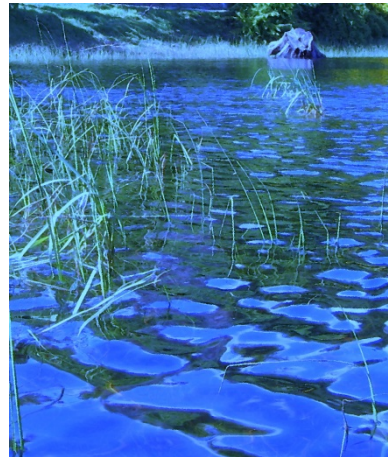
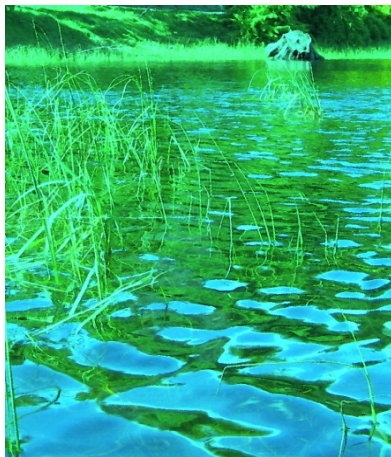
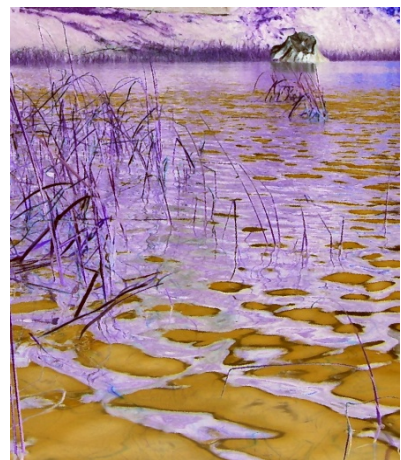
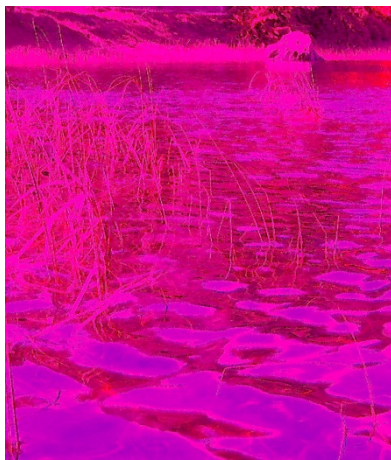




Universidad Nacional del Comahue

Centro Regional Universitario Bariloche

EL PAPEL DE LAS MACRÓFITAS EN LAS RELACIONES ELEMENTALES DE HUMEDALES PATAGÓNICOS.



Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Autor: Licenciada Florencia Cuassolo

Director: Dra. Beatriz Estela Modenutti

Codirector: Dr. Esteban Gabriel Balseiro

Junio 2013

*A Joel, quien
me enseñó a amar la Vida.*

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	v
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I.....	7
RELACIONES ELEMENTALES DE MACRÓFITAS SUMERGIDAS Y ALGAS BÉNTONICAS DE UN MALLÍN CORDILLERANO.....	7
INTRODUCCIÓN.....	7
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
Hipótesis.....	10
Predicciones.....	10
METODOLOGÍA.....	11
Área de estudio.....	11
Estudio de campo.....	11
Procedimientos de laboratorio.....	13
Medición de nutrientes y clorofila.....	13
Preparación de los lixiviados.....	13
Diseño Experimental.....	14
Análisis estadísticos.....	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSION.....	24
CAPITULO II.....	28
MACRÓFITAS NATIVAS Y EXÓTICAS EN UN HUMEDAL PATAGÓNICO: LAS RELACIONES ELEMENTALES Y LOS EFECTOS EN LA ESTEQUIOMETRÍA DEL ECOSISTEMA.....	28
INTRODUCCIÓN.....	28
Objetivo General.....	31
Objetivos Específicos.....	31
Hipótesis.....	32
Predicciones.....	32

MATERIALES Y MÉTODOS	33
Área de estudio	33
Estudio de campo	35
Procedimientos de laboratorio	35
Análisis estadísticos	36
RESULTADOS	38
Las relaciones elementales C:N:P	40
Análisis de Micorrizas	42
Análisis de lixiviados como fuente de MOD	44
DISCUSIÓN	48
CAPITULO III	52
PRODUCCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DISUELTA Y PARTICULADA DE MACROFITAS NATIVAS Y EXÓTICAS EN LA PATAGONIA: EFECTO DE LA RADIACIÓN SOLAR.....	52
INTRODUCCIÓN	52
Objetivo General	54
Objetivos Específicos.....	54
Hipótesis	55
Predicción	55
MATERIALES Y METODOS.....	56
Diseño experimental	56
Procedimientos de laboratorio	58
Análisis estadísticos	58
RESULTADOS	60
Relaciones elementales C:P y C:N en los tejidos de las plantas.....	60
Materia Orgánica Particulada (MOP)	61
Materia Orgánica Disuelta	63
DISCUSION	68
CAPITULO IV	71
LA MATERIA ORGANICA PARTICULADA (DETRITO) DE MACROFITAS (NATIVA Y EXÓTICA) EN UN HUMEDAL ANDINO-PATAGÓNICO: DECAIMIENTO <i>IN SITU</i> Y EFECTOS DE DETRITÍVOROS.	71
INTRODUCCIÓN	71
Objetivo General.....	74

Objetivos Específicos.....	74
Hipótesis	74
Predicciones	74
MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
Diseño experimental	75
Procedimientos.....	77
Análisis estadísticos.....	78
RESULTADOS	79
Tasas de decaimiento (k) y curvas de decaimiento.....	80
Relaciones elementales del material vegetal a lo largo del experimento.....	82
El Detrito Fino (<250 µm)	84
Los macroinvertebrados.....	87
DISCUSIÓN.....	88
CONCLUSIONES FINALES	91
BIBLIOGRAFÍA.....	95

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me acompañaron en este período de formación, especialmente en este último tiempo.

A la Doctora Beatriz Modenutti, mi Directora de Tesis, y al Doctor Esteban Balseiro, mi Co-director; gracias por su tiempo, paciencia, dedicación y esmero por enseñarme y formarme en ciencia. Gracias por transmitirme su conocimiento y amor por la ciencia y la educación.

A los compañeros del lab: Sol, Chili, Marce, Caro, Vero y Nico, gracias por compartir el día a día, por el compañerismo y la mistad, la calidez y calidad humana, por cada momento compartido, de todos y cada uno aprendí mucho.

Agradezco infinitamente a toda mi familia, en especial a mis padres y hermanos por su apoyo y amor incondicional. A mi amado hijo, Lauti, que es mi fuerza y motor en esta Vida.

A Joel por su apoyo y amor incondicional durante todos estos años. No tengo palabras para agradecerte por todo lo que hemos compartido y aprendido juntos. Por tu ayuda, hoy esta Tesis se concreta. Te amamos! Te extrañamos!

A todos los amigos de toda la vida, de acá, de allá, del pasado y del presente, que de una u otra forma nos acompañaron y nos acompañan.

A la Universidad Nacional del Comahue, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura y Doctorado de manera libre y gratuita. Gracias a todos los Profesores que a lo largo de mi carrera han aportado en mi formación académica.

Al decano, Victor Báez por brindarme su apoyo en momentos difíciles y a todo el CRUB, Docentes, No-Docentes, Profesores y compañeros, infinitas gracias a Todos.

A la Administración de Parques Nacionales por otorgarnos el permiso para tomar las muestras.

Este trabajo fue realizado con una beca doctoral de CONICET, y financiado por los siguientes proyectos: FONCyT PICT 2007-1256, PICT 2007-1258, PICT 2011-2240, PICT 2012-1168, UNC B141 y B163.

RESUMEN

En esta Tesis se estudiaron diferentes macrófitas en humedales de Patagonia para comprender su papel en las relaciones elementales, Carbono: Nitrógeno: Fósforo (C:N:P) del humedal. Por ello, nos proponemos evaluar las diferencias en la asignación de nutrientes entre macrófitas sumergidas y emergentes, nativas y exóticas y también de algas bentónicas. Por otra parte, también se analizó la producción de la materia orgánica disuelta y particulada y su interacción con factores abióticos y bióticos.

Los resultados se presentan en cuatro capítulos que tratan los diversos aspectos analizados:

En ambientes acuáticos someros, las macrófitas y las algas filamentosas constituyen una importante fuente para el contenido total de materia orgánica (MO) del ambiente. Los mallines andino-patagónicos son humedales particulares surcados por arroyos internos con una laguna permanente. En el Capítulo I, se llevó a cabo un estudio de campo en el Mallín Los Patos (Cerro Chall-huaco) comparando la composición elemental (C:N:P) de algas bentónicas (*Zygnema* y *Spirogyra*), y de una macrófita sumergida (*Myriophyllum quitense*). Además, se realizaron experimentos de laboratorio para poder estudiar el efecto de las radiaciones ultravioletas (RUV) sobre las propiedades ópticas y liberación de nutrientes de la materia orgánica disuelta (MOD) proveniente de lixiviados de las algas bentónicas y de las macrófitas sumergidas. Los resultados obtenidos indicaron que la macrófita sumergida es más rica en nutrientes que las algas bentónicas. Por otra parte, la macrófita liberó mayor concentración de lixiviados y más ricos en nutrientes que las algas bentónicas. Además debido a su mayor aporte de color y fotoreactividad los lixiviados de *M. quitense* podrían contribuir significativamente a los cambios en las características ópticas del humedal mientras que las algas bentónicas contribuyen con lixiviados de baja fotoreactividad. Finalmente, los nutrientes liberados difieren entre las plantas y la estación del año: los lixiviados de las algas bentónicas liberan más P en primavera, mientras que los lixiviados de *M. quitense* liberaron más P en otoño. Estos resultados sugieren que las diferencias en la colonización por parte de una u otra especie vegetal podrían contribuir diferencialmente con nutrientes al humedal.

Los humedales están sujetos a invasión por especies de plantas exóticas, especialmente durante el período de sequía cuando se asemejan a los sistemas terrestres, así, las plantas terrestres pueden aprovechar esta situación para colonizar nuevos ambientes. En el capítulo II de esta Tesis, nosotros hemos centrado el estudio en

macrófitas palustres en relación con plantas invasoras. Se analizó la invasión por *Potentilla anserina* en un humedal temporario de Patagonia (Laguna Fantasma) en términos de las relaciones elementales que podrían modificar la estequiometría del humedal debido al ingreso de MO proveniente de estas plantas. Se estudiaron las relaciones elementales (C:N:P) de *P. anserina* en comparación con dos macrófitas nativas del humedal, *Eleocharis pachycarpa* y *Carex aematorrhyncha*. Además, se analizó la presencia de hongos micorrízicos en las raíces y la proporción de infección en cada especie. La especie invasora presentó una localización de nutrientes (especialmente P) en las raíces y diferencias en la infección por micorrizas, con una predominancia de las micorrizas del tipo arbusculares, comparado con las macrófitas nativas. Durante los períodos inundados con el decaimiento de las partes aéreas, *P. anserina* almacena P en las raíces y libera MOD de alto peso molecular, de color oscuro, y con una alta relación C: nutrientes en comparación con las macrófitas nativas. Estos resultados muestran la estrategia particular que presenta una planta terrestre invasora de ecosistemas acuáticos temporarios, con menores relaciones C: nutrientes que podría modificar sustancialmente la estequiometría del humedal que coloniza.

En el capítulo III se profundizó el estudio de los impactos que podría ejercer esta invasión en la MO del humedal. Para ello se comparó la producción y calidad de la MOD y materia orgánica particulada (MOP) de dos macrófitas, la nativa *E. pachycarpa* y la exótica *P. anserina*. Se estudió experimentalmente en mesocosmos como los diferentes espectros lumínicos de la radiación solar (RUV, radiación fotosintéticamente activa y oscuridad) afectan la producción y calidad de la MOP y MOD liberada por ambas plantas. Los resultados indican que las plantas difieren en la producción de MOP y liberación de MOD. *Potentilla anserina* libera significativamente mayores cantidades de MOD que *E. pachycarpa*, mientras que la especie nativa genera altas cantidades de MOP. El experimento sugiere que la invasión por *P. anserina* podría impactar en el ciclo del C en estos ecosistemas acuáticos produciendo bajas cantidades de MOP durante la descomposición pero de mejor calidad (bajas relaciones C:P y C:N) que la nativa *E. pachycarpa*. La producción de MOP de calidad superior aunque comparativamente en menores cantidades, podría afectar a los detritívoros del humedal.

En el capítulo IV, se estudió la descomposición de la materia orgánica *in situ* (bolsas de hojarasca) proveniente de las dos macrófitas y en relación con el efecto por parte de los macroinvertebrados detritívoros. Se determinaron las tasas de descomposición, la producción y calidad de la MOP fina y gruesa, en

presencia/ausencia de macroinvertebrados detritívoros (con clausura mediante diferente tamaño de mallas). Las tasas de descomposición difirieron entre ambas especies, siendo significativamente más rápida en la especie exótica y sin clausura para el acceso de macroinvertebrados. *Potentilla anserina* presentó una composición elemental más rica en nutrientes con relaciones C:P y C:N más bajas que la macrófita nativa lo que implica una mejor calidad de alimento para los detritívoros. La mayor abundancia de detritívoros fue registrada en las bolsas con detrito de la especie exótica. Por otro lado, la producción de detrito fino fue mayor en los tratamientos “con clausura” en ambas especies pero considerablemente mayor en la especie nativa aunque la calidad del detrito fue disminuyendo (se incrementaron las relaciones C:N y C:P) a lo largo del tiempo por una mayor lixiviación (observada en el capítulo III). En conclusión, el decaimiento más rápido observado en la especie invasora, implicaría una rápida disponibilidad de nutrientes para otros componentes bióticos del humedal. Por el contrario, el detrito de la nativa *E. pachycarpa*, decae más lentamente y, por lo tanto, retiene por mayor tiempo la materia orgánica y a los nutrientes que se traduciría en un reciclado más lento.

SUMMARY

This Doctoral Thesis analyzed the elemental relationship Carbon: Nitrogen: Phosphorus (C:N:P) of different macrophytes from Patagonia wetlands in order to understand their role in dissolved and particulate organic matter production. We evaluated the differences in nutrient allocation between submerged and emergent, native and exotic macrophytes and also benthonic algae. Finally we analyzed the interaction between dissolved and particulate organic matter and ultraviolet radiation, and biotic factors: mycorrhiza fungi and macroinvertebrates.

The results are presented in four chapters that are centered in the each studied aspect:

In wetlands, macrophytes and filamentous algae constitute an important carbon source for the total content of Organic Matter (OM) of the environment. Mallín wetland meadows are highly diverse and particular habitats in Patagonia that can be characterized as wet meadows with a dense cover mainly dominated by herbaceous plants. The surfaces are crossed by inner streams and can have a permanent pond and the whole system is exposed to changes in the water level. In Chapter I we carried out a field study in Mallín Los Patos (Cerro Chall-huaco), a high altitude wetland, comparing elemental composition (C:N:P) of benthic algae (*Spirogyra* sp and *Zygnema* sp) and the submerged macrophyte (*Myriophyllum quitense*). In addition we performed laboratory experiments in order to study the effect of ultraviolet radiation (UVR) on the optical properties and nutrient release of dissolved organic matter (DOM) from leachates of these benthic algae and submerged macrophyte. The obtained results indicated that macrophyte elemental composition was richer in nutrients than benthic algae. The same trend was found in the leachates, *M. quitense* leachates were produced in higher concentration and richer in nutrient than algae. In addition, the macrophyte leachates could contribute significantly to changes in the optical characteristics of the wetlands while benthic algae contribute with leachates with low photoreactivity. Finally, nutrient release differs among plant species and season: benthic algae leachates release more P in spring, while *M. quitense* releases more of this element in autumn. These results suggested that the different colonization may contribute differentially to the chemical environment of the wetland.

Wetlands are subject to invasion by exotic plant species, especially during the dry season when they resemble terrestrial systems; therefore, terrestrial plants may exploit this situation to colonize this environment. In Chapter II we analyzed *Potentilla*

anserina invading Patagonian wetlands in terms of elemental ratios that would modify wetland stoichiometry due to organic matter inputs. We studied in a temporary pond (Laguna Fantasma) the elemental relationship (C:N:P) of *P. anserina* in comparison with native emergent macrophytes (*Eleocharis pachycarpa* and *Carex aematorrhyncha*). *Potentilla anserina* is an exotic hemicryptophyte species that remains in wetlands as senescent shoots during flooded periods. These plant species are common and dominant in the wetland. Additionally, we analyzed the presence of mycorrhizal fungi in the roots and their proportion of root infection. Our study reveals that the invasive species presented nutrient (especially phosphorus) allocation in roots and differences in mycorrhizal infection, with a predominance of arbuscular mycorrhiza, while native species showed infection of dark septate fungi. During flooded periods with the decay of shoots, *P. anserina* stores phosphorus in the roots and releases dissolved organic matter of high molecular weight, high color, and a high C: nutrient ratio in comparison with native macrophytes. These results show the strategy of an invasive terrestrial plant in temporary aquatic systems, and how the elemental relationships of the invasive plant can modify the stoichiometry of the environment.

In the next Chapter (Chapter III) we studied the impact that this invasion could cause in the wetlands. For this purpose we compared particulate and dissolved organic matter (POM and DOM) production, in a mesocosm experiment, of the native emergent macrophyte *E. pachycarpa* and the exotic *P. anserina*. The objective was to understand how the different light spectra from solar radiation (ultraviolet radiation, photosynthetic active radiation and darkness) affect POM production and DOM quality release of both plants. Results indicated that the plants differed from each other in POM production and DOM release. *Potentilla anserina* released a significantly higher amount of DOM than *E. pachycarpa*, while the native species generated higher amounts of POM. Our experiment suggests that the invasion by *P. anserina* may impact C cycling in these aquatic ecosystems by producing lower amounts of POM during decomposition but of better quality (lower C:P and C:N ratio) than the native *E. pachycarpa*. This production of higher quality POM, albeit in comparatively lower amounts, may indicate more readily available nutrients for detritivores.

The analysis of the decay rate of the different plant species is important for the estimation of nutrient release rate, detritus accumulation in sediments and detritus quality for detritivores. In Chapter IV, we studied in a field experiment (litter bags) the OM decomposition of the two studied emergent macrophytes (Chapter II and III) in

relation with detritivorous macroinvertebrate colonization. We determined the decaying rate and fine and coarse POM production in the presence/absence of detritivorous macroinvertebrates (enclosures with different mesh size). Our results indicated that decomposition rate differed between both species, been more rapid in the exotic *P. anserina* and in the bag without enclosures. In this case the detritus of *P. anserina* presented lower C:P and C:N ratios (more nutrients) than the native species, implying higher quality for detritivores. Accordingly, exotic detritus was colonized by higher abundance of detritivores than the native one. The production of fine POM was observed in the enclosure treatment and in the native species although the detritus quality decreases along the treatment due to leaching (observed in chapter III). In conclusion, the rapid decay observed in the invasive species would imply a rapid nutrient availability for the biotic component of the wetland. On the contrary, the detritus of the native *E. pachycarpa* with low decay rates retained for longer time the OM and nutrients that would imply a slow recycling in the wetland.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las macrófitas juegan un importante papel en la estructuración, metabolismo y regulación de los ambientes acuáticos, en particular en ambientes someros (Meerhoff *et al.*, 2003). En estos lagos someros la vegetación litoral contribuye significativamente a la productividad y puede dominar y regular el metabolismo de todo el ecosistema (Wetzel, 2001). La presencia-ausencia y la distribución de las macrófitas en los humedales o en la zona litoral de los lagos someros es precisamente una de las características usadas para definir a estos ambientes (Wetzel, 2001). Los lagos sin macrófitas son excepcionales, y suelen ser lagos de alta montaña oligotróficos o distróficos (Szczepański, 1977).

Los distintos tipos de macrófitas, ya sean macrófitas emergentes, flotantes o sumergidas, tienen diferencias morfológicas y estructurales entre sí (Wetzel, 2001). Las macrófitas emergentes generalmente son más productivas que las macrófitas sumergidas (Weisner *et al.*, 1994). Por otro lado, las macrófitas sumergidas tienen más algas epífitas (Weisner *et al.*, 1994), por ello contribuyen al asentamiento de una compleja red trófica donde las algas epífitas constituyen una importante fuente de alimento para la micro y macrofauna (Cattaneo *et al.*, 1998; Díaz Villanueva & Trochine, 2005; Bastidas Navarro & Modenutti, 2007). La presencia de macrófitas en la zona litoral proporciona diferentes condiciones con respecto a la zona pelágica, generando una zona bien diferenciada de las aguas abiertas con respecto a la disponibilidad de recursos, a la química del agua, la concentración de oxígeno, el pH y la temperatura (Vitt & Bayley, 1984; Cyr & Downing, 1988b, a; Bastidas Navarro & Modenutti, 2007). En tal sentido, se ha indicado que las macrófitas tienen un importante papel en el modelado de las comunidades acuáticas, generando heterogeneidad espacial, lo cual afecta a la diversidad de especies y la disponibilidad de refugios para el zooplancton (Meerhoff *et al.*, 2006; Bastidas Navarro & Modenutti, 2007; Genkai-Kato, 2007; Trochine *et al.*, 2009).

Por otro lado, el estudio de las macrófitas resultó muy importante para el uso de las mismas en bioremediación de ambientes acuáticos degradados (Osmolovskaya & Kurilenko, 2005). En tal sentido, las macrófitas emergentes como *Typha domingensis*, han sido utilizadas en programas de bioremediación de ambientes acuáticos degradados, urbanos o artificiales, o para el tratamiento de aguas residuales (Varnell *et al.*, 2010). También en ambientes acuáticos contaminados por metales pesados provenientes de la

actividad agrícola en la provincia de Córdoba, la macrófita sumergida *Myriophyllum aquaticum* demostró una gran acumulación de metales pesados en las hojas, resultando un elemento clave en el diseño de estrategias de conservación y rehabilitación de estos ambientes (Harguinteguy *et al.*, 2013).

Las macrófitas constituyen una de las principales vías en el reciclado de los nutrientes y de la materia orgánica (Wetzel, 2001). En particular son una de las principales fuentes de materia orgánica disuelta (MOD) y particulada (MOP) de los ambientes acuáticos (Anesio *et al.*, 1999; Wetzel, 2001; Bertilsson & Jones, 2003). Por lo tanto, la constitución elemental de las macrófitas (en términos de Carbono (C), Nitrógeno (N) y Fósforo (P)) podría tener una particular significancia para estos procesos. El contenido de nutrientes en los tejidos podría ser una cuestión especie-específica (Demars & Edwards, 2007). Sin embargo, la hipótesis de tasa crecimiento (Growth Rate Hypothesis) establece que los organismos de rápido crecimiento tienen en general bajas relaciones C:P y N:P en los tejidos (Matzek & Vitousek, 2009). En los sistemas acuáticos, la disponibilidad de nutrientes podría ser un factor importante para la competencia entre especies de plantas, ya que por ejemplo una rápida absorción de los nutrientes permite altas tasas de crecimiento (Zedler & Kercher, 2004). El reciclado de nutrientes provenientes de estos tejidos vegetales puede resultar sumamente importante para la dinámica ecosistémica de los ambientes (Caceres *et al.*, 2008). Los nutrientes generados por esta descomposición son real y potencialmente utilizables por productores de la trama trófica sestónica (Horppila & Nurminen, 2001; Bastidas Navarro *et al.*, 2009).

La estequiometría ecológica involucra el estudio del balance de elementos químicos, especialmente C, N y P y su relación a lo largo de la cadena trófica (Elser *et al.*, 2000; Elser & Hamilton, 2007; Elser *et al.*, 2010). Es una herramienta muy útil que nos brinda información para comprender los mecanismos de limitación por nutrientes en los organismos, y cómo estas relaciones elementales afectan a sus relaciones ecológicas (Sturner & Elser, 2002). La composición elemental de los productores primarios es más fluctuante en respuesta a los cambios en los aportes de nutrientes y luz. Sobre el particular, la hipótesis luz-nutrientes (Light-Nutrient-Hypothesis, LNH) (Sturner *et al.*, 1997; Caceres *et al.*, 2008) predice que cambios en la luz alteran el balance de nutrientes y por consiguiente variará la limitación para los productores y el contenido de N y P de sus tejidos. El concepto general indica que si la luz es más limitante (menor irradiancia) la composición elemental de los productores será más rica en N y P en

relación con el C, resultando en un incremento de la calidad del alimento para los pastoreadores y en una mayor eficiencia trófica de transferencia (mayor contenido de nutrientes) (Hessen *et al.*, 2002). Es interesante notar que los primeros estudios sobre la composición de nutrientes de plantas acuáticas aparecen durante la década del 1930 en respuesta a una gran sequía (Kirby *et al.*, 1989). En la actualidad, la concentración de nutrientes en la biomasa vegetal de macrófitas acuáticas, ha sido usada para evaluar la disponibilidad de nutrientes para las plantas y en particular qué nutriente es limitante para el crecimiento de las mismas.

Las relaciones elementales de las plantas podrían ser modificadas además por interacciones mutualistas. Por ejemplo, la asociación entre el helecho acuático *Azolla* y cianobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Anabaena* aporta significativamente a la fijación del nitrógeno atmosférico en ambientes acuáticos (Peters, 1975). Los lóbulos dorsales de los frondes de *Azolla* contienen cavidades elipsoidales donde se localizan entre 2000 a 5000 células de cianobacterias (Rai & Rai, 2000). Se ha observado que estas cianobacterias presentan una mayor frecuencia de heterocistos lo cual genera bajas relaciones C:N de la planta por incremento de fijación de N (Rai & Rai, 2000). Otro ejemplo lo brinda la colonización por micorrizas a pesar que, en ambientes acuáticos, se ha estudiado poco a esta asociación (Daleo *et al.*, 2007; Ipsilantis & Sylvia, 2007). Los estudios señalan que la colonización por hongos micorrizicos de tipo arbuscular favorece la absorción de P por parte de la planta (Ipsilantis & Sylvia, 2007), lo que generaría bajas relaciones C:P en los tejidos (Cuassolo *et al.*, 2012, ver capítulo II de esta tesis). Recientemente, se ha comenzado a considerar cuáles serían las implicancias del contenido elemental de las macrófitas para la estequiometría de los ambientes acuáticos, en particular de los humedales (Chimney & Pietro, 2006; Bastidas Navarro *et al.*, 2009; González *et al.*, 2010; Cuassolo *et al.*, 2011; Cuassolo *et al.*, 2012).

En Patagonia, los humedales ocupan un 5 % del área total (Iriondo, 1989) y se encuentran asociados a una gran variedad de ambientes, desde bosques lluviosos de *Nothofagus* hasta estepas en ambientes áridos y semiáridos. En la región andina hay numerosos lagos pequeños y someros definidos como aquellos ambientes con superficie menor a 5 km² y con una profundidad menor a 12 m, presentando además una zona litoral vegetada bien desarrollada (Perotti *et al.*, 2005; Modenutti *et al.*, 2010). Según el régimen hidrológico, estos ambientes pueden ser permanentes o temporales. En el caso de los ambientes permanentes la relación entre recarga hídrica y drenaje es positiva y condiciona la presencia y permanencia anual de la napa freática cerca de la superficie

(Raffaele, 1999). Al permanecer el suelo saturado de agua, sobre todo en los períodos de lluvias, se favorece el desarrollo de vegetación hidrófila, como es el caso de las macrófitas sumergidas *Myriophyllum* y *Potamogeton*. Cuando los horizontes superficiales sólo reciben humedad proveniente del ascenso capilar se favorece el desarrollo de vegetación mesófitas, por ejemplo macrófitas emergentes del género *Juncus*, *Carex* y *Eleocharis* (Raffaele, 2004). Esta gran fluctuación de la napa freática los hace ambientes vulnerables o susceptibles a las invasiones biológicas particularmente de especies de plantas terrestres (Raffaele, 2004; González *et al.*, 2010). En los humedales de la Patagonia, las macrófitas son una importante fuente de materia orgánica disuelta (MOD) que es liberada al medio extracelular en forma de exudados o en tejidos senescentes a través de lixiviados de MOD y materia orgánica particulada (MOP) al agua circundante (Bastidas Navarro *et al.*, 2009; Modenutti *et al.*, 2010). Los lixiviados de macrófitas acuáticas son considerados, en general, un recurso sustancial de MOD para la mayoría de las aguas continentales (Wetzel, 2001; Bertilsson & Jones, 2003).

La MOD de los lagos puede ser fotoquímicamente modificada por las radiaciones solares de onda corta (RUV, 280-400nm), provocando la ruptura de las macromoléculas refractarias a compuestos de menor peso molecular (Bertilsson & Tranvik, 2000), afectando la biodisponibilidad de carbono orgánico para la comunidad bacteriana. Como consecuencia, esta transformación fotoquímica podría tener una profunda influencia sobre el flujo del carbono en sistemas acuáticos (Farjalla *et al.*, 2001). Por otra parte, la materia orgánica disuelta (MOD) y en particular la coloreada, controlan la penetración de las RUV en muchos ambientes acuáticos (Morris *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1996; Schindler & Curtis, 1997; Hader *et al.*, 2011). Por ello la acción de la MOD dentro del cuerpo de agua es considerada equivalente al ozono estratosférico (Williamson & Rose, 2010). En los ecosistemas acuáticos, el Carbono Orgánico Disuelto (COD) es la forma de materia orgánica más abundante (Benner & Kaiser, 2003). El COD, operacionalmente se define como el carbono orgánico que pasa a través de un filtro con tamaño de poro de entre 0.2 y 0.7 μm , y éste incluye tanto coloides como moléculas disueltas. Desde el punto de vista biológico, la MOD puede ser clasificada como lábil (MODL) o refractaria (MODR). MODL está constituida mayormente por compuestos de bajo peso molecular tales como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas, nucleótidos y esteroides (Amon & Benner, 1996; Münster, 1999). Parte de esta fracción es producida fotosintéticamente y

excretada como carbono orgánico disuelto extracelular (COE), mayormente por el fitoplancton, macrófitas y sus algas epífitas. Debido a que esta fracción de MOD se genera dentro del sistema, se denomina de origen autóctono (Tranvik, 1992). La MODR, por su parte, comprende cientos de macromoléculas con una estructura y composición compleja (Münster & Chróst, 1990). Las sustancias húmicas que pertenecen a esta categoría; son sustancias orgánicas heterogéneas y biogénicas que pueden ser caracterizadas por ser de color amarillo a negro, de alto peso molecular y refractarias (McKnight *et al.*, 1994). Debido a que ingresan a los cuerpos de agua a través de los lixiviados provenientes del área de drenaje del sistema acuático, esta MOD es de origen alóctono (Sachse *et al.*, 2001). Estas sustancias alcanzan cerca del 50 % del total de COD en la mayoría de las aguas superficiales, sin embargo, en aguas altamente coloreadas, características de los lagos húmicos, las sustancias húmicas pueden alcanzar tanto como el 90 % del COD (Kronberg, 1999).

En las últimas décadas se ha determinado que existe una tendencia a la disminución del ozono estratosférico que provoca un incremento de la radiación ultravioleta B (RUV-B) (Lozan, 2001). La región de los lagos andino-patagónicos se encuentra próxima al vortex Antártico Polar y al agujero de ozono (Orce & Helbling, 1997; Villafañe *et al.*, 2001), por lo tanto, recibe proporcionalmente altos niveles de radiación solar RUV. Resulta entonces interesante el estudio de la interacción de la RUV como factor ecológico en la producción y calidad de la MOD y MOP proveniente de macrófitas y a partir de la descomposición de las mismas.

A pesar del reconocimiento de la importancia de las macrófitas en la dinámica de los ecosistemas, su estudio en ambientes someros de Argentina es reciente (Villar *et al.*, 2001; Poi De Neiff *et al.*, 2006; Daleo *et al.*, 2007; De Tezanos Pinto *et al.*, 2007; O'Farrell *et al.*, 2007; González Sagrario *et al.*, 2009; González Sagrario & Balseiro, 2010; Izaguirre *et al.*, 2010) entre otros) y escasos en Patagonia (Díaz Villanueva & Trochine, 2005; Bastidas Navarro & Modenutti, 2007; Bastidas Navarro *et al.*, 2009; Trochine *et al.*, 2009; Bastidas Navarro & Modenutti, 2010; Cuassolo *et al.*, 2011; Cuassolo *et al.*, 2012). En la presente tesis se analizará a las relaciones elementales C:N:P de macrófitas de humedales andino-patagónicos con el propósito de comprender su papel en la producción de materia orgánica disuelta y particulada. El marco conceptual plantea el problema de las diferentes estrategias de las macrófitas desde el punto de vista estequiométrico. Por ello, nos proponemos evaluar las diferencias en la asignación de nutrientes entre macrófitas sumergidas y emergentes, nativas y exóticas y

también de algas bentónicas. Por otra parte, también analizaremos la interacción de la materia orgánica (disuelta y particulada) proveniente de estas plantas con distintos factores ambientales como la radiación solar. Posteriormente focalizaremos nuestro análisis en las relaciones elementales de los tejidos (raíz y tallo) de macrófitas nativas y exóticas. La colonización por hongos micorrízicos que puedan afectar las relaciones elementales de las mismas y como se modifican estas relaciones al interactuar con la RUV. Por último, analizaremos el papel de los macroinvertebrados detritívoros en el decaimiento de la materia orgánica proveniente de diferentes plantas.

CAPÍTULO I

RELACIONES ELEMENTALES DE MACRÓFITAS SUMERGIDAS Y ALGAS BENTÓNICAS DE UN MALLÍN CORDILLERANO



INTRODUCCIÓN

En Patagonia, los humedales ocupan aproximadamente el 5 % del área total (Iriondo, 1989). Entre estos hay un tipo particular de humedal llamado “*mallin*” en lengua Mapuche. Estos mallines, limnológicamente similares a pantanos, pueden ser caracterizados como prados húmedos con una alta producción primaria neta y con una densa cobertura dominada principalmente por plantas herbáceas, pertenecientes a las familias Juncaceae, Cyperaceae y Poaceae (Raffaele, 1999). Los mallines son hábitats altamente diversos en el Oeste de la Patagonia (Raffaele, 2004) y se localizan tanto en la estepa como en bosques en la Cordillera de los Andes. Los mallines de estepa son importantes recursos para las especies de herbívoros nativos e introducidos y, en particular, muy importantes en las economías locales basadas en ganadería de vacunos y

ovinos (Raffaele, 1999; Hauenstein *et al.*, 2002). Por el contrario, los mallines que se localizan a mayor altura en las montañas andinas nord-patagónicas están constituidos por prados inundados y generalmente están incluidos en áreas protegidas como Parques Nacionales (Raffaele, 2004), y relativamente protegidos del pastoreo y del ganado. Sin embargo, debido a su ubicación en altitud (1400 a 2000 m.s.n.m), están expuestos a factores ambientales severos como la alta radiación ultravioleta (RUV) (Zagarese *et al.*, 2001) y el hielo y la nieve que provocan un acortamiento en el período de crecimiento de las plantas (Ferreyra *et al.*, 2005).

Los mallines son ambientes hidrológicamente complejos (Iriando *et al.*, 1974). Las zonas que permanecen siempre con agua poseen un fondo cubierto generalmente por una macrófita sumergida *Myriophyllum quitense* Kunth E (Ezcurra & Brion, 2005), y algas verdes filamentosas bentónicas (*Zygnema sp.* y *Spirogyra sp.*). Aunque, hay estudios en relación con la hidrología, los bancos de semillas, la flora y la fauna incluyendo comunidades microbianas (Markgraf, 1984; Raffaele, 1996; del Valle, 1998; Cardoso *et al.*, 2010), nada se conoce acerca de la composición elemental de las plantas que habitan estos ambientes así como tampoco cómo se relacionan algas y macrófitas con las características del agua del mallín a través de la liberación de lixiviados a lo largo de su ciclo de vida.

Las macrófitas y las algas verdes filamentosas constituyen una importante fuente de carbono (C) para el contenido total de Materia Orgánica Disuelta (MOD) de los humedales (Wetzel, 2001). Estos productores primarios liberan MOD sintetizada durante la fotosíntesis, o también por medio de la lixiviación de los tejidos muertos o senescentes (Bertilsson & Jones, 2003). La MOD al entrar en el medio acuático puede permanecer en la columna de agua (Naiman & Melillo, 1984), y luego ser incorporada en la red trófica acuática a través de la actividad bacteriana (Triska *et al.*, 1989; Bastidas Navarro *et al.*, 2009). Por otro lado, la MOD representa un componente importante en los ecosistemas acuáticos absorbiendo la radiación solar, particularmente en la región del UV del espectro lumínico (290-400 nm) (Morris *et al.*, 1995; Schindler & Curtis, 1997; Osburn *et al.*, 2001). Esta absorción de energía puede conducir a una variedad de procesos fotoquímicos, incluyendo la fotodegradación que podría estar relacionada a cambios en las propiedades moleculares y espectrales de la MOD (Bertilsson & Tranvik, 2000; Farjalla *et al.*, 2001; Helms *et al.*, 2008). Además, la radiación ultravioleta (RUV) aumenta la degradación de las macrófitas y la producción de lixiviados (Mans *et al.*, 1998; Anesio *et al.*, 1999), y los procesos fotoquímicos podrían

resultar en una importante fuente y sumidero de nutrientes esenciales tales como el Nitrógeno (N) y el Fósforo (P) (Lewis, 2002; Qualls & Richardson, 2003).

El hecho que Patagonia se encuentre afectada, al menos parte de su territorio, por el agujero de ozono antártico (Villafañe *et al.*, 2001) ha aumentado el interés en reacciones fotoquímicas debidas a un aumento de la RUV causada por la reducción de la capa de ozono estratosférica (Osburn *et al.*, 2001; Zepp *et al.*, 2003; Vernet, 2006). A pesar que hay escasa información acerca de cómo la RUV afecta la dinámica de los humedales, estudios previos en lagos de altura de la Patagonia han indicado un fuerte efecto detrimental en sus comunidades (Zagarese & Williamson, 2000). En particular y como consecuencia del incremento en los niveles de la radiación UV se observó un aumento de la fotodegradación de la MOD (Osburn *et al.*, 2001). Por otra parte, la interacción de la RUV con la MOD puede resultar en una fuente de nutrientes para las micro-comunidades acuáticas (Bastidas Navarro & Modenutti, 2010). Todas estas situaciones ejercerán un efecto notable sobre la dinámica de la calidad de agua en los mallines de altura.

La importancia de las macrófitas y algas en la dinámica de humedales ha sido muy reconocida en numerosos trabajos previos (Stevenson *et al.*, 1996; Wigand *et al.*, 2000; Engelhardt & Ritchie, 2001; Egertson *et al.*, 2004). Sin embargo, aún es poco conocida la constitución elemental de estos productores primarios y de cómo sus lixiviados influyen en las características ópticas del agua por su aporte de MOD con diferentes características químicas. Esto es de particular importancia dado que por cambios en estos productores y/o lixiviados se podrían afectar los ciclos de los nutrientes del ambiente, la producción heterótrofica, y, por lo tanto, la transferencia de energía en las cadenas tróficas acuáticas (Moran & Hodson, 1990; Tranvik, 1992). En este contexto, hemos realizado un estudio de las relaciones elementales de los tejidos de macrófitas sumergidas y algas bentónicas, como también la calidad de la MOD (lixiviado) que liberan al agua, y el efecto de las RUV sobre las características ópticas y estequiométricas de dicho lixiviado.

Objetivo General

Analizar la composición elemental (C:N:P) de los tejidos y lixiviados de una macrófita sumergida (*Myriophyllum quitense*) y de algas bentónicas (de *Zygnema* sp. y *Spirogyra* sp.) de un mallín andino nord-patagónico.

