, 706, 135744.
- Fort F, Cruz P, Catrice O, Delbrut A, Luzarreta M, Stroia C, Jouany C. 2015. Root functional trait syndromes and plasticity drive the ability of grassland Fabaceae to tolerate water and phosphorus shortage. *Environmental and Experimental Botany*, 110, 62-72.
- Frame, J. 1990. Herbage productivity of a range of grass species in association with white clover - *Grass and Forage Science*, 45, 57-64.
- García I, Mendoza R. 2008. Relationships among soil properties, plant nutrition and arbuscular mycorrhizal fungi–plant symbioses in a temperate grassland along hydrologic, saline and sodic gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 359-371.

- García, I.; Mendoza, R. 2012. Impact of defoliation intensities on plant biomass, nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus tenuis* growing in a saline-sodic soil. *Plant Biology*, 14 964–971.
- García, I.; Mendoza, R. 2014. *Lotus tenuis* seedlings subjected to drought or waterlogging in a saline sodic soil. *Environmental Experimental Botany*, 98: 47– 55.
- García, I.; Mendoza, R.; Pomar, M. 2008. Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 304, Issue 1, pp 117– 131.
- García, I.; Mendoza, R.; Pomar, M. 2012. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes under contrasting grazing modes in the Magellanic steppe of Tierra del Fuego. *Elsevier*, 155, Pag. 194– 201.
- García, I.; Depalma, D.; Mendoza, R. 2013. Efecto del estrés hídrico y defoliación sobre la distribución de nutrientes en especies forrajeras creciendo en un suelo halomórficos. *Bol, Soc. Argent. Bot* 48 (Supl.) pág. 187.
- Gehring, C.; Whitham, T. 1994. Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualist of plants. *Elsevier, TREE* vol. 9, no. 7 July.
- Ghannoum, O., & Conroy, J. P. 2007. Phosphorus deficiency inhibits growth in parallel with photosynthesis in a C3 (*Panicum laxum*) but not two C4 (*P. coloratum* and *Cenchrus ciliaris*) grasses. *Functional Plant Biology*, 34(1), 72-81.

- Ginzo, H.; Collantes, M.; Caso, O. 1986. Fertilization of a halophytic grassland in Argentina: Herbage dry matter, botanical composition, and mineral content. *Turrialba*.36:453-459.
- Giovannetti, M.; Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Gosling, P.; Mead, A.; Proctor, M.; Hammond, J.P.; Bending, G.D. 2013. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. *The New Phytologist* 198, 546-556.
- Hall, I. R. 1977. Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. *Trans. Br. MYCO~SO. C.6* 8, 341-56.
- Harley, J.; Smith, S. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Londres 483 pp.
- Hart, M.; Reader, R.; Klironomos, J. 2003. Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology Evolution*, Volumen 18, Pag. 418–423.
- Hartnett, D.; Wilson, G. 2002. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. Volume 94 of the series *Developments in Plant and Soil Sciences* pp 319-331.
- Hasan, M.; Hasan, M.; da Silva, J.; Li, X. 2016. Regulation of phosphorus uptake and utilization: transitioning from current knowledge to practical strategies. *Cellular & molecular biology letters*, 21(1), 7.
- Heredia, Olga Susana. 2016. Capítulo: Fósforo en M. E. Conti (Ed) y L. Giuffré (Ed.). *Edafología, bases y aplicaciones ambientales argentinas*

(2da edición., pp. 387-407). Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

