

Solicitud de concesión de ayudas a la

Convocatoria de ayuda a proyectos de investigación liderados por jóvenes investigadores

1. Datos de identificación.

Título de la propuesta	“Consecuencias de la diversidad específica vegetal en el mutualismo áfido-hormiga y en la estructura de la comunidad de artrópodos”	
Nombre y apellidos del solicitante	XO AQUÍN MOREIRA TOMÉ	
Datos de contacto: e-mail y teléfono	xmoreira@mbg.cesga.es	
Departamento/Instituto/Grupo de Investigación/Otros	Misión Biológica de Galicia-CSIC (Departamento de Genética Forestal)	
Dirección, código postal, provincia	C/ Carballeira (Salcedo), 8 36143 Pontevedra	

2. Memoria Técnica. Actividades y resultados de investigación

2.1. Introducción (Planteamiento, objetivos y justificación)

Las consecuencias ecológicas de la diversidad de especies vegetales en la estructura de las comunidades con las que interactúan y en las funciones del ecosistema ha sido un tema ampliamente estudiado durante los últimos años (Tilman et al. 1997; Tilman 1999; Cardinale et al. 2007; Haddad et al. 2009; Hector et al. 2010; Haddad et al. 2011). Dos décadas de investigación han demostrado que, de forma general, una mayor biodiversidad vegetal incrementa la producción primaria neta (Isbell et al. 2009; Hector et al. 2010), estabiliza la comunidad multitrófica de artrópodos que interactúa con las plantas (Haddad et al. 2009; Cook-Patton et al. 2011; Haddad et al. 2011) e incluso incrementa la resistencia a las invasiones biológicas (Levine 2000). En particular, una mayor diversidad de especies vegetales se ha asociado a una mayor diversidad y abundancia de las poblaciones y comunidades de artrópodos que interactúan con las plantas (Haddad et al. 2009, Cook-Patton et al. 2011, Haddad et al. 2011). Actualmente, existen dos teorías ecológicas, no excluyentes, para explicar las consecuencias ecológicas de la diversidad vegetal sobre la comunidad multitrófica de artrópodos que soportan las plantas. En primer lugar la ‘*Resource Specialization Hypothesis*’ argumenta que al aumentar la biodiversidad vegetal se incrementa la diversidad de recursos, atrayendo a una mayor diversidad de artrópodos (Keddy 1984;

Hurlbert 2004). Alternativamente, la '*More Individuals Hypothesis*' argumenta que el aumento de la abundancia y diversidad de artrópodos en asociaciones más diversas se debe a un efecto indirecto asociado a la mayor productividad de éstas (Srivastava y Lawton 1998).

La mayoría de los estudios previos sobre los efectos de la diversidad vegetal en la comunidad de artrópodos se han centrado casi exclusivamente en investigar cuales eran las consecuencias de una mayor o menor diversidad vegetal sobre el primer escalón de la cadena trófica: los herbívoros (e.g. Ninkovic et al. 2011; Utsumi et al. 2011). Sin embargo, Crutsinger et al. (2006) y Haddad et al. (2011) ampliaron recientemente el espectro de posibilidades al descubrir que la diversidad vegetal también podría afectar directa o indirectamente al tercer nivel trófico. En particular, estos autores observaron que la abundancia y la riqueza de los predadores de los herbívoros incrementaban al aumentar tanto la diversidad de especies herbáceas (Haddad et al. 2011) como la diversidad de genotipos de *Solidago altissima* (Crutsinger et al. 2006). Estos descubrimientos abrieron nuevas puertas y, especialmente, aportaron una nueva visión multitrófica para el estudio de los efectos de la diversidad vegetal en las comunidades de artrópodos que interactúan con las plantas. Además de los predadores de los herbívoros, otros componentes del tercer escalón de la cadena trófica que tienen una gran importancia en los ecosistemas, y de los que todavía se desconoce los efectos de la biodiversidad sobre ellos, son los mutualistas de los herbívoros. En este sentido, uno de los modelos más estudiados en ecología evolutiva es el mutualismo que establecen algunos áfidos con las hormigas (Stadler y Dixon 2005; Styrsky y Eubanks 2007). Las hormigas se alimentan del fluido azucarado que generan los áfidos en su digestión, y éstos a cambio reciben protección contra sus predadores y parasitoides.