Objetivos Específicos

1. Analizar comparativamente las relaciones elementales C:N y C:P de los tejidos de una macrófita sumergida (*Myriophyllum quitense*) y algas bentónicas (*Zygnema* sp. y *Spirogyra* sp.) en otoño y primavera.
2. Analizar la calidad de la MOD liberada en los lixiviados de macrófitas y algas bentónicas como fuente importante de carbono del humedal.
3. Estudiar el efecto de la exposición a radiaciones UV, en las características ópticas y en la calidad de la MOD resultante de los lixiviados de macrófitas sumergidas y algas bentónicas.

Hipótesis

1. Las relaciones elementales C:N:P serán diferentes en las especies estudiadas, por lo tanto, la MOD producto de los lixiviados será de diferente calidad
2. Los cambios en la MOD, producto de la exposición a la RUV, dependerán del origen de la misma, sea de macrófitas o algas bentónicas

Predicciones

1. Debido a la complejidad tisular se espera que la macrófita sumergida posea relaciones elementales más ricas en nutrientes que las algas bentónicas.
2. Debido a la complejidad tisular se espera que la macrófita sumergida posea MOD más refractaria y por lo tanto menos afectada por la degradación fotoquímica de la RUV.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el mallín de la Laguna de Los Patos que se encuentra a una altitud de 1500 m.s.n.m. en la ladera oriental del Cerro Chall-huaco (41° 16'S y 71° 20'O). El humedal presenta una estructura hidrológica con dos arroyos principales, y en el lado oeste hay un estanque de agua permanente llamado Laguna de Los Patos (Área= 1.5 ha) (Fig. 1.1). El fondo de la laguna está colonizado por la macrófita sumergida *Myriophyllum quitense* y por algas verdes filamentosas del género *Spirogyra* y *Zygnema* (en este trabajo llamadas algas bentónicas). La laguna se encuentra rodeada de una macrófita emergente *Carex subantarctica*. La flora completa relevada en el mallín incluye a 52 especies nativas vasculares y 3 especies de briofitas (Raffaele, 1993; Raffaele, 1996). La vegetación circundante es de tipo bosque subalpino de la caducifolia *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. (“lenga”). El área está incluida dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina.

Estudio de campo

La Laguna de los Patos fue muestreada en dos ocasiones diferentes: primavera tardía (Diciembre 2009) y otoño (Abril 2010) y en 5 puntos de muestreo diferentes (Fig. 1.1). La temperatura del agua y el oxígeno disuelto fueron medidos utilizando un oxímetro (YSI Pro ODO Yellow Spring Instruments, USA), y el pH fue medido con un pH-metro (HI 8424 Hanna Instruments, USA). El potencial redox se midió en el agua y en los sedimentos con un electrodo Pt combinado Ag/AgCl de referencia interna (HI-3131B Hanna Instruments). Las muestras de agua fueron obtenidas con una botella limnológica (2 L). Las plantas macrófitas y algas bentónicas fueron colectadas en cada ocasión de muestreo en cada punto indicado en la figura 1.1 y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio en bolsas de polietileno. Además, la cobertura vegetal fue estimada midiendo directamente la totalidad del área cubierta por cada especie en la laguna.

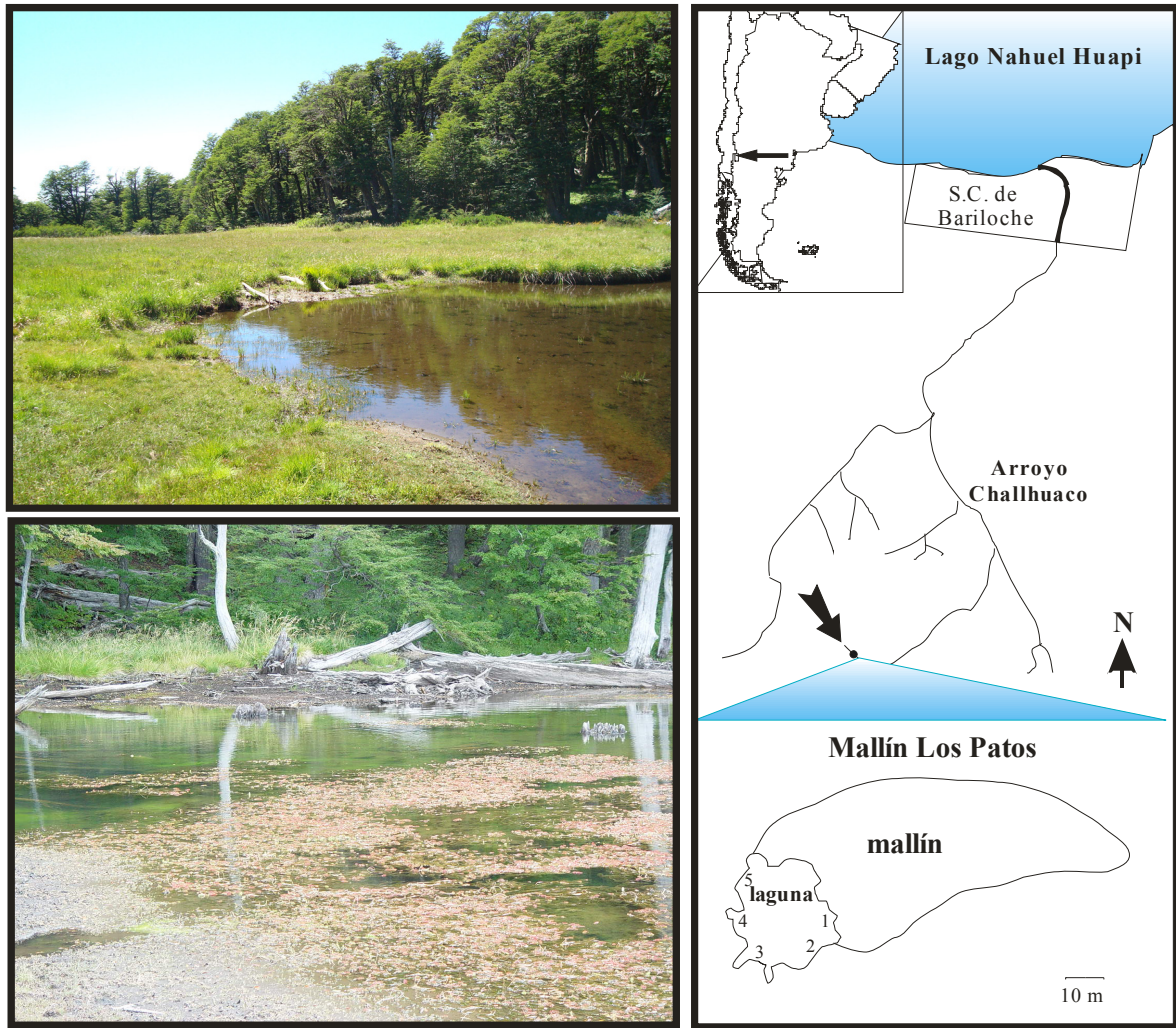


Figura 1.1. Fotografías y ubicación geográfica del área de estudio: Laguna de Los Patos (con ojo de agua permanente).

Procedimientos de laboratorio

Medición de nutrientes y clorofila

El Fósforo Total (PT), el Fósforo Total Disuelto (PTD) y el Nitrógeno Total (NT) fueron medidos en el agua de la laguna de acuerdo con APHA (APHA, 2005) y Valderrama (Valderrama, 1981). La concentración de clorofila-*a* se midió por extracción con etanol 90 % siguiendo el método de Nusch (Nusch, 1980) y se utilizó un fluorómetro 10-AU (Turner Design). La concentración de carbono orgánico disuelto (COD) se determinó con un analizador de carbono (TOC-VCSH Shimadzu).

El análisis elemental del tejido vegetal de macrófitas y algas se realizó luego de un cuidadoso lavado con agua destilada y luego con agua MilliQ. Los vegetales fueron secados a 60 °C por 48 hs hasta obtener un peso constante. Luego, el material vegetal seco fue molido utilizando un molinillo y aproximadamente 2 mg de peso seco (PS) fueron destinados para análisis elemental. Las concentraciones de carbono (C) y nitrógeno (N) en los tejidos fueron medidas con un analizador de CN (Thermo Finnigan Flash EA 1112). El fósforo (P) fue medido luego de la combustión a 450°C de 2 mg de PS de tejido durante 1 h, seguido de una reacción ácida con molibdato de amonio (APHA, 2005). De esta manera se pudieron calcular las relaciones C:N y C:P de las plantas.

Preparación de los lixiviados

Previo al comienzo de cada experimento se acondicionó el material de vidrio utilizado. El material fue lavado con ácido clorhídrico diluido (5-10 %) y luego enjuagado con agua MilliQ, secado en estufa y posteriormente muflado a 450 °C durante 1 h o autoclavado durante 20 minutos a 1.5 atmósferas, para esterilizar el material. De igual manera, los filtros GF/F (Osmonics) fueron pre muflados a 450 °C por 1 h.

Se recolectaron plantas enteras de *Myriophyllum quitense* y algas bentónicas de los 5 puntos de muestreo y se guardaron en bolsas de polietileno. En laboratorio, las muestras fueron enjuagadas cuidadosamente con agua destilada, secadas a temperatura ambiente y luego almacenadas hasta su utilización, en ambiente seco a temperatura ambiente en sobres de papel. La preparación del lixiviado se llevó a cabo 2 a 3 días previos a su utilización en los experimentos. Para ello, 1 g de material seco de la

macrófita o algas, fue colocado en 100 mL de agua MilliQ por 48 hs a 4 °C, siguiendo a Anesio y colaboradores (Anesio *et al.*, 2000). El agua obtenida (lixiviado), fue filtrada por filtros GF/F pre-muflados y luego por un filtro de membrana estéril de 0.22 µm de tamaño de poro.

A los lixiviados se les midió la concentración de COD con un analizador de carbono (TOC-VCSH Shimadzu) y fósforo reactivo soluble (PRS) que fue medido por el método del ácido ascórbico, previa digestión con persulfato de potasio.

Diseño Experimental

Las características ópticas de los lixiviados de algas y macrófitas frente a diferentes condiciones lumínicas fueron estudiadas en dos experimentos: Experimento 1: primavera tardía (Diciembre 2009); Experimento 2: otoño (Abril 2010). Ambos experimentos consistieron en la exposición de los lixiviados de algas verdes filamentosas y *M. quitense* (obtenidos según la metodología ya explicada) a diferentes tratamientos lumínicos por 4 hs: (1) exposición a radiación visible + ultravioleta (RUV) (2) exposición sólo a radiación fotosintéticamente activa (RFA, 400-700 nm), y (3) oscuridad (cubierto con papel aluminio). Los experimentos fueron realizados en un incubador a 15±1 °C con una intensidad de RFA de 92 µmol de fotones m⁻² s⁻¹ (tubos fluorescentes luz día). La RUV fue provista con dos tubos de luz artificial fluorescentes UVA-340 (Q-Panel Lab Products, Cleveland, OH, U.S.A.). El espectro de irradiancia de UV de estos tubos es cercano al espectro solar entre los 280 y 350 nm (Shick *et al.*, 1999). Las exposiciones lumínicas se realizaron en tubos de cuarzo de 20 mL. Los tubos de cuarzo fueron distribuidos en un armazón a 30 cm de distancia de la fuente de luz siguiendo a Bertilsson & Tranvik (Bertilsson & Tranvik, 2000). En ambos experimentos, las exposiciones se realizaron en 3 réplicas. Durante la incubación, el agua recibió 35 µW cm⁻² nm⁻¹ de la banda de los 340 nm, y este nivel de irradiancia es equivalente a la luz solar del mediodía en verano en la superficie de los lagos andinos. En el tratamiento RFA, se evitó la RUV usando un filtro de polietileno de corte a 380 nm y 85 % de transmitancia por encima de los 380 nm. Estas condiciones se verificaron antes del experimento usando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV 2450.

Al inicio y al final de cada experimento, se realizaron escaneos espectrofotométricos de los lixiviados, en un espectro desde los 250 nm a 790 nm en

cubetas de cuarzo de 10 cm usando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV2450. Por otra parte, la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) fue medida con un analizador de carbono Shimadzu TOC VCSH. Para el análisis de los nutrientes liberados, se estimó en el tiempo inicial y en tiempo final, la concentración de fósforo reactivo soluble (PRS) mediante el método de reducción con ácido ascórbico.

Análisis estadísticos

Las unidades de absorbancia (A) de los escaneos espectrofotométricos de los lixiviados fueron convertidas a coeficientes de absorción (a_d) como $a = \ln(10^A)/lc$, donde lc es el largo de la cubeta en m y normalizados a la concentración de DOC (a^*_{COD}) (Gallegos *et al.*, 1990).

La relación $a_{250}:a_{365}$ fue usada como una medida relativa del tamaño molecular promedio de las moléculas que componen la MOD (Pérez & Sommaruga, 2006) y el color del agua fue determinada como el coeficiente de absorbancia a 440 nm (a_{440}) siguiendo a Pace & Cole (Pace & Cole, 2002), todo determinado en una cubeta de cuarzo en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV 2450 siguiendo a Pace & Cole (Pace & Cole, 2002).

Las diferencias en los parámetros limnológicos de la Laguna Los Patos entre primavera y otoño fueron analizadas usando un *t*-test. Para determinar la existencia de diferencias significativas en las características ópticas y en el contenido de nutrientes de ambos lixiviados se aplicó un ANOVA de dos vías (“plantas” y “estación” como factores). Las diferencias en las relaciones elementales, en la relación $a_{250}:a_{365}$ y la concentración de PRS fueron analizadas con un ANOVA de una vía. Las comparaciones post hoc fueron realizadas mediante un Test de Tukey con un nivel de significancia del 5 %. Todos los análisis fueron realizados usando los programas SigmaStat 3.1 y Statistica 6.0.

RESULTADOS

En la Laguna Los Patos los parámetros limnológicos fueron diferentes en las dos estaciones del año muestreadas (Tabla 1.1). En primavera, se registró una mayor temperatura (t -test, $P= 0.009$) en coincidencia con una relativa menor concentración de oxígeno disuelto (t -test, $P= 0.202$). No obstante, la concentración de oxígeno disuelto fue siempre cercana a la saturación (85 % en primavera y 94 % en otoño). El potencial redox del agua exhibió valores altos en el agua y los sedimentos. Los valores redox en el agua fueron significativamente más altos en primavera (t -test, $P= 0.027$), mientras que en los sedimentos no se observaron diferencias significativas entre las estaciones (t -test, $P= 0.189$). En primavera, hubo mayores concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) así como también mayores absorbancias a 440 nm (a_{440}), lo que implica mayor color; sin embargo esa materia orgánica exhibió una mayor relación $a_{250}:a_{365}$ lo que significa una mayor concentración de moléculas de bajo peso molecular (t -test, $P= 0.023$ para COD, $P\leq 0.001$ para a_{440} y $a_{250}:a_{365}$). En primavera también se observaron mayores concentraciones de PT, y PTD (t -test, $P< 0.001$ para ambos casos). Sin embargo, las concentraciones de clorofila a fueron bajas en ambas estaciones ($\approx 2.5 \mu\text{g L}^{-1}$), y significativamente menores que en otoño (t -test, $P< 0.001$) (Tabla 1.1).

La cobertura vegetal exhibió diferentes patrones de distribución espacial entre primavera y otoño. Durante la primavera, la cobertura vegetal de *M. quitense* fue cerca de 80 %, mientras que de las algas bentónicas permaneció por debajo del 15 %. Por el contrario, en otoño, la cobertura de las algas bentónicas se incrementó a un 60 %, mientras que *M. quitense* constituyó menos que el 30 %.

Tabla 1.1. Características limnológicas de la Laguna Los Patos. Los valores están dados como promedios \pm desvío estandard.

	Primavera	Otoño
Temperatura (°C)	13.33 \pm 1.91	7.55 \pm 1.88
Oxígeno Disuelto (mg L ⁻¹)	9.2 \pm 1.24	11.3 \pm 2.27
pH	6.51 \pm 0.83	6.24 \pm 0.71
Potencial Redox (mV)(agua)	197 \pm 15.51	114 \pm 43.61
Potencial Redox (mV)(sedimentos)	275 \pm 80.10	202 \pm 58.94
COD (mg L ⁻¹)	1.1 \pm 0.02	0.4 \pm 0.08
<i>a</i> ₂₅₀ : <i>a</i> ₃₆₅	3.50 \pm 0.10	2.61 \pm 0.06
<i>a</i> ₄₄₀	1.68 \pm 0.04	1.08 \pm 0.03
PT (μg L ⁻¹)	20 \pm 0.81	8 \pm 0.06
PTD (μg L ⁻¹)	8 \pm 0.34	5 \pm 0.06
NT (μg L ⁻¹)	n.d	65 \pm 5.07
Clorofila- <i>a</i> (μg L ⁻¹)	2 \pm 0.01	3 \pm 0.05

Las relaciones elementales entre las especies estudiadas y en las dos estaciones del año resultaron diferentes (Fig. 1.2). La relación C:N fue significativamente diferente entre las estaciones del año para ambas especies, las algas bentónicas (*Spirogyra* y *Zygnema*) exhibieron altos valores en primavera (*t*-test, $P= 0.007$), mientras que *M. quitense* mostró altas relaciones en otoño (*t*-test, $P= 0.025$). Por el otro lado la relación C:P no exhibió diferencias significativas durante ambas estaciones del año para ambas plantas (*t*-test, $P= 0.184$ para algas bentónicas, y $P= 0.258$ para *M. quitense*). Las algas bentónicas exhibieron una relación N:P mayor que 20, mientras que la macrófita sumergida fue siempre menor que 20 (Fig. 1.2) y esta relación permaneció similar durante ambas estaciones (*t*-test, $P=0.280$ para algas bentónicas, y $P= 0.613$ para *M. quitense*).

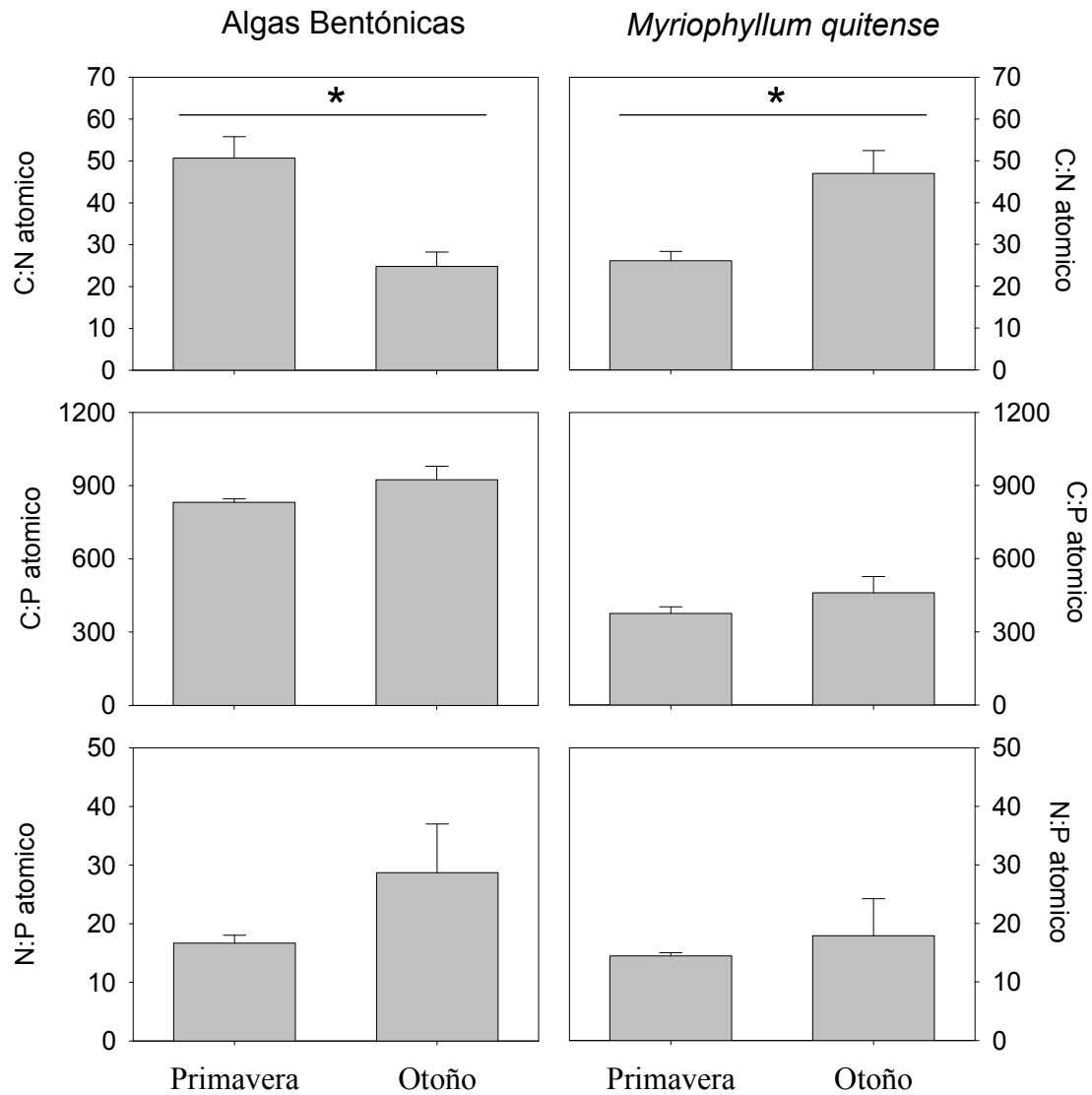


Figura 1.2. Relaciones elementales (C:N, C:P y N:P) en los tejidos de las especies estudiadas en primavera y otoño. (*) indica diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre estaciones.

Los lixiviados de ambas plantas (Fig. 1.3) también presentaron diferencias en sus características ópticas y químicas (Tabla 1.2). El lixiviado de las algas bentónicas exhibió bajos valores en la relación $a_{250}:a_{365}$ indicando alto peso molecular mayor que en *M. quitense* (ANOVA de dos vías, $P < 0.001$ para el factor “especies”, *a posteriori* Tukey test, $P < 0.001$), y estos valores no fueron diferentes entre estaciones del año (ANOVA de dos vías, $P = 0.363$ para el factor “estaciones”). También se observaron diferencias en los lixiviados obtenidos entre ambas especies ya que la sumergida produjo mayor concentración de lixiviados ricos tanto en C (COD) como en P (PRS) que el lixiviado de las algas bentónicas en ambas estaciones del año (ANOVA de dos vías, $P < 0.001$, *a posteriori* Tukey test $P < 0.001$) (Tabla 1.2).



Figura 1.3. Fotografía de los lixiviados, a la izquierda de *M. quitense* y a la derecha de algas bentónicas (*Zygnema* sp. y *Spirogyra* sp.)

Tabla 1.2. Características ópticas y contenido de nutrientes de los lixiviados de macrófitas y algas bentónicas.

	Algas bentónicas		<i>M. quitense</i>	
	Primavera	Otoño	Primavera	Otoño
$a_{250}:a_{365}$	3.00 ± 0.05	2.91 ± 0.09	3.51 ± 0.10	3.52 ± 0.03
a_{440}	2.19 ± 0.01	2.29 ± 0.10	2.63 ± 0.12	3.68 ± 0.01
COD (mg g ⁻¹)	58.4 ± 0.05	54.8 ± 0.40	70.7 ± 0.02	90.4 ± 0.68
PRS (mg g ⁻¹)	3.4 ± 0.29	4.1 ± 0.96	7.4 ± 0.73	7.8 ± 0.21

Para cada especie y en los dos experimentos realizados, el efecto de la luz sobre las características ópticas de los lixiviados mostró tendencias similares (Fig. 1.4). Los lixiviados de las algas bentónicas mostraron un patrón bimodal en el momento inicial, con picos máximos a los 307 nm y a los 370 nm (Fig. 1.4a y c); mientras que *M. quitense* exhibió un espectro unimodal con un máximo a los 265 nm (Fig. 1.4b y d). Sin embargo, los lixiviados de las algas bentónicas no exhibieron cambios luego de la exposición a RUV o RFA ni en los escaneos espectrofotométricos ni en la relación $a_{250}:a_{365}$ (ANOVA de una vía, $P= 0.918$) (Fig. 1.5). Esto indicaría una baja fotorreacción de esta MOD a la exposición lumínica independientemente de la calidad de la luz. Por el contrario, los lixiviados de *M. quitense* mostraron cambios significativos en los escaneos espectrofotométricos y en la relación $a_{250}:a_{365}$ entre los tratamientos (ANOVA de una vía, $P < 0.001$ en ambas estaciones) (Fig. 1.5), con altos valores en el tratamiento RUV y RFA (test de Tukey, $P < 0.001$ para RUV y RFA vs. OSCURIDAD para ambas estaciones).

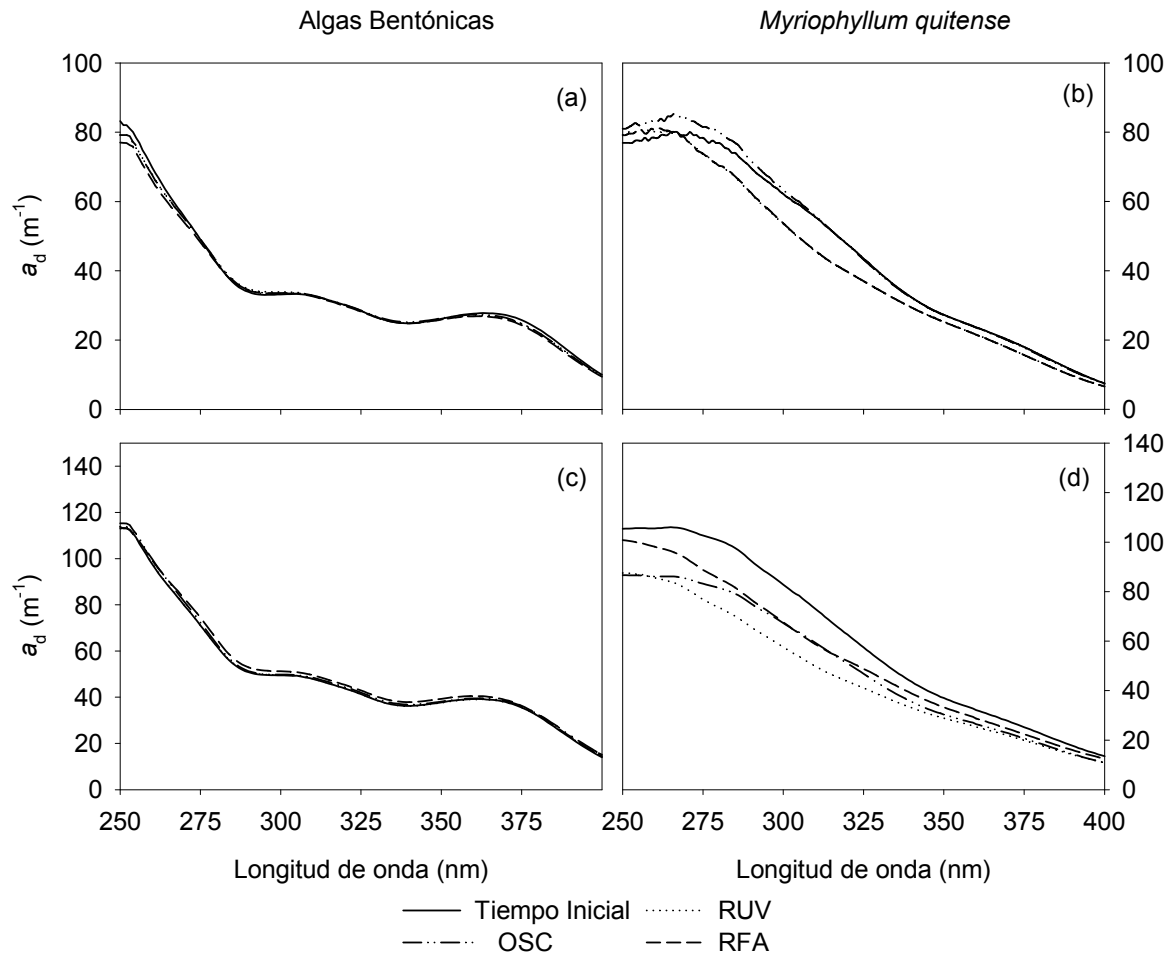


Figura 1.4. Curvas de absorbancia espectrofotométrica de los lixiviados de algas bentónicas (izquierda) y de *Myriophyllum quitense* (derecha) en los experimentos de primavera (a y b) y de otoño (c y d).

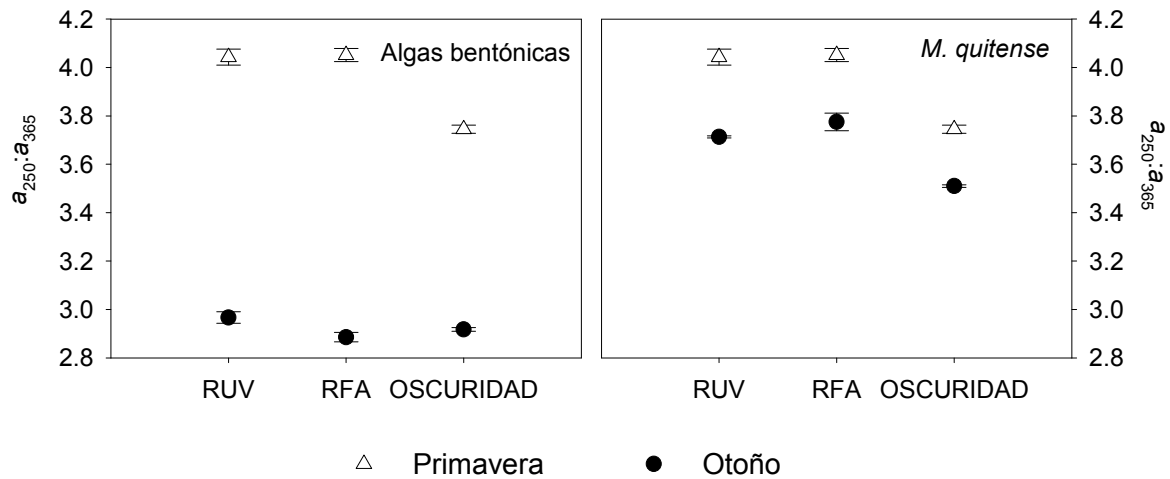


Figura 1.5. Tamaño medio molecular (relación $a_{250}:a_{365}$) en los lixiviados de algas bentónicas y de *Myriophyllum quitense* en los dos experimentos.

Con respecto a la liberación de P por parte de los lixiviados provenientes de ambos vegetales también se observaron diferencias significativas. En el experimento de primavera las algas bentónicas liberaron más P en el tratamiento OSCURIDAD (ANOVA de una vía, $P= 0.002$, test de Tukey, $P < 0.003$ para RUV y RFA vs. OSCURIDAD), mientras que no se hallaron diferencias significativas en el experimento de otoño (ANOVA de una vía, $P= 0.078$) (Fig. 1.6a, b). Por el contrario, en el experimento de primavera *M. quitense* no exhibió diferencias en el P liberado (ANOVA de una vía, $P= 0.176$) (Fig. 1.6), mientras que en el experimento de otoño se encontraron diferencias significativas (ANOVA de una vía, $P < 0.001$) con más P liberado en el tratamiento OSCURIDAD (Fig. 1.6c y d).

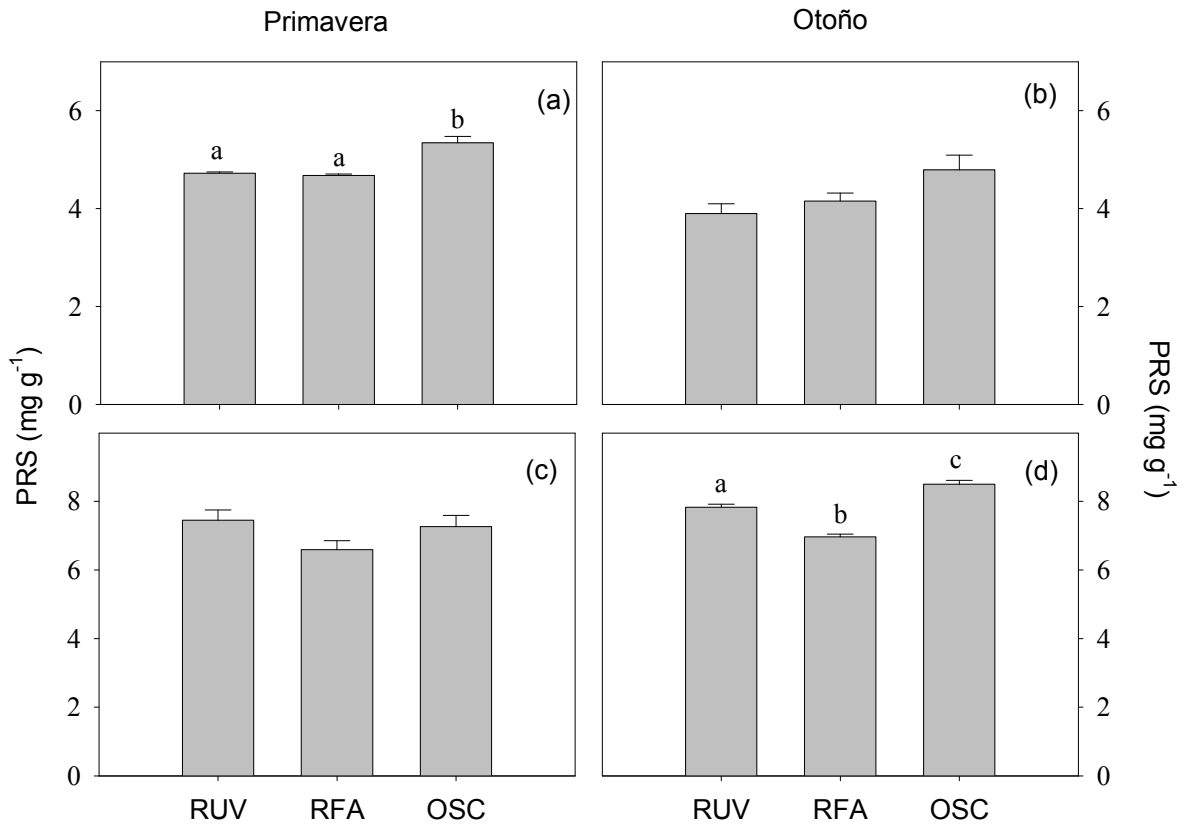


Figura 1.6. Concentración de PRS para algas bentónicas (a y b) y *Myriophyllum quitense* (c y d) en los experimentos de primavera y otoño. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos lumínicos (RUV, RFA y OSCURIDAD).

DISCUSION

La mayoría de los lagos someros y algunos ríos y arroyos tienen una alta proporción de sus fondos potencialmente disponibles para la colonización por parte de macrófitas y epifitas. Dada esta potencial extensión en la colonización del hábitat bentónico y los altos índices de producción que estos vegetales pueden alcanzar (Moss, 1998), las macrófitas y las algas bentónicas son fuente importante de materia orgánica disuelta (MOD) (Bertilsson & Jones, 2003). En la Laguna Los Patos la totalidad del fondo puede ser colonizado por macrófitas y algas epifitas, así como también buena parte de los fondos de los canales que conforman la compleja estructura del mallín Chall-huaco. Por ello, se puede asumir que estas plantas son importantes recursos para la dinámica de estos ecosistemas. En particular, nuestros resultados mostraron que la macrófita sumergida *M. quitense* y las algas verdes filamentosas (*Spirogyra* y *Zygnema*) son un importante recurso de carbono orgánico disuelto (COD), proporcionando cerca de 55 y 80 mg por g de peso seco de planta, respectivamente. Además, estas especies también constituyen un recurso de P que podría ser liberado directamente al agua (3.75 y 7.58 mg P g⁻¹PS para algas bentónicas y *M. quitense*, respectivamente).

Curiosamente, la concentración de oxígeno disuelto en el agua fue siempre cercana a la saturación, y condiciones aeróbicas con alto potencial redox fueron también determinadas en los sedimentos (Tabla 1.1). Esta condición, sugiere la existencia de vías completamente aeróbicas para la descomposición de la materia orgánica en este ambiente. En algunos humedales, las condiciones aeróbicas podrían ser determinantes para la colonización por hongos micorrízicos (Daleo *et al.*, 2007). En el caso del mallín Chall-Huaco los valores de potencial redox observados en los sedimentos podrían favorecer el desarrollo de hongos micorrízicos en su flora. Así, las posibles asociaciones simbióticas podrían también jugar un importante papel en la asignación de los nutrientes (P y N) en las plantas que colonizan estos particulares humedales de montaña.

La relación elemental C:N:P de las especies estudiadas resultó diferente lo que soporta nuestra primer hipótesis. Esta diferencia podría ser explicada por características especie-específicas (Sturner & Elser, 2002; Demars & Edwards, 2007; Osborne & Kovacic, 2007), a pesar que hay muy pocos estudios comparativos entre algas y plantas vasculares. Las pocas evidencias señalan que la estequiometría en las relaciones C:N:P de las microalgas bénticas tuvo una respuesta variable e indicadora de diferentes niveles y tipos de limitación por nutrientes (Hillebrand & Sommer, 1999). En nuestro estudio, nosotros observamos que la relación C:N de las algas bentónicas exhibió los valores

más bajos en otoño, que podría estar asociada con una alta tasa de crecimiento y reproducción (González *et al.*, 2010). Por el contrario, la relación elemental C:P no varió en las dos estaciones del año. De acuerdo con Loladze & Elser (Loladze & Elser, 2011) una relación N:P mayor que 16 implica limitación por P. La relación elemental N:P observada fue alrededor de 20 sugiriendo que las algas bentónicas están limitadas por P. Entonces estas algas bentónicas están limitadas por nutrientes, como es frecuentemente el caso en condiciones naturales (Elser *et al.*, 1990), lo que ocasiona una fuerte competencia por nutrientes. Trabajos previos han observado que las algas bentónicas, bajo limitación por P, aumentan la relación C:P con una disminución de la tasa de crecimiento y exhiben un mayor crecimiento cuando la relación C:P es alrededor de 130 (Hillebrand & Sommer, 1999). Una situación diferente fue observada para *M. quitense*, en el que la relación N:P fue por debajo de 20 aunque superior a 16, y las relaciones C:N y C:P fueron mayores en otoño, lo que indica una mayor tasa de crecimiento en primavera. Estos resultados también concuerdan con las diferencias observadas en la cobertura de ambas plantas en la laguna Los Patos, con la dominancia de las algas bentónicas en otoño y de *M. quitense* en primavera.

Las diferentes especies de macrófitas asignan diferencialmente los nutrientes en la estructura de sus tejidos, y por lo tanto la MOD procedente de estas especies tiene diferente contenido de nutrientes (Davis & Van der Valk, 1983). La composición elemental y los lixiviados de *M. quitense* podrían ser más ricos en nutrientes que aquellos de las algas bentónicas, debido a su posibilidad de almacenamiento en tallos modificados y raíces. Nuestros resultados soportan esta hipótesis resultando *M. quitense* más rico en nutrientes en comparación con las algas bentónicas.

Por otra parte, se observó que existe una alternancia en la liberación de nutrientes al agua por parte de los lixiviados de los dos vegetales. *M. quitense* presentó una mayor liberación de P a partir de sus lixiviados en otoño, cuando posiblemente almacene más P en los tallos modificados y raíces previo a la senescencia del follaje de la planta en invierno. Debe destacarse que en este estudio no se separó a tallos, de tallos modificados ni de raíces. Por otra parte, los lixiviados de las algas bentónicas liberan más P en primavera que en otoño sugiriendo que durante la estación de crecimiento se incluye una mayor fracción de nutrientes. Independiente de las causas de esta liberación, resulta ecológicamente interesante que las fuentes de nutrientes liberados podrían variar de acuerdo a la dominancia alternativa de las algas bentónicas y de las macrófitas que ocurra en el humedal. Restaría para futuros trabajos investigar si estas fuentes

alternativas se corresponden con comunidades bacterianas diferentes que hacen uso particular de este recurso de carbono orgánico con distintas concentraciones de fósforo.