- Hetrick B, Wilson G, Hartnett D (1989) Relationship between mycorrhizal dependence and competitive ability of two tallgrass prairie grasses. *Canadian Journal of Botany* 67, 2608-2615.
- Hetrick, B.; Wilson, G.; Owensby, C. 1990a. Mycorrhizal Influences on Big Bluestem Rhizome Regrowth and Clipping Tolerance. *Journal of Range Management* Vol. 43, No. 4 (Jul., 1990), pp. 286-290.
- Hetrick, B.; Wilson, G.; Todd, T. 1990b. Differential responses of C₃ and C₄ grasses to mycorrhizal symbiosis, phosphorus fertilization, and soil microorganisms. *Canadian Journal of Botany*, 1990, 68(3): 461-467.
- Hetrick B (1991) Mycorrhizas and root architecture. *Experientia* 47, 355-362.
- Hill, J.; Simpson, R.; Ryan, M.; Chapman, D. 2010. Root hair morphology and mycorrhizal colonisation of pasture species in response to phosphorus and nitrogen nutrition. *Crop and Pasture Science* 61, 122-131.
- Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J. & Zhang, F. 2011. P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant physiology*, 156(3), 1078-1086.
- Hoeksema, J.; Bala Chaudhary, V.; Gehring, C.; Johnson, N.; Karst, J.; Koide, R.; Pringle, A.; Zabinski, K.; Bever, J.; Moore, J.; Wilson, G.; Klironomos, J.; Umbanhowar, J. 2010. A meta-analysis of context-

dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13: 394–407.

- Hoeksema, J. D., Bever, J. D., Chakraborty, S., Chaudhary, V. B., Gardes, M., Gehring, C. A. & Lajeunesse, M. J. 2018. Evolutionary history of plant hosts and fungal symbionts predicts the strength of mycorrhizal mutualism. *Communications biology*, 1(1), 1-10.
- Høgh-Jensen, H., & Schjoerring, J. K. 2010. Interactions between nitrogen, phosphorus and potassium determine growth and N₂-fixation in white clover and ryegrass leys. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 87(3), 327-338.
- Höpfner, I. 2015. PhD Tesis: Competition and facilitation among grassland plants-the role of arbuscular mycorrhiza.
- Horton, T.; Van der Heijden, M. 2008. The role of symbioses in seedling establishment and survival. *Seedling Ecology and Evolution*, Chapter 9.
- Ikoyi, I., Fowler, A., & Schmalenberger, A. 2018. One-time phosphate fertilizer application to grassland columns modifies the soil microbiota and limits its role in ecosystem services. *Science of the Total Environment*, 630, 849-858.
- Imaz, J.; Giménez A, D.; Grimoldi C, A.; Striker, G. 2015. Ability to recover overrides the negative effects of flooding on growth of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum*. *Crop & Pasture Science*. Journal compilation _ CSIRO 2015.
- INVAM, International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. <http://www.invam.caf.wvu.edu/>.

- Jackson, M.L. 1964. 'Soil chemical analysis.' (Eds Black CA, Evans DD, White JR, Ensminger GE, Clarck FE) (Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, USA).
- Jacobo, E., Rodríguez, A., González, J., & Golluscio, R. 2016. Efectos de la intensificación ganadera sobre la eficiencia en el uso de la energía fósil y la conservación del pastizal en la cuenca baja del río Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Agriscientia*, 33(1), 1-14.
- Jacobs, M.; Schloeder, C. 2003. Defoliation effects on basal cover and productivity in perennial grasslands. *Plant Ecology* 169: 245–257.
- Jakobsen, I. 1995. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In *Mycorrhiza* (pp. 297-324). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Javot, H., Pumplin, N., & Harrison, M. J. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell & Environment*, 30(3), 310-322.
- Jeffery, R.; Simpson, R.; Lambers, H.; Kidd, D.; Ryan, M. 2017. Root morphology acclimation to phosphorus supply by six cultivars of *Trifolium subterraneum* L. *Plant and Soil* 412, 21-34.
- Jeffery, R. P., Simpson, R. J., Lambers, H., Orchard, S., Kidd, D. R., Haling, R. E., & Ryan, M. H. 2018. Contrasting communities of arbuscule-forming root symbionts change external critical phosphorus requirements of some annual pasture legumes. *Applied Soil Ecology*, 126, 88-97.
- Johnson, N.; Graham, J.; Smith, F. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135, 575-5R5.