Los mecanismos por los cuales las plantas, y en especial la diversidad vegetal, podrían afectar directa o indirectamente a las interacciones entre niveles superiores de la cadena trófica (es decir herbívoro-mutualista y herbívoro-predador) podrían ser de tres tipos (Mooney y Singer 2012). Por un lado podrían tratarse de efectos indirectos mediados por la densidad de herbívoros, donde la diversidad afecta directamente a la densidad de herbívoros y ésta regula la abundancia de mutualistas y predadores (ver flechas A en la figura 1). En este caso no son esperables cambios numéricos en la proporción herbívoros/mutualistas y herbívoros/predadores. Alternativamente, la diversidad vegetal podría afectar a las interacciones entre niveles superiores de la cadena trófica a través de efectos indirectos mediados por ciertos rasgos de los herbívoros que se modifican al variar la diversidad vegetal, como por ejemplo la susceptibilidad a los predadores o la producción de sustancias para los mutualistas (ver flechas A en la figura 1). En este caso sí que deberían existir cambios numéricos en la proporción herbívoros/mutualistas y herbívoros/predadores. Por último, las plantas también podrían afectar directamente a determinados rasgos o a la densidad de los predadores/mutualistas (ver flechas B en la figura 1; Mooney y Singer 2012) y sólo indirectamente a los herbívoros. A pesar de los recientes avances en el estudio de las consecuencias ecológicas de la biodiversidad vegetal en la dinámica de funcionamiento de las cadenas tróficas, hasta la fecha se desconoce cuales son los mecanismos por los

cuales la biodiversidad vegetal afecta a las interacciones entre distintos componentes de la comunidad, por ejemplo las interacciones herbívoro-predador y herbívoro-mutualista.

Los objetivos de este estudio fueron investigar (1) los efectos de la diversidad específica vegetal dentro del género *Pinus* en la comunidad multitrófica de artrópodos (áfidos, hormigas mutualistas de los áfidos y predadores de los áfidos) y (2) los mecanismos por los cuales la diversidad específica podría afectar a las interacciones entre distintos niveles de la cadena trófica, es decir herbívoro-mutualista y herbívoro-predador.

2.2. Descripción de la ejecución- Metodología

Área de estudio y especies vegetales

Para testar los objetivos de este estudio se llevó a cabo un experimento de campo en una parcela situada en Pontevedra (Galicia, 42,26° N 8,39° O) donde se comprobó la presencia de hormigas (*Lasius* spp.) y áfidos (*Cinara* spp.) de forma natural en los pinares próximos. El clima en esta zona es atlántico con una precipitación anual cercana a 1.600 mm y una temperatura media anual de 15,4°C. Se emplearon cuatro especies diferentes de pinos en estado juvenil que conviven de forma natural en los bosques atlánticos: *Pinus pinaster* Ait., *P. radiata* D. Don., *P. pinea* L. y *P. sylvestris* L. Todas las plantas fueron adquiridas en un vivero local (Viveros Norfor, Pontevedra). Los pinos crecen muy juntos en el regenerado y durante su etapa juvenil son especialmente vulnerables a los daños causados por la herbivoría (e.g. Zas et al. 2006) que afecta tanto a la supervivencia como a la competencia entre las especies en el regenerado. Aunque hasta la fecha no existen muchos estudios al respecto tenemos cada vez más evidencias de que las hormigas pueden ser mutualistas de los pinos, reduciendo el impacto generado por los herbívoros (Manak et al. 2012).

Diseño experimental

En la primavera de 2011 plantamos pinos de 6 meses de edad en el campo manipulando tanto la accesibilidad de hormigas (ausencia/presencia) como la diversidad específica. Utilizamos tres tratamientos de diversidad con tres combinaciones diferentes de cada uno (ver el esquema representado en la figura 2): (1) monocultivos de tres especies de pinos, (2) todos los posibles dicultivos resultantes de la combinación de esas tres especies (3 combinaciones), (3) tricultivos producto de mezclar las cuatro especies de pino estudiadas (3 combinaciones). Cada tratamiento experimental (llamado combinación) consistió de seis plantas en dos líneas paralelas de tres (Figura 2). Las plantas dentro de cada combinación estaban separadas por 10 cm, y las combinaciones entre sí por 1 m. Dos días después de realizar la plantación, medimos la altura total de cada una de las plantas y aplicamos el tratamiento de exclusión de hormigas (Mooney 2006; Mooney 2007) a la mitad de las plantas colocando una cinta alrededor del tallo impregnada de pegamento (Tanglefoot®, Tanglefoot Company, Michigan, USA). En las plantas control también se colocó una cinta alrededor del tallo pero sin pegamento para