Los lixiviados son compuestos químicamente heterogéneos con una fracción lábil y una fracción refractaria (Peret & Bianchini, 2004). El espectro de absorbancia obtenido para las algas bénticas y *M. quitense* mostró máxima absorbancia a diferentes longitudes de onda, sugiriendo que estas plantas liberan diferentes calidades de MOD. El rango de la radiación ultravioleta (UV-A y UV-B), promueve la fototransformación de la estructura de la MOD, peso molecular y propiedades ópticas (Reche *et al.*, 2001; Brinkmann *et al.*, 2003; Obernosterer & Benner, 2004), incluyendo la liberación de nutrientes (Maranger & Pullin, 2003). Los experimentos de laboratorio indicaron que ambos lixiviados reaccionaron diferencialmente frente a las diferentes fuentes lumínicas, confirmando nuestra H2. En otoño, las algas bentónicas no exhibieron cambios en el espectro de absorbancia espectrofotométrica o la relación $a_{250}:a_{365}$, indicando que esta MOD es mayormente refractaria. Estos resultados fueron consistentes con la baja concentración de PRS liberado luego de la exposición lumínica (RUV o RFA). En tal sentido, se ha mencionado que en las algas de los lagos situados a gran altitud la radiación UV promueve la acumulación de compuestos fenólicos (Figueroa *et al.*, 2009). Por ello, es muy probable que las algas posean mecanismos que favorezcan la acumulación de estos compuestos con una MOD muy refractaria.

Por otro lado, los tratamientos de luz indujeron cambios en los espectros de absorbancia de los lixiviados de *M. quitense* y una disminución significativa en el tamaño molecular de la MOD luego de exposición a RUV y a RFA. Esta disminución de tamaño molecular promedio podría estar relacionada con la liberación de P después de la exposición a los rayos UV. La alta fotorreactividad de la MOD se ha observado en los lagos con una mayor MOD de origen autóctono (Reche *et al.*, 2001). Resultados similares se obtuvieron en experimentos de campo en el lago El Trébol, donde el agua natural del lago fue expuesta a la radiación solar (Zagarese *et al.*, 2001; Bastidas Navarro *et al.*, 2009). Otros estudios en lagos andinos someros han indicado que los lixiviados de las macrófitas *Potamogeton linguatus* y *Schenoplectus californicus* podrían contribuir significativamente a cambios en las características ópticas lacustres y en la liberación de nutrientes (Bastidas Navarro & Modenutti, 2010). Los resultados del presente capítulo indican que la fotorreactividad de la MOD autóctona es dependiente de la especie vegetal. Los lixiviados de *M. quitense*, de manera similar a otras especies

de macrófitas, resultaron ser fotorreactivos, mientras que las algas bentónicas mostraron una muy baja fotorreactividad.

CAPITULO II

MACRÓFITAS NATIVAS Y EXÓTICAS EN UN HUMEDAL PATAGÓNICO: LAS RELACIONES ELEMENTALES Y LOS EFECTOS EN LA ESTEQUIOMETRÍA DEL ECOSISTEMA



INTRODUCCIÓN

Los humedales se caracterizan por las fluctuaciones estacionales en el nivel del agua, con alternancia de períodos húmedos y secos. Este tipo de disturbio promueve que sean ambientes especialmente vulnerables a las invasiones por especies exóticas (Zedler & Kercher, 2004), provocando que estas plantas invasoras incrementen su distribución espacial y se expandan dentro de las comunidades de plantas acuáticas nativas (Richardson *et al.*, 2000). Por lo tanto, la susceptibilidad de las comunidades a las invasiones requiere una mayor atención (Prieur-Richard & Lavorel, 2000) ya que actualmente las plantas acuáticas nativas son poco comunes o están amenazadas debido a que las plantas invasoras de humedales tienden a dominar formando monotipos (Champion & Reeves, 2009). Esta situación puede además causar variaciones

substanciales en la dinámica del humedal porque provoca cambios en la acumulación de la materia orgánica y en el secuestro del carbono (Zedler & Kercher, 2005).

En los sistemas acuáticos, el suministro de nutrientes podría ser un factor importante en el balance competitivo entre las especies de plantas, ya que en general una rápida absorción de los nutrientes les permite desarrollar altas tasas de crecimiento (Zedler & Kercher, 2004). Por ejemplo, en un estudio en Norteamérica se ha demostrado para plantas acuáticas sumergidas bajo condiciones de alta fertilidad, que la especie invasora *Hydrilla verticillata* es mejor competidora que la nativa *Vallisneria americana*, mientras que en condiciones de baja concentración de nutrientes, las especies nativas superan a las invasoras (Van *et al.*, 1999). Otros estudios indicaron que las especies de macrófitas emergentes mejor adaptadas a los ambientes ricos en nutrientes tales como *Thypha dominguensis* (“tatora”), pueden, con una gran capacidad competitiva, efectivamente invadir ambientes con altas condiciones de nutrientes (Davis, 1991).

Los humedales temporarios o semi-temporarios representan una situación particular, porque durante la estación seca, el ambiente permanece sin agua semejando a un sistema terrestre. Las fluctuaciones en los niveles del agua es uno de los disturbios naturales que estos sistemas pueden tolerar, los cuales causan cambios tanto en la diversidad de plantas como en el reciclado del carbono. Sin embargo, debido a la alternancia entre los períodos de sequía e inundación, aquellas especies de plantas que pueden tolerar un amplio rango de niveles de agua son más exitosas (Raffaele, 2004). Durante el período de sequía, algunas de estas plantas desarrollan todo su ciclo de crecimiento convirtiéndose en una fuente importante de materia orgánica en descomposición durante el período de inundación (Díaz Villanueva & Trochine, 2005; Roehm, 2005). En este caso, la composición elemental del tejido de la planta podría jugar un papel importante en la calidad de la materia orgánica resultante (Osborne *et al.*, 2007). Si bien se ha indicado que la concentración de nutrientes en el tejido de las macrófitas resulta en una estricta relación C:N:P (carbono: nitrógeno: fósforo) (Demars & Edwards, 2007), la composición elemental (N y P) en los tejidos de las plantas está determinada por varios factores como: 1) el balance entre la absorción de nutrientes y el C asimilado en la fotosíntesis (Aerts & Chapin, 2000 ; Sterner & Elser, 2002); 2) las pérdidas a través de lixiviados, respiración, exudación, y pérdidas por herbivoría (Ventura *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2010) y 3) la presencia de hongos micorrízicos

simbiontes en las raíces que favorecen la toma de nutrientes como el P (Cornwell *et al.*, 2001; Dunham *et al.*, 2003).

En el distrito lacustre andino templado (41 °S) hay lagos grandes y profundos, lagos someros, lagunas y humedales (Modenutti *et al.*, 1998). En comparación con los lagos profundos, las lagunas y humedales presentan una alta concentración de materia orgánica disuelta (MOD) (Morris *et al.*, 1995). Este alto contenido de MOD puede estar asociado con la presencia de macrófitas en la zona litoral y con contribuciones externas a la cuenca (MOD alóctona) las cuales aumentan en la época de lluvias por escorrentía (Bastidas Navarro *et al.*, 2009; Navarro & Modenutti, 2012). Las macrófitas pueden contribuir significativamente a la MOD principalmente durante la senescencia por la descomposición de los tejidos y subsecuentes lixiviados (Bertilsson & Jones, 2003). Además, las macrófitas son una importante fuente y reservorio de nutrientes esenciales como el P (Bastidas Navarro & Modenutti, 2010), y aportan nutrientes a la producción heterotrófica del lago (Bastidas Navarro *et al.*, 2009).

Potentilla anserina L. es una especie exótica que está ampliamente distribuida en ambientes de suelo húmedo de la Patagonia (Correa, 1984. ; Ezcurra & Brion, 2005). En humedales de la Patagonia, esta especie exótica y hemicriptófito puede cubrir casi todo el fondo del humedal y restringir la distribución de las macrófitas nativas (Naiman & Melillo, 1984; Díaz Villanueva & Trochine, 2005). Recientes estudios en Chile (Hauenstein *et al.*, 2008) han indicado que *P. anserina* es una especie con requerimientos intermedios de N, lo cual podría ser beneficioso al momento de colonizar estos ambientes. Tanto los requerimientos elementales de la especie exótica en relación a las nativas, como las asociaciones mutualísticas con micorrizas, podrían resultar de gran importancia en determinar la capacidad de la especie exótica en colonizar los humedales y en las consecuencias para el ecosistema. Por esta razón, se estudian las relaciones elementales de los tejidos de macrófitas nativas y exóticas y de la calidad de la MOD que liberan al agua, así como también el estudio de las estrategias de asignación de nutrientes en los tejidos y los efectos de esta invasión sobre la estequiometría del ecosistema.

Objetivo General

Analizar las relaciones elementales C:N:P de tres macrófitas dominantes en un humedal patagónico y su impacto en la dinámica del humedal, comparando dos especies nativas (*Eleocharis pachycarpa* E. Desv. y *Carex aematorrhyncha* E. Desv.) y una especie invasora (*Potentilla anserina*).

Objetivos Específicos

1. Analizar las relaciones elementales C:N:P de los tejidos vegetales (partes aéreas y radiculares) de las tres macrófitas, bajo condiciones de sequía e inundación.
2. Analizar las relaciones elementales C:N:P de los lixiviados provenientes de esas macrófitas como fuente importante de MOD del humedal.
3. Estudiar la presencia de hongos micorrízicos endófitos en las raíces de las tres especies, considerando que este tipo de interacción puede ser utilizada diferencialmente por exóticas y nativas, como una estrategia para la obtención de los nutrientes necesarios para el crecimiento que favorecería la colonización de ambientes.
4. Por último, discutir sobre las posibles estrategias de asignación de nutrientes por parte de las tres especies estudiadas y los posibles impactos sobre la estequiometría del humedal.

Hipótesis

1. La especie invasora, *P. anserina* exhibirá diferentes estrategias en términos de asignación de nutrientes y colonización por micorrizas que las macrófitas nativas, *Eleocharis pachycarpa* y *Carex aematorrhyncha*.
2. La composición elemental de los lixiviados y los tejidos de macrófitas nativas e invasoras afectará a la MOD en términos cuali y cuantitativos.

Predicciones

1. La estrategia nutricional de la planta invasora se basará en exhibir menores relaciones C:P y C:N (mayor concentración de P y de N) situación que le permitirá colonizar exitosamente al humedal.
2. Se espera una mayor colonización por micorrizas en la planta invasora.
3. A partir de las macrófitas del humedal se obtendrán diferentes calidades de MOD en términos de composición elemental así como también en sus características ópticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Este estudio fue realizado en Laguna Fantasma, que es una laguna temporaria ubicada a los 41° 07'S, 71° 27', a 780 m.s.n.m, en Patagonia Norte, Argentina (Fig. 2.1). La laguna posee un hidroperíodo que se extiende de mayo a diciembre y en su máxima extensión posee un área de 1,1 ha (170 m de largo y 80 m de ancho aproximadamente) con una profundidad máxima de 2 m durante la época de las lluvias. Las mayores precipitaciones ocurren durante el otoño y el invierno (Mayo- Agosto) con un promedio 208.3 ± 91 mm por mes y se reducen a 24.2 ± 15 mm en primavera y verano (Septiembre- Enero). La laguna está colonizada por dos macrófitas emergentes nativas *Eleocharis pachycarpa* y *Carex aematorrhyncha* (Fig. 2.1) y por una especie exótica e invasora *Potentilla anserina* (Fig. 2.1). Estas especies son comunes y dominantes en el humedal. La vegetación rivereña es escasa, con lo cual otros aportes de materia orgánica de origen alóctono son despreciables.

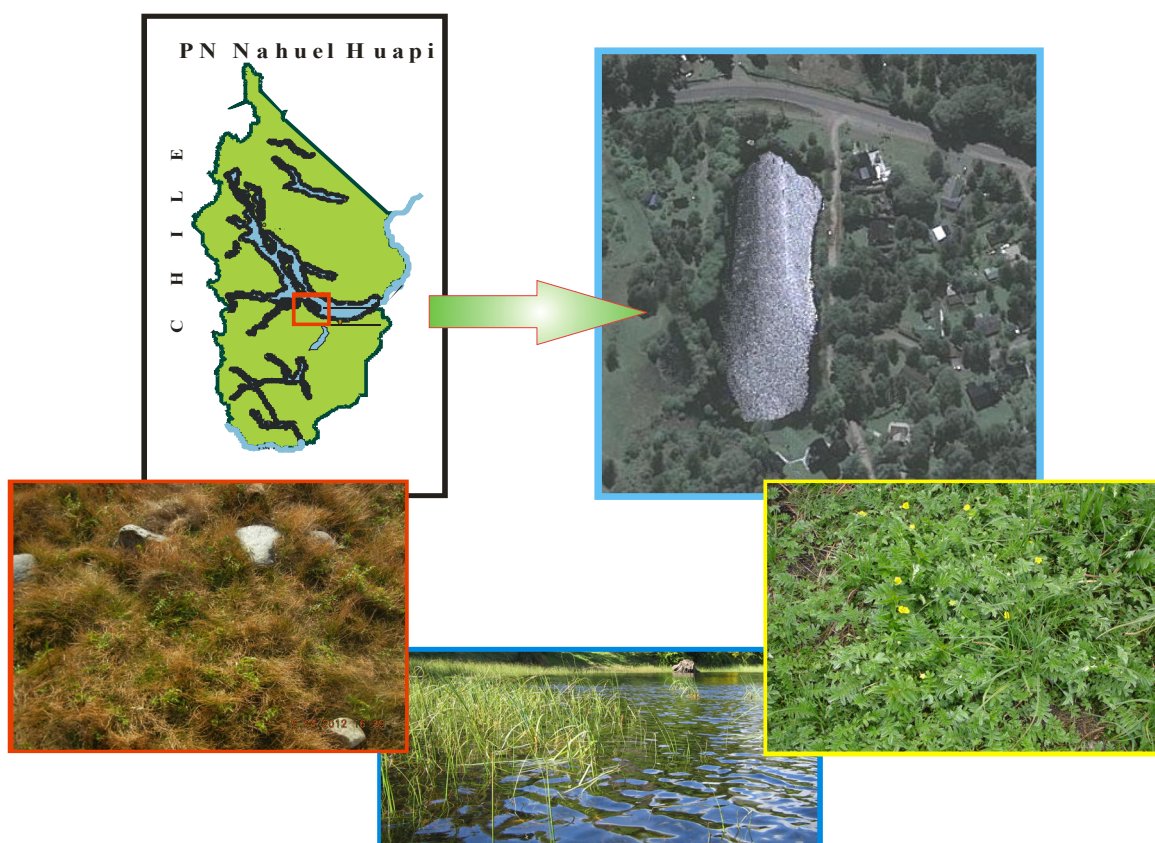


Figura 2.1. Mapa de Parque Nacional Nahuel Huapi, imagen satelital de la Laguna Fantasma y fotografías: a la izquierda en condición de sequía *Eleocharis pachycarpa* junto con *P. anserina*; al centro *Carex aematorrhyncha* formando un anillo periférico y a la derecha *P. anserina* en el periodo de sequía del humedal.

Estudio de campo

El humedal fue muestreado en 6 ocasiones desde Abril 2009 a Enero 2010. La temperatura del agua y el pH fueron medidos usando un termistor (YSI 85 Yellow Spring Instruments, USA) y un pHmetro (HI 8424 Hanna Instruments, USA), respectivamente. Para el muestreo se establecieron dos transectas ortogonales permanentes de 105 y 48 m de largo. A lo largo de las mismas se colectaron muestras de agua con botella limnológica (2L) y de sedimentos con un core de 5 cm de diámetro y 5 cm de profundidad. Las tres especies de plantas estudiadas también fueron colectadas a lo largo de la transecta a intervalos de 3 m. Las plantas fueron colectadas enteras tanto en su parte aérea como radicular. Asimismo, se consignó si las plantas fueron colectadas en puntos inundados o secos a lo largo de la transecta. Las muestras de agua, de sedimentos y las plantas fueron llevadas inmediatamente al laboratorio en recipientes adecuados. La cobertura vegetal discriminada por especie fue estimada al comienzo y al final del hidropériodo (Mayo y Diciembre 2009) en 55 puntos al azar con un cuadrado de 50 x 50 cm.

Procedimientos de laboratorio

El agua de lago fue inmediatamente filtrada con filtros GF/F muflados (a 450 °C por 2 h). Este filtrado fue utilizado para determinar la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) con un analizador de carbono (TOC-VCSH Shimadzu), el fósforo total disuelto (PTD) y el nitrógeno total disuelto (NTD). El PTD fue determinado por medio de digestión con persulfato de potasio a 1.5 atm. (121 °C) por 1 h en autoclave, seguida de una reacción ácida con molibdato de amonio (APHA, 2005). El NTD fue determinado siguiendo a Valderrama (Valderrama, 1981).

Las muestras de sedimentos fueron secadas a 60 °C hasta peso constante para luego determinar el contenido de Carbono (C), Nitrogeno (N) y Fósforo (P) particulado. Las concentraciones de C y N en las muestras fueron medidas con un analizador elemental CN (Thermo Finnigan EA 1112). El P fue medido en muestras de 2 mg de sedimento, combustionadas a 450 °C por 1 h, seguido por la reacción ácida con molibdato de amonio (APHA, 2005).

Las plantas fueron cuidadosamente lavadas con agua destilada y posteriormente se separaron las partes aéreas y las radiculares en bandejas, las que fueron dispuestas en

estufa a 60 °C hasta peso constante (aproximadamente 48 h). Cada parte fue molida con un molinillo limpio, y aproximadamente 2 mg de peso seco de la molienda fueron destinados para el análisis elemental (3 réplicas). La concentración de C y N en los tejidos fue determinada con un analizador CN (Thermo Finigan Flash EA 1112). El P fue medido en otra submuestra de molienda de 2 mg (tres réplicas) los que fueron combustionadas a 450 °C por 1 h, seguido por la reacción ácida con molibdato de amonio (APHA, 2005).

Para el estudio de las micorrizas se preservaron 10 raíces jóvenes de cada planta, en etanol al 50 %. Las raíces fueron clarificadas en KOH (hidróxido de potasio) al 10 % (w/v), acidificadas con HCL al 5 % (v/v), teñidas con Tryphan Blue (Brundrett *et al.*, 1994) y luego cortadas en piezas de 1 cm. Las estructuras típicas de la colonización por micorrizas arbusculares (MA) (hifas, arbusculos, vesículas, rulos) y por el hongo septado oscuro (HSO) (hifas oscuras, microesclerocios, hifas hialinas) fueron identificados y cuantificados de acuerdo a su presencia-ausencia en el campo del microscopio (Daleo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2010) usando un microscopio directo Olympus BX50 a 400x.

El análisis elemental de los lixiviados fue llevado a cabo también para las tres especies estudiadas. Para obtener los lixiviados, las partes aéreas de cada planta fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada, secadas a temperatura ambiente y luego 1 g de peso seco fue colocado en 100 mL de agua MilliQ y dejado en heladera a 4 °C por 48 h siguiendo a Anesio *et al.* (Anesio *et al.*, 2000). El agua resultante fue filtrada por filtros GF/F premuflados (Osmonics). En todos los casos, los lixiviados fueron obtenidos en 4 réplicas. Todo el material de vidrio utilizado fue previamente lavado con ácido y muflado a 450 °C por 1 h. El PTD, el NTD y el COD fueron determinados con la misma metodología utilizada para el agua de lago. Además se realizaron escaneos espectrofotométricos desde 250 a 790 nm para cada lixiviado en cubetas de cuarzo de 5 cm usando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV2450.

Análisis estadísticos

Para determinar diferencias significativas entre C, N y P en las diferentes partes (aérea y radicular) de los tejidos de las plantas y en dos diferentes condiciones del humedal (condición inundada y seca), se utilizó un ANOVA de dos vías, considerando las dos especies y las partes vegetales como factores. Las diferencias entre C, N y P en los lixiviados de las tres especies estudiadas fueron analizadas utilizando un ANOVA de

una vía. El porcentaje de infección en las raíces por los distintos tipos de hongos micorrízicos (MA o HSO) en cada especie fue analizado utilizando un ANOVA de una vía. Cuando el modelo de ANOVA fue significativo se aplicó un test *a posteriori* de Tukey. Las pruebas de ANOVA fueron realizadas mediante el programa SigmaPlot (version 11.0, software package).

El análisis de covarianza (ANCOVA) se aplicó para evaluar si había diferencias en la concentración de P entre *E. pachycarpa* (nativa) y *P. anserina* (exótica) usando las partes de las plantas (aérea vs. radicular) y la condición (seca vs. inundada) como tratamientos y el tiempo como covariable, para evitar su efecto en la variable. Los datos de la concentración de P fueron transformados a logaritmo, y el tiempo fue usado como una variable categórica (cada ocasión de muestreo). El ANCOVA fue aplicado mediante el programa STATISTICS para Windows. La homogeneidad de varianza fue evaluada a través del test de Levene's con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Cuando este supuesto no se cumplió después de la transformación de los datos (log), el test no paramétrico de Kruskal-Wallis fue aplicado en lugar del ANOVA de una vía.

Las unidades de absorbancia (A) fueron calculadas de la misma manera que fue descrita en el capítulo I de esta Tesis. El tamaño molecular relativo fue estimado usando la relación $a_{250}:a_{365}$ (Pérez & Sommaruga, 2006), y el color del agua como la absorbancia a 440 nm (a_{440}) todo determinado en una cubeta de cuarzo en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV 2450 siguiendo a Pace & Cole (Pace & Cole, 2002).

RESULTADOS

La distribución de las tres especies estudiadas en el ambiente fue heterogénea. La nativa *Carex aematorrhyncha* fue dominante en la zona litoral formando un anillo periférico. La zona interna del anillo fue ocupada por la nativa *Eleocharis pachycarpa* y por la exótica *Potentilla anserina* (Fig. 2.1). La cobertura vegetal de las diferentes especies al comienzo y el final del hidropériodo y para el período de muestro 2009-2010, fue estimada en 60 % *E. pachycarpa*, 30 % *P. anserina*, y 10 % *C. aematorrhyncha*. Sin embargo, es importante mencionar que durante el período de inundación las partes aéreas de la exótica *P.anserina* decaen aportando una gran cantidad de MO al ambiente, subsistiendo las raíces en los sedimentos inundados.

La temperatura del agua osciló entre 4.81 ± 2.88 °C en otoño-invierno (Mayo-Agosto) y 14.47 ± 2.95 °C en primavera-verano (Septiembre-Enero). Con respecto a la concentración de nutrientes en el agua y los sedimentos no se observaron diferencias significativas en los períodos otoño-invierno y primavera-verano (Fig. 2.2). Sin embargo, la concentración del COD en el agua fue significativamente diferente entre ambos períodos (Kruskal–Wallis, $H_{(1,10)} = 7.500$, $P = 0.004$), observándose los mayores valores en primavera-verano (Fig. 2.2).

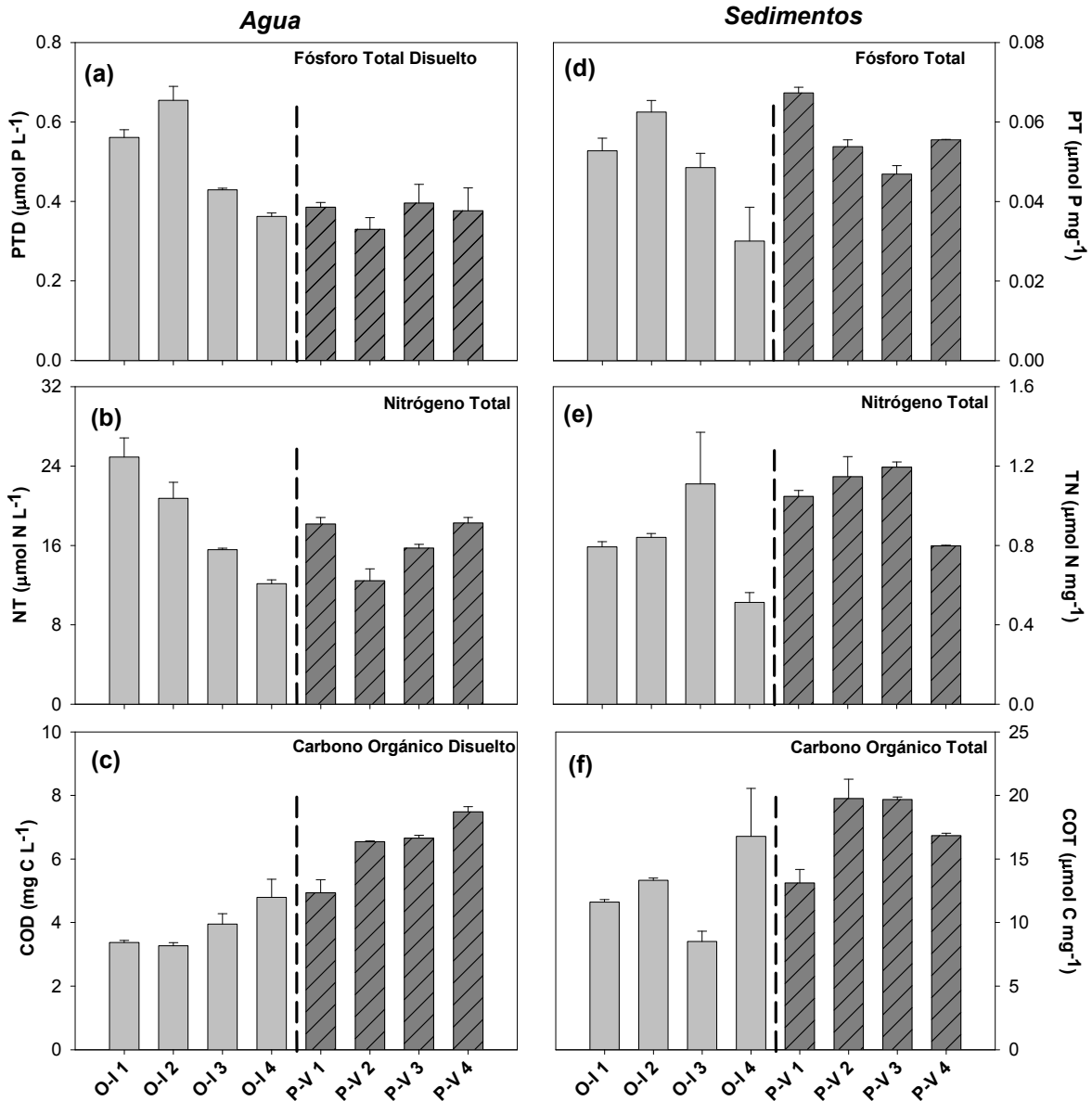


Figura 2.2. (a) Fósforo Total Disuelto (PTD), (b) Nitrógeno Total, y (c) Carbono Orgánico Disuelto (COD) en el agua. (d) Fósforo Total (PT), (e) Nitrógeno Total (NT), y (f) Carbono Orgánico Total (COT) en sedimentos. Los valores están dados como promedio \pm error estándar. O-I son muestras tomadas en el periodo inundado (otoño-invierno) y P-V son muestras tomadas en el periodo seco (primavera-verano). La línea punteada divide ambos periodos.

Las relaciones elementales C:N:P

En cuanto a las relaciones elementales (C:N:P) en el tejido vegetal, se hallaron diferencias significativas al comparar las plantas colectadas en condición inundada y en condición seca. Bajo condiciones de inundación, la relación C:P varió significativamente entre especies (ANOVA de dos vías; $F_{(2,33)}=14.513$, $P < 0.001$) y entre partes de las plantas (ANOVA de dos vías; $F_{(1,33)}= 7.342$, $P= 0.011$). En particular, la especie exótica (*P. anserina*) exhibió la relación C:P más alta en las partes aéreas (Test de Tukey, $q_{\text{aérea vs. radicular}}= 3.754$, $P= 0.013$) (Fig. 2.3a). Por otra parte, la relación C:P en las raíces de la planta exótica fue dos a tres veces menor (indica mayor concentración de P en las raíces) que en las dos macrófitas nativas emergentes (Test de Tukey, $q_{\text{Potentilla vs. Carex}}= 5.798$, $P= 0.001$; $q_{\text{Potentilla vs. Eleocharis}}= 3.829$, $P= 0.030$) (Fig. 2.3a). Por el contrario, las partes aéreas de *C. aematorrhyncha* tuvieron una mayor relación C:P (indica menor concentración de P) que las otras dos especies (Test de Tukey, $q_{\text{Carex vs. Potentilla}}= 4.945$, $P= 0.004$; $q_{\text{Carex vs. Eleocharis}}= 3.616$, $P= 0.042$) (Fig. 2.3a).

En cuanto a la relación C:N se observaron diferencias significativas entre las especies (ANOVA de dos vías; $F_{(2,35)}= 19.039$, $P < 0.001$). En particular, *C. aematorrhyncha* exhibió las mayores relaciones C:N de las tres especies (Test de Tukey, $q_{\text{Carex vs. Potentilla}}=7.938$, $P < 0.001$, y $q_{\text{Carex vs. Eleocharis}}= 7.078$, $P < 0.001$) aunque no se detectaron diferencias entre las otras dos especies (Fig. 2.3b).

Bajo la condición de sequía, se encontró una interacción significativa en la relación C:P entre especies y partes de las plantas (ANOVA de dos vías, $F_{(2,20)}= 6.341$, $P= 0.010$). *Eleocharis pachycarpa* exhibió la relación más baja de C:P en las raíces (mayor concentración de P), pero las diferencias fueron significativas sólo al comparar con la otra especie nativa, *Carex aematorrhyncha* (test de Tukey, $q_{\text{Eleocharis vs. Carex}}= 4.590$, $P= 0.014$) (Fig. 2.3c) y sin diferencias con la especie exótica (test de Tukey, $q_{\text{Eleocharis vs. Potentilla}}=2.999$, $P= 0.119$) (Fig. 2.3c). Con respecto a las partes aéreas no se encontraron diferencias significativas entre las especies de plantas estudiadas (test de Tukey, $P > 0.05$) (Fig. 2.3c). En cambio, en la relación C:N, sólo se encontró una diferencia marginal entre partes (aérea y raíz) (ANOVA de dos vías, $F_{(1,20)}= 4.547$, $P= 0.050$) (Fig. 2.3d).

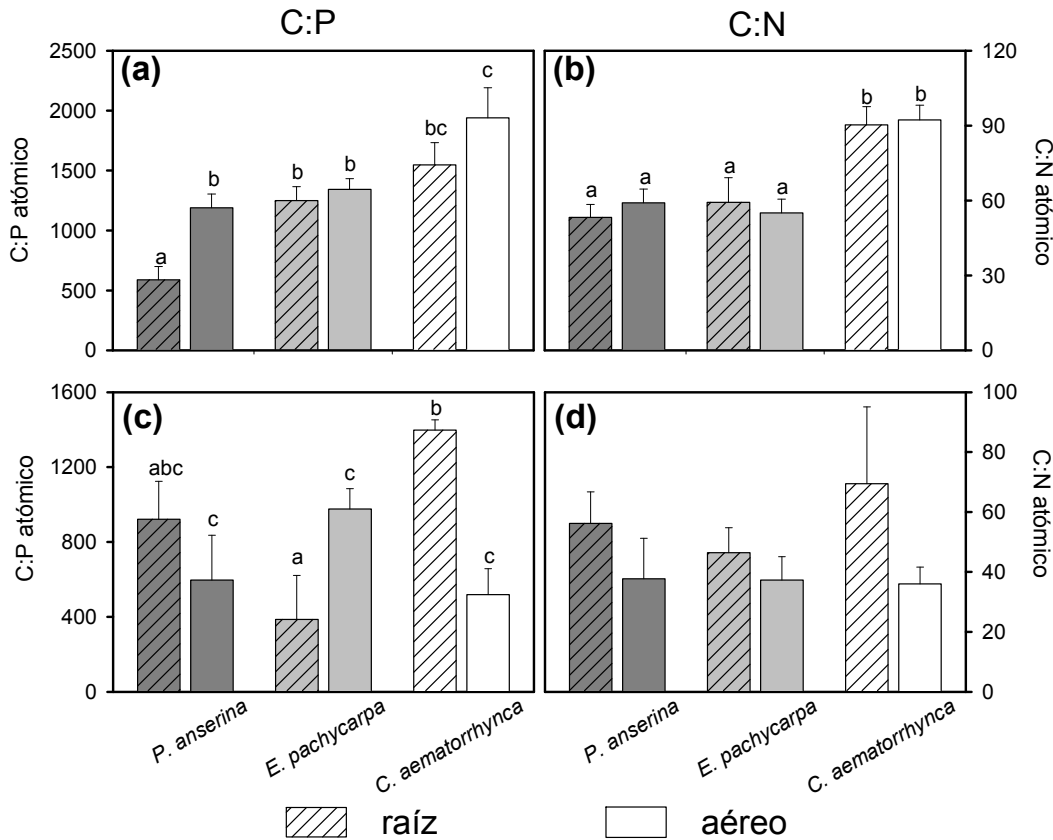


Figura 2.3. Las relaciones elementales (C:P y C:N) en las partes vegetales, aérea y raíz, de las tres especies estudiadas (*P. anserina*, *E. pachycarpa*, y *C. aematorrhyncha*); (a) y (b) plantas colectadas en condición es de inundación, y (c) y (d) plantas colectadas en condición seca. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies y partes vegetales.

Analizando las concentraciones de P, para la especie exótica, se halló una interacción entre las condiciones (inundación y sequía) y entre las partes vegetales (aérea y radicular). Las partes aéreas de *P. anserina* tuvieron una concentración de P dos veces mayor en la condición de sequía comparada con la de inundación (ANCOVA $F_{(1,77)} = 15.597$, $P < 0.001$) (Fig. 2.4 izquierda). Por otro lado, la concentración de P en las raíces fue significativamente mayor en la condición inundada que en la seca. Para la especie nativa *E. pachycarpa*, las concentraciones de P variaron entre ambas condiciones (seca vs. inundada) y no entre partes (aérea vs. radicular) (ANCOVA, $F_{(1,42)} = 12.778$, $P < 0.001$) (Fig. 2.4 derecha). En los dos casos, no hallamos una interacción entre la covariable tiempo y los tratamientos (ANCOVA, *E. pachycarpa* $F_{(1,42)} = 1.978$, $P < 0.167$; *P. anserina* $F_{(1,77)} = 0.733$ $P = 0.394$).

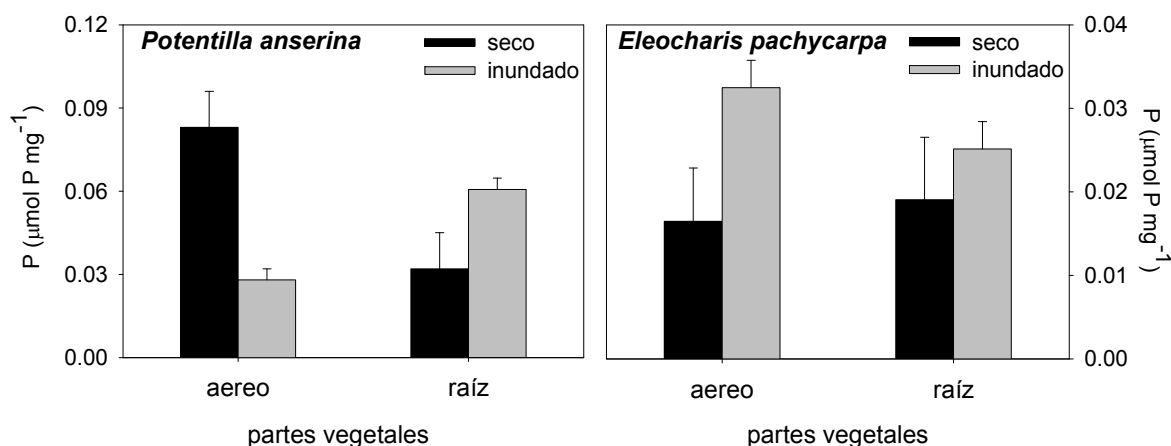


Figura 2.4. Concentración de fósforo (P) en la especie exótica *P. anserina* y en la macrófita nativa *E. pachycarpa*, en el período seco (barra oscura) e inundado (barra clara) y en las partes vegetales (aéreo vs. raíz).

Análisis de Micorrizas

El análisis de las asociaciones micorrízicas estudiadas, evidenció diferencias en el tipo y el grado de colonización hallado en las macrófitas estudiadas (ANOVA de dos vías, $F_{(2,12)} = 26.030$, $P < 0.001$). La infección con micorrizas arbusculares fue mayor en la exótica *P. anserina* (Fig. 2.5 a) que en la nativa *C. aematorrhyncha* (test de Tukey, $q_{Potentilla \text{ vs. } Carex} = 5.784$, $P = 0.011$), mientras que la infección con *Hongos Septados Oscuros* (HSO) siguiendo a Jumpponen (Jumpponen, 2001) fue dominante en las dos especies nativas (Fig. 2.5 b) en comparación con la exótica (test de Tukey, $q_{Potentilla \text{ vs. } Eleocharis} = 6.357$, $P = 0.007$, $q_{Potentilla \text{ vs. } Carex} = 8.564$, $P = 0.001$) (Fig. 2.6). Considerando el tipo de infección en cada especie, la nativa *E. pachycarpa* no presentó diferencias significativas entre la infección con uno u otro tipo de hongo (MA y HSO) (test de Tukey, $q_{MA \text{ vs } HSO} = 2.087$, $P = 0.184$) (Fig. 2.6).

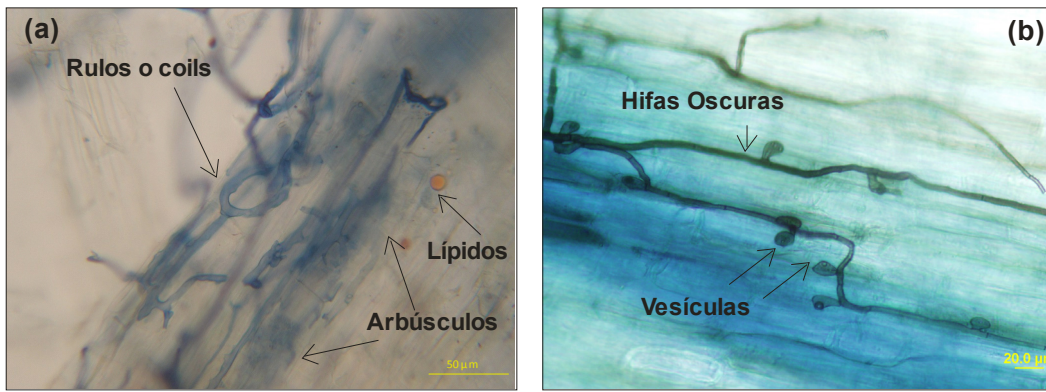


Figura 2.5. (a) Foto de raíz de *P. anserina* teñida con Tryphan Blue, donde se evidencian las MA y sus estructuras diagnóstico, (b) raíz de *E. pachycarpa* teñida con Tryphan Blue, donde se evidencian los HSO y sus estructuras diagnóstico.