- Johnson, N. C. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist*, 185, p 631-647.
- Jouany, C., Cruz, P., Daufresne, T., & Duru, M. 2011. Biological phosphorus cycling in grasslands: interactions with nitrogen. In *Phosphorus in Action* (pp. 275-294). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kade, M., Pagani, E. A., & Mendoza, R. E. 2003. Phosphorus utilization efficiency in populations of narrow-leaf birdsfoot trefoil. *Communications in soil science and plant analysis*, 34(1-2), 271-284.
- Kaschuk, G.; Kuyper, T., Leffelaar, P.; Hungria, M.; Giller, K. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology & Biochemistry*, 41 1233–1244.
- Kirkbride, J. H. 1999. *Lotus* systematic and distribution. In: *Trefoil: The Science and Technology of the Lotus*, ed. P. R. Beuselinck, pp. 1–20. St. Louis, MO: Crop Science Society of America.
- Klironomos, J. N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84(9), 2292-2301.
- Konvalinková, T., Püschel, D., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Jansa, J. 2017. Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. *Plant and Soil*, 419(1-2), 319-333.
- Kytöviita, M. M., Vestberg, M., & Tuomi, J. 2003. A test of mutual aid in common mycorrhizal networks: established vegetation negates benefit in seedlings. *Ecology*, 84(4), 898-906.

- Lambers, H.; Shane, M.W.; Cramer, M.D.; Pearse, S.J.; Veneklaas, E.J. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98, 693-713.
- Lambers, H.; Hayes, P.; Laliberte, E.; Oliveira, R.; Turner, B. 2015. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. *Trends in Plant Science* 20, 83-90.
- Lavado, R.; Rubio, G.; Aleonada, M. 1992. Grazing management and soil salinization in two Pampean Natraqualfs. *Turrialba*. 42: 500-508.
- Li, L., Li, S. M., Sun, J. H., Zhou, L. L., Bao, X. G., Zhang, H. G., & Zhang, F. S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11192-11196.
- Liu, W.; Zhang, Y.; Jiang, S.; Deng, Y.; Christie, P.; Murray, P.; Li, X.; Zhang, J. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots respond differently to phosphorus inputs in an intensively managed calcareous agricultural soil. *Science Research*, 6, 24902.
- Liu, H., Wu, Y., Xu, H., Ai, Z., Zhang, J., Liu, G., & Xue, S. 2021. Mechanistic understanding of interspecific interaction between a C4 grass and a C3 legume via arbuscular mycorrhizal fungi, as influenced by soil phosphorus availability using a ¹³C and ¹⁵N dual-labelled organic patch. *The Plant Journal*, 108(1), 183-196.
- Lugo, M.A.; González Maza, M.E.; Cabello, M.N. 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* 95, 407-415.

- Lynch, J. 2011. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology* 156, 1041-1049.
- Mai, Q. 2013. Interactions between lucerne, rhizobia and mycorrhizas under different levels of N and P in the glasshouse and field. Tesis de Master en Ciencias Agrícolas.
- Mai, W.; Xue, X.; Feng, G.; Yang, R.; Tian, C. 2018. Can optimization of phosphorus input lead to high productivity and high phosphorus use efficiency of cotton through maximization of root/mycorrhizal efficiency in phosphorus acquisition?. *Field Crops Research*, 216, 100-108.
- Marschner, H.; Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159: 89-102.
- McCune, B. 1991. Multivariate analysis on the PC-ORD system. Oregon State University, Corvallis.
- McGonigle, T.; Millar, M.; Evans, D.; Fairchild, G.; Swan, J. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115: 495-501.
- Mendoza, R. E., Cogliatti, D. H., Collantes, M. B., y Kade, M. (1983). Efecto de la fertilización nitrógeno-fosfatada sobre el crecimiento otoño-invernal y la absorción de fósforo en tepes de un pastizal natural. *Turrialba*, 33(3), 311-320.