permitir el acceso de las hormigas (plantas control). El diseño experimental consistió en un *split-plot* replicado en cuatro bloques, con el tratamiento de hormigas (dos niveles: presencia o ausencia) como factor principal (*whole factor*), y los tres tratamientos de diversidad específica como factor secundario (*split factor*), con tres combinaciones diferentes de cada tratamiento de diversidad para un total de nueve combinaciones por bloque. El total de plantas fue 432, correspondientes a 4 bloques \times 2 tratamientos de hormigas \times 3 tratamientos de diversidad específica \times 3 combinaciones de cada tratamiento de diversidad \times 6 plantas en cada combinación.

Mediciones

A finales de agosto, aproximadamente 4 meses después de establecer la parcela de estudio, censamos el número de artrópodos clasificándolos como: áfidos atendidos por hormigas (en su mayoría *Cinara maritima*, Figura 3a), hormigas mutualistas (*Lasius grandis*, Figura 3a), predadores de los áfidos (en su mayoría arañas y escarabajos) y herbívoros no mutualistas (mayormente chupadores de floema), aunque estos últimos fueron poco abundantes. Inmediatamente después de realizar el censo de artrópodos medimos la altura total de todas las plantas, las cosechamos y las transportamos al laboratorio para evaluar la biomasa aérea total.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos de artrópodos fue llevado a cabo mediante modelos lineales mixtos generalizados, usando el procedimiento Glimmix del paquete estadístico SAS (SAS 9.2 System, SAS, Cary, NC). Los efectos principales de los tratamientos de hormigas, de los tratamientos de diversidad y la interacción entre ambos fueron tratados como factores fijos. El efecto de las diferentes combinaciones anidadas dentro de los tratamientos de diversidad así como la interacción entre la combinación y el tratamiento de hormigas fueron también considerados como factores fijos. Incluyendo las diferentes combinaciones de cada tratamiento de diversidad en el modelo estadístico eliminamos la posible variación que generaría cada especie particular dentro de cada combinación. El efecto del bloque y la interacción entre el bloque y el tratamiento de hormigas fueron considerados como factores aleatorios con el fin de analizar los efectos principales del diseño *split-plot* con los términos de error adecuados (Littell et al. 2006). Para eliminar los efectos asociados a las diferencias de tamaño entre las distintas especies de pino también incluimos la altura final como covariable en el análisis de la abundancia de artrópodos.

2.3. Resultados obtenidos (cumplimiento de objetivos)

Cuatro meses después de establecer la plantación censamos 1.440 artrópodos de los cuales un 39% fueron áfidos, un 44% hormigas, un 15% predadores de los áfidos y un 2% herbívoros no mutualistas.

La diversidad específica incrementó significativamente la abundancia de áfidos ($F_{2,47} = 25,96$; $P < 0,001$; Figura 3b). La abundancia de áfidos fue dos y tres veces mayor en los dicultivos y tricultivos que en los monocultivos, respectivamente (Figura 3b). Sin embargo, el incremento en la abundancia de áfidos en los tratamientos más diversos solamente fue significativo en las plantas control (con hormigas) (Figura 3b). Este resultado indica que el efecto positivo de la diversidad de especies vegetales sobre los áfidos está determinado por las interacciones mutualistas áfido-hormiga.

La diversidad específica incrementó significativamente la abundancia de hormigas ($F_{2,23} = 19,13$; $P < 0,001$; Figura 4a), siendo el número de hormigas dos y tres veces mayor en los dicultivos y tricultivos que en los monocultivos, respectivamente (Figura 4a). Interesantemente, la diversidad específica también incrementó significativamente el número de hormigas por áfido ($F_{2,23} = 5,46$; $P = 0,011$; Figura 4b). Estos resultados demuestran que el efecto de la diversidad sobre las hormigas mutualistas fue un efecto indirecto mediado por cambios en determinados rasgos de los áfidos, y no solamente por cambios en la densidad de áfidos.

Los tratamientos de diversidad específica no tuvieron efectos significativos sobre la abundancia de predadores de áfidos ($F_{2,47} = 2,17$; $P = 0,126$; Figura 4c).

En cuanto al efecto de la diversidad vegetal sobre el crecimiento de las plantas, la diversidad específica afectó significativamente al crecimiento de los pinos ($F_{2,47} = 25,59$; $P < 0,001$). Específicamente, los tricultivos y dicultivos de especies de pino incrementaron significativamente la altura final de los pinos con respecto a los monocultivos, aunque este incremento solamente fue significativo en las plantas control (con hormigas, Figura 3c).