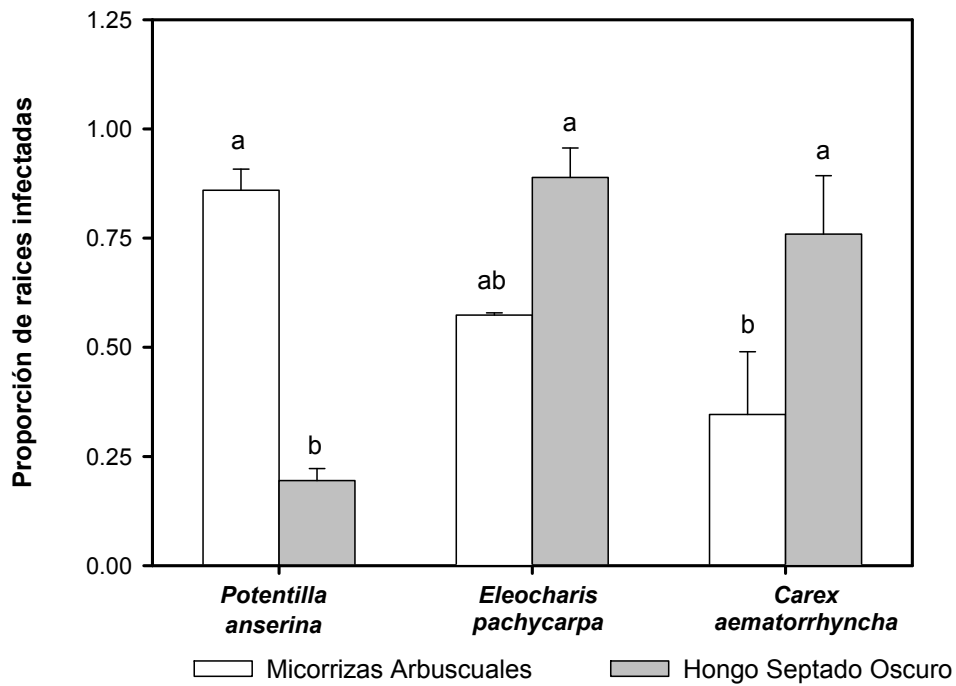


Figura 2.6. Proporción de las raíces infectadas en cada especie, con los dos tipos de hongos micorrízicos estudiados. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tipos de colonización.

Análisis de lixiviados como fuente de MOD

La composición elemental de los lixiviados mostró diferencias entre las especies. La nativa *E. pachycarpa* exhibió la mayor concentración de nutrientes (P y N) en comparación con las otras dos especies (ANOVA, $F_{(2,11)}= 198.113$, $P < 0.001$, y $F_{(2,11)}= 80.766$, $P < 0.001$, respectivamente) (Fig. 2.7 a y b); mientras que la exótica *P. anserina* presentó la mayor concentración de C en sus lixiviados (ANOVA, $F_{(2,11)}= 80.766$, $P < 0.001$) (Fig. 2.7 c). En consecuencia, las relaciones C:P y C:N fueron menores en los lixiviados de la nativa *E. pachycarpa* (indicando mayor liberación de nutrientes en los lixiviados) que en las otras dos especies (ANOVA, $F_{(2,4)}= 7.538$, $P= 0.011$, ANOVA, $F_{(2,4)}=9.269$, $P= 0.011$ para P y N) (Fig. 2.8a y b).

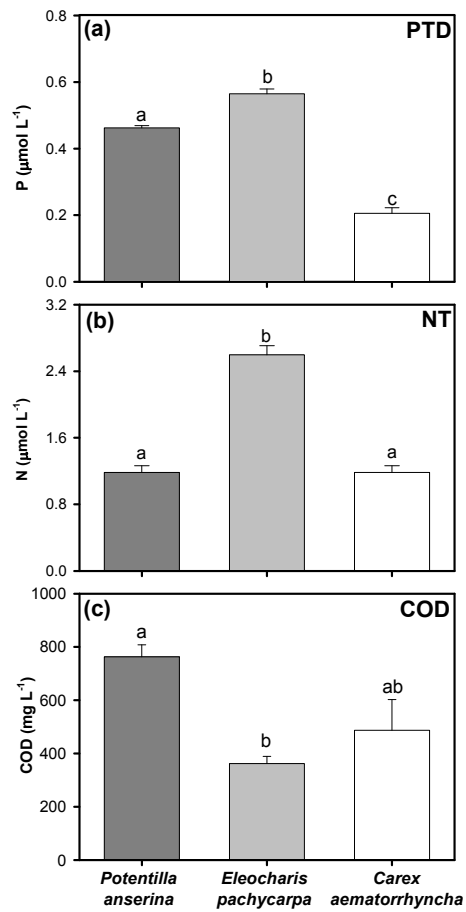
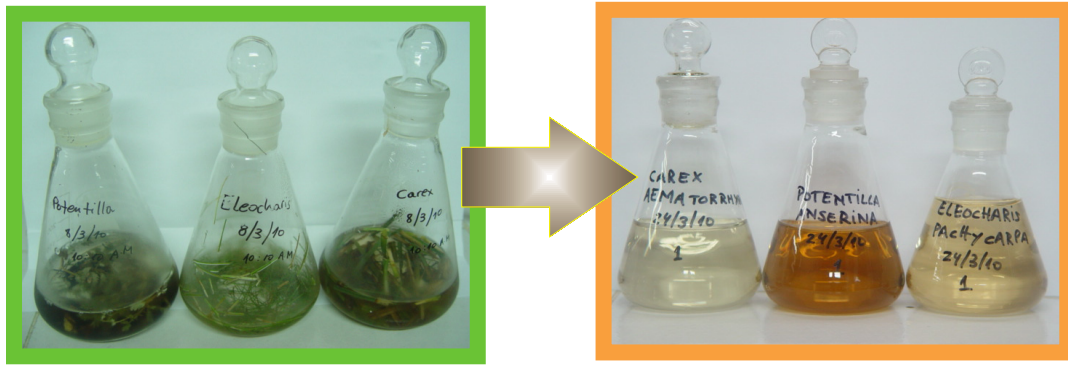


Figura 2.7. Arriba: Lixiviados obtenidos a partir de 1 g de material vegetal seco y 100 mL de agua MilliQ, para cada especie (derecha), lixiviados filtrados (izquierda). Abajo: Concentración de nutrientes en los lixiviados de las tres especies estudiadas: (a) Fósforo (P); (b) Nitrógeno (N) y (c) Carbono (C), *P. anserina*, *E. pachycarpa*, y *C. aematorrhyncha*. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies.

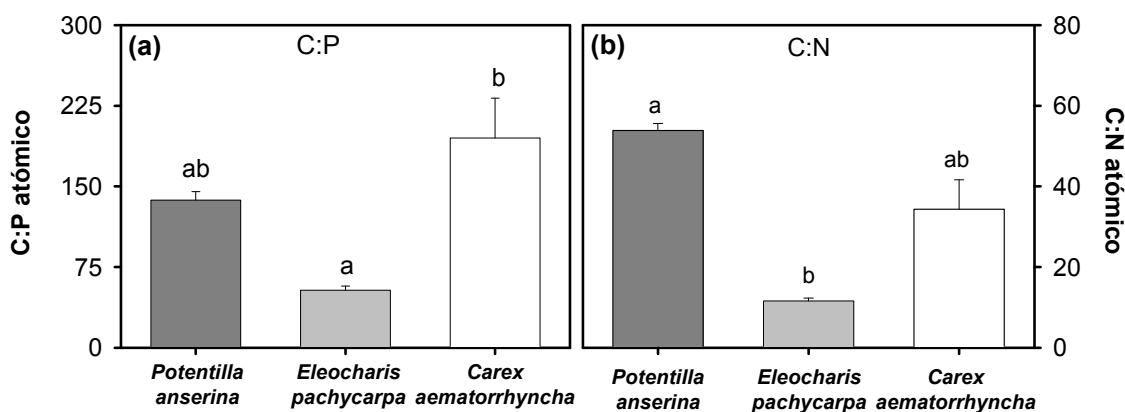


Figura 2.8. Las relaciones elementales en los lixiviados de las tres especies (*P. anserina*, *E. pachycarpa* y *C. aematorrhyncha*): (a) C:P y (b) C:N. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies.

Los espectros de absorbancia de los lixiviados exhibieron un patrón unimodal en las tres especies. Las nativas *E. pachycarpa* y *C. aematorrhyncha* exhibieron el pico máximo de absorbancia a los 250 nm, mientras que la exótica *P. anserina* tuvo la mayor absorbancia entre los 250 y 450 nm (Fig. 2.9a). El tamaño molecular medio de la MOD de los lixiviados, indicado por la relación $a_{250}:a_{365}$, fue significativamente diferente entre las tres especies (ANOVA de una vía, $F_{(2,11)} = 60.899$, $P < 0.001$). La relación $a_{250}:a_{365}$ indicó que los lixiviados de *E. pachycarpa* estaban compuestos por las moléculas de menor peso molecular (indicado por la mayor relación $a_{250}:a_{365}$), mientras que la exótica *P. anserina* mostró valores intermedios en comparación con las especies nativas (Fig. 2.9b, puntos negros). La absorbancia a 440nm (a_{440}), usada como indicador del color del agua, fue mayor en los lixiviados de *P. anserina* que en las dos especies nativas (Fig. 2.9 b, puntos blancos), lo que indica que la MOD liberada posee un color más oscuro (ver la figura 2.7 lado derecho).

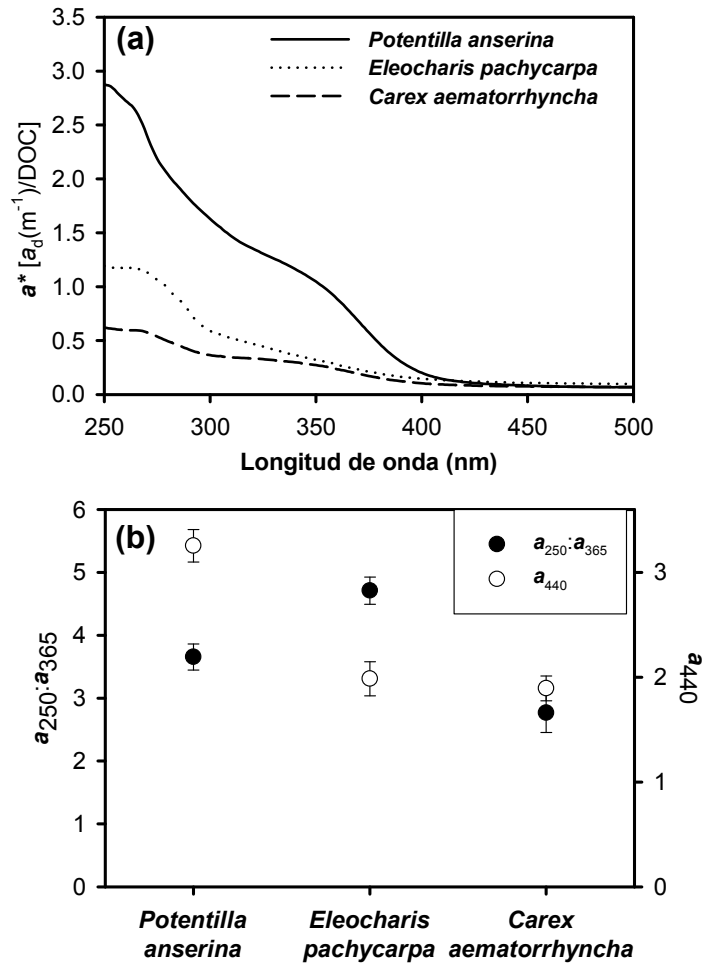


Figura 2.9. Curvas de absorción espectral (a^*_{COD}) y relación $a_{250}:a_{365}$ y a_{440} (b) en los lixiviados de las tres especies estudiadas (*P. anserina*, *E. pachycarpa*, y *C. aematorrhyncha*).

DISCUSIÓN

Las tres especies de plantas estudiadas, dominantes en el humedal, mostraron diferencias marcadas en la composición elemental de sus tejidos así como también en los lixiviados. La relación C:P de las raíces de la exótica *Potentilla anserina* fue dos a tres veces más baja (mayor concentración de P) que las macrófitas nativas en la condición inundada. Esta diferencia en la concentración de nutrientes en el tejido vegetal podría atribuirse a que las relaciones elementales son especie-específicas (Sterner & Elser, 2002; Demars & Edwards, 2007; Osborne *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de las micorrizas en las raíces favorece la toma de nutrientes (Cornwell *et al.*, 2001) siendo un factor modificador de las relaciones elementales.

En este sentido, las micorrizas arbusculares favorecen la absorción de P (Rathore & Singh, 1995), y su dominancia en las raíces de la especie exótica *P. anserina* podría explicar el bajo C:P observado en el tejido de esta especie. Por el contrario, los efectos del HSO son inciertos, porque podrían ser tanto beneficiosos como dañinos para las plantas (Jumpponen, 2001). En este caso, la alta relación C: nutrientes observada para las dos especies nativas estaría también relacionada a la dominancia del HSO entre los hongos micorrízicos de las raíces. Por otro lado, Dunham y colaboradores (Dunham *et al.*, 2003) sugieren que las plantas con micorrizas tienen mayor concentración de N en sus raíces. Sin embargo, observamos que el C:N no cambió significativamente en las condiciones secas ni inundadas ni entre especies, sugiriendo que el N es un nutriente relativamente constante en los tejidos de las tres especies estudiadas. Nuestro estudio revela que el mutualismo entre hongos micorrízicos y plantas podría conferir a las plantas exóticas, como *P. anserina*, una ventaja para obtener los nutrientes necesarios para el crecimiento, en particular de P.

Recientemente se ha relacionado de manera teórica a las invasiones biológicas con la estequiometría ecológica (González *et al.*, 2010) proponiendo que en condiciones de baja concentración de nutrientes en el ambiente, la eficiencia en el uso de los recursos es mayor, y en condiciones de altas concentraciones de nutrientes, una tasa alta de crecimiento y reproducción se podría esperar con una baja relación C: nutriente en los tejidos vegetales. Nuestros resultados indicaron que la especie exótica *P. anserina* es exitosa a bajas condiciones de nutrientes exponiendo un bajo C:P radicular. Esta situación es probable que se deba a la dominancia de MA en las raíces y sugiriendo que el mutualismo micorrízico es una importante ventaja para plantas invasoras en sistemas acuáticos temporarios que podría resultar en altas tasas reproductivas. Estos resultados

confirman nuestra primera hipótesis y apoyan nuestras predicciones 1 y 2. Además, se puede sugerir que estas especies invasoras, hacen una transferencia de P durante el período inundado desde las partes aéreas a las raíces.

Las inferencias mencionadas también se fundamentan en el hecho que *P. anserina* presentó lixiviados de comparativamente bajas concentraciones de P, pero alta concentraciones de C. La estrategia estequiométrica de esta planta invasora parecería ser la siguiente: cuando el humedal está seco, *P. anserina* comienza a brotar; el fósforo almacenado en las raíces es enviado a los nuevos brotes, reduciendo el P en las raíces (Fig. 2.3) y aumentando su relación C:P (Fig. 2.4). Cuando el humedal se inunda, el P es enviado a las raíces disminuyendo la relación C:P (Figs. 2.3 y 2.4). Esta estrategia le confiere a la especie la ventaja de ser enriquecida con P cuando comienza la temporada de crecimiento. Es importante mencionar que la concentración de nutrientes en los sedimentos no varió a lo largo del hidropériodo; indicando que las plantas tuvieron similares concentraciones de nutrientes para el crecimiento. Por lo tanto, no podrían atribuirse a estas diferencias a las diferencias estequiométricas observadas en las plantas del humedal (ver Fig. 2.2).

Con respecto al impacto potencial de invasiones de plantas terrestres en los humedales o lagunas temporarias, es importante considerar la liberación de nutrientes al ambiente durante los periodos de inundación cuando las partes aéreas decaen al ambiente. Luego de la inundación y seguido a la muerte celular de los tejidos anegados ocurre un pulso de MOD que es liberado desde el tejido de las macrófitas al ambiente acuático (Bertilsson & Jones, 2003). Esta MOD procedente de los lixiviados es una de las fuentes más importantes para el crecimiento de la comunidad bacteriana (Anesio *et al.*, 1999; Bastidas Navarro *et al.*, 2009), y es crucial en la transferencia de materia y energía en las redes tróficas acuáticas (Osborne *et al.*, 2007). En nuestro estudio, los resultados obtenidos de la composición de los lixiviados revela que *P. anserina* libera una MOD de alto peso molecular con un alto grado de color y una alta relación C: nutrientes, en comparación con las macrófitas nativas (Figs. 2.8 y 2.9). Estos resultados también confirman nuestra segunda hipótesis y apoyan nuestra tercera predicción. La alta absorbancia detectada para *P. anserina* en el rango de las radiaciones UV (ultravioleta entre 250 y 350 nm) indica una alta proporción de materia orgánica coloreada liberada en sus lixiviados, a diferencia de las nativas cuya MOD exhibe menores absorbancias en ese rango (Fig. 2.9). En un estudio reciente, Cáceres y colegas (Caceres *et al.*, 2008) observaron que un aumento en el suministro de nutrientes debido

a la caída de hojas estacional, causa una disminución en la disponibilidad de luz, alterando el equilibrio de nutrientes para los productores primarios, y produciendo un efecto de sombra que reduce la concentración de clorofila. Debido a que los lixiviados de la exótica *P. anserina* son de color oscuro, con una absorción máxima en el rango del UV, nosotros podemos predecir que el ingreso de estos lixiviados podría afectar a las algas fitoplanctónicas en el humedal. Al mismo tiempo, este tipo de MOD produce un sombreado para la RUV (Radiación Ultravioleta) que protege a las comunidades planctónicas (Souza *et al.*, 2010).

Por otro lado, el bajo peso molecular, (alta relación $a_{250}:a_{365}$) observado en los lixiviados de *Eleocharis pachycarpa* resalta la importancia del efecto de esta planta nativa sobre la comunidad microbiana. El peso y el tamaño molecular de la MOD han sido considerados como factores que influyen actividades microbianas, tales como el crecimiento bacteriano y la utilización del carbono y los nutrientes (Anesio *et al.*, 2000; Bastidas Navarro *et al.*, 2009; Bastidas Navarro & Modenutti, 2010). Considerando la relación C: nutrientes, se ha sugerido que la eficiencia en el crecimiento bacteriano disminuye cuando el C:N atómico del sustrato es mayor a 10 (Del Giorgio & Cole, 1998). La relación C:N atómica en los lixiviados de la nativa *E. pachycarpa* fue en promedio 10, mientras que en la exótica y en la otra nativa *C. aematorrhyncha* fueron en promedio 55 y 35 respectivamente. En consecuencia, los cambios en esta relación debido a incrementos en la invasión de *P. anserina* podrían afectar a la comunidad bacteriana mediante el aumento de la limitación por N para las bacterias y algas del humedal. En tal sentido se ha indicado que la estructura de las comunidades de plantas podría ser un modulador importante de la calidad de la MOD y cantidad debido a las contribuciones específicas de cada especie (Osborne *et al.*, 2007). Por ello, esta comparación de los lixiviados y tejidos de especies nativas e invasoras en la Patagonia sugiere que diferencias en las relaciones elementales de los tejidos de las plantas se relaciona con estrategias distintivas de las especies que podrían causar un impacto directo en el humedal vía la MOD y la cadena trófica microbiana.

En conclusión, este capítulo señala que la especie invasiva *Potentilla anserina* y las nativas *Eleocharis pachycarpa* y *Carex aematorrhyncha* presentaron notables diferencias en las estrategias de asignación de nutrientes en sus partes aéreas y radiculares durante sus etapas de crecimiento y senescencia. Nuestros resultados muestran que *P. anserina* presentó una asignación de nutrientes (especialmente P) en las raíces que podría relacionarse con una predominancia del tipo micorriza arbuscular en

sus raíces. Durante el período inundado con el decaimiento de las partes aéreas, la planta invasora libera MOD de alto peso molecular, coloreada, y con una alta relación C: nutrientes en comparación con las macrófitas nativas. Así, la invasión de esta especie terrestre durante los períodos secos del humedal, podría en los periodos inundados, afectar la calidad de la MOD liberada y enriquecer los sedimentos. Como consecuencia de estos desbalances elementales, podrían esperarse importantes impactos ecológicos que podrían afectar a las comunidades planctónicas y bentónicas del ambiente, incluyendo la facilitación a nuevas especies invasoras.

CAPÍTULO III

PRODUCCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DISUELTA Y PARTICULADA DE MACRÓFITAS NATIVAS Y EXÓTICAS EN LA PATAGONIA: EFECTO DE LA RADIACIÓN SOLAR



INTRODUCCIÓN

La descomposición de la materia orgánica es uno de los procesos clave en el flujo del carbono y en el ciclo de los nutrientes (Hoorens *et al.*, 2003). En humedales de agua dulce, las macrófitas emergentes son una fuente importante de materia orgánica tanto particulada (MOP) como disuelta (MOD) (Wetzel, 2001). En muchas macrófitas emergentes, los tallos senescentes o las hojas comienzan a decaer sin desprenderse, resultando en grandes cantidades de detritos de plantas muertas en pie, que contribuyen con grandes cantidades de MOP que ingresa al sistema (Newel, 1993; Gehrke *et al.*, 1995). El detrito de estas macrófitas emergentes lixivía materia orgánica que, a su vez, puede ser transformada fotoquímicamente (Wetzel, 1995; Denward & Tranvik, 1998).

Las diferentes especies vegetales de los humedales producen diferentes calidades de MOD (Osborne *et al.*, 2007). Estas diferencias impactan en la cantidad y calidad de la MOD de los humedales principalmente durante la senescencia, debido a la

variabilidad en la descomposición de los tejidos y las subsecuentes tasas de lixiviación (Bertilsson & Jones, 2003). La MOD puede clasificarse como lábil (MODL) o refractaria (MODR) de acuerdo al tiempo que tarda en ser removida por las bacterias del ambiente (Kragh & Søndergaard, 2004). La MODL está compuesta principalmente por moléculas de bajo peso molecular tales como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas, nucleótidos y esteroides (Amon & Benner, 1996; Münster, 1999). Por otro lado, la MODR comprende mayormente ácidos húmicos de alto peso molecular y alto grado de aromaticidad (Miller *et al.*, 2009; Bastidas Navarro & Modenutti, 2010), siendo esto último considerado recalcitrante, especialmente para su utilización por bacterias. Estas moléculas pueden ser fotooxidadas generando liberación de carbono inorgánico disuelto (Anesio *et al.*, 1999) o moléculas orgánicas de menor tamaño (Kieber *et al.*, 1989), las cuales se encuentran más disponibles para la utilización bacteriana que los compuestos originales.

En los ecosistemas terrestres, la radiación solar juega un importante rol en la descomposición de la materia orgánica de la hojarasca (Austin & Vivanco, 2006). De la misma manera, en los ecosistemas acuáticos la radiación solar actúa como un factor determinante en la transformación fotoquímica de la MOD (Osborne *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios sobre los efectos de la radiación solar sobre la descomposición de macrófitas acuáticas son escasos (Denward & Tranvik, 1998; Anesio *et al.*, 1999). Particularmente, la radiación ultravioleta (RUV) tiene varios efectos potenciales sobre la descomposición de los tejidos de macrófitas. La descomposición puede verse acelerada debido a la fotodegradación abiótica del detrito. Asimismo, puede disminuir la velocidad de descomposición afectando la biodegradabilidad de los tejidos vivos (Gehrke *et al.*, 1995; Rozema, 1997), o provocando un efecto negativo directo sobre las bacterias (Zepp *et al.*, 1995). La interacción entre la MOD y la RUV resulta en varias reacciones fotoquímicas conduciendo a una disminución de la absorbancia espectrofotométrica, disminución del tamaño molecular, y pérdida progresiva de color resultando en un aumento de la penetración de la luz a través de la columna de agua (De Lange & Lüring, 2003). Además, la RUV aumenta la degradación de las macrófitas aumentando la producción de MOD a través de lixiviados, los cuales constituyen una importante fuente de nutrientes esenciales (nitrógeno y fósforo) para el humedal (Lewis, 2002; Qualls & Richardson, 2003; Bastidas Navarro & Modenutti, 2010; Cuassolo *et al.*, 2012).

Eleocharis pachycarpa E. Desv. es una macrófita nativa emergente y perenne de humedales patagónicos. Por el contrario, *Potentilla anserina* L. es una especie exótica hemicriptófita que permanece en el humedal como brotes senescentes en los períodos de inundación. Estas dos especies coexisten en los humedales de Patagonia y estudios previos han demostrado que la composición elemental de los lixiviados y tejidos de ambas macrófitas difieren significativamente (Cuassolo *et al.*, 2012) (Capítulo II). Durante extensos períodos ambas plantas coexisten en humedales, sin embargo, con lluvias copiosas que resultan finalmente en inundaciones o cambios de nivel de agua del humedal, ambas macrófitas son cubiertas por las aguas originándose procesos de descomposición con producción de lixiviados y detritos dentro del humedal. Por otra parte, en la región Patagónica se ha observado que la incidencia de la radiación ultravioleta (RUV) puede ser importante en relación con otras áreas del mundo (Villafañe *et al.* 2001), lo que interactuaría con esta producción de lixiviados y detritos.

Objetivo General

Considerando el posible efecto de la exposición a la RUV al que estaría expuesta la Patagonia (Villafañe *et al.* 2001), en el presente capítulo se analizó de qué manera las diferentes condiciones lumínicas (radiación solar total, radiación fotosintéticamente activa y oscuridad) afectan la producción y calidad de la MOP y MOD de las macrófitas nativa *E. pachycarpa* y exótica *P. anserina*.

Objetivos Específicos

1. Analizar comparativamente las relaciones elementales C:N y C:P de los tejidos de una macrófita nativa y exótica antes y luego de un período de inundación bajo diferentes condiciones lumínicas.
2. Analizar la MOD y MOP durante la descomposición de una planta nativa y exótica bajo diferentes condiciones lumínicas.
3. Estudiar las características ópticas y la calidad de la MOD resultante de la descomposición de macrófitas nativas y exóticas.

Hipótesis

1. Las condiciones lumínicas afectarán a la producción de MOP y MOD de las plantas tanto nativas y exóticas.

Predicción

1. Bajo condiciones de radiación solar completa, incluyendo a la RUV, esperamos una mayor producción de MOP y MOD.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental

El experimento fue llevado a cabo en el predio del Centro Regional Universitario Bariloche de la Universidad Nacional del Comahue, en Bariloche, Argentina, desde el 14 de Noviembre hasta el 22 de Diciembre de 2010 (39 días en primavera tardía). Se analizó la descomposición de dos plantas: la nativa *Eleocharis pachycarpa*, y la exótica *Potentilla anserina*. Tallos y raíces enteros de ambas plantas fueron recolectados en Laguna Fantasma, descrita en el Capítulo II de esta Tesis. Las plantas fueron llevadas al laboratorio inmediatamente luego de su recolección, y lavadas cuidadosamente con agua destilada. Se utilizaron plantas vivas para simular la condición de ingreso de agua o cambio de nivel en la laguna. Las fechas de experimentación fueron aquellas de primavera cuando la Patagonia está más expuesta a un probable mayor impacto de RUV (Villafañe *et al.*, 2001).

Los experimentos de descomposición fueron realizados en mesocosmos de 15 L, llenados con agua natural de la laguna filtrada con tamiz de tamaño de poro de 20 μm para eliminar los macroinvertebrados (pH 7.5, carbono orgánico disuelto (COD) $0.81\pm 0.17 \text{ mg L}^{-1}$, nitrógeno total (NT) $57\pm 2.9 \mu\text{g L}^{-1}$ y fósforo total (PT) $9.4\pm 0.41 \mu\text{g L}^{-1}$). En cada unidad se colocó un termómetro para registrar periódicamente la temperatura.

Este experimento consistió en un diseño factorial completo para comparar la descomposición de ambas plantas bajo tres condiciones lumínicas diferentes. En cada unidad, se colocaron 15 g de peso seco de cada especie, sumergidos en agua filtrada de la laguna (filtro de 20 μm de poro para eliminar a los macroinvertebrados). El diseño experimental consistió en tres tratamientos lumínicos con tres réplicas cada uno para cada especie: Radiación Solar Total (RST), Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA) y Oscuridad (OSC). El tratamiento RST se logró cubriendo la unidad con un filtro de polietileno transparente a la RUV (85 % de transmitancia de 300 a 700 nm); y el tratamiento RFA cubriendo con un filtro de polietileno que bloquea el paso de la RUV (corte a 380 nm, con 85 % de transmitancia sobre los 400 nm). Las propiedades ópticas de este polietileno fueron analizadas previamente, utilizando un espectrofotómetro de doble haz (Shimadzu UV 2450). La radiación solar total fue medida tres veces a lo largo del experimento en días soleados (15 de Noviembre, 30 de Noviembre y 20 de Diciembre de 2010) desde las 7:00 h hasta las 21:00 h, utilizando un radiómetro PUV-

500 (Biospherical Instruments, CA, USA). Por último, el tratamiento OSC, se logró cubriendo la unidad con papel aluminio.

Durante el experimento se midió la temperatura diariamente, el pH, y la concentración de oxígeno en cada ocasión de muestreo. Estos parámetros fueron determinados utilizando para ello un oxímetro (YSI Pro ODO Yellow Spring 117 Instruments, USA) y un PHmetro (YSI Pro ODO Yellow Spring 117 Instruments, USA).



Figura 3.1. Fotografía de los mesocosmos utilizados, donde se pueden observar los tratamientos lumínicos (RSC y RFA) y el de oscuridad.

Procedimientos de laboratorio

Al comenzar el experimento cada planta fue colectada y llevada al laboratorio con el propósito de conocer sus relaciones elementales (C, N y P). Al finalizar el experimento, las plantas fueron cuidadosamente removidas de la unidad y pesadas. El agua remanente se filtró a través de una malla de 45 μm , y la MOP resultante fue suspendida en 500 mL de agua MilliQ. Luego, se filtraron 30 mL a través de filtros GF/F (Whatman) previamente pesados, para el análisis elemental de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P). Los filtros fueron secados durante 48 h a 60 °C y luego pesados nuevamente para estimar la producción de MOP de cada especie (como peso seco).

Tanto al principio como al final del experimento, cada parte de las plantas (tallos y raíces) fueron secadas (60° C durante 48 h hasta alcanzar peso constante) y molidas utilizando un mortero. Aproximadamente 2 mg de peso seco (PS) de planta fueron usados para análisis elemental. La concentración elemental (C y N) fue medida utilizando un analizador de CN (Thermo Finigan Flash EA 1112). La concentración de P fue medida luego de la combustión de 2 mg de tejidos o del filtro entero con MOP a 450 °C durante 1 h, seguida por la determinación a través del método de reducción con ácido ascórbico (APHA, 2005).

Con el objetivo de determinar la concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD) y analizar las características ópticas de la MOD se tomaron muestras de agua de 250 mL de cada unidad a lo largo del experimento, en cinco (5) ocasiones. El agua fue filtrada a través de filtros GF/F muflados (450 °C, 2 h) y la concentración de COD fue determinada a través de un analizador de carbono (TOC-VCSH Shimadzu). Finalmente, para analizar las propiedades ópticas, se realizaron escaneos espectrofotométricos (250-750 nm) utilizando para ello un espectrofotómetro de doble-haz (Shimadzu UV2450) en una cubeta de cuarzo según Pace & Cole (Pace & Cole, 2002).

Análisis estadísticos

Las diferencias entre las relaciones elementales de las plantas (C:P y C:N) al iniciar el experimento fueron analizadas a través de un ANOVA de dos vías con las especies y las partes de las plantas (tallo y raíz) como factores. Si las diferencias eran significativas, se llevaron a cabo las comparaciones *a posteriori* usando un Test de Tukey con un nivel de significancia de $P= 0.05$. Las diferencias entre especies, partes

de plantas y condiciones lumínicas, al final del experimento, fueron analizadas con ANOVA de tres vías.

Las unidades de absorbancia (A) de los escaneos realizados con el agua de los mesocosmos fueron convertidas a coeficientes de absorción a

$$a = \ln(10^A) / lc$$

donde lc es el largo de la cubeta en m. El color del agua fue estimado a través del coeficiente de absorbancia a los 440 nm (a_{440}). Las pendientes de los espectros para los intervalos entre los 275-295 nm (S_{275} - S_{295}) y 350-400 nm (S_{350} - S_{400}) fueron calculadas usando una regresión lineal de los datos del espectro transformados a logaritmo natural. Luego se calculó la relación entre S_{275} - S_{295} y S_{350} - S_{400} (*Slope Ratio*= S_R), como una estimación del peso molecular del MOD, ya que valores altos de S_R indican bajos pesos moleculares en promedio y viceversa (Helms *et al.*, 2008).

La concentración de COD y el S_R fueron analizadas con ANOVA de medidas repetidas (MR ANOVA). Para cada análisis, el factor entre sujetos fue la luz (RST, RFA y OSC) y el factor dentro de los sujetos fue el tiempo en semanas (T1, T2, T3, T4 y T5). Los supuestos de normalidad y esfericidad fueron verificados previamente. El análisis de Greenhouse-Geisser se utilizó para ajustar el nivel de P del test F cuando el supuesto de esfericidad no se cumplió. Las comparaciones *a posteriori* se realizaron aplicando un Test de Tukey. Los análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS 18.

RESULTADOS

La temperatura, el pH y la concentración de oxígeno disuelto permanecieron relativamente constante a través del experimento ($P > 0.05$). La temperatura promedio fue de 18 °C en los tratamientos RFA y RSC y levemente menor en el tratamiento OSC (17 °C). El pH mostró un decrecimiento desde 7.5 a 6.85 en los mesocosmos de *P. anserina* y de 7.5 a 6.9 en los mesocosmos de *E. pachycarpa*. La concentración de oxígeno disuelto varió entre 9 y 11 mg L⁻¹, indicando condiciones aeróbicas durante todo el período experimental.

Durante el experimento, 75 % de los días fueron claros con una alta irradiancia. En los tres días donde la luz fue medida, el total de irradiancia recibido en un día soleado promedio fue de 90.30 moles de fotón m⁻² de RFA, 21.5 KJ m⁻² nm⁻¹ de 340 nm y 0.6 KJ m⁻² nm⁻¹ de 305 nm.

Relaciones elementales C:P y C:N en los tejidos de las plantas

Las relaciones elementales (C:P y C:N) antes del experimento fueron significativamente diferentes entre las especies (ANOVA de dos vías *Potentilla* vs. *Eleocharis*; $F_{(1,14)} = 9.943$, $P = 0.009$) y las partes de las plantas (ANOVA de dos vías tallo vs. raíz; $F_{(1,14)} = 8.737$, $P = 0.013$). La relación C:P más baja se observó en las raíces de la especie exótica *P. anserina* (indicando mayor concentración de P) comparado con las raíces de la especie nativa *E. pachycarpa* (Test de Tukey, *Potentilla* vs. *Eleocharis*; $P = 0.018$, Fig. 3.2 a). La relación C:N varió significativamente entre las especies (ANOVA de dos vías; $F_{(1,14)} = 8.423$, $P = 0.014$) y las partes (ANOVA de dos vías; $F_{(1,14)} = 7.896$, $P = 0.017$). También la relación C:N fue la más baja en las raíces de la exótica (indicando mayor concentración de N) en relación a las raíces de la especie nativa (Test de Tukey, $P = 0.014$, Fig. 3.2 b).

Finalizado el experimento, la relación C:P de las plantas mostró diferencias dependiendo de la especie, partes de plantas y tratamientos lumínicos (ANOVA de 3 vías, $F_{(2,35)} = 3.614$; $P = 0.043$). *Potentilla anserina* mostró valores de C:P más bajos (mayor concentración de P) que *E. pachycarpa* en todos los tratamientos (Fig. 3.2 c). Los análisis de la relación C:N mostraron una interacción significativa entre especies y partes de las plantas (ANOVA de tres vías, $F(1,36) = 17.99$; $P < 0.0001$). El C:N fue más alto en las raíces de *P. anserina* (menor concentración de N), y en los tallos de la *E.*

pachycarpa (Fig. 3.2 d), pero no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos lumínicos (ANOVA de tres vías, $P= 0.189$).

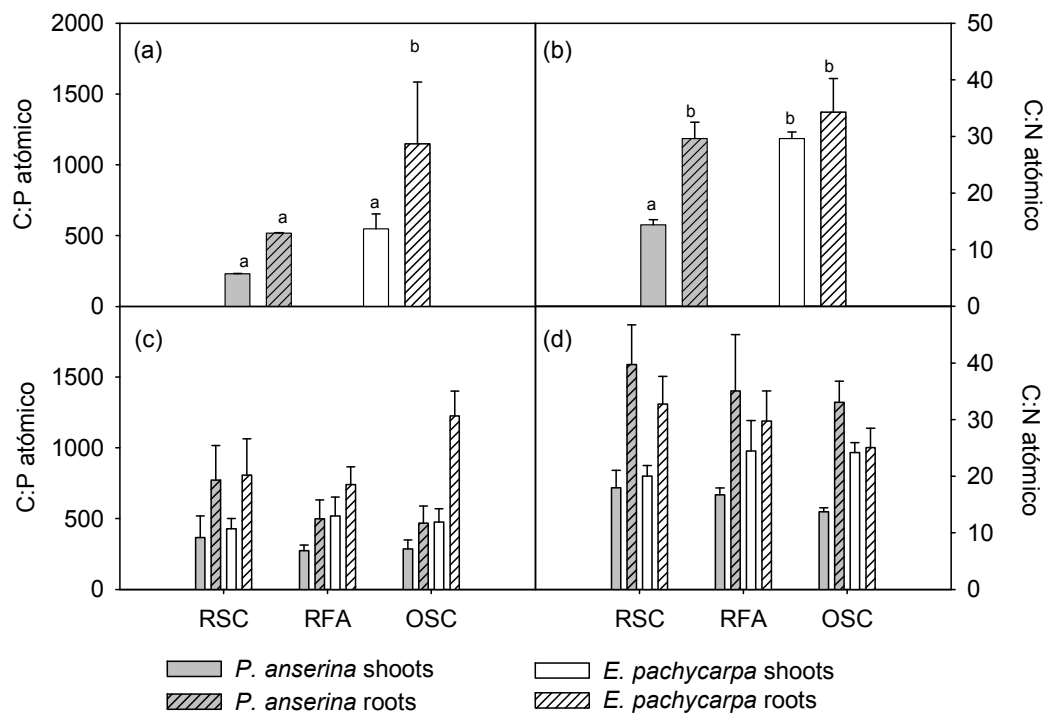


Figura 3.2. Relaciones elementales C:P y C:N en los tejidos de las plantas (*P. anserina* y *E. pachycarpa*) antes del experimento (a y b) y luego del experimento (c y d) en cada uno de los tres tratamientos. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras de error representan \pm el error standard de las medias.

Materia Orgánica Particulada (MOP)

Las dos especies difirieron en la producción de MOP, la especie nativa *E. pachycarpa* produjo altas cantidades de MOP ($6.253 \pm 0.582 \text{ mg g}^{-1}$ planta) en comparación con la exótica *P. anserina* ($3.930 \pm 0.566 \text{ mg g}^{-1}$ planta) (ANOVA de dos vías, $F_{(1,30)} = 8.185$, $P = 0.008$; Fig. 3.3). Se observó una interacción marginal entre las especies y los tratamientos lumínicos (ANOVA de dos vías, $F_{(2,30)} = 2.918$, $P = 0.073$). Bajo condiciones de radiación solar total (RST) la especie nativa *E. pachycarpa* produjo significativamente mayores cantidades de MOP (Fig. 3.3) (Test de Tukey, $P = 0.002$).

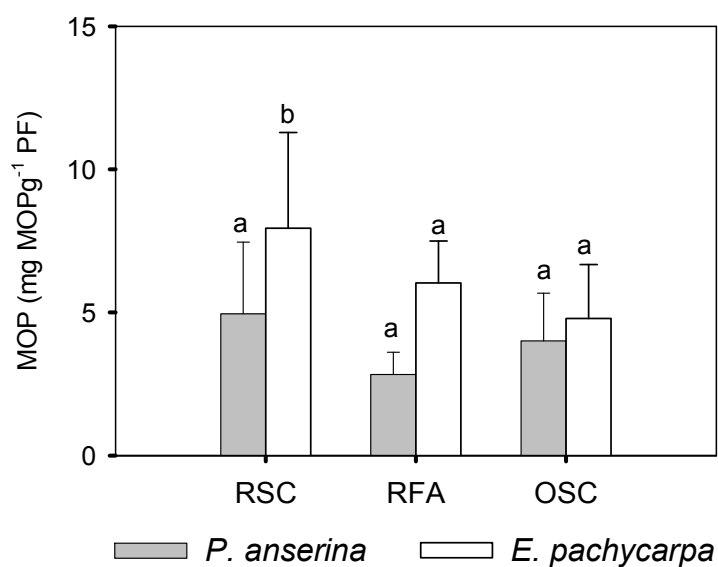


Figura 3.3. Producción de MOP por ambas especies (*P. anserina* y *E. pachycarpa*) en los tres tratamientos experimentales. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras de error representan \pm el error standard de las medias.