- Mendoza, R. 1980. Adsorción de fósforo en el suelo y su relación con la producción de dos especies forrajeras. *Revista de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires*, 1: 19-30.
- Mendoza, R. 2001. Phosphorus nutrition and mycorrhizal growth response of broadleaf and narrowleaf birdsfoot trefoils. *Journal of Plant Nutrition* 24, 203-214.
- Mendoza, R.; Bailleres, M.; García, I.; Ruiz, O. 2016a. Phosphorus fertilization of a grass-legume mixture: Effect on plant growth, nutrients acquisition and symbiotic associations with soil microorganisms. *Journal of plant nutrition*, Vol. 39, NO. 5, 691–701.
- Mendoza R, García I, Depalma D, López Fernandez C. 2016b. Competition and growth of a grass-legume mixture fertilized with nitrogen and phosphorus: effect on nutrient acquisition, root morphology and symbiosis with soil microorganisms. *Crop and Pasture Science* 67, 629-640.
- Mendoza, R.; Cogliatti, D.; Collantes, M.; Kade, M. 1983. Efecto de la fertilización nitrógeno-fosfatada sobre el crecimiento otoño-invernal y la absorción de fósforo en tepes de un pastizal natural. *Turrialba* 33: 311-320.
- Mendoza, R.; Escudero, V.; García, I. 2005. Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant and Soil*, 275: 305-315.
- Mendoza, R.; Gigli, S. 1995. Relative effectiveness of phosphate for *Lotus glaber* and *Lotus corniculatus* growth and the effect of added P on

vesicular arbuscular mycorrhizal infection. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 1483-1494.

- Mendoza, R.; Lamas, M.; García, I. 2009. How do soil P tests, plant yield and P acquisition by *Lotus tenuis* plants reflect the availability of added P from different phosphate sources. *Nutrient Cycle Agroecosystems*, 85:17–29.
- Mendoza, R.; Pagani, E. 1997. Influence of phosphorus nutrition on mycorrhizal growth response and morphology of mycorrhizae in *Lotus tenuis*. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 625-639.
- Mendoza, R.; Pagani, E.; Pomar, M. 2000. Variabilidad poblacional de *Lotus glaber* en relación con la absorción de fósforo en suelo. *Ecología Austral*, 10: 3-14.
- Mezeli, M. M., Page, S., George, T. S., Neilson, R., Mead, A., Blackwell, M. S., & Haygarth, P. M. 2020. Using a meta-analysis approach to understand complexity in soil biodiversity and phosphorus acquisition in plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 142, 107695.
- Miñón, D. P., Sevilla, G. H., Montes, L., & Fernández, O. N. 1990. *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. *Boletín técnico*, 98.
- Miranda, J.D.; Harris, P.J. 1994. Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *The New Phytologist*, 128:103-108.
- Muir, J. P.; Pitman, W. D.; Foster, J. L. 2011. Sustainable, low-input, warm-season, grass–legume grassland mixtures: mission (nearly) impossible? *Grass and Forage Science*, 66: 301–315.

- Nyfeler, D.; Huguenin-Elie, O.; Suter, M.; Frossard, E.; Lüscher, A. 2011. Grass–legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 140 155–163.
- Otondo, J.; Borrajo, C.; Bandera, R. 2019. Capítulo 7: Forrajeras templadas y subtropicales en suelos afectados por sales de regiones húmedas y subhúmedas. En: *Suelos afectados por sales con énfasis en Argentina*. (Ed R Bandera). pp. 135-167. (Orientación Gráfica Editora, Argentina).
- Pang, J.; Ryan, M.H.; Tibbett, M.; Cawthray, G.R.; Siddique, K.H.; Bolland, M.D.; Lambers, H. 2010. Variation in morphological and physiological parameters in herbaceous perennial legumes in response to phosphorus supply. *Plant and Soil* 331, 241-255.
- Paz, R. C.; Rocco, R. A.; Reinoso, H.; Menendez, A. B.; Pieckenstein, F.L.; Ruiz, O.A. 2012. Comparative study of alkaline, saline, and mixed saline-alkaline stresses with regard to their effects on growth, nutrient accumulation, and root morphology of *Lotus tenuis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31: 448–459.
- Pérez, M.; Urcelay, C. 2009. Differential growth response to arbuscular mycorrhizal fungi and plant density in two wild plants belonging to contrasting functional types. *Springer*, Volumen 19, pag. 517–523.
- Pesqueira, J. 2016. Biomass production and fertilization response of subtropical forage species grown in Buenos Aires Flooding Pampa.

Revista de Investigaciones Agropecuarias, ISSN-e1669-2314, ISSN 0325-8718, Vol. 42, N° 1.