2.4. Conclusiones y valoración de la ejecución

Los resultados de este estudio demuestran que la diversidad específica vegetal determina en gran medida la composición de la comunidad de artrópodos que interactúan con las plantas y, además, también modifica las interacciones entre los distintos componentes de esa comunidad multitrófica. En particular, observamos como una mayor diversidad de especies de pino genera un incremento en la abundancia de herbívoros (áfidos), aunque solamente en las plantas con hormigas, y de mutualistas de los herbívoros (hormigas), aunque no de los predadores de los herbívoros. Por lo tanto, el efecto positivo de la diversidad de especies vegetales sobre los áfidos no fue directo sino que fue determinado por las interacciones mutualistas áfido-hormiga. Además, nuestros resultados también sugieren que el efecto positivo de la diversidad de especies de pino sobre el tercer nivel trófico (hormigas mutualistas) fue un efecto indirecto mediado por determinados rasgos de los herbívoros, y no solamente debido al incremento en la abundancia de los herbívoros. Esta interpretación se

basa en el incremento del reclutamiento de hormigas por áfido que se observó en los tratamientos con mayor diversidad de especies.

El efecto positivo de la diversidad vegetal, intra- e inter-específica, sobre la abundancia de herbívoros ha sido frecuentemente observado en investigaciones previas (e.g. Crutsinger et al. 2006; Haddad et al. 2009; Cook-Patton et al. 2011; Haddad et al. 2011; Ninkovic et al. 2011; Utsumi et al. 2011). Varios de estos autores han propuesto diferentes mecanismos para interpretar estos resultados. Por ejemplo, el efecto positivo de la diversidad vegetal sobre el crecimiento de las plantas podría incrementar la calidad y la abundancia de recursos para los herbívoros, modificando con ello su abundancia. Nuestros resultados sólo apoyan en parte esta idea ya que, aunque la altura de los pinos efectivamente fue mayor en el tratamiento de mayor diversidad específica, ese efecto solamente fue positivo en las plantas control (con hormigas). Otra posibilidad es que si la diversidad genera un mayor crecimiento de las plantas esto podría generar a su vez una reducción de las defensas contra los herbívoros (compromisos debido a los costes de producción de las defensas). En este trabajo no encontramos, sin embargo, evidencias de que las plantas creciendo en los tratamientos de diversidad tuviesen un mayor nivel de defensas (ver resultados sobre defensas químicas en Moreira et al. 2012). Una mayor diversidad vegetal podría también incrementar la atracción de los herbívoros hacia una mayor diversidad de compuestos volátiles. En este sentido, Ninkovic et al. (2011), en un estudio en el laboratorio, observaron que escarabajos de la especie *Coccinella septempunctata* eran más atraídos por los compuestos volátiles emitidos por genotipos de cebada mezclados (policultivos) que por los compuestos volátiles emitidos por monocultivos de un solo genotipo. Esta posibilidad no debe descartarse en nuestro caso concreto ya que es sabido que el patrón de emisión de volátiles difiere notablemente entre las distintas especies estudiadas (Moreira et al., en revisión).

Uno de los resultados más notorios de este trabajo fue que la diversidad específica incrementó significativamente el número de hormigas por áfido, lo que sugiere que la biodiversidad vegetal afectó indirectamente a las interacciones entre niveles tróficos superiores (herbívoros-mutualistas) a través de cambio en determinados rasgos de los herbívoros. Tan sólo hemos encontrado un trabajo previo donde se investigue los efectos de la biodiversidad vegetal sobre las interacciones entre el segundo y el tercer nivel de la cadena trófica (Haddad et al. 2009). De acuerdo con nuestros resultados, estos autores observaron como la relación herbívoros/predadores fue 3.1 veces mayor en los tratamientos de mayor diversidad de especies con respecto a los monocultivos (Haddad et al. 2009). Algunas variables de las plantas

como la producción de defensas, azúcares y carbohidratos podrían variar significativamente entre diferentes tratamientos de diversidad por lo que, a su vez, podrían modificar la susceptibilidad o la capacidad de establecer mutualismos de los herbívoros, lo cual a su vez modificaría la estructura del tercer nivel trófico.