La relación elemental C:P mostró diferencias significativas entre especies, siendo menor en la especie exótica *P. anserina* (ANOVA de dos vías, $F_{(1;15)} = 15.575$, $P = 0.003$, Fig. 3.4). La relación C:N mostró una interacción entre especies y tratamientos (ANOVA de dos vías, $F_{(2;16)} = 4.934$, $P = 0.030$). *E. pachycarpa*, mostró MOP con la menor relación C:N en el tratamiento OSC (Test de Tukey, $P = 0.034$, Fig. 3.4).

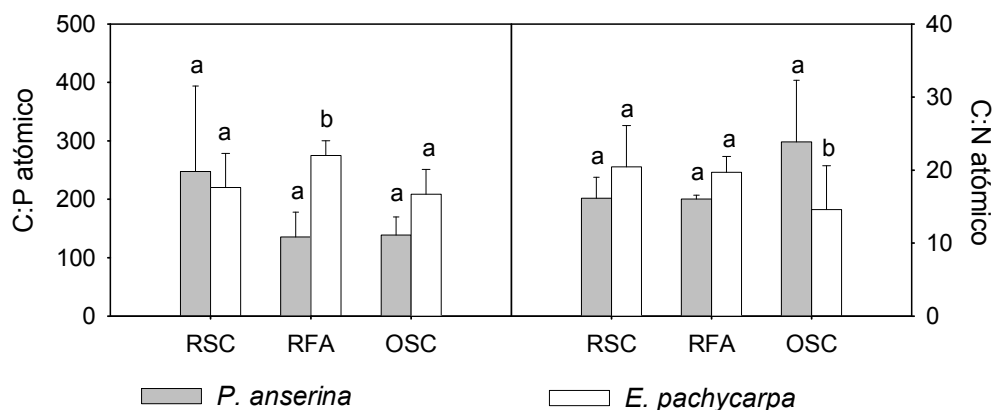


Figura 3.4. Relaciones elementales (C:P y C:N) de la MOP producida por *P. anserina* y *E. pachycarpa* en los tres tratamientos experimentales. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras de error representan \pm el error standard de las medias.

Materia Orgánica Disuelta

El efecto de las diferentes condiciones lumínicas (RST, RFA y OSC) sobre la MOD liberada al agua (cuantificada como COD) se estudió semanalmente. Se observó una interacción significativa entre el tiempo de incubación y los tratamientos (RMANOVA de tres vías; $P < 0.008$), y entre el tiempo y las especies (RMANOVA de tres vías, $P < 0.001$) (Tabla 3.1). La concentración de COD aumentó a lo largo del tiempo de 1.19 a 5.53 mg L⁻¹ en *P. anserina*, y de 0.77 a 2.48 mg L⁻¹ en *E. pachycarpa* (Fig. 3.5). La diferencia entre las dos especies fue significativa (RMANOVA de tres vías, $P < 0.0001$) (Tabla 3.1; Fig. 3.5). Finalmente, se observó que las concentración de COD en el tratamiento OSC fue significativamente menor que en los tratamientos lumínicos (Test de Tukey, OSC vs. RFA: $P < 0.001$ y OSC vs. RFA: $P < 0.001$).

Tabla 3.1. Resultados del ANOVA de medidas repetidas de tres vías para la MOD liberada por *Potentilla anserina* y *Eleocharis pachycarpa*.

<i>Test de Esfericidad de Mauchly W</i>					
Test de Mauchly W	g.l	<i>P</i>		EpsilonGreenhouse-Geisser	
0.011	9	<0.0001		0.372	
Fuente de variación	g.l ^a	SS	MS	F	P ^b
tiempo	1.489	95.413	64.091	84.912	<0.0001*
Tiempo x luz	2.977	12.504	4.200	5.564	<0.008*
tiempo x especies	1.489	15.740	10.573	14.008	<0.001*
tiempo x luz x especies	2.977	2.756	0.926	1.226	0.332
Error	16.376	12.361	0.755		
luz	2	25.376	12.688	27.625	<0.0001*
especies	1	43.201	43.201	94.060	<0.0001*
luz x especies	2	2.541	1.270	2.766	0.106
Error	11	5.052	0.459		

(a) grados de libertad calculados basados en el coeficiente de Epsilon Greenhouse-Geisser cuando el supuesto de esfericidad no se cumple.

(b) probabilidad ajustada, calculada en base al test de Epsilon Greenhouse-Geisser cuando el supuesto de esfericidad no se cumple (Mauchly's test $P < 0.05$).

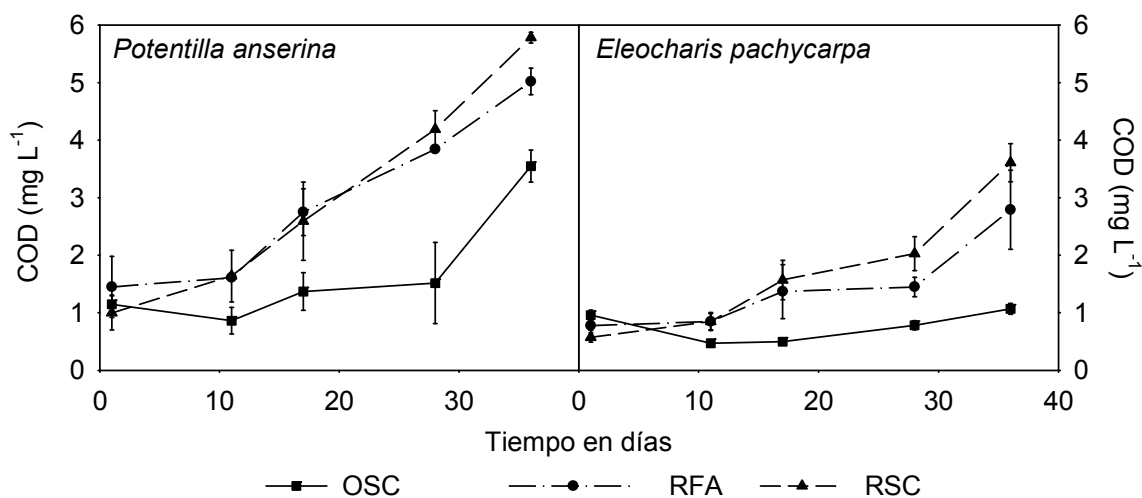


Figura 3.5. Materia Orgánica Disuelta (MOD) medida como concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD) procedente de la descomposición de ambas plantas (*P. anserina* y *E. pachycarpa*) en los tres tratamientos experimentales a lo largo del experimento. Las barras de error representan \pm el error standard de las medias.

El peso molecular relativo de la MOD (estimado como S_R) mostró ser significativamente diferente entre especies (Tabla 3.2) y exhibió una interacción entre el tiempo y las especies (Tabla 3.2, Figs. 3.6a, 3.6b). El tratamiento RSC tuvo la mayor relación S_R en ambas especies (Test de Tukey, RSC vs. RFA, $P < 0.05$; RSC vs. OSC, $P = 0.05$). A medida que transcurrió el experimento, se observó una tendencia general a la disminución del tamaño molecular (Figs. 3.6a, 3.6b). La absorbancia a los 440 nm (a_{440}), fue significativamente diferente entre especies, (RMANOVA de tres vías, $P < 0.0001$); que resultó en un incremento en el color del agua en los mesocosmos de la especie exótica ($a_{440} = 0.14$) comparado con la nativa ($a_{440} = 0.07$) (Fig. 3.6c, 3.6d).

Tabla 3.2. Resultados del MRANOVA de tres vías para la relación de pendientes (SR) para *Potentilla anserina* y *Eleocharispachycarpa*.

<i>Test de Esfericidad de Mauchly</i>					
Test de Mauchly	g.l	P		EpsilonGreenhouse-Geisser	
0.000	9	<0.0001		0.312	
Fuente de variación	SS	g.l. ^a	MS	F	<i>P</i> ^b
tiempo	1.780	1.248	1.426	71.811	<0.0001
tiempo x tratamiento	0.071	2.496	0.029	1.439	<0.277
tiempo x especies	0.361	1.248	0.290	14.576	<0.001
Tiempo x tratamiento x especies	0.027	2.496	0.011	0.550	0.628
Error	0.248	12.481	0.020		
luz	0.088	2	0.044	4.567	0.039
especies	0.991	1	0.991	102.827	0.0001
luz x especies	0.014	2	0.007	0.747	0.498
Error	0.096	10	0.010		

(a) grados de libertad calculados basados en el coeficiente de Epsilon Greenhouse-Geisser cuando el supuesto de esfericidad no se cumple.

(b) probabilidad ajustada, calculada en base al test de Epsilon Greenhouse-Geisser cuando el supuesto de esfericidad no se cumple (Mauchly's test $P < 0.05$).

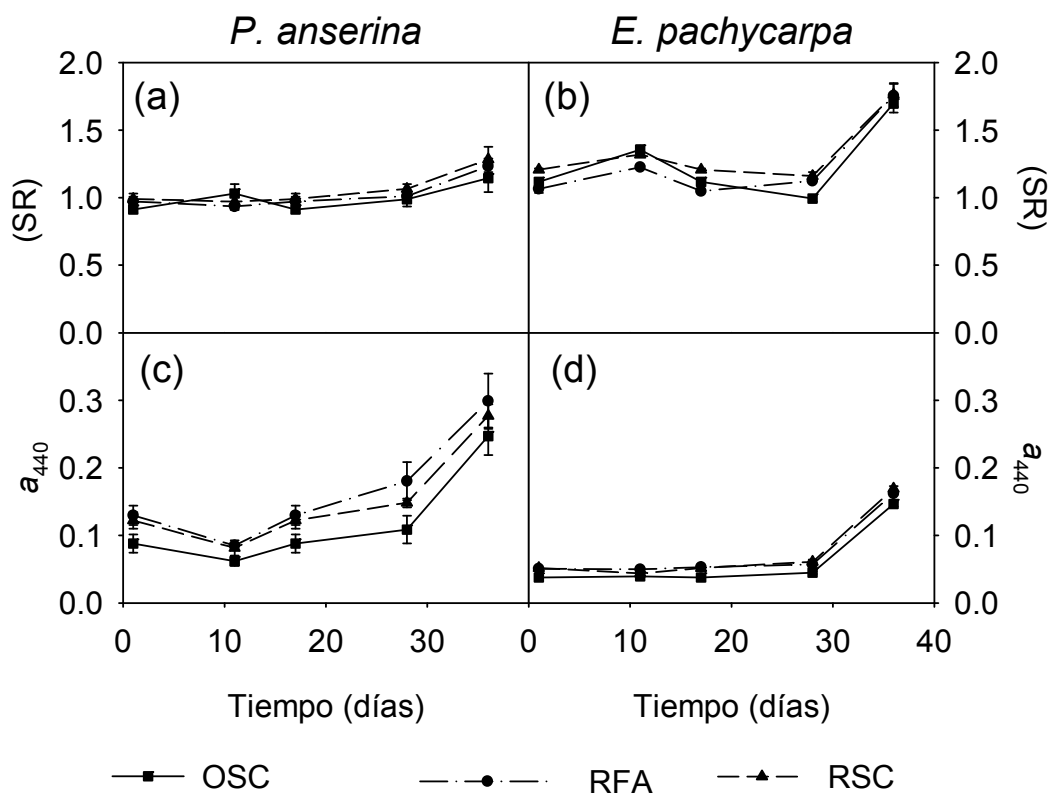


Figure 3.6. Relación de pendientes (SR) (a y b) y color del agua [ad(440)] (c y d) en el experimento de descomposición de ambas especies (*P. anserina* y *E. pachycarpa*). Valores como: promedios \pm desvío standard para cada ocasión de muestreo.

DISCUSION

La interacción entre la descomposición de los tejidos de las plantas con las condiciones de luz natural nos provee más información acerca de la contribución de la MOP y la MOD a los humedales. Este estudio experimental enfatizó las diferentes contribuciones de dos plantas, una macrófita nativa y una exótica como recurso de MOD y MOP interactuando con condiciones de luz variable.

En este experimento, se observó que ambas plantas difirieron en la producción de MOP y en la liberación de MOD. En todos los tratamientos, la especie nativa *E. pachycarpa* generó grandes cantidades de MOP en comparación con la exótica *P. anserina*. La mayoría de la MOP fue generada en el tratamiento de radiación solar completa, indicando que la RUV acelera los procesos de descomposición debido a fotodegradación abiótica del detrito, lo cual apoya nuestra hipótesis.

La producción de MOD fue diferente en ambas plantas. La especie terrestre (*P. anserina*) liberó significativamente mayores cantidades de MOD que la macrófita emergente (*E. pachycarpa*). Las concentraciones de MOD aumentaron durante el experimento para ambas especies (Fig. 3.5), sin embargo, en los mesocosmos con *P. anserina* también se observaron incrementos en el tamaño molecular de la MOD y en el color del agua (Fig. 3.6).

Además de estas diferencias especie-específicas, los tratamientos lumínicos afectaron la producción de MOD y su calidad (Figs. 3.5 y 3.6). En particular, bajo condiciones de oscuridad (OSC) registramos la menor cantidad de MOD y esta fue caracterizada por un mayor tamaño molecular en comparación con los otros tratamientos. La radiación solar, en particular la RUV, fotoliza la MOD produciendo moléculas más pequeñas, es decir de menor peso molecular (Wetzel, 1995; Farjalla *et al.*, 2001). En este estudio, la MOD de los tratamientos RSC y RFA estuvo caracterizada por moléculas de bajo peso molecular, sin observarse diferencias significativas entre los dos tratamientos (Fig. 3.6, Tabla 3.2). Estos resultados indicaron que la presencia de la luz visible (400-700 nm) fue importante en determinar el tamaño final de la MOD. Resultados similares fueron descritos por Denward y Tranvik (1998) en un estudio con *Phragmites australis*, en el cual los microcosmos oscuros difirieron de aquellos expuestos a la luz y a medida que transcurrió el tiempo de experimentación, también se observó una disminución en el tamaño molecular en la MOD posiblemente por los efectos de la luz y/o de la actividad bacteriana (no fue medido en este trabajo de

tesis). En tal sentido, se ha indicado que los procesos biológicos y fotoquímicos compiten en cuanto a la mineralización del COD (Obernosterer *et al.*, 2001).

Potentilla anserina y *E. pachycarpa* presentaron diferente composición elemental en sus tejidos. Antes del experimento, la relación C:P en las raíces de la nativa *E. pachycarpa* fue el doble que en las raíces de la exótica *P. anserina*, sin embargo, en los tallos de ambas especies fue similar (Fig. 3.2). La composición elemental observada podría ser explicada por características especie-específicas ya que las macrófitas comprenden diferentes grupos funcionales (emergentes, sumergidas, hoja-flotante, etc.) que difieren en su composición química (Sturner & Elser, 2002; Demars & Edwards, 2007; Osborne *et al.*, 2007). Estudios previos de *P. anserina* y *E. pachycarpa* revelaron además que la presencia de diferentes tipos de micorrizas en las raíces podría explicar las diferencias observadas en la composición elemental (Cuassolo *et al.*, 2012, ver capítulo II), ya que la presencia de hongos micorrízicos favorece potencialmente la toma de nutrientes en plantas de humedales (Cornwell *et al.*, 2001; Dunham *et al.*, 2003).

Las macrófitas emergentes de los humedales pueden producir grandes cantidades de detritus que pueden permanecer en pie o ser depositado en la zona bentónica, descomponiéndose e impactando en el reciclaje del C en el ecosistema (Christensen *et al.*, 2009). Los resultados experimentales obtenidos en este capítulo indican que al inundarse o cambiar de nivel un humedal colonizado por la especie exótica *P. anserina*, resultaría en una modificación de los sedimentos ya que se depositarían menores cantidades de MOP pero con alta calidad de nutrientes (más P y N). En contraposición si el humedal estuviera colonizado por la especie nativa *E. pachycarpa*, se depositarían mayores cantidades de MOP pero de menor calidad en nutrientes. Por otra parte, estas condiciones podrían trasladarse a lo largo de la cadena trófica detritívora, ya que las condiciones naturales con sedimentos con MOP rica en C y pobres en nutrientes generado por la nativa cambiarían sustancialmente con un incremento de la exótica *P. anserina*. Estos cambios llevarían a un aumento de la calidad de los recursos alimenticios (más nutrientes, menos C) para los detritívoros de los humedales, pero con una disminución en la cantidad. Por lo tanto, con el transcurrir de los años esta invasión podría producir cambios en el balance estequiométrico (C: nutrientes) y en las relaciones ecológicas del ambiente que, a su vez, podría modificar las características de las redes tróficas del humedal.

Por último, el hábito de vida hemicriptófito de la especie invasora, *P. anserina* (Domínguez *et al.*, 2006; Cuassolo *et al.*, 2012) le permite sobrevivir en los periodos de inundación y contribuir con grandes cantidades de MOD al agua. Esta situación podría afectar la calidad óptica del agua, incrementando la cantidad de C disuelto y el color del agua, lo que se traduciría en una menor penetración de la RUV en estos ambientes y también en cambios en la estructura trófica microbiana del humedal.

CAPÍTULO IV

LA MATERIA ORGÁNICA PARTICULADA (DETRITO) DE MACRÓFITAS (NATIVA Y EXÓTICA) EN UN HUMEDAL ANDINO-PATAGÓNICO: DECAIMIENTO *IN SITU* Y EFECTOS DE DETRITÍVOROS.



INTRODUCCIÓN

Las macrófitas son el componente principal en los depósitos de materia orgánica en las zonas litorales de los lagos (Wetzel, 2001), presentando una alta productividad primaria y jugando un rol importante en la producción del detrito (Bianchini Jr *et al.*, 2010). De esta manera, el decaimiento de la materia orgánica vegetal (MO) en ambientes acuáticos someros ha sido considerado como uno de los principales aportes de materia orgánica disuelta (MOD) y particulada (MOP) a los mismos. En tal sentido, el decaimiento es un proceso fundamental en los ciclos biogeoquímicos del C y de los nutrientes en los ecosistemas (Hoorens *et al.*, 2003), por ello estudiar los procesos de decaimiento aporta valiosa información acerca de estos ciclos (Rejmánková & Houdková, 2006). En particular, en los humedales las macrófitas emergentes juegan un

papel importante en la cadena trófica del detrito porque ellas son las que producen mayoritariamente material orgánico senescente (Wetzel, 1995; Gessner, 2001). Estas macrófitas, pueden llegar a cubrir todo el fondo de la cubeta y contribuyen al detrito que luego es descompuesto por la comunidad microbiana y por organismos acuáticos detritívoros (Wetzel, 1995; Kuehn *et al.*, 2000). En consecuencia, los ecosistemas acuáticos someros son sistemas basados en el detritus a partir del cual se establece una red trófica dominada por heterótrofos bentónicos (Wetzel, 2001).

Los diferentes grupos funcionales de macrófitas (emergentes, sumergidas, flotantes, etc.) difieren fuertemente en su composición química (Sternner & Elser, 2002; Demars & Edwards, 2007; Osborne *et al.*, 2007), lo cual afecta al metabolismo de los ecosistemas acuáticos (Marinho *et al.*, 2010). Las macrófitas contribuyen con nutrientes y materia orgánica al agua por medio del decaimiento de sus tejidos senescentes (Carpenter & Adams, 1978). En particular, las macrófitas arraigadas en el sedimentos, transportan considerables cantidades de fósforo (P) desde el sedimento a sus tejidos durante la estación de crecimiento, el cual es en parte liberado al ambiente en el proceso de decaimiento (Frost *et al.*, 2002). En la naturaleza el proceso de decaimiento de los tejidos vegetales comprende varios pasos: lixiviación, fragmentación mecánica, colonización microbiana y el procesado por los invertebrados (Longhi *et al.*, 2008). Durante este proceso, el material producido es consumido por diferentes ensambles de detritívoros (Fellerhoff *et al.*, 2003). Este proceso de decaimiento puede llevar meses o años y numerosos estudios han evaluado este decaimiento en largos períodos de tiempo (Kuehn *et al.*, 2000; Rodrigo *et al.*, 2007; Longhi *et al.*, 2008).

La estequiometría ecológica estudia las causas del desequilibrio en las relaciones elementales (C:N:P) entre los niveles tróficos (predador-presa), en la dinámica de la red trófica, y en los procesos del ecosistema, por ejemplo, los ciclos de los nutrientes (Frost *et al.*, 2002; Sternner & Elser, 2002). La composición elemental del material orgánico particulado bentónico (principalmente detrito) no se ha estudiado de forma exhaustiva, pero la información disponible muestra que el C:N:P puede variar de manera sustancial (Frost *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha observado que las condiciones iniciales de nutrientes del detrito se reflejan en las tasas de decaimiento y tanto en hábitats terrestres como acuáticos fueron correlacionadas negativamente con el C:N y C:P del tejido vegetal (Frost *et al.*, 2002). Además, en sitios pobres en nutrientes las macrófitas se caracterizan por tener una alta reabsorción de los nutrientes, resultando en materia orgánica vegetal de baja calidad y consecuentemente en una baja tasa de decaimiento

(k) (Aerts & Chapin, 2000 ; Rejmánková & Houdková, 2006). Como consecuencia de una baja calidad del detrito, la comunidad herbívora y detritívora se verá limitada en nutrientes como el N y el P. Los avances en la teoría estequiométrica sugieren que altas relaciones C:N y C:P en los consumidores detritívoros impone una limitación en el crecimiento de tal manera que la relación estequiométrica de su fuente de alimento está relacionada con su tasa de crecimiento (Albariño & Balseiro, 2002; Marinho *et al.*, 2010).

Debido a las diferencias observadas previamente tanto en las relaciones estequiométricas (Cap: II) como en la producción y calidad del detrito en condiciones experimentales (Cap III), en este capítulo proponemos un estudio *in situ* del decaimiento del detrito de dos macrófitas (nativa y exótica) por la acción de organismos detritívoros propios del humedal.

Objetivo General

Estudiar el decaimiento *in situ* de la materia orgánica particulada (MOP) proveniente de dos especies vegetales: la macrófita nativa *E. pachycarpa* y la especie invasora *P. anserina*, en relación con la presencia y/o ausencia de macroinvertebrados.

Objetivos Específicos

1. Calcular las tasas de decaimiento en peso del detrito (k) *in situ*, de las dos especies (nativa y exótica) a lo largo del tiempo.
2. Analizar las tasas de decaimiento en peso del detrito en relación con la presencia/ausencia de macroinvertebrados (experimentos con y sin clausura).
3. Analizar la producción de detrito de diferentes tamaños de partículas: fino ($<250 \mu\text{m}$) y grueso ($>250 \mu\text{m}$), en ambas especies vegetales y en ambos tratamientos (experimentos con y sin clausura para macroinvertebrados).

Hipótesis

1. Las tasas de decaimiento variarán en función de la calidad del detrito (relaciones C:N:P) proveniente de cada especie de macrófita.
2. Las tasas de decaimiento variarán en función de la existencia de clausuras que impidan el acceso de los macroinvertebrados.
3. La colonización del detrito por parte de los macroinvertebrados variará en función de su calidad nutricional.

Predicciones

1. Las tasas de decaimiento serán mayores en el tratamiento “sin clausura” por el efecto de desmenuzamiento que realizan los macroinvertebrados.
2. La abundancia de macroinvertebrados será mayor en el detrito de menor relación C:N y C:P debido a un detrito de mejor calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en Laguna Fantasma, la cual fue descrita en el capítulo II y se realizó con las dos plantas ya mencionadas que colonizan el humedal: *P. anserina* (exótica) y *E. pachycarpa* (nativa).

Se colectaron plantas de ambas especies previas al comienzo del hidroperíodo, en Abril de 2012, las cuales fueron lavadas con agua destilada y secadas en estufa a 60 °C hasta peso constante. Este material considerado como detrito fue expuesto al proceso de decaimiento *in situ*. Para esto, se llevó a cabo un diseño factorial 2X2 (dos especies de macrófitas X dos tratamientos de clausuras). El experimento se realizó en bolsitas de hojarasca (litter bag) de 10x10 cm confeccionadas con redes, de diferente tamaño de abertura: 0.3 mm (Tratamiento “*con clausura*”) y 2 mm (Tratamiento “*sin clausura*”). En cada bolsa se colocó 1 g de peso seco (PS) de detrito de cada especie. Cada tratamiento se realizó para las dos macrófitas utilizando 6 réplicas por tratamiento. El experimento se realizó desde el 13 de Agosto de 2012 hasta el 9 de Octubre de 2012, durante 60 días. Durante este período, las bolsas se retiraron en cuatro oportunidades de muestreo (cada 2 semanas aprox.). Los tratamientos se dispusieron a 2 m de distancia de la costa a una profundidad de 50 cm (Fig. 4.1 esquema y foto).

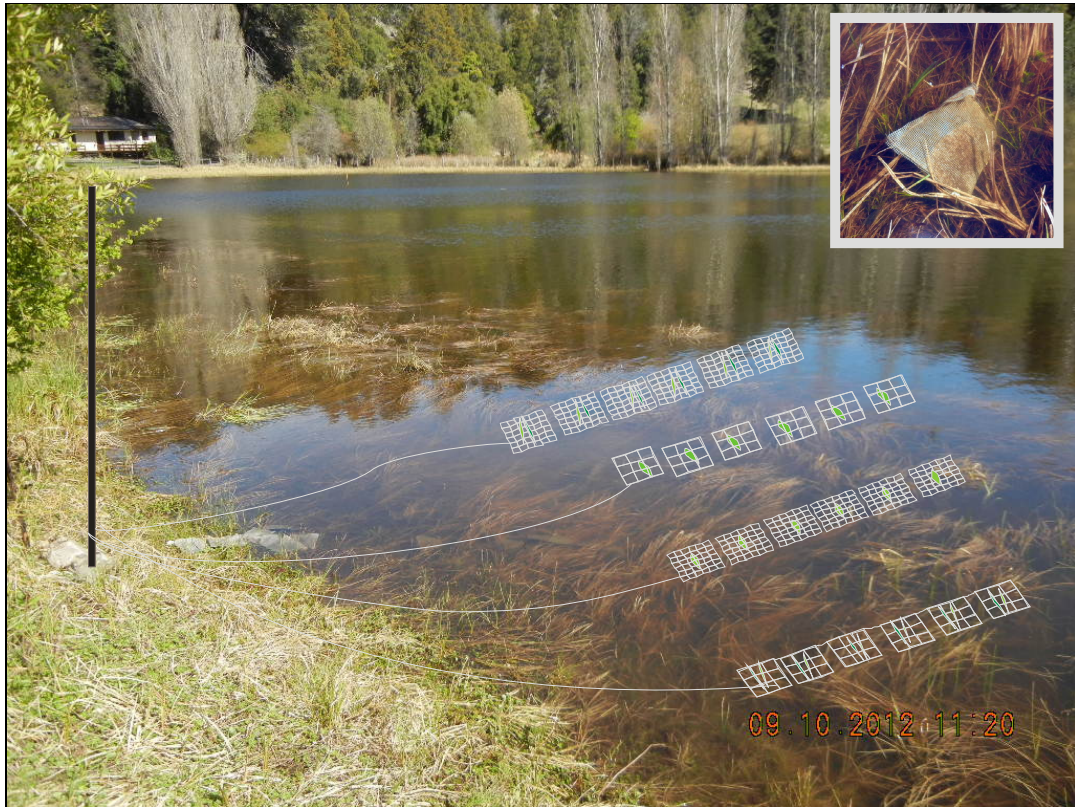


Figura 4.1. Esquema del dispositivo experimental colocado en Laguna Fantasma, formado por bolsas de hojarasca de 10x10 cm con 1g de PS de cada especie, y con dos tamaños de malla distintos conformando los tratamientos “con clausura” y “sin clausura”.

Procedimientos

En cada ocasión de muestreo se midieron las variables limnológicas: temperatura, pH, conductividad y concentración de oxígeno disuelto. La temperatura del agua, la conductividad, el oxígeno disuelto y el pH fueron medidos usando un termistor (YSI 85 Yellow Spring Instruments, USA) y un pHmetro (HI 8424 Hanna Instruments, USA), respectivamente. Además, se colocó un Data Logger (UA-001-08 HOBO Pendant Temp) durante todo el experimento para conocer las fluctuaciones de la temperatura en el agua. En cada ocasión de muestreo se recolectaron las bolsitas correspondientes a cada macrófita y a cada tratamiento, las cuales fueron llevadas al laboratorio en bolsas con cierre individuales en contenedores térmicamente aislados.

En el laboratorio, el detrito contenido dentro de las bolsitas fue removido cuidadosamente de las mismas mediante pinzas y lavado con 250 ml de agua destilada sobre un tamiz con tamaño de poro de 250 μm . Este material vegetal fue secado en estufa a 60 °C hasta peso constante (aproximadamente 48 h) y pesado obteniendo de esta manera el detrito grueso (>250 μm) remanente en cada bolsa. Al mismo tiempo, se separaron, cuantificaron e identificaron los macroinvertebrados (>250 μm) presentes en cada bolsita, los cuales fueron conservados en freezer. El agua del lavado fue recuperada en bandeja y posteriormente filtrada por un filtro GF/F previamente lavado con ácido, muflado, secado en estufa a 60 °C, y pesado. Luego del filtrado los filtros fueron secados nuevamente en estufa y pesados, de esta manera se obtuvo una estimación del peso seco del detrito fino (<250 μm).

El detrito inicial y ambos tamaños estudiados, grueso y fino, resultantes a lo largo del experimento se analizaron para conocer su contenido elemental en nutrientes. El carbono (C) y nitrógeno (N) se estimaron utilizando un analizador de CN (Thermo Finnigan Flash EA 1112), y el fósforo (P) por medio del método del ácido ascórbico (APHA, 2005).

Análisis estadísticos

Se analizó la tasa de decaimiento (k) y la producción de Detrito Fino usando un análisis de covarianza ANCOVA seguido por test a posteriori de Tukey. La tasa de decaimiento fue calculada como la pérdida de masa seca de hojas en función del tiempo, utilizando el modelo exponencial de decaimiento:

$$M_t = M_0 * e^{-kt}$$

donde M_t = masa en el tiempo, M_0 = es la masa inicial, k es el coeficiente de decaimiento exponencial y t = tiempo en días.

Las relaciones elementales C:N:P del detrito de ambas especies fueron analizadas con ANOVA de dos vías, utilizando para todos los análisis el programa estadístico SigmaPlot. Para cumplir los supuestos del modelo de ANOVA, algunas de las variables fueron transformadas a logaritmo para normalizar los datos. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el $\alpha < 0.05$. La abundancia de macroinvertebrados fue analizada con Test de Mann-Whitney en rangos. En todos los casos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SigmaPlot.

RESULTADOS

A lo largo del experimento la temperatura promedio del agua de la laguna fue de 10.35 ± 1.81 °C (media \pm error estándar), siendo la mínima de 5.68 °C y la máxima de 14 °C, mostrando una amplia variabilidad (Fig. 4.2). El promedio del pH registrado fue 6.67 ± 0.22 , la conductividad 87.02 ± 3.79 (μ S) y el oxígeno disuelto estuvo siempre cercano a la saturación, 92.72 ± 6.12 %, indicando condiciones aeróbicas durante el proceso de decaimiento. Las precipitaciones durante los meses del experimento fueron 115 mm en agosto, 70 mm en Septiembre y 45 mm en octubre (registradas por una estación meteorológica situada 1500 m de la laguna).

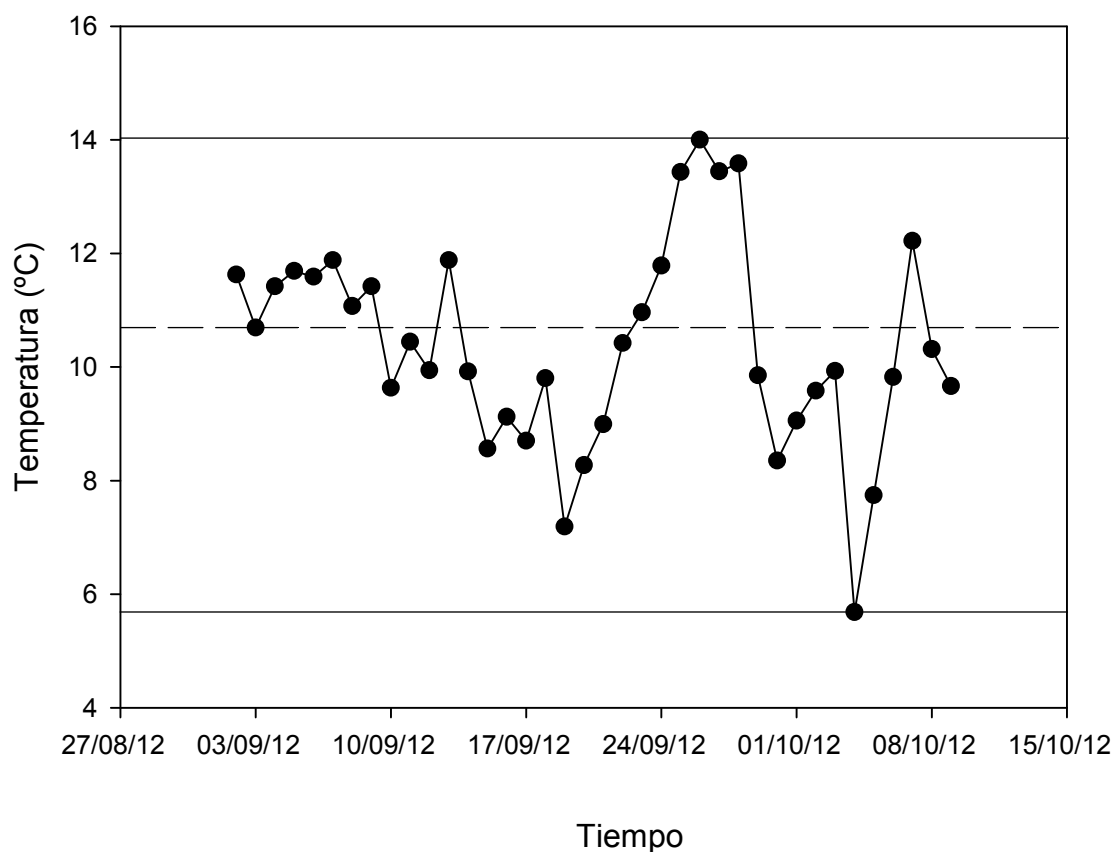


Figura 4.2. Datos de temperatura (°C) en el agua, durante los días del experimento, tomados con un Data Logger (UA-001-08 HOBO Pendant Temp). La línea punteada representa el promedio de la temperatura en el agua durante el experimento, y las líneas sólidas la temperatura mínima y máxima.

Tasas de decaimiento (k) y curvas de decaimiento

Las curvas de decaimiento de las dos especies mostraron que la pérdida de biomasa fue más importante en las primeras dos semanas de tratamiento, exhibiendo la especie exótica *P. anserina* el 50 % de pérdida de biomasa a los 39 días mientras que la nativa *E. pachycarpa* no alcanzó esos valores en el tiempo que duró este experimento (Figs. 4.3a y 4.3b).

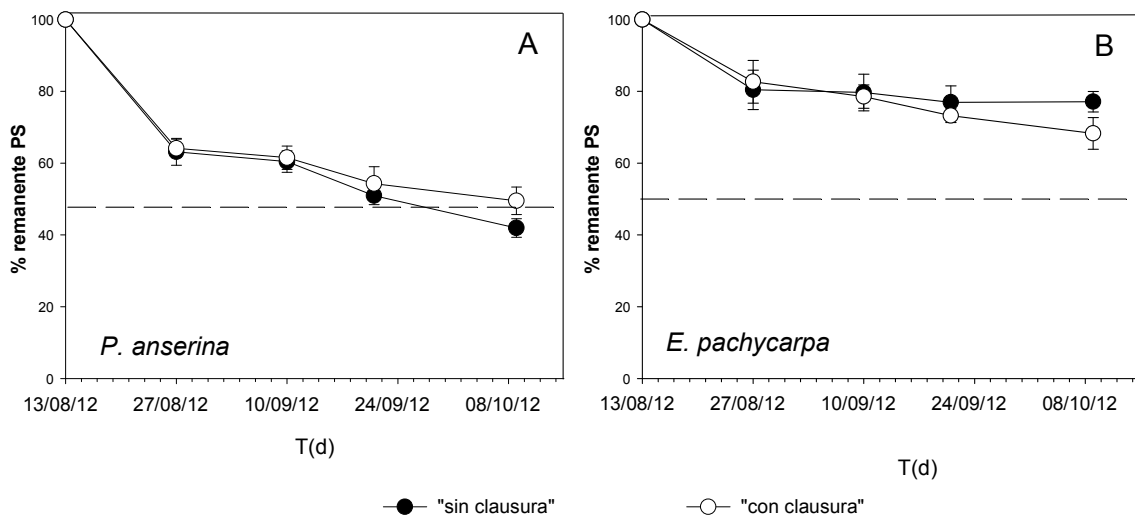


Figura 4.3. Curvas de decaimiento, medidas como % de biomasa remanente en cada bolsa de hojarasca a lo largo del tiempo. A la izquierda (a) la especie invasora *P. anserina* y a la derecha (b) *E. pachycarpa*, nativa.

La tasa de decaimiento (k) de la especie invasora, *P. anserina*, ($k= 0.0147 \pm 0.0011$, $r^2= 0.67$, $P< 0.001$) fue significativamente mayor (2 a 3 veces más rápida) que en la macrófita nativa (ANCOVA, $P< 0.001$). En las primeras dos semanas se registraron las tasas de decaimiento más altas ($k= 0.032 \pm 0.0042$) luego disminuyen a la mitad ($k= 0.016$), se estabilizan hasta el día 42 y vuelven a disminuir en los restantes 18 días ($k= 0.013$) (Fig. 4a). Por otro lado, la tasa de decaimiento fue mayor en el tratamiento “sin clausura” es decir en el que se permitía el ingreso de macroinvertebrados (Test de Tukey, $P< 0.05$) (Tabla 4.1).

Por su parte, la tasa de decaimiento de la especie nativa, *E. pachycarpa*, fue como ya se mencionó, significativamente más lenta ($k= 0.0054 \pm 0.0010$, $r^2= 0.53$, $P< 0.001$) (Fig. 4 b) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Tasas de decaimiento (k) calculadas para las dos especies, la exótica *P. anserina* (P) y la nativa *E. pachycarpa* (E) en los tratamientos “con clausura” (C) y “sin clausura” (S).