- Petigrosso, L. R., García, M., Vignolio, O., Salvat, A. E., Cristos, D. S., & Castaño, J. A. 2020. Plant interactions and ergovaline concentration in mixture of *Lotus tenuis* and *Schedonorus arundinaceus* infected with the fungus *Epichloë coenophiala*. Asociación Argentina de Ecología.
- Petruzzi, H.; Stritzler, N.; Adema, E.; Ferri, C.; Pagella, J. 2003. Mijo Perenne - *Panicum coloratum*. - Sitio Argentino de Producción Animal. E.E.A. Anguil- INTA. CC 11. 6326- ANGUIL (La Pampa). Fac. de Agronomía. UNLPam. C.C. 300. 6300- SANTA ROSA (L:P).
- Phillips, J.; Hayman, D. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions British Mycological Society, 55: 158-161.
- Pietikäinen, A.; Kytöviita, M. 2007. Defoliation changes mycorrhizal benefit and competitive interactions between seedlings and adult plants. Journal of Ecology, Volume 95, Issue 4 July Pages 639–647.
- Pittaro, G.; Caceres, L.; Bruno, C.; Tomás, A.; Bustos, D.; Monteoliva, M.; Ortega, L.; Taleisnik, E. 2015. Salt tolerance variability among stress-selected *Panicum coloratum* cv. Klein plants. Grass and Forage Science.
- Plenchette, C., Perrin, R., & Duvert, P. 1989. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. Canadian Journal of Botany, 67(1), 112-115.

- Porter, W. M. 1979. The 'Most Probable Number' method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Soil Research*, 17(3), 515-519.
- Powell, C. L. (1980). Mycorrhizal infectivity of eroded soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 12(3), 247-250.
- Quinos, P. M., Insausti, P., & Soriano, A. 1998. Facilitative effect of *Lotus tenuis* on *Paspalum dilatatum* in a lowland grassland of Argentina. *Oecologia*, 114(3), 427-431.
- Raj, H.; Sharma, S. 2008. Integration of soil solarization and chemical sterilization with beneficial microorganisms for the control of white root rot and growth of nursery apple. Elsevier B.V, pag. 6.
- Read, D.; Koucheki, H.; Hodgson, J. 1976. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. *New Phytologist*, Volume 77, Issue 3, November 1976, Pages 641–653.
- Rearte, D. 2007. Distribución territorial de la ganadería vacuna. Programa Nacional Carnes-INTA.
- Refi, R. O., & Escuder, C. J. 1998. Nitrogen fixation by *Trifolium repens* and *Lotus tenuis*-based pastures in the Flooding Pampa, Argentina. *Agronomie*, 18(4), 285-297.
- Reinhart, K. O., Wilson, G. W., & Rinella, M. J. 2012. Predicting plant responses to mycorrhizae: integrating evolutionary history and plant traits. *Ecology Letters*, 15(7), 689-695
- Remy, W.; Taylor, T.; Hass, H.; Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91, pp. 11841-11843, December, *Plant Biology*.

- Řezáčová, V., Slavíková, R., Zemková, L., Konvalinková, T., Procházková, V., Šťovíček, V. & Gryndler, M. 2018. Mycorrhizal symbiosis induces plant carbon reallocation differently in C3 and C4 *Panicum* grasses. *Plant and soil*, 425(1-2), 441-456.
- Richter, M.; Von Wistinghausen, E. 1981. Unterscheidbarkeit von humusfraktionen in boden bei unterschiedlicher bewirtschaftung. - *Z Pflanzenernaehrung Bodenkd.* 144: 395-406.
- Rilling, M.; Mummey, D. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171(1):41 - 53.
- Rodríguez, A. M., Jacobo, E. J., Scardaoni, P., & Deregibus, V. A. 2007. Effect of phosphate fertilization on Flooding Pampa grasslands (Argentina). *Rangeland Ecology & Management*, 60(5), 471-478.
- Rossi, C. 2005. Mejoramiento de la Condición Forrajera en Bajos Alcalino-Sódicos con Especies Subtropicales en la Cuenca del Salado. Informe resultado de proyecto, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Lomas de Zamora.
- Rosso, O.; Gómez, P. 1995. Selectividad de novillos en una pastura de agropiro y *Lotus tenuis*. *Revista Argentina de Producción Animal*. 15: 364-366.
- Rubio, G.; Gutierrez Boem, F. H.; Lavado, R. S. 2010. Responses of C3 and C4 grasses to application of nitrogen and phosphorus fertilizer at two dates in the spring. *Grass and Forage Science*, 65: 102–109.
- Ruiz-Lozano, J.; Azcon, R.; Gomez, M. 1996. Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. *Physiologia Plantarum* 98, 767-772.