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que la diversidad de especies vegetales modifica de manera notable la estructura de la comunidad multitrófica de artrópodos que interactúan con las plantas, modificando además las interacciones que tienen lugar entre los niveles tróficos superiores. Particularmente importante, este estudio demuestra que la composición de la comunidad multitrófica de artrópodos podría estar determinada no sólo por el ambiente y por el genotipo de las plantas tal y como propusieron autores previos (e.g. Whitham et al. 2006) sino también por la biodiversidad de especies.

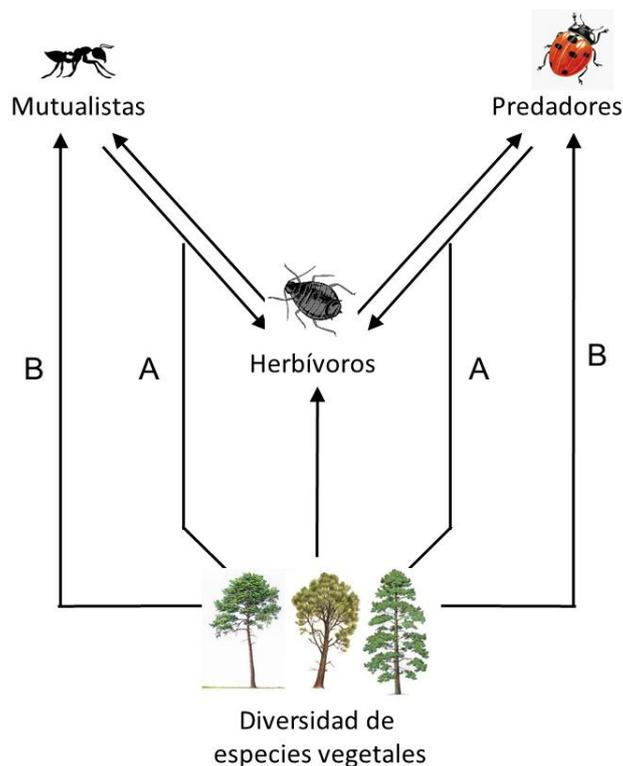


Figura 1. Ejemplo de cadena trófica mostrando los efectos indirectos (flechas A) y directos (flechas B) de la diversidad de especies de pinos sobre el tercer nivel trófico (mutualistas y predadores) mediados por la densidad o rasgos de los herbívoros

DISEÑO EXPERIMENTAL

○ *P. pinaster* ● *P. radiata* ◐ *P. sylvestris* ● *P. pinea*

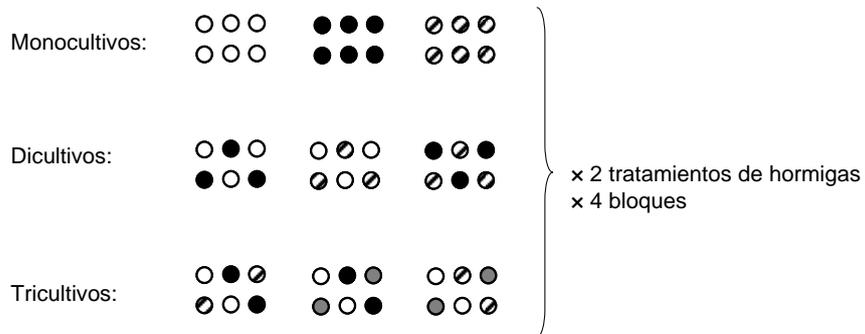


Figura 2. Esquema del diseño experimental de la parcela de estudio. En esta figura se representan los tres tipos de combinaciones de los tres tratamientos de diversidad específica (mono-, di- y tri-cultivos). Cada uno de estos tratamientos de diversidad y combinaciones fueron replicados en 2 tratamientos de hormigas y 4 bloques.