<i>Tratamientos</i>	<i>Tasa descomposición</i> (k)
PS	0.0147 ± 0.0010
PC	0.0119 ± 0.0012
ES	0.00441 ± 0.0010
EC	0.00650 ± 0.0010

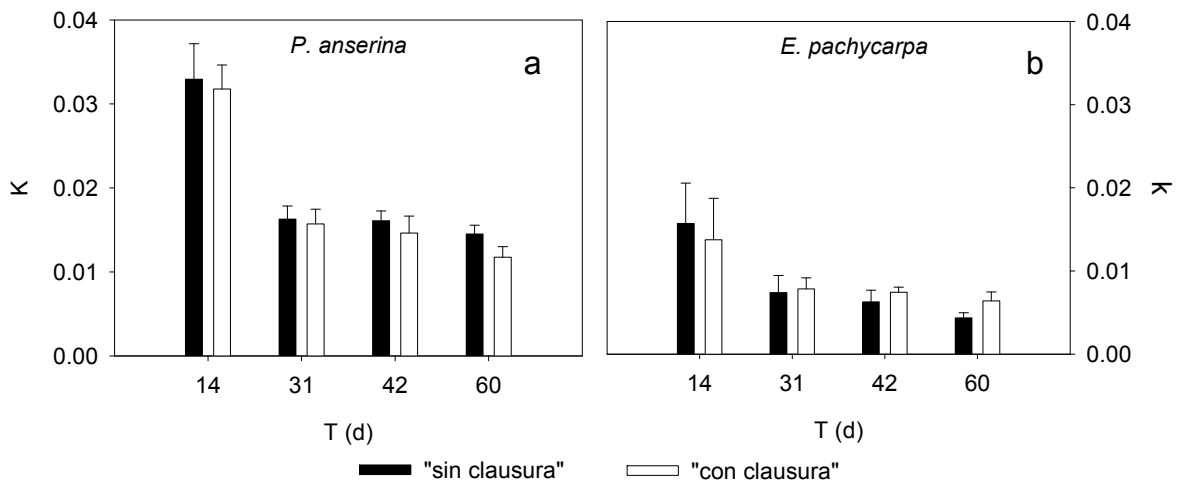


Figura 4.4. Tasas de decaimiento periódico calculado para cada una de las especies, en cada tratamiento. A la izquierda (a) la especie invasora *P. anserina* y a la derecha (b) *E. pachycarpa*, nativa.

Relaciones elementales del material vegetal a lo largo del experimento

Para el detrito de la invasora *P. anserina* se observó que la relación C:P varió a lo largo del tiempo (Fig. 4.5a), determinándose una interacción significativa entre los tratamientos y el tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,41)} = 3.577$; $P = 0.024$). Esta relación C:P fue significativamente mayor a los 60 días (Test de Tukey, $P < 0.05$) (Fig. 4.5a). En cuanto a la relación C:N de *P. anserina* no se observaron diferencias significativas ni a lo largo del tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,47)} = 1.555$; $P = 0.215$) ni entre los tratamientos con y sin clausura (ANOVA de dos vías, $F_{(1,47)} = 0.178$; $P = 0.675$) (Fig. 4.5c). Por último, la relación N:P varió significativamente a lo largo del tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,47)} = 4.474$; $P < 0.001$), siendo mayor el N:P (menos P) a los 60 días en ambos tratamientos (Test de Tukey, $P < 0.05$) (Fig. 4.5e).

Las relaciones elementales C:P y C:N del detrito de la macrófita nativa, *E. pachycarpa*, no presentaron variaciones significativas. La relación C:P no varió significativamente ni en los tratamientos (ANOVA de dos vías, $F_{(1,46)} = 0.645$; $P = 0.427$) ni a lo largo del tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,47)} = 1.451$; $P = 0.243$) (Fig. 4.5b). La relación C:N tampoco varió entre los tratamientos (ANOVA de dos vías, $F_{(1,47)} = 0.130$; $P = 0.721$) ni a lo largo del tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,47)} = 1.284$; $P = 0.293$) (Fig. 4.5d). Tampoco presentó diferencias significativa la relación N:P ni entre los tratamientos (ANOVA de dos vías, $F_{(1,46)} = 0.543$; $P = 0.466$), ni a lo largo del tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,46)} = 0.952$; $P = 0.425$) (Fig. 4.5f).

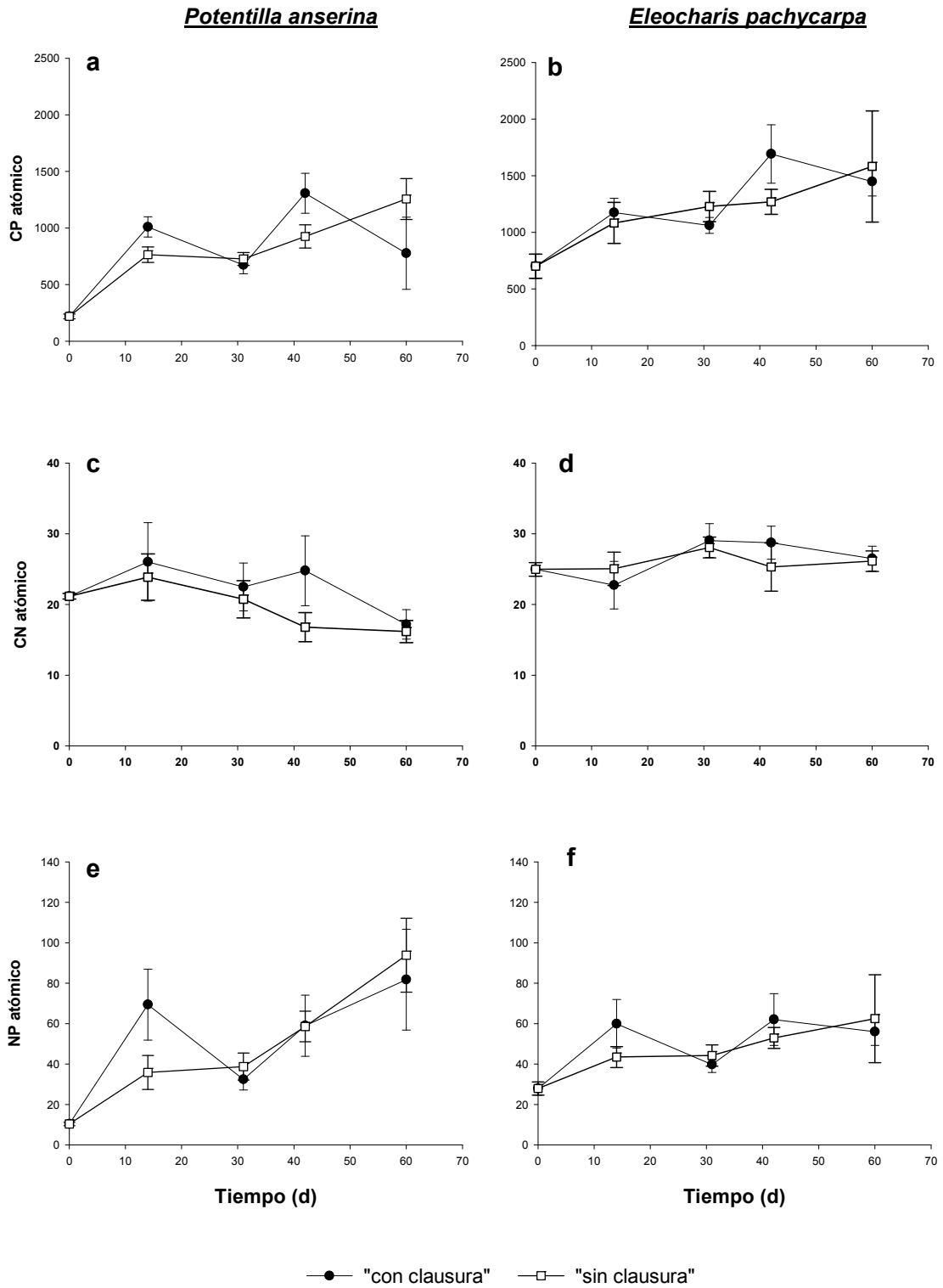


Figura 4.5. Relaciones elementales (C:P, C:N y N:P) en ambas especies, *P. anserina* (a,c ye) y *E. pachycarpa* (b, d y f) a lo largo del tiempo y en los tratamientos, “con clausura” y “sin clausura”.

El Detrito Fino (< 250 μm)

La producción de detrito se analizó con el modelo de ANCOVA, y al no cumplir con el supuesto de no interacción entre la variable categórica (tratamientos) y la covariable (tiempo) se utilizó el modelo de ANOVA de dos vías. En el caso de la especie exótica, *P. anserina*, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de dos vías, $F_{(1,35)} = 8.929$; $P < 0.005$) y en la variable tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,35)} = 5.585$; $P < 0.005$). Particularmente, el tratamiento “con clausura” tuvo la mayor producción de detrito (Test de Tukey, $P < 0.05$) a los 60 días (Test de Tukey, $P < 0.05$) (Fig. 6a).

En el caso de la macrófita nativa, se halló una interacción significativa entre las variables *tiempo* y *tratamientos* (ANOVA de dos vías, $F_{(3,47)} = 13.377$; $P < 0.001$), siendo significativamente mayor la cantidad de detrito en el tratamiento “sin clausura” a los 14 y 31 días (Test de Tukey, $P < 0.05$), y luego a los 60 días se revierte hallando mayor cantidad en el tratamiento “con clausura” (Test de Tukey, $P < 0.05$) (Fig. 6b).

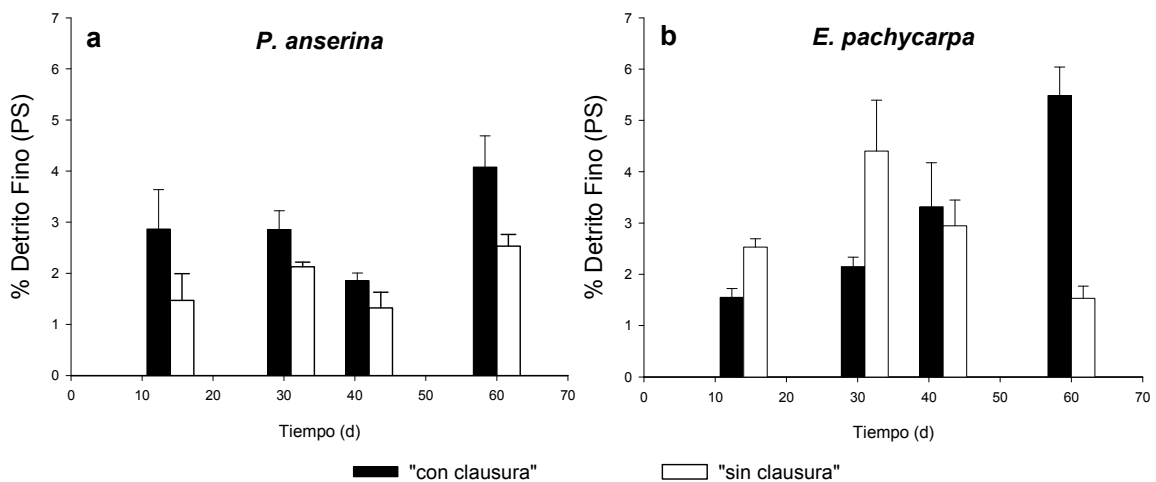


Figura 4.6. Producción de detrito fino (<250 μm) a lo largo del tiempo, en las dos especies, la exótica *P. anserina* (A) y la nativa *E. pachycarpa* (B) y en los tratamientos “con clausura” y “sin clausura”.

En cuanto a la calidad del detrito fino producido, la especie exótica presentó variaciones significativas a lo largo del tiempo en la relación C:P y N:P (ANOVA de dos vías, $F_{(3,39)}= 12.435$, $P<0.001$ y $F_{(3,38)}= 11.032$, $P<0.001$, respectivamente) (Figura 4.7a y 4.7c). En particular la relación C:P fue aumentando a lo largo del tiempo desde 131 a 300, indicando que el detrito producido fue disminuyendo la calidad (Figura 4.7a).

La especie nativa mostró diferencias significativas en la relación C:N a lo largo del tiempo (ANOVA de dos vías, $F_{(3,38)}= 12.870$, $P<0.001$) siendo el C:N mayor a los 60 días (indica menos N) (Figura 4.7d). Se determinó una interacción significativa entre las variables *tiempo* y *tratamientos* en las relaciones C:P y N:P (ANOVA de dos vías, $F_{(3,41)}= 4.043$, $P<0.05$ y $F_{(3,41)}= 5.914$, $P<0.05$, respectivamente), mostrando el mayor C:P (indica menos P) a los 60 días en el tratamiento “*con clausura*” (Figura 4.7d y 4.7f).

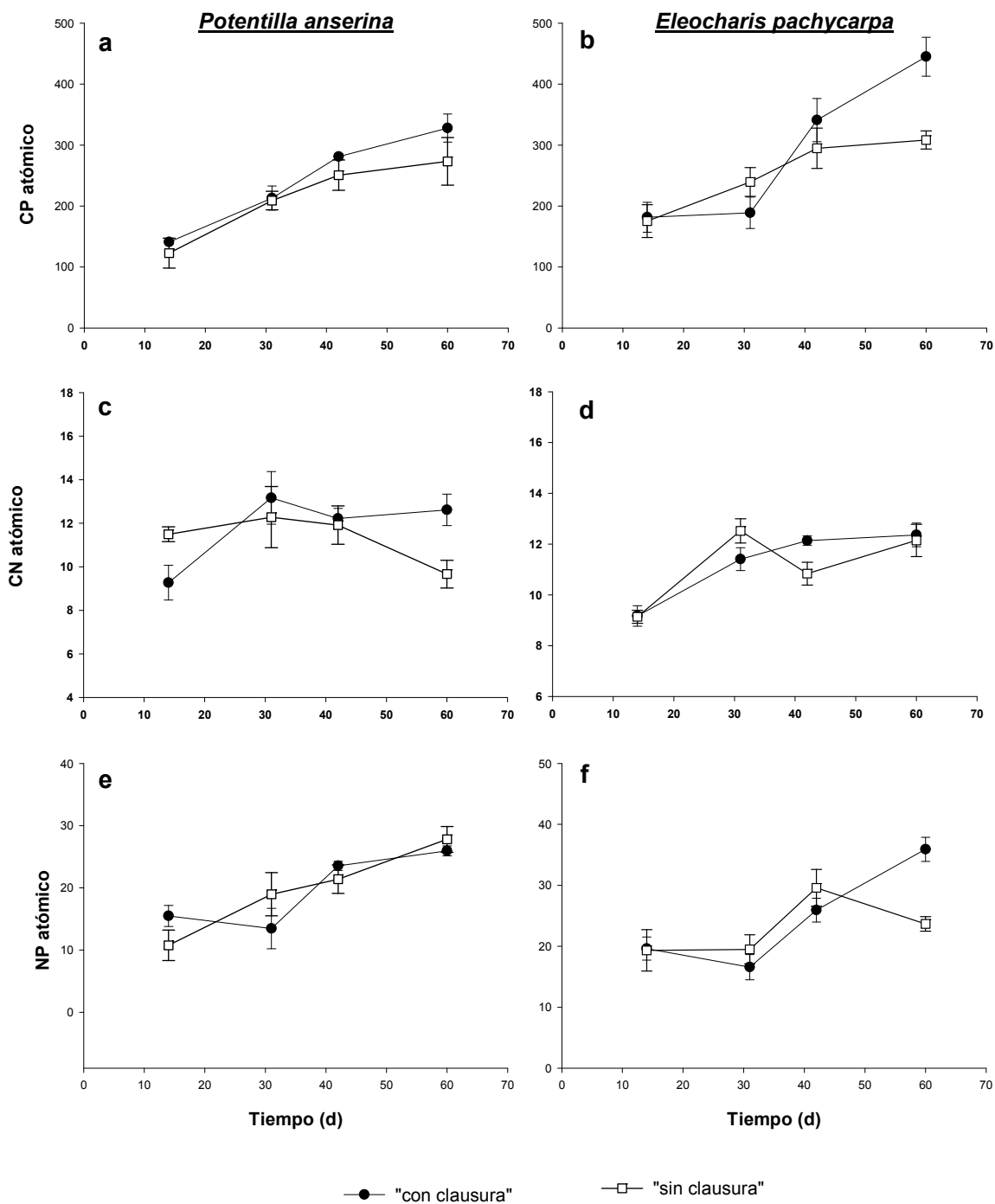


Figura 4.7. Relaciones elementales del detrito fino producido (C:P, C:N y N:P) en ambas especies, *P. anserina* (a,c y e) y *E. pachycarpa* (b, d y f) a lo largo del tiempo y en los tratamientos, “con clausura” y “sin clausura”.

Los macroinvertebrados

La abundancia de macroinvertebrados fue significativamente mayor en los tratamientos “*sin clausura*” para ambas especies (*P. anserina*: Test de Mann-Whitney en rangos, $U= 153.500$, $P< 0.001$ y *E. pachycarpa*: Test de Mann-Whitney en rangos, $U= 167$, $P< 0.001$). Los macroinvertebrados hallados fueron en su mayoría oligoquetos (Oligoqueta, Naididae), seguidos por una baja abundancia de *Verger* cf. *limnophilus* (Trichoptera: Limnephilidae).

Sin embargo, se observaron marcadas diferencias entre ambas especies vegetales en cuanto a la presencia y abundancia de macroinvertebrados. La abundancia de macroinvertebrados fue mayor a los 60 días (hasta 23 ind/bolsa, en promedio 8 ind/bolsa) en el detrito de la especie exótica *P. anserina*. Por otra parte, en el detrito de la nativa, *E. pachycarpa* se registró un máximo de 4 ind/bolsa (promedio 2 ind/bolsa). Por último, la presencia del tricóptero *Verger* sólo fue registrada en muy bajas abundancias (1-2 indiv/bolsa) en el detrito de la exótica.

DISCUSIÓN

La composición elemental y la estequiometría de las plantas acuáticas han sido consideradas muy importantes para comprender la dinámica de los nutrientes en el hábitat acuático (Demars & Edwards, 2007). El decaimiento del detrito es un intrincado proceso regulado por las características químicas del mismo y por factores externos (Bianchini Jr *et al.*, 2010), entre ellos se destaca a la temperatura y a la concentración de oxígeno como factores importantes en el decaimiento de la materia orgánica (Fellerhoff *et al.*, 2003). Nuestro experimento fue realizado en momentos de hidroperíodo máximo, entre agosto-octubre, correspondiendo a fines del invierno e inicio de primavera. Así, las temperaturas resultaron comparativamente bajas y fluctuando entre los 5.68 °C y los 14 °C (Fig. 4.2). En los datos registrados se puede observar que si bien existe un incremento en la temperatura a partir de septiembre, también los registros pueden bajar notablemente como puede verse el 4 de octubre en el que la temperatura descendió a la mínima registrada (5.68 °C). Por otra parte, siempre se registraron condiciones de alta concentración de oxígeno cercanas a la saturación. Por lo tanto, las condiciones *in situ* en las que se desarrolló este experimento de decaimiento fueron temperaturas bajas con un promedio de 10.35 °C y condiciones aeróbicas.

Conocer las tasas de decaimiento de los distintos componentes vegetales es importante para el metabolismo de los cuerpos de agua porque influyen en las tasas de liberación de nutrientes, las tasas de acumulación de detrito en los sedimentos y en la calidad del detrito (Rejmánková & Houdková, 2006). Nuestros resultados muestran diferencias en las tasas de decaimiento de ambas especies exótica y nativa, que colonizan el humedal. El tiempo donde se registra el 50 % de biomasa remanente o cuando la pérdida en biomasa alcanza el 50 % que se conoce como T_{50} , ocurrió a los 39 días para el caso de *P. anserina* en el tratamiento “*sin clausura*”: Esta situación indicaría que este rápido decaimiento resulta del efecto de los detritívoros, lo que apoyaría a nuestra primer hipótesis que indica que las tasas de decaimiento variarán en función de la existencia de clausuras que impidan el acceso de los macroinvertebrados.

Por otra parte, el detrito de la planta nativa tuvo un decaimiento extremadamente lento en ambos tratamientos (con y sin clausura) por lo que no alcanzó el valor de T_{50} en los plazos de este experimento (60 días) (Fig. 4.3). Estos datos resultan comparables con otras macrófitas palustres ya que estudios realizados en rizomas de *Phragmites australis*, indicaron que el 50 % de la pérdida de masa seca fue a los 99 días (Agoston-Szabo *et al.*, 2006) y en *Juncus maritimus* a los 380 días de experimento (Menendez,

2008). Lo que permitiría concluir que estas hidrófitas exhibirían un decaimiento lento, requiriendo *E. pachycarpa* de 100 a 150 días para perder el 50 % de la masa.

La composición de nutrientes inicial de los tejidos vegetales es un factor que influye en las tasas de decaimiento y cuando estos tejidos exhiben relaciones C:P mayores a 4000 las tasas de decaimiento son extremadamente bajas (Rejmánková & Houdková, 2006). Esto puede también deberse al alto contenido de compuestos más refractarios como la celulosa y la lignina, mientras que el mayor contenido de N y P produce tasas de decaimiento más rápidas (Longhi *et al.*, 2008; Menendez, 2008). En tal sentido, *E. pachycarpa*, es una macrófita emergente (como *Juncus* sp.) y por lo tanto tiene tejidos estructurales ricos en carbono, lo que resulta en una mayor relación C:nutrientes en el detrito (Farjalla *et al.*, 1999).

Las mayores tasas de decaimiento han sido asociadas con altas tasas de respiración microbiana, aumento del consumo por parte de detritívoros, y con una mayor lixiviación de MOD (Sánchez-Andrés *et al.*, 2010). En este sentido, la mayor abundancia de detritívoros fue registrada en las bolsas con detrito de la especie exótica que posee relaciones elementales C:P y C:N más bajas (más nutrientes) lo que implica una mejor calidad de alimento. Por ello nuestra segunda hipótesis que propone que la colonización del detrito por parte de los macroinvertebrados variará en función de su calidad nutricional es sustentada por los presentes resultados. Elser y colaboradores (2000) indican que hay una estrecha relación entre la estequiometría del alimento y la tasa de crecimiento. Esto fue estudiado para detritívoros en ríos andino-patagónicos con diferentes hojas del bosque nativo y una exótica como detrito y un plecóptero como detritívoro (Albariño & Balseiro, 2002). Si bien en el presente trabajo no se midieron tasas de crecimiento, la mayor colonización de macroinvertebrados detritívoros en *P. anserina* demuestra que este detrito fue preferido como fuente de alimento lo que se tradujo en mayores tasas de decaimiento del detrito de la exótica. Por último, estos resultados apoyan nuestra tercera hipótesis que indican que las tasas de decaimiento variarán según el detrito proveniente de cada especie de macrófita y de los macroinvertebrados que la colonicen.

En relación con la producción de detrito fino, nuestros resultados mostraron, en general, que la producción fue mayor en ambas especies en el tratamiento “*con clausura*”. Esto puede deberse a dos razones, en primer lugar a que el tamaño de poro de la red fina (clausura para macroinvertebrados) retuviera más detrito fino; pero también podría indicar que el detrito producido estaría siendo consumido por los

detritívoros en el tratamiento “*sin clausura*”. Por otra parte, en un análisis comparativo de ambas macrófitas se observa que la acumulación de DF en ambos tratamientos fue mayor en *E. pachycarpa*. Esto podría deberse precisamente a que la menor colonización por parte de macroinvertebrados implica un menor consumo del detrito. Además, en ambos casos estudiados el detrito fino producido fue disminuyendo de calidad lo cual se vio reflejado por un aumento de las relaciones C:P, C:N. Probablemente este efecto se deba a un incremento en la lixiviación a medida que el detrito va disminuyendo su tamaño de partícula.

En conclusión, cada especie mostró un patrón de decaimiento diferente, siendo el detrito de la especie exótica más colonizado por macroinvertebrados detritívoros debido a su mayor calidad en cuanto a su menor relación C:P. Esto se traduce en un decaimiento rápido de la invasora, que implicaría una rápida disponibilidad de nutrientes en el ambiente. Por el contrario, el detrito de la nativa *E. pachycarpa*, decae más lentamente por lo que retiene por mayor tiempo la materia orgánica y a los nutrientes lo que se traduce en un reciclado más lento en el ambiente acuático.

CONCLUSIONES FINALES

Las conclusiones de este trabajo de Tesis se refieren al papel de diferentes macrófitas (nativas y exóticas) sumergidas y emergentes y de algas bentónicas en la producción de materia orgánica disuelta y particulada de humedales andino-patagónicos. Asimismo, se analizó la interacción de esta materia orgánica con factores ambientales abióticos (radiación solar) y bióticos (micorrizas, macroinvertebrados detritívoros). Las principales conclusiones son:

En un humedal de altura (Mallín Los Patos) se analizó a la composición elemental y a los lixiviados de lamacrófitasumergida *Myriophyllum quitense* y de las algas bentónicas (*Zygnema* y *Spirogyra*). La composición de los tejidos y los lixiviados de la macrófita sumergida resultaron más ricos en nutrientes (P) en comparación con las algas bentónicas.

La macrófita liberó mayor concentración de lixiviados y más ricos en nutrientes que las algas. Además debido a su mayor aporte de color y fotoreactividad los lixiviados de *M. quitense* podrían contribuir significativamente a los cambios en las características ópticas del humedal mientras que las algas bentónicas contribuye con lixiviados de baja fotoreactividad.

Los lixiviados de la macrófita sumergida exhibieron una mayor liberación de P en otoño, mientras que los lixiviados de las algas bentónicas liberan más P en primavera. Esto sugiere que la fuente de liberación de nutrientes podría variar de acuerdo a la dominancia alternativa de macrófitas o algas bentónicas en el humedal.

En un ambiente temporario con fluctuaciones en su nivel de agua se estudiaron a tres macrófitas (dos nativas y una exótica) con estrategias diferentes. La especie invasora *Potentilla anserina* y las nativas *Eleocharis pachycarpa* y *Carexa ematorrhyncha* presentaron notables diferencias en las estrategias de asignación de nutrientes en sus partes aéreas y radicales durante sus etapas de crecimiento y senescencia.

Nuestros resultados muestran que *P. anserina* presentó una asignación de nutrientes (especialmente P) en las raíces que podría relacionarse con una predominancia del tipo micorriza arbuscular en sus raíces. Esta situación le genera una menor relación C:P en sus raíces lo que representaría una ventaja competitiva frente a las nativas.

Durante el período inundado con el decaimiento de las partes aéreas, la planta invasora libera MOD de alto peso molecular, coloreada, y con una alta relación C:

nutrientes en comparación con las macrófitas nativas. Así, la invasión de esta especie terrestre durante los períodos secos del humedal, podría en los períodos inundados, afectar la calidad de la MOD liberada y enriquecer los sedimentos.

Como consecuencia de estos desbalances elementales entre estas tres macrófitas, podrían esperarse importantes impactos ecológicos que podrían afectar a las comunidades planctónicas y bentónicas del ambiente, incluyendo la facilitación a nuevas especies invasoras.

Los resultados experimentales obtenidos indican que al inundarse o cambiar de nivel un humedal colonizado por la especie exótica *P. anserina*, resultaría en una modificación de los sedimentos ya que se depositarían menores cantidades de MOP pero con alta calidad de nutrientes (más P y N).

En contraposición si el humedal estuviera colonizado por la especie nativa *E. pachycarpa*, se depositarían mayores cantidades de MOP pero de menor calidad en nutrientes.

El hábito de vida hemicriptófito de la especie invasora, *P. anserina* le permite sobrevivir en los períodos de inundación y contribuir con grandes cantidades de MOD al agua. Esta situación podría afectar la calidad óptica del agua, incrementando la cantidad de Carbono disuelto y el color del agua, lo que se traduciría en una menor penetración de la RUV en estos ambientes y también en cambios en la estructura trófica microbiana del humedal.

Las condiciones de diferente relación elemental entre la macrófita nativa y exótica se trasladan a lo largo de la cadena trófica detritívora, tal como fuera observado en un experimento de campo.

En un experimento *in situ* cada especie (nativa vs. exótica) mostró un patrón de decaimiento del detritus diferente. Las tasas de decaimiento de la invasora *P. anserina* fueron mayores lo que implicaría una rápida disponibilidad de nutrientes en el ambiente.

Por el contrario, el detrito de la nativa *E. pachycarpa*, decayó más lentamente por lo que retiene por mayor tiempo a la materia orgánica y a los nutrientes lo que se traduce en un reciclado más lento en el ambiente acuático.

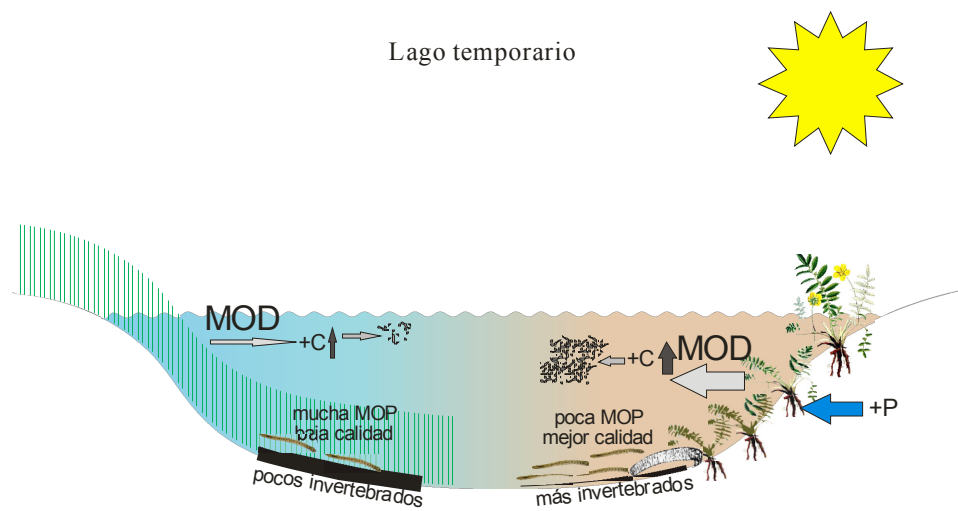
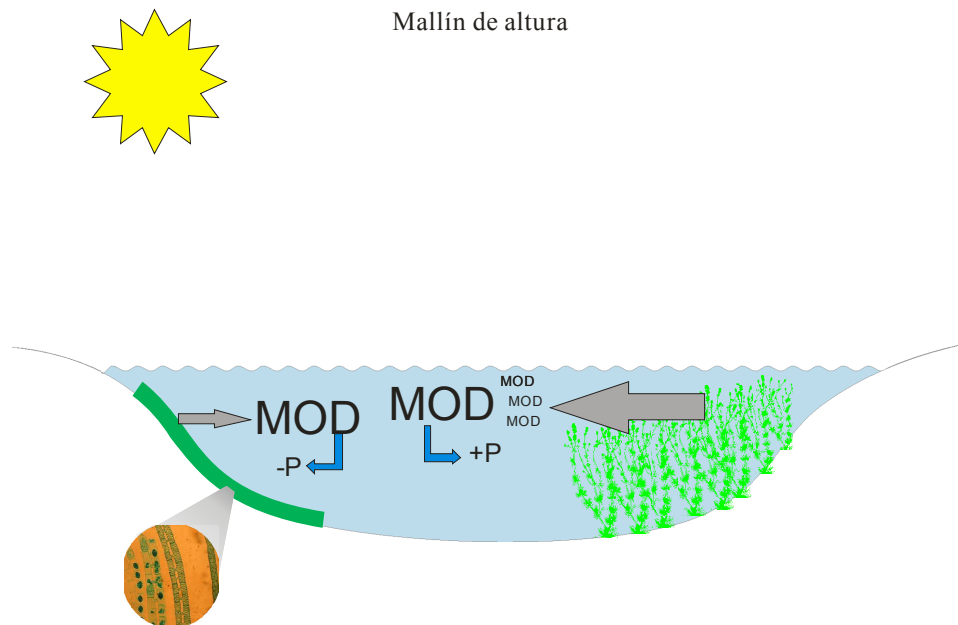
El detrito de la especie exótica fue más colonizado por macroinvertebrados detritívoros debido a su mayor calidad como alimento en cuanto a su menor relación C:P (más P).

Por lo tanto, las condiciones naturales con la nativa *E. pachycarpa* que genera sedimentos con MOP rica en C y pobre en nutrientes cambiarían sustancialmente con un incremento de la exótica *P. anserina*.

Estos cambios llevarían a un aumento de la calidad de los recursos alimenticios (más nutrientes, menos C) para los detritívoros de los humedales. Por lo tanto, con el transcurrir de los años esta invasión podría producir cambios en el balance estequiométrico (C:nutrientes) y en las relaciones ecológicas del ambiente que, a su vez, podría modificar las características de las redes tróficas del humedal.

Ver esquema final de los procesos estudiados en la página siguiente.

Esquemas de los procesos estequiométricos en los ambientes estudiados



BIBLIOGRAFÍA

- Aerts, R. & Chapin, F.S., 2000 The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research***30**:1-67.
- Agoston-Szabo, E., Dinka, M., Nemedi, L. & Horvath, G., 2006. Decomposition of *Phragmites australis* rhizome in a shallow lake. *Aquatic Botany***85**:309-316.
- Albariño, R. & Balseiro, E., 2002. Leaf litter breakdown in Patagonian streams: native versus exotic trees and the effect of invertebrate size. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems***12**:181-192.
- Amon, R.M.W. & Benner, R., 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography***41**:41-51.
- Anesio, A.M., Tranvik, L.J. & Granéli, W., 1999. Production of inorganic carbon from aquatic macrophytes by solar radiation. *Ecology***80**:1852-1859.
- Anesio, A.M., Theil-Nielsen, J. & Graneli, W., 2000. Bacterial growth on photochemically transformed leachates from aquatic and terrestrial primary producers. *Microbial Ecology***40**:200-208.
- APHA, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, AWWA, Washington, D.C.
- Austin, A.T. & Vivanco, L., 2006. Plant litter decomposition in a semi-arid ecosystem controlled by photodegradation. *Nature***442**:555-558.
- Bastidas Navarro, M. & Modenutti, B., 2007. Efecto de la estructuración por macrófitas y por recursos alimentarios en la distribución horizontal de tecamebas y rotíferos en un lago andino patagónico. *Revista chilena de historia natural***80**:345-362.
- Bastidas Navarro, M., Balseiro, E. & Modenutti, B., 2009. Effect of UVR on lake water and macrophyte leachates in shallow Andean-Patagonian lakes: bacterial response to changes in optical features. *Photochemistry and Photobiology***85**:332-340.
- Bastidas Navarro, M. & Modenutti, B.E., 2010. UVR induce optical changes and phosphorous release of lake water and macrophyte leachates in shallow Andean lakes. *Journal of Limnology***69**:112-119.
- Benner, R. & Kaiser, K., 2003. Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography***48**:118-128.
- Bertilsson, S. & Tranvik, L.J., 2000. Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnology and Oceanography***45**:753-762.

-
- Bertilsson, S. & Jones, J.B., 2003. Supply of Dissolved Organic Matter to aquatic Ecosystem: autochthonous sources. En: Findlay, S.E.G. & Sinsabaugh, R.L. (Eds.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, pp. 3-24.
- Bianchini Jr, I., Silva, R.H., Cunha-Santino, M.B. & Panhota, R.S., 2010. Aerobic and anaerobic decomposition of *Pistia stratiotes* leachates from a tropical eutrophic reservoir (Barra Bonita, sp, Brazil). *Decomposição aeróbia e anaeróbia de lixiviados de Pistia stratiotes de um reservatório eutrófico tropical (Barra Bonita, SP, Brasil)*70:559-568.
- Brinkmann, T., Sartorius, D. & Frimmel, F.H., 2003. Photobleaching of humic rich dissolved organic matter. *Aquatic Sciences*65:415-424.
- Brundrett, M., Melville, L. & Peterson, L., 1994. Isolating and propagating Glomalean fungi. En: Brundrett, M., Melville, L. & Peterson, L. (Eds.), *Practical methods in mycorrhizal research*. . Mycologue Publications, Waterloo, Ontario, Canada.
- Caceres, C.E., Tessier, A.J., Andreou, A. & Duffy, M.A., 2008. Stoichiometric relationships in vernal pond plankton communities. *Freshwater Biology*53:1291-1302.
- Cardoso, B.M., Chaia, E.E. & Raffaele, E., 2010. Are Northwestern Patagonian "mallín" wetland meadows reservoirs of *Ochetophila trinervis* infective *Frankia*? *Symbiosis*52:11-19.
- Carpenter, S.R. & Adams, M.S., 1978. Macrophyte control by harvesting and hericides: implications for phosphorous cycling in lake Wingra, Wisconsin. *Journal of Aquatic Plant Management*16:20-23.
- Cattaneo, A., Galanti, G., Gentinetta, S. & Susana, A., 1998. Epiphytic algae and macroinvertebrates on submerged and floating-leaved macrophytes in an Italian lake. *Freshwater Biology*39:725-740.
- Cornwell, W.K., Bedford, B.L. & Chapin, C.T., 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus-poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany*88:1824-1829.
- Correa, 1984. . Escalloniaceae, Dicoliledoneae dialipétalas (Rosaceae a Leguminosae). . En: Correa, M.N. (Ed.), *Flora Patagónica*. Colección Científica. INTA, pp. 77-73.
-

-
- Cuassolo, F., Bastidas Navarro, M., Balseiro, E. & Modenutti, B., 2011. Leachates and elemental ratios of macrophytes and benthic algae of an andeanhigh altitude wetland. *Journal of Limnology***70**:168-176.
- Cuassolo, F., Balseiro, E. & Modenutti, B., 2012. Alien vs. native plants in a Patagonian wetland: elemental ratios and ecosystem stoichiometric impacts. *Biological Invasions***14**:179-189.
- Cyr, H. & Downing, J.A., 1988a. Empirical relationships of phytomacrofaunal abundance to plant biomass and macrophyte bed characteristics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences***45**:976-984.
- Cyr, H. & Downing, J.A., 1988b. The abundance of phytophilous invertebrates on different species of submersed macrophyte. *Freshwater Biology***20**:365-374
- Champion, P.D. & Reeves, P., 2009. *Factors causing dune ephemeral wetlands to be vulnerable to weed invasion*. Publishing Team, Department of Conservation.
- Chimney, M.J. & Pietro, K.C., 2006. Decomposition of macrophyte litter in a subtropical constructed wetland in south Florida (USA). *Ecological Engineering***27**:301-321.
- Christensen, J.R., Crumpton, W.G. & Van Der Valk, A.G., 2009. Estimating the breakdown and accumulation of emergent macrophyte litter: A mass-balance approach. *Wetlands***29**:204-214.
- Daleo, P., Fanjul, E., Casariego, A.M., Silliman, B.R., Bertness, M.D. & Iribarne, O., 2007. Ecosystem engineers activate mycorrhizal mutualism in salt marshes. *Ecology Letters***10**:902-908.
- Davis, C. & Van der Valk, A., 1983. Litter decomposition in prairie glacial marshes. En: R. Good, Whigham, D. & Simpson, R. (Eds.), *Freshwater Wetlands: Ecological Processes and Management Potential* Academic Press, New York, NY.
- Davis, S.M., 1991. Growth, decomposition, and nutrient retention of *Cladium jamaicense* Crantz and *Typha domingensis* Pers. in the Florida Everglades. *Aquatic Botany***40**:203-224.
- De Lange, H.J. & Lüring, M., 2003. Effects of UV-B irradiated algae on zooplankton grazing. *Hydrobiologia***491**:133-144.