- Sanallah, M., Usman, M., Wakeel, A., Cheema, S. A., Ashraf, I., & Farooq, M. 2020. Terrestrial ecosystem functioning affected by agricultural management systems: A review. *Soil and Tillage Research*, 196, 104464.
- Sanchez, J. M., Vendramini, J. M., Silveira, M. L., Sollenberger, L. E., Dubeux Jr, J. C., Moriel, P. & Leite de Oliveira, F. C. 2019. Seeding strategies of bahiagrass and pinto peanut affect pasture establishment under weed competition. *Grass and Forage Science*, 74(3), 381-388.
- Sannazzaro, A.; Ruiz, O.; Albertó, E.; Menéndez, A. 2006. Alleviation of salt stress in *Lotus glaber* by *Glomus intraradices*. *Plant Soil*. 285: 279-287.
- Scheneiter, J.; Kaufmann, I.; Ferreira, A.; Llorente, R. 2015. The herbage productivity of tall fescue in the Pampas region of Argentina is correlated to its ecological niche. *Grass and Forage Science Early View*, Version of Record online: 6 AUG.
- Schenk, N.; Pérez, Y. 1990. Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. Synergistic Publications, Gainesville, FL, USA.
- Schroeder, M.; Janos, D. 2004. Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 264: 335–348.
- Schübler, A.; Schwarzott, D.; Walker, C. 2001. *Glomus*, the Largest Genus of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales), Is Nonmonophyletic - *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 21, No. 2, November, pp. 190–197.

- Scullion, J., Eason, W. R., & Scott, E. P. 1998. The effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi from high input conventional and organic grassland and grass-arable rotations. *Plant and Soil*, 204(2), 243-254.
- Sikes, S.; Cottenie, K.; Klironomos, J. 2009. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Ecology*, 97, 1274–1280.
- Skinner, R. H. 2005. Emergence and survival of pasture species sown in monocultures or mixtures. *Agronomy Journal*, 97(3), 799-805.
- Smith, S.; Smith, F. 1990. Structure and function of interface in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transfer. *New Phytologist*, 114: 1-38.
- Smith, S.; Facelli, E.; Pope, S. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas - *Plant and Soil*, 326:3–20.
- Smith, S. E.; Jakobsen, I.; Gronlund, M.; Smith, A. F. 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implication for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology*, Vol. 156, pp. 1050-1057.
- Smith, S.; Read, D. 2008. Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhiza. pp. 42-90. *Mycorrhyzal*. 3rd ed. Elsevier, London.
- Striker, G.; Insausti, P.; Grimoldi, A.; Ploschuk, E.; Vasellati, V. 2005. Root strength and trampling tolerance in the grass *Paspalum dilatatum* and the dicot *Lotus glaber* in flooded soil. *Plant and Soil*, 276: 301-311.

- Tawaraya, K. 2003. Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(5), 655-668.
- Tawaraya, K., Saito, C., Morioka, M., & Wagatsuma, T. 1996. Effect of concentration of phosphate on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall. *Soil science and plant nutrition*, 42(3), 667-671.
- Temperton, V.M.; Mwangi, P.N.; Scherer-Lorenzen, M.; Schmid, B.; Buchmann, N. 2007. Positive interactions between nitrogen-fixing legumes and four different neighbouring species in a biodiversity experiment. *Oecologia*, 151, 190–205.
- Tîtei, V., Blaj, V. A., & Marusca, T. 2019. The productivity and the quality of green mass and hay from romanian cultivars of *Festuca arundinacea*, grown in the Republic of Moldova. *Journal of Plant Development*, 26, 189.
- Thompson, J. P. 1987. Decline of vesicular-arbuscular mycorrhizae in long fallow disorder of field crops and its expression in phosphorus deficiency of sunflower. *Australian Journal of Agricultural Research*, 38(5), 847-867.
- Unger, S., Habermann, F. M., Schenke, K., & Jongen, M. 2021. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Nutrition Determine the Outcome of Competition Between *Lolium multiflorum* and *Trifolium subterraneum*. *Frontiers in plant science*, 3008.
- Van der Heijden, M.; Bruin, S.; Luckerhoff, L.; Van Logtestijn, R.; Schlaeppi, K. 2015. A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. *The*

ISME Journal, 1–11 - International Society for Microbial Ecology All rights reserved 1751-7362/15.