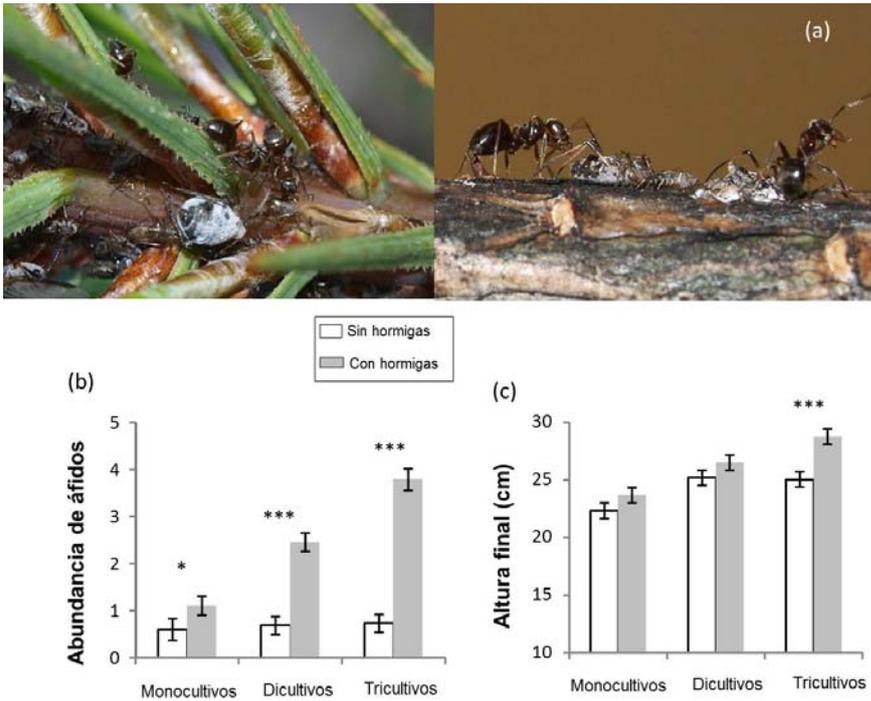


Figura 3. (a) Hormigas mutualistas de la especie *Lassius grandis* atendiendo a áfidos de la especie *Cinara maritima* mientras se alimentan en *Pinus pinaster* (izquierda) y *P. sylvestris* (derecha). Créditos: Luis Sampedro. Efecto de la diversidad específica vegetal (mono-, di- y tri-cultivos) en (b) la abundancia de áfidos (número medio de individuos por planta) y (c) altura final en plantas con exclusión de hormigas (barras blancas) y plantas control con hormigas (barras grises). Las barras muestran las medias \pm error estándar ($N = 72$). Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas (* = $P < 0,05$, *** = $P < 0,001$) entre los tratamientos de presencia/ausencia de hormigas en cada tratamiento de diversidad específica vegetal.

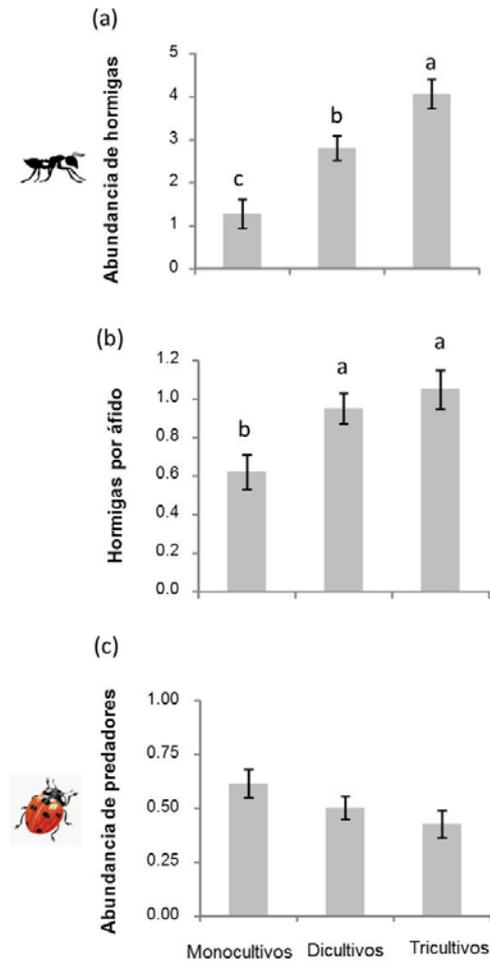


Figura 4. Efecto de la diversidad específica vegetal (mono-, di- y tri-cultivos) en la abundancia (número medio de individuos por planta) de hormigas mutualistas de los áfidos (a), reclutamiento de hormigas por áfido (b) y predadores de los áfidos (c). Las barras muestran las medias \pm error estándar (N = 72 en Fig. 4a y 4b y N = 144 en Fig. 4c). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos de diversidad específica vegetal.

2.5. Publicaciones resultantes

Moreira, X., Mooney, K.A., Zas, R., Sampedro, L. 2012. Bottom-up effects of host-plant species diversity and top-down effects of ants interactively increase plant performance. *Proceedings of the Royal Society B*. [Doi:10.1098/rspb.2012.0893]