-
- De Tezanos Pinto, P., Allende, L. & O'Farrell, I., 2007. Influence of free-floating plants on the structure of a natural phytoplankton assemblage: an experimental approach. *Journal of Plankton Research***29**:47-56.
- Del Giorgio, P.A. & Cole, J.J., 1998. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annual Review of Ecology and Systematics***29**:503-541.
- del Valle, H.F., 1998. Patagonian soils: A regional synthesis. *Ecología Austral***8**:103-123.
- Demars, B.O.L. & Edwards, A.C., 2007. Tissue nutrient concentrations in freshwater aquatic macrophytes: high inter-taxon differences and low phenotypic response to nutrient supply. *Freshwater Biology***52**:2073-2086.
- Denward, C.M.T. & Tranvik, L.J., 1998. Effects of solar radiation on aquatic macrophyte litter decomposition. *Oikos***82**:51-58.
- Díaz Villanueva, V. & Trochine, C., 2005. The role of microorganisms in the diet of *Verger* cf. *limnophilus* (Trichoptera: Limnephilidae) larvae in a Patagonian Andean temporary pond. *Wetlands***25**:473-479.
- Domínguez, E., Elvebakk, A., Marticorena, C. & Pauchard, A., 2006. Plantas introducidas en el Parque Nacional Torres del Paine, Chile. *Gayana Botanica***63**:131-141.
- Dunham, R.M., Ray, A.M. & Inouye, R.S., 2003. Growth, physiology, and chemistry of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Typha latifolia* seedlings. *Wetlands***23**:890-896.
- Egertson, C.J., Kopaska, J.A. & Downing, J.A., 2004. A century of change in macrophyte abundance and composition in response to agricultural eutrophication. *Hydrobiologia***524**:145-156.
- Elser, J., Marzolf, E. & Goldman, C., 1990. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences***47**:1468-1477.
- Elser, J.J., Fagan, W.F., Denno, R.F., Dobberfuhl, D.R., Folarin, A., Huberty, A., Interlandi, S., Kilham, S.S., McCauley, E., Schulz, K.L., Siemann, E.H. & Sterner, R.W., 2000. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature***408**:578-580.
- Elser, J.J. & Hamilton, A., 2007. Stoichiometry and the New Biology: The Future Is Now. *PLoS Biology***5**:e181.
-

-
- Elser, J.J., Fagan, W.F., Kerkhoff, A.J., Swenson, N.G. & Enquist, B.J., 2010. Biological stoichiometry of plant production: Metabolism, scaling and ecological response to global change. *New Phytologist***186**:593-608.
- Engelhardt, K.A. & Ritchie, M.E., 2001. Effects of macrophyte species richness on wetland ecosystem functioning and services. *Nature***411**:687-689.
- Ezcurra, C. & Brion, C., 2005. *Plantas del Nahuel huapi*. Universidad Nacional del Comahue & Red Latinoamericana de Botánica, San Carlos de Bariloche.
- Farjalla, V., Marinho, C. & Esteves, F., 1999. Uptake of oxygen in the initial stages of decomposition of aquatic macrophytes and detritus from terrestrial vegetation in a tropical coastal lagoon. *Acta Limnol. Brasil***11**:185-193.
- Farjalla, V.F., Anesio, A.M., Bertilsson, S. & Granéli, W., 2001. Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates: Abiotic transformations and bacterial response. *Aquatic Microbial Ecology***24**:187-195.
- Fellerhoff, C., Voss, M. & Wantzen, K.M., 2003. Stable carbon and nitrogen isotope signatures of decomposing tropical macrophytes. *Aquatic Ecology***37**:361-375.
- Ferreira, M., Ezcurra, C. & Clayton, S. (Eds.), 2005. *High mountain flowers*, Buenos Aires, Argentina.
- Figuerola, F.L., Korbee, N., Carrillo, P., Medina-Sánchez, J.M., Mata, M., Bonomi, J. & Sánchez-Castillo, P.M., 2009. The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). *Journal of Limnology***68**:206-216.
- Frost, P.C., Stelzer, R.S., Lamberti, G.A. & Elser, J.J., 2002. Ecological stoichiometry of trophic interactions in the benthos: understanding the role of C: N: P ratios in lentic and lotic habitats. *Journal of the North American Benthological Society*:515-528.
- Gallegos, C.L., Correll, D.L. & Pierce, J.W., 1990. Modeling spectral diffuse attenuation, absorption, and scattering coefficients in a turbid estuary. *Limnology and Oceanography***35**:1486-1502.
- Gehrke, C., Johanson, U., Callaghan, T.V., Chadwick, D. & Robinson, C.H., 1995. The impact of enhanced ultraviolet-B radiation on litter quality and decomposition in *Vaccinium* leaves from the Subarctic. *Oikos***72**:213-222.
-

-
- Genkai-Kato, M., 2007. Macrophyte refuges, prey behaviour and trophic interactions: consequences for lake water clarity. *Ecology Letters***10**:105-114.
- Gessner, M.O., 2001. Mass loss, fungal colonisation and nutrient dynamics of *Phragmites australis* leaves during senescence and early aerial decay. *Aquatic Botany***69**:325-339.
- González, A.L., Kominoski, J.S., Danger, M., Ishida, S., Iwai, N. & Rubach, A., 2010. Can ecological stoichiometry help explain patterns of biological invasions? *Oikos***119**:779-790.
- González Sagrario, M., Balseiro, E., Ituarte, R. & Spivak, E., 2009. Macrophytes as refuge or risky area for zooplankton: A balance set by littoral predacious macroinvertebrates. *Freshwater Biology***54**:1042-1053.
- González Sagrario, M.A. & Balseiro, E., 2010. The role of macroinvertebrates and fish in regulating the provision by macrophytes of refugia for zooplankton in a warm temperate shallow lake. *Freshwater Biology***55**:2153-2166.
- Hader, D.P., Helbling, E.W., Williamson, C.E. & Worrest, R.C., 2011. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences***10**:242-260.
- Harguinteguy, C.A., Schreiber, R. & Pignata, M.L., 2013. *Myriophyllum aquaticum* as a biomonitor of water heavy metal input related to agricultural activities in the Xanaes River (Córdoba, Argentina). *Ecological Indicators***27**:8-16.
- Hauenstein, E., González, M., Peña-Cortes, F. & Muñoz-Pedrerros, A., 2002. Flora and vegetation of coastal wetlands near Tolten, Chile. *Gayana Botanica***59**:s87-100.
- Hauenstein, E., Peña-Cortés, F., Bertrán, C., Tapia, J. & Schlatter, R., 2008. Floristic comparison and trophic condition based on indicator species in coastal lagoons of the Araucanian region, Chile. *Ecología Austral***18**:43-53.
- Helms, J.R., Stubbins, A., Ritchie, J.D., Minor, E.C., Kieber, D.J. & Mopper, K., 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography***53**:955-969.
- Hessen, D.O., Faerovig, P.J. & Andersen, T., 2002. Light, nutrients, and P : C ratios in algae: Grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology***83**:1886-1898.

-
- Hillebrand, H. & Sommer, U., 1999. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnology and Oceanography***44**:440-446.
- Hoorens, B., Aerts, R. & Stroetenga, M., 2003. Does initial litter chemistry explain litter mixture effects on decomposition? *Oecologia***137**:578-586.
- Horppila, J. & Nurminen, L., 2001. The effect of an emergent macrophyte (*Typha angustifolia*) on sediment resuspension in a shallow north temperate lake. *Freshwater Biology***46**:1447-1455.
- Ipsilantis, I. & Sylvia, D., 2007. Abundance of fungi and bacteria in a nutrient-impacted Florida wetland. *Applied Soil Ecology***35**:272-280.
- Iriondo, M., Orellana, J. & Neiff, M., 1974. Sobre el concepto de mallín cordillerano. . *Revista de la Asociación Científico Naturalista Literario* **5**:45-52.
- Iriondo, M., 1989. Quaternary lakes of Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology***70**:81-88.
- Izaguirre, I., Pizarro, H., de Tezanos Pinto, P., Rodriguez, P., O'Farrell, I., Unrein, F. & Gasol, J.M., 2010. Macrophyte influence on the structure and productivity of photosynthetic picoplankton in wetlands. *Journal of Plankton Research***32**:221-238.
- Jumpponen, A., 2001. Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza***11**:207-211.
- Kieber, D.J., McDaniel, J. & Mopper, K., 1989. Photochemical source of biological substrates in sea water: Implications for carbon cycling. *Nature***341**:637-639.
- Kirby, D.R., Green, D.M. & Mings, T., 1989. Nutrient composition of selected submerged macrophytes in Northern Prairie wetlands. *Journal of Range Management***42**:323-326.
- Kragh, T. & Søndergaard, M., 2004. Production and bioavailability of autochthonous dissolved organic carbon: effects of mesozooplankton. *Aquatic Microbial Ecology***36**:61-72.
- Kronberg, L., 1999. Content of humic substances in freshwater. En: Keskitalo, J. & Eloranta, P. (Eds.), *Limnology of Humic Waters*. Backhuys Publishers, Leiden the Netherlands, pp. 9-10. .
-

-
- Kuehn, K.A., Lemke, M.J., Suberkropp, K. & Wetzel, R.G., 2000. Microbial biomass and production associated with decaying leaf litter of the emergent macrophyte *Juncus effusus*. *Limnology and Oceanography***45**:862-870.
- Lewis, W.M., 2002. Yield of nitrogen from minimally disturbed watersheds of the United States. *Biogeochemistry***57-58**:375-385.
- Loladze, I. & Elser, J.J., 2011. The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. *Ecology Letters***14**:244-250.
- Longhi, D., Bartoli, M. & Viaroli, P., 2008. Decomposition of four macrophytes in wetland sediments: Organic matter and nutrient decay and associated benthic processes. *Aquatic Botany***89**:303-310.
- Lozan, J.L.G.H.H.P., 2001. *Cilamte of the 21st century: Changes and risks*. WA, Hamburg, Germany.
- Mans, C., Demvard, T. & Tranvik, L.J., 1998. Effects of solar radiation on aquatic macrophyte litter decomposition. *Oikos***82**:51-58.
- Maranger, R. & Pullin, M., 2003. Elemental complexation by dissolved organic matter in lakes: implications for Fe speciation and the bioavailability of Fe and P. *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter*. Academic Press/Elsevier Science, San Diego, California, USA:185–214.
- Marinho, C.C., Meirelles-Pereira, F., Gripp, A.d.R., Guimarães, C.d.C., Esteves, F.d.A. & Bozelli, R.L., 2010. Aquatic macrophytes drive sediment stoichiometry and the suspended particulate organic carbon composition of a tropical coastal lagoon. *Acta Limnologica Brasiliensia***22**:208-217.
- Markgraf, V., 1984. Late Pleistocene and Holocene vegetation history of temperate Argentina: Lago Morenito, Bariloche. . *Dissertations Bot***72**:235-254.
- Matzek, V. & Vitousek, P.M., 2009. N:P stoichiometry and protein:RNA ratios in vascular plants: an evaluation of the growth-rate hypothesis. *Ecology Letters***12**:765-771.
- McKnight, D.M., Andrews, E.D., Spaulding, S.A. & Aiken, G.R., 1994. Aquatic fulvic acids in algal-rich antarctic ponds. *Limnology and Oceanography***39**:1972-1979.
- Meerhoff, M., Mazzeo, N., Moss, B. & Rodríguez-Gallego, L., 2003. The structuring role of free-floating versus submerged plants in a subtropical shallow lake. *Aquatic Ecology***37**:377-391.
-

-
- Meerhoff, M., Fosalba, C., Bruzzone, C., Mazzeo, N., Noordoven, W. & Jeppesen, E., 2006. An experimental study of habitat choice by *Daphnia*: plants signal danger more than refuge in subtropical lakes. *Freshwater Biology***51**:1320-1330.
- Menendez, M., 2008. Leaf growth, senescence and decomposition of *Juncus maritimus* Lam. in a coastal Mediterranean marsh. *Aquatic Botany***89**:365-371.
- Miller, M.P., McKnight, D.M., Chapra, S.C. & Williams, M.W., 2009. A model of degradation and production of three pools of dissolved organic matter in an alpine lake. *Limnology and Oceanography***54**:2213–2227.
- Modenutti, B., Albariño, R., Bastidas Navarro, M., Díaz Villanueva, V., Souza, M.S., Trochine, C., Laspoumaderes, C., Cuassolo, F., Mariluán, G., Buria, L. & Balseiro, E., 2010. Structure and dynamic of food webs in Andean North Patagonian freshwater systems: organic matter, light and nutrient relationships. . *Ecología Austral***20**:95-114.
- Modenutti, B.E., Balseiro, E., Dieguez, M.C., Queimaliños, C. & Albariño, R., 1998. Heterogeneity of fresh-water Patagonian ecosystems. *Ecología Austral***8**:155-165.
- Moran, M.A. & Hodson, R.E., 1990. Bacterial production on humic and nonhumic components of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography***35**:1744-1756.
- Morris, D.P., Zagarese, H., Williamson, C.E., Balseiro, E.G., Hargreaves, B.R., Modenutti, B., Moeller, R. & Queimaliños, C., 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography***40**:1381-1391.
- Moss, B., 1998. *Ecology of fresh waters: man and medium, past to future*. Wiley-Blackwell.
- Münster, U. & Chróst, R.J., 1990. Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. En: Overbeck, J. & Chrost, R.J. (Eds.), *Aquatic Microbial Ecology*. Springer, pp. 8-46.
- Münster, U., 1999. Amino acid profiling in natural organic matter isolated by reverse osmosis from eight different boreal freshwaters. *Environment International***25**:209-224.
- Naiman, R.J. & Melillo, J.M., 1984. Nitrogen budget of a subarctic stream altered by beaver (*Castor canadensis*). *Oecologia***62**:150-155.
-

-
- Navarro, M.A.B. & Modenutti, B.E., 2012. Precipitation patterns, dissolved organic matter and changes in the plankton assemblage in Lake Escondido (Patagonia, Argentina). *Hydrobiologia***691**:189-202.
- Newel, S.Y., 1993. Removal of fungal and total organic matter from decaying cordgrass leaves by shredder snails. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology***171**:39-49.
- Nusch, E., 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Archiv für Hydrobiologie Beihefte Ergebnisse der Limnologie***14**:14-36.
- O'Farrell, I., Pinto, P.D.T. & Izaguirre, I., 2007. Phytoplankton morphological response to the underwater light conditions in a vegetated wetland. *Hydrobiologia***578**:65-77.
- Obernosterer, I., Sempéré, R. & Herndl, G.J., 2001. Ultraviolet radiation induces reversal of the bioavailability of DOM to marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology***24**:61-99.
- Obernosterer, I. & Benner, R., 2004. Competition between biological and photochemical processes in the mineralization of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography***49**:117-124.
- Orce, V.L. & Helbling, E.W., 1997. Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: Extent of the 'ozone hole'. *Global and Planetary Change***15**:113-121.
- Osborne, L.L. & Kovacic, D.A., 2007. Riparian vegetated buffer strips in water-quality restoration and stream management. *Freshwater Biology***52**:243-258.
- Osborne, T., Inglett, P. & Reddy, K., 2007. The use of senescent plant biomass to investigate relationships between potential particulate and dissolved organic matter in a wetland ecosystem. *Aquatic Botany***86**:53-61.
- Osburn, C.L., Morris, D.P., Thorn, K.A. & Moeller, R.E., 2001. Chemical and optical changes in freshwater dissolved organic matter exposed to solar radiation. *Biogeochemistry***54**:251-278.
- Osmolovskaya, N. & Kurilenko, V., 2005. Macrophytes in phytoremediation of heavy metal contaminated water and sediments in urban inland ponds. *Geophysical research abstracts*, p. 10510.
- Pace, M. & Cole, J., 2002. Synchronous variation of dissolved organic carbon and color in lakes. *Limnology and Oceanography***47**:333-342.
-

-
- Peret, A. & Bianchini, I., 2004. Stoichiometry of aerobic mineralization (O/C) of aquatic macrophytes leachate from a tropical lagoon (São Paulo–Brazil). *Hydrobiologia***528**:167-178.
- Pérez, M. & Sommaruga, R., 2006. Differential effect of algal-and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnology and Oceanography***51**:2527-2537.
- Perotti, M.G., Diéguez, M.C. & Jara, F.G., 2005. Estado del conocimiento de humedales del norte patagónico (Argentina): aspectos relevantes e importancia para la conservación de la biodiversidad regional. *Revista chilena de historia natural***78**:723-737.
- Peters, G.A., 1975. The *Azolla-Anabaena azollae* relationship. III. Studies on metabolic capabilities and a further characterization of the symbiont. *Archives of Microbiology***103**:113-122.
- Poi De Neiff, A., Neiff, J.J. & Casco, S.L., 2006. Leaf litter decomposition in three wetland types of the Parana River floodplain. *Wetlands***26**:558-566.
- Prieur-Richard, A.-H. & Lavorel, S., 2000. Invasions: the perspective of diverse plant communities. *Austral Ecology***25**:1-7.
- Qualls, R.G. & Richardson, C.J., 2003. Factors controlling concentration, export, and decomposition of dissolved organic nutrients in the Everglades of Florida. *Biogeochemistry***62**:197-229.
- Raffaele, E., 1993. Estructura y dinámica de la vegetación de un mallín de altura sometido a perturbaciones experimentales. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina, p. 116.
- Raffaele, E., 1996. Relationship between seed and spore banks and vegetation of a mountain flood meadow (Mallín) in Patagonia, Argentina. *Wetlands***16**:1-9.
- Raffaele, E., 1999. Mallines: Aspectos generales y problemas particulares. En: AI, M. (Ed.), *Tópicos sobre Humedales Templados y Tropicales de Sudamérica*. . UNESCO, Montevideo, pp. 27-33.
- Raffaele, E., 2004. Susceptibility of a Patagonian mallín flooded meadow to invasion by exotic species. *Biological Invasions***6**:473–481.
- Rai, A.K. & Rai, V., 2000. Response of NaCl-adapted and unadapted *Azolla pinnata-Anabaena azollae* complex to salt-stress: Partial photosynthetic processes and respiration. *Symbiosis***29**:249-261.

-
- Rathore, V.P. & Singh, H.P., 1995. Quantification and correlation of vesicular-arbuscular mycorrhizal propagules with soil properties of some mollisols of northern India. *Mycorrhiza***5**:201-203.
- Reche, I., Pulido-Villena, E., Conde-Porcuna, J.M. & Carrillo, P., 2001. Photoreactivity of dissolved organic matter from high-mountain lakes of Sierra Nevada, Spain. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research***33**:426-434.
- Rejmánková, E. & Houdková, K., 2006. Wetland plant decomposition under different nutrient conditions: What is more important, litter quality or site quality? *Biogeochemistry***80**:245-262.
- Richardson, D.M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D. & West, C.J., 2000. Naturalization and Invasion of Alien Plants: Concepts and Definitions. *Diversity and Distributions***Vol. 6**:93-107.
- Rodrigo, M.A., Rojo, C., Álvarez-Cobelas, M. & Cirujano, S., 2007. Chara hispida beds as a sink of nitrogen: Evidence from growth, nitrogen uptake and decomposition. *Aquatic Botany***87**:7-14.
- Roehm, C.L., 2005. Respiration in wetland ecosystems. En: del Giorgio, P.A. & Wulliams, P.J.I.B. (Eds.), *Respiration in Aquatic Ecosystems*. OXFORD, University Press, Montreal, Canada, pp. 83-102.
- Rozema, J., Staajvan, de J., Bjorn, OL, Caldwell, M., 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecology and Evolution***12**:22-28.
- Sachse, A., Babenzien, D., Ginzler, G., Gelbrecht, J. & Steinberg, C.E.W., 2001. Characterization of dissolved organic carbon (DOC) in a dystrophic lake and an adjacent fen. *Biogeochemistry***54**:279-296.
- Sánchez-Andrés, R., Sánchez-Carrillo, S., Alatorre, L.C., Cirujano, S. & Álvarez-Cobelas, M., 2010. Litterfall dynamics and nutrient decomposition of arid mangroves in the Gulf of California: Their role sustaining ecosystem heterotrophy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science***89**:191-199.
- Schindler, D. & Curtis, P., 1997. The role of DOC in protecting freshwaters subjected to climatic warming and acidification from UV exposure. *Biogeochemistry***36**:1-8.
- Shick, J.M., Romaine-Lioud, S., Ferrier-Pagès, C. & Gattuso, J.P., 1999. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its
-

- population of symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography***44**:1667-1682.
- Souza, M.S., Balseiro, E., Laspoumaderes, C. & Modenutti, B., 2010. Effect of Ultraviolet Radiation on Acetylcholinesterase Activity in Freshwater Copepods. *Photochemistry and Photobiology***86**:367-373.
- Sturner, R.W., Elser, J.J., Fee, E.J., Guildford, S.J. & Chrzanowski, T.H., 1997. The light:nutrient ratio in lakes: The balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *The American Naturalist***150**:663-684.
- Sturner, R.W. & Elser, J.J., 2002. *Ecological stoichiometry. The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, Princeton, NJ USA.
- Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. & Thorp, J.H., 1996. *Algal ecology: Freshwater benthic ecosystem*. Academic press.
- Szczepański, A., 1977. Limiting factors and productivity of macrophytes. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica***12**:1-7.
- Tranvik, L., 1992. Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. En: Salonen, K., Kairesalo, T. & Jones, R.I. (Eds.), *Dissolved Organic Matter in Lacustrine Ecosystems*. Springer Netherlands, pp. 107-114.
- Triska, F.J., Kennedy, V.C., Avanzino, R.J., Zellweger, G.W. & Bencala, K.E., 1989. Retention and transport of nutrients in a third-order stream: channel processes. *Ecology***70**:1877-1892.
- Trochine, C., Modenutti, B.E. & Balseiro, E.G., 2009. Chemical signals and habitat selection by three zooplankters in Andean Patagonian ponds. *Freshwater Biology***54**:480-494.
- Valderrama, J.C., 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry***10**:109-122.
- Van, T.K., Wheeler, G.S. & Center, T.D., 1999. Competition between *Hydrilla verticillata* and *Vallisneria americana* as influenced by soil fertility. *Aquatic Botany***62**:225-233.
- Varnell, C.J., Thawaba, S.A. & Solis, M., 2010. *Typha domingensis*-A potential tool for bioremediation of wetlands as relevant to environmental forensics: A case study from Palo Verde, Costa Rica. *Environmental Forensics***11**:102-107.

-
- Ventura, M., Liboriussen, L., Lauridsen, T., SØndergaard, M. & Jeppesen, E., 2008. Effects of increased temperature and nutrient enrichment on the stoichiometry of primary producers and consumers in temperate shallow lakes. *Freshwater Biology***53**:1434-1452.
- Vernet, M., 2006. Introduction: Enhanced UV-B radiation in natural ecosystems as an added perturbation due to ozone depletion. *Photochemistry and Photobiology***82**:831-833.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W. & Zagarese, H.E., 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio***30**:112-117.
- Villar, C.A., de Cabo, L., Vaithyanathan, P. & Bonetto, C., 2001. Litter decomposition of emergent macrophytes in a floodplain marsh of the Lower Paraná River. *Aquatic Botany***70**:105-116.
- Vitt, D.H. & Bayley, S., 1984. The vegetation and water chemistry of four oligotrophic basin mires in northwestern Ontario. *Canadian Journal of Botany***62**:1485-1500.
- Weisner, S.E.B., Eriksson, P.G., Granéli, W. & Lars, L., 1994. Influence of Macrophytes on Nitrate Removal in Wetlands. *Ambio***23**:363-366.
- Wetzel, R., 2001. *Limnology: lake and river ecosystems*. Academic Press San Diego, CA.
- Wetzel, R.G., 1995. Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems. *Freshwater Biology***33**:83-89.
- Wigand, C., Wehr, J., Limburg, K., Gorham, B., Longergan, S. & Findlay, S., 2000. Effect of *Vallisneria americana* (L.) on community structure and ecosystem function in lake mesocosms. *Hydrobiologia***418**:137-146.
- Williamson, C.E., Stemberger, R.S., Morris, D.P., Frost, T.M. & Paulsen, S.G., 1996. Ultraviolet radiation in North American lakes: Attenuation estimates from DOC measurements and implications for plankton communities. *Limnology and Oceanography***41**:1024-1034.
- Williamson, C.E. & Rose, K.C., 2010. When UV meets fresh water. *Science***329**:637-639.
- Wong, P.K., Liang, Y., Liu, N.Y. & Qiu, J.W., 2010. Palatability of macrophytes to the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata*: Differential effects of multiple plant traits. *Freshwater Biology***55**:2023-2031.

-
- Zagarese, H. & Williamson, C., 2000. Impact of solar UV radiation on zooplankton and fish. En: de Mora, S., Demers, S. & Vernet, M. (Eds.), *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 279–309.
- Zagarese, H.E., Diaz, M., Pedrozo, F., Ferraro, M., Cravero, W. & Tartarotti, B., 2001. Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***61**:35-45.
- Zedler, J. & Kercher, S., 2004. Causes and Consequences of Invasive Plants in Wetlands: Opportunities, Opportunists, and Outcomes. *Critical Reviews in Plant Sciences***23**:431-452.
- Zedler, J.B. & Kercher, S., 2005. Wetland resources: Status, Trends, Ecosystem Services, and Restorability. *Annual Review of Environment and Resources***30**:39-74.
- Zepp, R.G., Callaghan, T.V. & Erickson, D.J., 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. *Ambio***24**:181-187.
- Zepp, R.G., Callaghan, T.V. & Erickson Iii, D.J., 2003. Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. *Photochemical and Photobiological Sciences***2**:51-61.

Leachates and elemental ratios of macrophytes and benthic algae of an Andean high altitude wetland

Florencia CUASSOLO*, Marcela BASTIDAS NAVARRO, Esteban BALSEIRO and Beatriz MODENUTTI

INIBIOMA (CONICET) – UNC Laboratorio de Limnología, Quintral 1250, 8400 Bariloche, Argentina

*e-mail corresponding author: cuassolof@comahue-conicet.gob.ar

ABSTRACT

In wetlands, macrophytes and filamentous algae constitute an important carbon source for the total content of Dissolved Organic Matter (DOM) of the environment. Mallin wetland meadows are highly diverse and rare habitats in Patagonia, that can be characterized as wet meadows with a dense cover mainly dominated by herbaceous plants. We carried out a field study comparing elemental composition (C:N:P) of benthic algae (Spirogyra sp. and Zygnema sp.) and the submerged macrophyte (Myriophyllum quitense) from a high latitude wetland (local name: mallin). Besides we performed laboratory experiments in order to study the effect of ultraviolet radiation (UVR) on the optical properties and nutrient release of DOM from leachates of these benthic algae and submerged macrophyte. The obtained results indicated that macrophyte leachates could contribute significantly to changes in the optical characteristics of the wetlands while benthic algae contribute with leachates with low photoreactivity. Finally, nutrient release differs among plant species and season: benthic algae leachates release more P in spring, while M. quitense releases more of this nutrient in autumn. These results suggested that the different colonization may contribute differentially to the chemical environment of the wetland.

Key words: high altitude wetlands, submerged macrophytes, dissolved organic matter, carbon nitrogen phosphorus, ultraviolet radiation

1. INTRODUCTION

Patagonian wetlands occupy approximately a 5% of the total Patagonia area (Iriondo 1989). Among these there is a particular kind of wetland called by the Mapuche name mallin. These wetlands, which are similar to bogs, can be characterized as wet meadows with a dense cover mainly dominated by herbaceous plants belonging to families Juncaceae, Cyperaceae and Poaceae with a high net primary production (Raffaele 1999). Mallin wetland meadows are highly diverse habitats in western Patagonia (Raffaele 2004) and they are located either in steppe or forest environments in the Andes Cordillera. The steppe mallin wetlands are important resources for native and introduced species and in particular very significant for local economies based on cattle and sheep (Leon *et al.* 1998; Raffaele 1999; Hauenstein *et al.* 2002). On the contrary, mallin wetlands located in the mountains constituted flooded mountain meadows that are included in protected areas such as National Parks (Raffaele 2004), and protected from cattle grazing. However, due to their high altitude location, they are exposed to harsh environmental factors like ice and snow (provoking a shortage in plant growth) and high ultraviolet radiation (UVR). These wetlands are hydrologically complex environments (Iriondo *et al.* 1974), with the bottom covered by the submerged macrophyte *Myriophyllum quitense* (Ezcurra & Brion 2005), and filamentous benthic algae (*Zygnema* and *Spirogyra*). Although, there are studies regarding

hydrology, seed banks, flora and fauna including microbial communities (Markgraf 1984; Raffaele 1996; Del Valle 1998; Cardoso *et al.* 2010), little is known about the elemental composition of plants, algae, and their leachates.

Macrophytes and filamentous algae constitute an important carbon source for the total content of dissolved organic matter (DOM) of wetlands (Wetzel 2001). These benthic producers release synthesized DOM during photosynthesis or through leaching of aged and dead tissues and filaments (Bertilsson & Jones 2003). The DOM entering the aquatic environment can remain in the wetland water (Naiman & Melillo 1984), and then be incorporated into the aquatic community through bacteria activity (Triska *et al.* 1989; Bastidas Navarro *et al.* 2009). On the other hand, DOM represents a significant component absorbing solar radiation in aquatic ecosystems, particularly in the ultraviolet region of the light spectrum (290 to 400 nm) (Morris *et al.* 1995; Schindler & Curtis 1997; Osburn *et al.* 2001). This energy absorption may lead to a variety of photochemical processes, including the photodegradation of DOM that could be related to changes in spectral and molecular properties (Bertilsson & Tranvik 2000; Farjalla *et al.* 2001; Helms *et al.* 2008). In addition, UVR increases macrophyte degradation and leachate production (Mans *et al.* 1998; Anesio *et al.* 1999), and the photochemical processes may result in an important source and sink of essential nutrients such as nitrogen and phosphorus (Lewis 2002; Qualls & Richardson

2003). Since Patagonia is under the effect of the Antarctic ozone hole (Villafañe *et al.* 2001) a particular interest in these reactions rises from the increment of UVR caused by the reduction in the stratospheric ozone layer (Osburn *et al.* 2001; Zepp *et al.* 2003; Vernet 2006). Although there is lack of information about how UVR affects mallín wetlands dynamics, a strong effect of UVR on high altitude lakes of Patagonia was pointed out by previous studies (Zagarese & Williamson 2000). Accordingly, an increase in DOM photobleaching due to increasing levels of UVR radiation was predicted (Osburn *et al.* 2001), and in turn the interaction of UVR with DOM can result in a nutrient source for aquatic microcommunities (Bastidas Navarro & Modenutti 2010).

The importance of macrophyte and filamentous algae in wetland dynamics was recognized (Wigand *et al.* 2000; Egertson *et al.* 2004). However, the elemental constitution of these producers and how their leachates influence the optical properties of natural water by the input of DOM with different chemical features is still poorly known. This is of particular importance because it will affect the environmental nutrient cycling. In addition, as these environments are exposed to high UVR, a high interaction of short wavelength with this DOM coming from macrophytes and benthic algae is expected, resulting in important photochemical processes. Thus, our main hypothesis is that DOM will interact with UVR differentially according to the different sources. Because of its tissue complexity we expect that vegetal elemental composition and leachates of *M. quitense* will be richer in nutrients than those of *Zygnema* and *Spirogyra*. In order to test this hypothesis, we performed a field study to analyze the elemental composition of macrophytes and algae, and laboratory experiments analyzing the effect of UVR on DOM optical properties and nutrient release of their leachates.

2. METHODS

2.1. Study Area

The study was carried out in the mallín Los Patos located at an elevation of 1500 m above sea level, on the western slope of Cerro Chall-Huaco (41°16'S and 71°20'W). The area is included in the Nahuel Huapi National Park, Patagonia, Argentina. At the centre of the meadow there are two streams, and on the western side there is a small pond (Area = 1.5 ha) (Fig. 1). The surrounding vegetation is a subalpine forest of the deciduous *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. The flora of this wetland includes 52 native vascular species and 3 species of bryophytes (Raffaele 1993; Raffaele 1996). In particular, the pond is colonized by two aquatic plants: the emergent *Carex subantarctica* and the submerged *Myriophyllum quitense*, however the bottom is also covered by green filamentous algae of the genera *Spirogyra* and *Zygnema*.

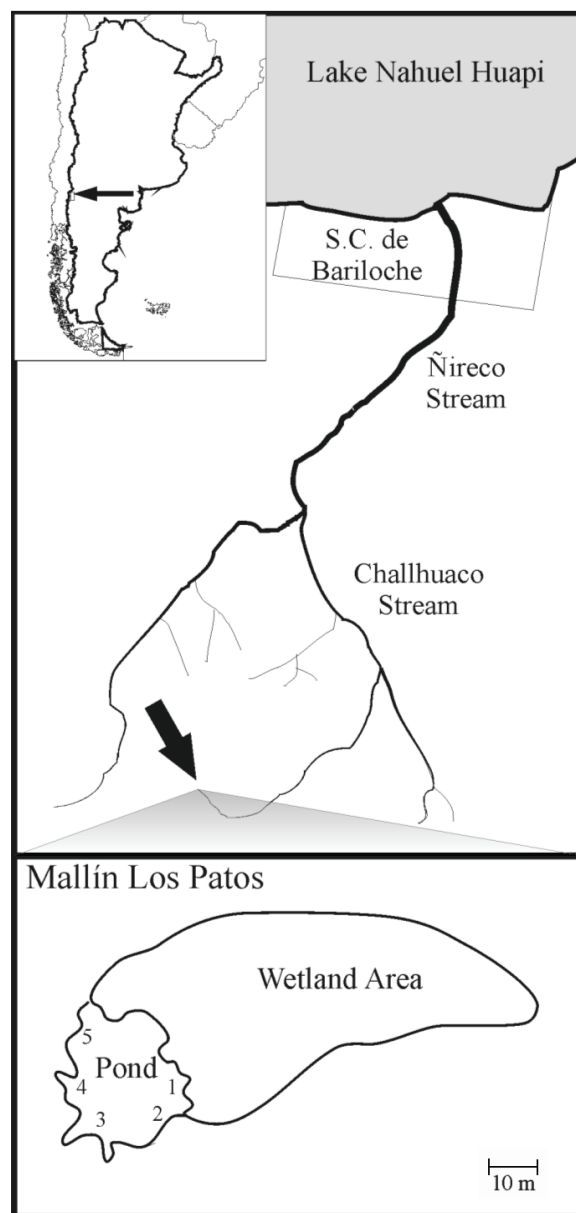


Fig. 1. Geographical location of study area. Numbers indicate the sampling points.

2.2. Field study

The pond was sampled on two different occasions: in late spring (December 2009) and autumn (April 2010) at 5 different sampling points (Fig. 1). Water temperature and dissolved oxygen were measured using an oxymeter (YSI Pro ODO Yellow Spring Instruments, USA), and pH was measured with a pH-meter (HI 8424 Hanna Instruments, USA). Redox potential was measured in the water, and in the sediments with a combined Pt electrode with Ag/AgCl internal reference (HI-3131B Hanna Instruments). Water samples were obtained with a limnological bottle (2 L). Macrophytes and algae were sampled at each sampling point on each sampling occasion. The plants and algae were immediately carried to

the laboratory in polyethylene bags. In addition, the vegetation cover was estimated by measuring directly the different areas covered by the different species.

2.3. Laboratory procedures

Total phosphorus (TP), total dissolved phosphorus (TDP) and total nitrogen (TN) in the pond water were determined according to APHA, (2005) and Valderrama (1981), and chlorophyll-*a* concentration was determined according to Nusch (1980).

The elemental analysis of vegetal tissue and algae was carried out after carefully washing the vegetal material with distilled water. In *Myriophyllum quitense* the shoot and root parts were separated and dried at 60 °C for 48 hours up to a constant weight. Afterwards, dry plants and algae were crushed to powder with a clean mortar and approximately 2 mg of dry weight (DW) was destined for elemental analysis. Carbon (C) and nitrogen (N) concentration in the tissues were measured with a CN analyzer (Thermo Finnigan Flash EA 1112). Phosphorus was measured after combustion of 2 mg DW of tissue at 450 °C during 1 hour followed by the ascorbate-reduced molybdenum method (Apha 2005).

Macrophyte and algae leachates were prepared with algae and plants collected in the field, which were carefully rinsed in distilled water and dried at room temperature. Finally, 1 g of algae or macrophyte was placed in 100 mL of MilliQ water and left there at 4 °C for 48 h following Anesio (2000). In order to eliminate any potential presence of bacteria in the samples all the glassware was sterilized, and the obtained water was filtered through precombusted GF/F filter and then through sterile membrane filters of 0.2 µm pore size. All glassware was previously cleaned with diluted chlorhidric acid (0.5 N), rinsed with MilliQ water, and then combusted at 450 °C for 1 hour to make sure that it was carbon free. Similarly, the GF/F filters (Osmonics) were precombusted at 450 °C for 1 hour.

2.4. Experimental design

The optical features of algae and macrophyte leachates were studied in two experiments: Experiments 1 (late spring: December 2009) and 2 (autumn: April 2010). Both experiments consisted in the exposure of leachates of green filamentous algae and *Myriophyllum quitense* to different light treatments for four hours: (1) exposed to UVR+PAR, (2) exposed to PAR, and (3) DARK (wrapped in aluminium foil). Experiments were carried out in an incubator at 15 ± 1 °C with a PAR intensity of $92 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (daylight fluorescent tubes). The UVR was provided by two UVA-340 fluorescent tubes (Q-Panel Lab Products, Cleveland, OH, U.S.A.). The UVR spectrum of these light tubes closely resembles the solar spectrum between 280 and 350 nm (Shick *et al.* 1999). During the incubation, water received $35 \mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$ of the 340 nm band, and this irradiance level is equivalent to surface noon summer sunlight in

Andean lakes. In the PAR treatment, UVR cutoff was reached using a polyethylene filter. The optical features of this polyethylene, with cutoff at 380 nm and 85% transmittance above 380 nm, were checked before the experiment using a double-beam spectrophotometer Shimadzu UV 2450. Light exposure was carried out in 20 mL quartz tubes. Quartz tubes were distributed in a frame at 30 cm distance from the light source following Bertilsson & Tranvik (2000). In both experiments, exposure was carried out in three replicates.

At the initial and final time of each experiment, spectrophotometric scans were carried out from 250 nm to 790 nm in 10 cm quartz cuvettes using a double-beam spectrophotometer Shimadzu UV2450. Dissolved Organic Carbon (DOC) was measured with a Shimadzu TOC VCSH carbon analyzer. For the nutrient release analysis, at initial and final time, Soluble Reactive Phosphorus (SRP) concentrations were obtained through the ascorbate-reduced molybdenum method.

2.5. Data Analysis

Absorbance units were converted to absorption coefficients (a_d). The ratio $a_{250}:a_{365}$ was used as a measure of the relative size of DOM molecules (Pérez & Sommaruga 2006), and water color was determined as the absorbance coefficient at 440 nm (a_{440}) according to Pace & Cole (2002).

Differences in limnological characteristics between spring and autumn were analyzed using a *t*-test. A Two Way ANOVA ("Plant" and "season" as factors) was applied in order to determine significant differences in optical characteristics and nutrient content between both leachates. Differences in elemental ratios, $a_{250}:a_{365}$ ratio, and SRP concentration were analyzed through a One Way ANOVA. Post hoc comparisons were made using the Tukey Test with an overall significance level of $p = 0.05$. All statistical analyses were performed using SigmaStat 3.1 and Statistica 6.0.

3. RESULTS

In Mallín Los Patos limnological features changed in the two sampling occasions (Tab. 1). Higher mean temperature values were recorded in spring (*t*-test, $p = 0.009$) in coincidence with a lower dissolved oxygen concentration (*t*-test, $p = 0.202$). Nevertheless, dissolved oxygen concentration was always near saturation (85% in spring and 94% in autumn). Water redox potential exhibited high values in both water and sediments. Redox values in the water were significantly higher in spring (*t*-test, $p = 0.027$), while in the sediments no significant differences between seasons were observed (*t*-test, $p = 0.189$). In spring, there were higher dissolved organic carbon concentrations as well as higher water color values (high a_{440}), but lower mean molecular size (high $a_{250}:a_{365}$) (*t*-test, $p = 0.023$ for DOC, $p \leq 0.001$ for a_{440} and $a_{250}:a_{365}$). In spring also higher concentrations of TP, and TDP were observed (*t*-

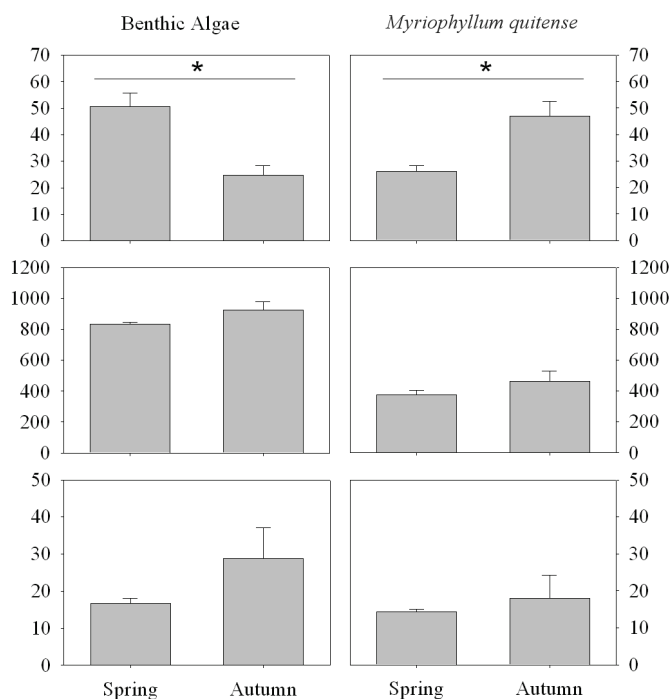


Fig. 2. Elemental relationships (C:N, C:P and N:P ratios) in the tissues of studied species in spring and autumn. (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) between seasons.

test, $p < 0.001$ for both cases). Finally, chlorophyll-*a* concentrations were low in both seasons ($\approx 2.5 \mu\text{g L}^{-1}$), though significantly higher in autumn (t -test, $p < 0.001$) (Tab. 1).