- Van Der Heijden, M.; Horton, T. 2009. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology*, Volume 97, Issue 6, November, Pages 1139–1150.
- Van Der Heijden, M.; Wiemken, A., Sanders, I. 2003. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytologist*, Volume 157, Issue 3, March Pages 569–578.
- Vazquez, P., Cabria, F. N., Rojas, M. D. C., & Calandroni, M. B. 2009. Riesgo de anegamiento: estimaciones para la cuenca baja del río Salado. *Ciencia del Suelo*, 27(2).
- Vecchio, M. C.; Bolaños, V.; Golluscio, R.; Rodríguez, A. 2019. Rotacional grazing and exclosure improves grassland condition of the halophytic steppe in Flooding Pampa (Argentina) compared with continuous grazing. *The Rangeland Journal*, 41, 1-12.
- Vignolio, O. R., Maceira, N. O., & Fernández, O. N. 1995. Efectos del anegamiento sobre el poder germinativo de las semillas de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. Implicancias para su propagación diferencial en la Depresión del Salado (Buenos Aires, Argentina). *Ecología Austral*, 5(2), 157-163.
- Vignolio, O.; Fernandez, O.; Maceira, N. 1999. Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill (Syn. *Lotus tenuis* Waldst. et. Kit.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 555-559.

- Vignolio, O. R., & Fernández, O. A. 2006. Bioecología de *Lotus glaber* mill.[Fabaceae] en la pampa deprimida [provincia de Buenos Aires, Argentina]. *Revista argentina de producción animal.*, 26(2).
- Vignolio, O. R., Cambareri, G. S., & Maceira, N. O. 2010. *Lotus tenuis* (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. *Revista Argentina de Producción Animal*, 30(1), 97-116.
- Vignolio, O. R., Cambareri, G. S., Petigrosso, L. R., Murillo, N., & Maceira, N. O. 2016. Reproductive development of *Lotus tenuis* (Fabaceae) crop defoliated at different times and intensities. *American Journal of Plant Sciences*, 7(08), 1180.
- Vignolio, O. R., Lafuente, S. M. B., Petigrosso, L. R., & Murillo, N. L. 2018. Resiembra natural de *Lotus tenuis* (Wald et. Kit). Efectos de la defoliación sobre atributos reproductivos. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 117(1), 99-109.
- Walker, J.A.; King, J.R. 2009. Above- and below-ground competition between Kura clover (*Trifolium ambiguum*) and meadow bromegrass (*Bromus biebersteinii*): A greenhouse study. *Canadian Journal of Plant Science* 89, 21-27.
- Wallace, L. 1981. Growth, morphology and gas exchange of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Panicum coloratum* L., a C4 grass species, under different clipping and fertilization regimes. *Oecologia (Berl)* 49 : 272-278.
- Wallace, L.; McNaughton, S.; Coughenour, M. 1982. The Effects of Clipping and Fertilization on Nitrogen Nutrition and Allocation by Mycorrhizal and Nonmycorrhizal *Panicum coloratum* L., a C4 Grass. *Oecologia (Berl)* 54:68 71.

- Wang, Y., & Lambers, H. 2019. Root-released organic anions in response to low phosphorus availability: recent progress, challenges and future perspectives. *Plant and Soil*, 1-22.
- Wilson, G.; Hartnett, D. 1997. Effects of mycorrhizae on plant growth and dynamics in experimental tallgrass prairie microcosms. *American Journal of Botany* 84, 478-482.
- Wilson, G. W., & Hartnett, D. C. 1998. Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American journal of botany*, 85(12), 1732-1738