Tab. 1. Limnological characteristics of Mallín Los Patos. Values are given as average \pm standard deviation.

	Spring	Autumn
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	13.33 ± 1.91	7.55 ± 1.88
Dissolved Oxygen (mg L^{-1})	9.2 ± 1.24	11.3 ± 2.27
pH	6.51 ± 0.83	6.24 ± 0.71
Redox Potential (mV)(water)	197 ± 15.51	114 ± 43.61
Redox Potential (mV)(sediments)	275 ± 80.10	202 ± 58.94
DOC (mg L^{-1})	1.1 ± 0.02	0.4 ± 0.08
$a_{250}:a_{365}$	3.50 ± 0.10	2.61 ± 0.06
a_{440}	1.68 ± 0.04	1.08 ± 0.03
TP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	20 ± 0.81	8 ± 0.06
TDP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8 ± 0.34	5 ± 0.06
TN ($\mu\text{g L}^{-1}$)	n.d.	65 ± 5.07
Chlorophyll- <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2 ± 0.01	3 ± 0.05

The vegetation cover exhibited different patterns of spatial distribution between spring and autumn. During spring, the bottom coverage of *M. quitense* was about 80%, while the benthic algae remained lower than 15%. On the other hand, in autumn, benthic algae bottom coverage increased up to 60%, whereas *M. quitense* constituted less than 30%.

We observed differences in the elemental ratios between the studied species and seasons (Fig. 2). The C:N ratio showed significant differences between seasons for both plants, while benthic algae (*Spirogyra* and *Zygnema*) exhibited higher values in spring (t -test, $p =$

0.007) *M. quitense* showed higher ratios in autumn (t -test, $p = 0.025$). On the other hand, the C:P elemental ratios showed no significant differences during both seasons for both plants (t -test, $p = 0.184$ for benthic algae, and $p = 0.258$ for *M. quitense*). Benthic algae exhibited N:P ratio higher than 20, whereas the submerged macrophyte was always below 20 (Fig. 2) and this relationship remained similar during both seasons (t -test, $p = 0.280$ for benthic algae, and $p = 0.613$ for *M. quitense*).

Leachates of both plants also presented differences in their optical and chemical features (Tab. 2). Benthic algae leachates exhibited lower values in the $a_{250}:a_{365}$ ratio indicating higher molecular size than in *M. quitense* (Two Way ANOVA, $p < 0.001$ for "Species" factor, a posteriori Tukey test, $p < 0.001$), and these values did not differ between seasons (Two Way ANOVA, $p = 0.363$ for "Season" factor). We also observed differences in C (DOC) and P (SRP) in the two leachates, *M. quitense* being richer in C and P than benthic algae in both seasons (Two Way ANOVA, $p < 0.001$, a posteriori Tukey test $p < 0.001$) (Tab. 2).

Tab. 2. Optical features and nutrient content of leachates of the macrophyte and the benthic algae.

	Benthic Algae		<i>M. quitense</i>	
	Spring	Autumn	Spring	Autumn
$a_{250}:a_{365}$	3.00 ± 0.05	2.91 ± 0.09	3.51 ± 0.10	3.52 ± 0.03
a_{440}	2.19 ± 0.01	2.29 ± 0.10	2.63 ± 0.12	3.68 ± 0.01
DOC (mg g^{-1})	58.4 ± 0.05	54.8 ± 0.40	70.7 ± 0.02	90.4 ± 0.68
SRP (mg g^{-1})	3.4 ± 0.29	4.1 ± 0.96	7.4 ± 0.73	7.8 ± 0.21

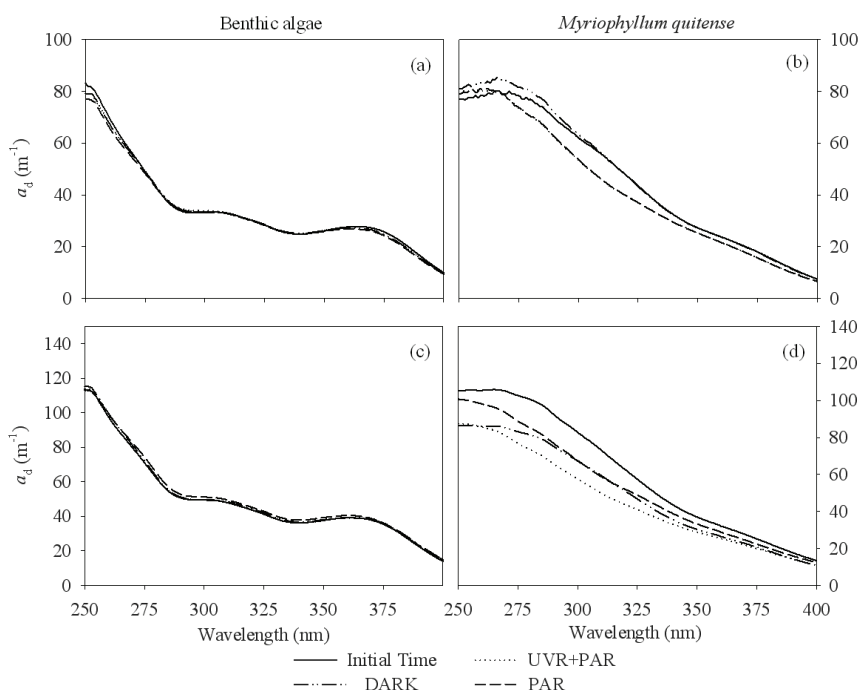


Fig. 3. Spectrophotometric absorbance curves in the leachates from benthic algae (left column) and *Myriophyllum quitense* (right column) in spring (a and b) and in autumn (c and d) experiments.

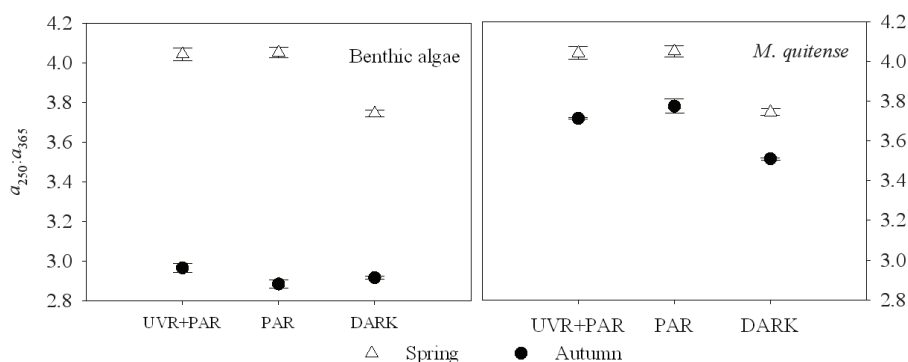


Fig. 4. Mean molecular weight ($a_{250}:a_{365}$ ratio) in the leachates from benthic algae and *Myriophyllum quitense* in both spring experiments.

In each species, in the two experiments the effect of light treatments on the optical features of the leachates showed similar trends (Fig. 3). Benthic algae leachates showed a bimodal pattern at the initial time, with maxima at 307 nm and at 370 nm (Fig. 3a and c); while *M. quitense* exhibited a unimodal spectrum with a maximum at 265 nm (Fig. 3b and d). However, the leachates from benthic algae did not exhibit changes after UVR+PAR or PAR exposure neither in the spectrophotometric scans nor in the $a_{250}:a_{365}$ ratio (One Way ANOVA, $p = 0.918$, Fig. 4), indicating a low photoreaction of this DOM to light exposure regardless of light quality. On the contrary, *M. quitense* leachates showed significant changes in the spectrophotometric scans and in the $a_{250}:a_{365}$ ratio between light treatments (One Way ANOVA, $p < 0.001$ in both seasons, Fig. 4), with higher

values in the UVR+PAR and PAR treatments (*a posteriori* Tukey test, $p < 0.001$ for UVR+PAR and PAR vs DARK for both seasons).

Analyzing nutrient release by the leachates, we found that in the spring experiment benthic algae release more P in the DARK treatment (One Way ANOVA, $p = 0.002$, a posteriori Tukey test, $p < 0.003$ for UVR+PAR and PAR vs DARK), while no significant differences were observed in the autumn experiment (One Way ANOVA, $p = 0.078$) (Fig. 5a, b). On the contrary, we found that *M. quitense* in the spring experiment did not exhibit differences in P release (One Way ANOVA, $p = 0.176$, Fig. 5), while in the autumn experiment significant differences were observed (One Way ANOVA, $p < 0.001$) with more P released in the DARK treatment (Fig. 5c, d).

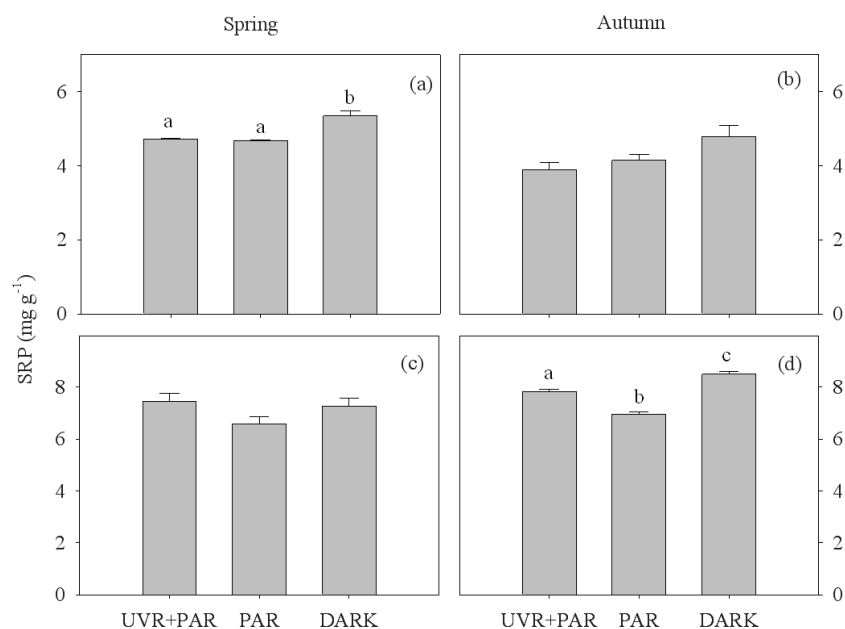


Fig. 5. SRP concentrations for benthic algae (a and b) and *Myriophyllum quitense* (c and d) in spring and autumn experiments. Letters on the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) between light treatments (UVR+PAR, PAR and DARK).

4. DISCUSSION

Most lakes and many streams and rivers have a large proportion of their basins potentially available to macrophytes and epiphytes. Given the extent of habitat colonization and the high production rates (Moss 1998) macrophytes and benthic algae are important sources of dissolved organic matter (DOM) (Bertilsson & Jones 2003). In Mallín Los Patos the whole bottom can be colonized by macrophytes and epiphytes; thus, these plants can be assumed to be very important for the ecosystem dynamics. In particular, our results showed that the submerged macrophyte *Myriophyllum quitense* and the green filamentous algae (*Spirogyra* and *Zygnema*) are important sources of dissolved organic carbon, providing about 55 and 80 mg g⁻¹ DW of benthic algae and *M. quitense*, respectively. These species also constitute a source of phosphorus that would be directly released to the water (3.75 and 7.58 mg P g⁻¹ DW for benthic algae and *M. quitense*, respectively).

Interestingly, we determined that the dissolved oxygen concentration in water was near saturation, and aerobic conditions were also observed in the sediments (high redox potential) suggesting aerobic decomposition of organic matter in this environment. In wetlands, aerobic conditions are assumed to be determinants for mycorrhizal fungi colonization (Daleo *et al.* 2007). The observed redox potential values in sediments may favor the development of mycorrhizal fungi. Thus, possible symbiotic associations would also play an important role in nutrient allocation in wetland macrophytes.

The C:N:P elemental ratios of the studied species showed differences that could be explained by species-

specific relationships (Sterner & Elser 2002; Demars & Edwards 2007; Osborne & Kovacic 2007). C:N:P stoichiometry of benthic microalgae has been indicated as largely variable in response to different levels and types of nutrient limitation (Hillebrand & Sommer 1999). In our study, we observed that benthic algae C:N exhibited lower values in autumn, that can be associated with a higher growth and reproductive rate (González *et al.* 2010). On the contrary C:P elemental ratio did not vary in the two seasons. According to Loladze & Elser (Loladze & Elser 2011) N:P ratio higher than 16 implies a P limitation. The observed N:P ratios were around or over 20 suggesting that benthic algae are P limited. Thus, if algae are limited by nutrients, as it is often the case in natural conditions (Elser *et al.* 1990), other algae and bacteria may compete for them. In benthic algae, under P limitation, the C:P ratios increased with decreasing growth rates and with higher growth when the ratio was around 130 (Hillebrand & Sommer 1999). A different situation was observed for *M. quitense*, in which N:P elemental ratio was below 20 though higher than 16, and C:N and C:P were higher in autumn, indicating a higher growth rate in spring. These results also support the differences observed in the cover of both plants, with dominance of benthic algae in autumn and of *M. quitense* in spring.

Different macrophyte species allocate nutrients differentially in their structural tissues, and therefore DOM coming from these species will have different nutrient content (Davis 1983). In that sense, we have hypothesized that the elemental composition and leachates of *M. quitense* would be richer in nutrients than those of benthic algae. Our results support this hypothesis, and in particular we observed a higher P release in autumn.

However, we determined that benthic algae leachates released more P in spring than in autumn, suggesting that nutrient release sources could vary according to the alternative dominance of benthic algae and macrophytes.

Leachates are chemically heterogeneous compounds with labile and refractory fractions (Peret & Bianchini 2004). The absorbance spectra obtained for benthic algae and *M. quitense* showed maximum absorbance at different wavelengths, suggesting that these plants have differences in the released DOM. Ultraviolet range (UV-A and UV-B), promotes the phototransformation of the DOM structure, molecular weight and optical properties (Reche *et al.* 2001; Brinkmann *et al.* 2003; Obernosterer & Benner 2004), including nutrient release (Maranger & Pullin 2003). Our laboratory experiments indicated that both leachates reacted differently to light. In autumn, benthic algae did not exhibit changes in spectrophotometric absorbance spectra or $a_{250}:a_{365}$ ratio, indicating that this DOM is mostly refractory. These results were consistent with the undetectable SRP release after light (UVR+PAR or PAR) exposure. It has been mentioned that in algae of high altitude lakes UVR promotes the accumulation of phenolic compounds (Figuerola *et al.* 2009). On the other hand, light treatments induced changes in the absorbance spectra of *M. quitense* leachates and a decrease in the DOM mean molecular size after UVR and PAR exposure. This decrease of mean molecular size seemed to be related to a release of P after UVR exposure. Higher DOM photoreactivity has been observed in lakes with a high influence of autochthonous DOM (Reche *et al.* 2001). Similar results were obtained in field experiments in Lake El Trébol where natural lake water was exposed to solar radiation (Zagarese *et al.* 2001; Bastidas Navarro *et al.* 2009). However, other studies in shallow Andean lakes have indicated that leachates of *Potamogeton linguatus* and *Schoenoplectus californicus* macrophytes could contribute significantly to changes in the optical characteristics and nutrient release (Bastidas Navarro & Modenutti 2010). However, our results indicate that the photoreactivity of autochthonous DOM is species dependent, since leachates of *M. quitense* seemed to react to light very similarly to other macrophyte species but the studied benthic algae exhibited a very low photoreactivity.

5. CONCLUSIONS

We observed that the elemental composition and leachates of the submerged macrophyte *M. quitense* were richer in nutrients than those of benthic algae and exhibited a higher P release in autumn. Besides, we determined that the colonization of wetlands by benthic algae will contribute with a DOM with lower photoreactivity than that of macrophytes. Finally, benthic algae leachates release more P in spring than in autumn, suggesting that nutrient release sources could vary accord-

ing to the alternative dominance of benthic algae and macrophytes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FONCyT PICT2007-1256 and PICT2007-1258. We thank Grace de Haro for English edition.

REFERENCES

- Anesio, A.M., J. Theil-Nielsen & W. Graneli. 2000. Bacterial growth on photochemically transformed leachates from aquatic and terrestrial primary producers. *Microbial Ecology*, 40: 200-208.
- Anesio, A.M., L.J. Tranvik & W. Graneli. 1999. Production of inorganic carbon from aquatic macrophytes by solar radiation. *Ecology*, 80: 1852-1859.
- APHA. 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, AWWA.
- Bastidas Navarro, M., E. Balseiro & B. Modenutti. 2009. Effect of UVR on lake water and macrophyte leachates in shallow Andean-Patagonian lakes: bacterial response to changes in optical features. *Photochemistry and Photobiology*, 85: 332-340.
- Bastidas Navarro, M. & B.E. Modenutti. 2010. UVR induce optical changes and phosphorous release of lake water and macrophyte leachates in shallow Andean lakes. *J. Limnol.*, 69: 112-119. DOI: 10.3274/JL10-69-1-10.
- Bertilsson, S. & J.B. Jones. 2003. Supply of Dissolved Organic Matter to aquatic Ecosystem: autochthonous sources. In: S.E.G. Findlay & R. L. Sinsabaugh (Eds), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press: 3-24.
- Bertilsson, S. & L.J. Tranvik. 2000. Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 753-762.
- Brinkmann, T., D. Sartorius & F.H. Frimmel. 2003. Photo-bleaching of humic rich dissolved organic matter. *Aquat. Sci.*, 65: 415-424.
- Cardoso, B.M., E.E. Chaia & E. Raffaele. 2010. Are North-western Patagonian "mallín" wetland meadows reservoirs of *Ochetophila trinervis* infective Frankia? *Symbiosis*, 52: 11-19.
- Daleo, P., E. Fanjul, A.M. Casariego, B.R. Silliman, M.D. Bertness & O. Iribarne. 2007. Ecosystem engineers activate mycorrhizal mutualism in salt marshes. *Ecology Letters*, 10: 902-908. 10.1111/j.1461-0248.2007.01082.x
- Davis, C. & A. Van der Valk. 1983. Litter decomposition in prairie glacial marshes. In G.R.D. Whigham & R. Simpson (Eds), *Freshwater Wetlands: Ecological Processes and Management Potential*. Academic Press: 99-113.
- del Valle, H.F. 1998. Patagonian soils: A regional synthesis. *Ecologia Austral*, 8: 103-123.
- Demars, B.O.L. & A.C. Edwards. 2007. Tissue nutrient concentrations in freshwater aquatic macrophytes: high inter-taxon differences and low phenotypic response to nutrient supply. *Freshwat. Biol.*, 52: 2073-2086. DOI:10.1111/j.1365-2427.2007.01817.x
- Egertson, C.J., J.A. Kopaska & J.A. Downing. 2004. A century of change in macrophyte abundance and composition in response to agricultural eutrophication. *Hydrobiologia*, 524: 145-156.
- Elser, J., E. Marzolf & C. Goldman. 1990. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 1468-1477.

- Ezcurra, C. & C. Brion. 2005. *Plantas del Nahuel huapi*. Primera ed. Universidad Nacional del Comahue & Red Latinoamericana de Botánica: 70 pp.
- Farjalla, V.F., A.M. Anesio, S. Bertilsson & W. Granéli. 2001. Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates: Abiotic transformations and bacterial response. *Aquat. Microb. Ecol.*, 24: 187-195.
- Figuroa, F.L., N. Korbee, P. Carrillo, J.M. Medina-Sánchez, M. Mata, J. Bonomi & P. M. Sánchez-Castillo. 2009. The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). *J. Limnol.*, 68: 206-216. DOI: 10.3274/JL09-68-2-05.
- González, A.L., J.S. Kominoski, M. Danger, S. Ishida, N. Iwai & A. Rubach. 2010. Can ecological stoichiometry help explain patterns of biological invasions? *Oikos*, 119: 779-790. DOI:10.1111/j.1600-0706.2009.18549.x
- Hauenstein, E., M. González, F. Peña-Cortes & A. Muñoz-Pederos. 2002. Flora and vegetation of coastal wetlands near Tolten, Chile. *Clasificación y caracterización de la flora y vegetación de los humedales de la costa de Tolten* (IX Region, Chile), 59: 87-100.
- Helms, J., A. Stubbins, J. Ritchie, E. Minor, D. Kieber & K. Mopper. 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photo-bleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.*, 53: 955-969.
- Hillebrand, H. & U. Sommer. 1999. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 440-446.
- Iriondo, M. 1989. Quaternary lakes of Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 70: 81-88.
- Iriondo, M., J. Orellana & M. Neiff. 1974. Sobre el concepto de mallín cordillerano. *Revista de la Asociación Científico Naturalista Literario*, 5: 45-52.
- Leon, R.J.C., D. Bran, M. Collantes, J.M. Paruelo & A. Soriano. 1998. Main vegetation units of the extra andean Patagonia. *Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina*, 8: 125-144.
- Lewis, W.M. 2002. Yield of nitrogen from minimally disturbed watersheds of the United States. *Biogeochemistry*, 57-58: 375-385. DOI:10.1023/a:1015709128245
- Loladze, I. & J.J. Elser. 2011. The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. *Ecology Letters*, 14(3): 244-250. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2010.01577.x
- Mans, C., T. Demvard & L.J. Tranvik. 1998. Effects of solar radiation on aquatic macrophyte litter decomposition. *Oikos*, 82: 51-58.
- Maranger, R. & M. Pullin. 2003. Elemental complexation by dissolved organic matter in lakes: implications for Fe speciation and the bioavailability of Fe and P. In: S. Findlay & R. Sinsabaugh (Eds), *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter*. Academic Press/Elsevier Science, San Diego, California, USA: 185-214.
- Markgraf, V. 1984. Late Pleistocene and Holocene vegetation history of temperate Argentina: Lago Morenito, Bariloche. *Dissertations Bot.*, 72: 235-254.
- Morris, D.P., H. Zagarese, C.E. Williamson, E.G. Balseiro, B.R. Hargreaves, B. Modenutti, R. Moeller & C. Queimaliños. 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 1381-1391.
- Moss, B. 1998. *Ecology of fresh waters: man and medium, past to future*. Wiley-Blackwell: 535 pp.
- Naiman, R.J. & J.M. Melillo. 1984. Nitrogen budget of a subarctic stream altered by beaver (*Castor canadensis*). *Oecologia*, 62: 150-155.
- Nusch, E. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 14: 14-36.
- Obernosterer, I. & R. Benner. 2004. Competition between biological and photochemical processes in the mineralization of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, 49: 117-124.
- Osborne, L.L. & D.A. Kovacic. 2007. Riparian vegetated buffer strips in water-quality restoration and stream management. *Freshwat. Biol.*, 52: 243-258.
- Osburn, C.L., D.P. Morris, K.A. Thorn & R.E. Moeller. 2001. Chemical and optical changes in freshwater dissolved organic matter exposed to solar radiation. *Biogeochemistry*, 54: 251-278.
- Pace, M. & J. Cole. 2002. Synchronous variation of dissolved organic carbon and color in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 47: 333-342.
- Peret, A. & I. Bianchini. 2004. Stoichiometry of aerobic mineralization (O/C) of aquatic macrophytes leachate from a tropical lagoon (São Paulo-Brazil). *Hydrobiologia*, 528: 167-178.
- Pérez, M. & R. Sommaruga. 2006. Differential effect of algal and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnol. Oceanogr.*, 51: 2527-2537.
- Qualls, R.G. & C.J. Richardson. 2003. Factors controlling concentration, export, and decomposition of dissolved organic nutrients in the Everglades of Florida. *Biogeochemistry*, 62: 197-229.
- Raffaele, E. 1993. *Estructura y dinámica de la vegetación de un mallín de altura sometido a perturbaciones experimentales*. Doctoral Dissertation. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina: 116 pp.
- Raffaele, E. 1996. Relationship between seed and spore banks and vegetation of a mountain flood meadow (Mallín) in Patagonia, Argentina. *Wetlands*, 16: 1-9.
- Raffaele, E. 1999. Mallines: Aspectos generales y problemas particulares. In: M. AI (Ed.), *Tópicos sobre Humedales Templados y Tropicales de Sudamérica*. UNESCO: 27-33.
- Raffaele, E. 2004. Susceptibility of a Patagonian mallín flooded meadow to invasion by exotic species. *Biological Invasions*, 6: 473-481.
- Reche, I., E. Pulido-Villena, J.M. Conde-Porcuna & P. Carrillo. 2001. Photoreactivity of dissolved organic matter from high-mountain lakes of Sierra Nevada, Spain. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 33: 426-434.
- Schindler, D. & P. Curtis. 1997. The role of DOC in protecting freshwaters subjected to climatic warming and acidification from UV exposure. *Biogeochemistry*, 36: 1-8.
- Shick, J.M., S. Romaine-Lioud, C. Ferrier-Pagès & J.P. Gattuso. 1999. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 1667-1682.
- Sturner, R. W. & J. J. Elser. 2002. *Ecological stoichiometry. The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press: 439 pp.
- Triska, F.J., V.C. Kennedy, R.J. Avanzino, G.W. Zellweger & K.E. Bencala. 1989. Retention and transport of nutrients in a third-order stream: channel processes. *Ecology*, 70: 1877-1892.
- Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10: 109-122.
- Vernet, M. 2006. Introduction: Enhanced UV-B radiation in natural ecosystems as an added perturbation due to ozone depletion. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 831-833.
- Villafañe, V.E., E.W. Helbling & H.E. Zagarese. 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio*, 30: 112-117.

- Wetzel, R. 2001. *Limnology: lake and river ecosystems*. Academic Press San Diego, CA: 850 pp.
- Wigand, C., J. Wehr, K. Limburg, B. Gorham, S. Longergan & S. Findlay. 2000. Effect of *Vallisneria americana* (L.) on community structure and ecosystem function in lake mesocosms. *Hydrobiologia*, 418: 137-146.
- Zagarese, H. & C. Williamson. 2000. Impact of solar UV radiation on zooplankton and fish. In: S. de Mora, S. Demers & M. Vernet (Eds), *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press: 279-309.
- Zagarese, H.E., M. Diaz, F. Pedrozo, M. Ferraro, W. Cravero & B. Tartarotti. 2001. Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 61: 35-45.
- Zepp, R.G., T.V. Callaghan & D.J. Erickson Iii. 2003. Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2: 51-61.

Received: February 2011

Accepted: March 2011

Alien vs. native plants in a Patagonian wetland: elemental ratios and ecosystem stoichiometric impacts

Florencia Cuassolo · Esteban Balseiro ·
Beatriz Modenutti

Received: 19 November 2010 / Accepted: 4 April 2011 / Published online: 19 April 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Wetlands are subject to invasion by exotic plant species, especially during the dry season when they resemble terrestrial systems; therefore, terrestrial plants could exploit this situation to colonize this environment. We analyzed *P. anserina* invading Patagonian wetlands in terms of elemental ratios that would modify wetland stoichiometry due to organic matter inputs. We studied the elemental relationship (carbon/nitrogen/phosphorus) of *P. anserina* in comparison with native emergent macrophytes (*Eleocharis pachicarpa* and *Carex aematorrhyncha*). These plant species are common and dominant in the wetland. Additionally, we analyzed the presence of mycorrhizal fungi in the roots and their proportion of root infection. Our study reveals that the invasive species presented nutrient (especially phosphorus) allocation in roots and differences in mycorrhizal infection, with a predominance of arbuscular mycorrhiza, compared with native species. During flooded periods with the decay of aerial parts, *P. anserina* stores phosphorus in the roots and releases dissolved organic matter of high molecular weight molecules, high color, and a high C-to-nutrient ratio in comparison with native macrophytes. These results show the strategy of an invasive terrestrial plant in temporary aquatic systems, and how the elemental relationships

of the invasive plant can modify the stoichiometry of the environment.

Keywords Invasion ecology · Wetland · Mycorrhizal fungi · Stoichiometric strategies · Leachates · Dissolved organic matter release

Introduction

Wetlands are characterized by seasonal fluctuations in water level, with alternating wet and dry periods. These ecosystems are especially vulnerable to alien weed invasions (Zedler and Kercher 2004); therefore, many wetland plants fit the definition of invasive plants, which are species or strains that rapidly increase their spatial distribution by expanding into native plant communities (Richardson et al. 2000). The susceptibility of communities to invasion requires more attention (Prieur-Richard and Lavorel 2000) because native plants are now uncommon or endangered due to wetland invaders that form monotypes (Champion et al. 2009), and they can cause substantial changes in organic matter accumulation and carbon sequestration (Zedler and Kercher 2004, 2005).

In aquatic systems, nutrient supply could be an important factor in the competitive balance between plant species, e.g. rapid nutrient uptake allowed a

F. Cuassolo (✉) · E. Balseiro · B. Modenutti
Laboratorio de Limnología, INIBIOMA-CONICET-
UNComahue, Quintral 1250, 8400 Bariloche, Argentina
e-mail: cuassolof@comahue-conicet.gob.ar

rapid growth (Zedler and Kercher 2004). In submerged plants, at high fertility, the invasive *Hydrilla verticillata* was a stronger competitor relative to *Vallisneria americana*, whereas under low nutrient conditions, native species outperform invasive ones (Van et al. 1999). Other studies also indicated that emergent species better adapted to high nutrient environment (e.g. *Typha dominguensis*) can effectively invade with greater competitive capability under high nutrient conditions (Davis 1991).

Temporary or semi-temporary wetlands represent a particular situation, because during the dry season, the environment remains without water resembling a terrestrial system. The water table fluctuation is a natural disturbance that these systems can tolerate, which causes changes in both plant diversity and carbon cycling. However, due to alternation between dry and flooded periods, plant species that can tolerate a wide range of water levels are more successful (Raffaele 2004). During dry periods, some of these species develop their whole growing cycle and become an important source of decaying organic matter during the flooded period (Díaz Villanueva and Trochine 2005; Roehm 2005). In this case, the elemental composition of the plant tissue would play a crucial role in the resulting organic matter quality (Osborne et al. 2007). The differences in macrophyte tissue nutrient concentrations were observed to be species specific with a strict C:N:P (carbon:nitrogen:phosphorous) stoichiometric ratios (Demars and Edwards 2007). The elemental composition (N and P) in plant tissues is determined by several factors such as (1) the balance of nutrient uptake and carbon (C) assimilation (Aerts and Chapin 2000; Sterner and Elser 2002), (2) losses through leaching, respiration, exudation, and herbivory (Ventura et al. 2008; Wong et al. 2010), and (3) the presence of mycorrhizal fungi since mycorrhizal associations favor nutrient uptake in wetland plants (Cornwell et al. 2001; Dunham et al. 2003). In the Andean temperate lacustrine district (41°S), there are large and deep lakes, along with small lakes and wetlands (Modenutti et al. 1998). In comparison with deep lakes, shallow lakes and wetlands present a higher concentration of dissolved organic matter (DOM) (Morris et al. 1995). This high content of DOM can be associated with the presence of macrophytes and external watershed contributions (Bastidas Navarro et al. 2009a). Leachates of macrophytes can contribute significantly to

the DOM water content mainly during senescence because of the decomposition of tissue and subsequent leachates (Bertilsson and Jones 2003). Moreover, they are an important source and reservoir of essential nutrients, such as phosphorus (Bastidas Navarro and Modenutti 2010), and contribute nutrients for heterotrophic production (Bastidas Navarro et al. 2009b). These results may imply that variations in the composition of macrophytes could generate changes in DOM quality, both in terms of elemental composition and in terms of optical features.

Potentilla anserina is an exotic species that is widely distributed in wet soils in Patagonia (Correa 1984; Ezcurra and Brion 2005). In Patagonia wetlands, this hemicriptophyte exotic species may cover almost the entire bottom and restrict the distribution of native macrophytes (Díaz Villanueva and Trochine 2005; Naiman and Melillo 1984). Recent studies in Chile (Hauenstein et al. 2008) have indicated that *P. anserina* has intermediate N requirements, which could create beneficial colonizing environments. We have hypothesized that invasive (*P. anserina*) and native macrophytes (*Eleocharis pachycarpa* and *Carex aematorrhyncha*) co-occurring in the same wetland exhibit different strategies in terms of nutrient allocation. In that sense, we also propose that the elemental composition of leachates and tissues of native and invasive macrophytes may distinctively affect the dissolved organic matter (DOM) source of the wetland. For that purpose, we analyzed the elemental relationships (C:N:P) in the plant tissues (aerial and radicular parts) and the leachates of the different species. Additionally, we analyzed the presence of mycorrhizal fungi because this type of interaction could be differentially used by exotic and native plants as a strategy for colonizing temporary environments and obtaining the necessary nutrients for growth.

Materials and methods

Study area

This study was conducted in Laguna Fantasma, which is a temporary pond located at 41°07'S, 71°27'W, 780 m above sea level in North Patagonia, Argentina. The pond has an area of 1 ha (170 m length and 80 m

wide approximately), with a maximum depth of 2 m during the autumn–winter period. Precipitation during autumn and winter (May–August 2009) averaged 208.3 ± 91 mm per month when the flooded area reached a maximum of 1 ha and was reduced to 24.2 ± 15 mm per month during late spring and summer (September–January 2009). The pond was colonized by two native macrophytes, *Eleocharis pachycarpa* and *Carex aematorrhyncha*, and by the exotic plant *Potentilla anserina*. These plant species are common and dominant in the wetland. Riparian vegetation was scarce, so other inputs of allochthonous particulate organic matter to the pond were negligible.

Field study

The wetland was sampled on six different occasions from April 2009 to January 2010. Water temperature and pH were measured using a thermometer (YSI 85 Yellow Spring Instruments, USA) and a pH meter (HI 8424 Hanna Instruments, USA), respectively. Water and sediment samples were taken, along two orthogonal permanent transects of 105 and 48 m in length, with a limnological bottle (2L) and a core of 5 cm in diameter in the upper 5 cm, respectively. The three plant species were sampled every 3 m along the transect lines on each sampling occasion. Plants were collected at each sampling point, and roots were dug out of the ground at a depth of 30 cm. Thus, on each sampling occasion, we sampled each species in dry and flooded plots. The plants were immediately carried in polyethylene bags to the laboratory. In addition, the vegetation coverage of each species was estimated at the beginning and at the end of the hydroperiod (May and December 2009) for 55 points chosen at random with a 50×50 -cm plot.

Laboratory procedures

Lake water was filtered with pre-combusted (450°C , 2 h) GF/F filters and analyzed for dissolved organic carbon (DOC) with a carbon analyzer (TOC-VCSH Shimadzu) and for total dissolved phosphorus (TDP) and total dissolved nitrogen (TDN). TDP was determined after digestion with persulfate at 1.5 atm for 1 h, followed by the ascorbate-reduced molybdenum method (APHA 2005). TDN was determined

following Valderrama (1981). Sediment samples were dried at 60°C and were analyzed for particulate carbon (C), nitrogen (N), and phosphorous (P) content. C and N concentrations were measured with a CN analyzer (Thermo Finingan Flash EA 1112). Phosphorus was measured after combustion of 2 mg of sediment at 450°C for 1 h, followed by the ascorbate-reduced molybdenum method (APHA 2005).

The elemental analysis of vegetal tissue was carried out by carefully washing the plants with tap water and then with distilled water. The aerial and root parts were separated and dried at 60°C for 48 h up to constant weight. Afterward, each part was crushed to powder with a clean mortar, and approximately 2 mg of dry weight (DW) was destined for elemental analysis. Carbon (C) and nitrogen (N) concentrations in the tissues were measured with a CN analyzer (Thermo Finingan Flash EA 1112). Phosphorus was measured after combustion of 2 mg of tissue at 450°C for 1 h, followed by the ascorbate-reduced molybdenum method (APHA 2005).

The mycorrhizal analysis was conducted on ten young roots of each plant preserved in 50% ethanol. The roots were cleared in KOH 10% (w/v) acidified with HCl 5% (v/v) and stained with trypan blue (Brundrett et al. 1994); they were then cut into 1-cm pieces. Typical structures of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization (hyphae, arbuscules, vesicles, coils) and of dark septate fungi (DSF) (dark hyphae, microsclerotia, hyaline hyphae) were identified and quantified according to their presence–absence in the microscope field (Cardoso et al. 2010) using a direct microscope Olympus BX50 at $400\times$.

The elemental analysis of leachates was conducted using the aerial parts of the three species. To obtain leachates, aerial parts were carefully washed with distilled water and dried at room temperature, and then 1 g (DW) of each plant was placed in 100 mL of MilliQ water and left at 4°C for 48 h following Anesio et al. (2000). The resulting water was filtered through a pre-combusted GF/F filter (Osmonics). In all cases, leachates were obtained in four replicates. All glassware was previously acid-washed and combusted at 450°C for 1 h. TDP, TDN, and DOC were determined as previously explained for the lake water analyses. Additionally, we obtained spectrophotometric scans from 250 to 790 nm for each leachate in 5-cm quartz cuvettes using a double-beam spectrophotometric Shimadzu UV2450.

Statistical analysis

To determine significant differences between C, N, and P in the different parts (aerial and radicular) of plant tissues and in two different wetland situations (dry and flooded plots), a two-way ANOVA was applied. Differences between C, N, and P in leachates for the three species were analyzed with one-way ANOVA. The percentage of root infection by AM or DSF in each species was analyzed with one-way ANOVA. An a posteriori Tukey's test was applied where the ANOVA model was significant. ANOVA was performed with SigmaPlot (version 11.0, software package). The analysis of covariance (ANCOVA) was used to evaluate whether P concentration differs between *E. pachycarpa* (native) and *P. anserina* (exotic) using the parts (aerial vs. radicular) and plots (dry vs. flooded) as treatments and time as a covariate, to avoid its effect in the variable. P concentration was log-transformed, and time was used as a categorical variable (each sampling date). ANCOVA was performed using the STATISTICA for Windows software package (Stat—Soft 1998). Homogeneity of variance was tested through Levene's test with a statistical significance $\alpha = 0.05$. When this assumption was not fulfilled after data transformation (log), Kruskal–Wallis test was applied instead of one-way ANOVA.

Finally, the absorbance units from the leachate scans (A) were converted to absorption coefficients (a) as $a = \ln(10^A)/cl$, where cl is the cuvette length in m. Relative molecular weight was estimated using the $a_{250}:a_{365}$ ratio (Perez and Sommaruga 2006), and water color was determined as the absorbance at 440 nm (a_{440}) in a 10-cm quartz cuvette according to Pace and Cole (Pace and Cole 2002).

Results

Lake water temperature ranged from 4.81 ± 2.88 in autumn–winter (May–August) to $14.47 \pm 2.95^\circ\text{C}$ in spring–summer (September–January). Nutrient concentrations in water and sediments (Fig. 1) did not show significant differences. However, DOC concentration in the water varied significantly between the two periods (Kruskal–Wallis, $H_{(1,10)} = 7.500$, $P = 0.004$), with the highest values observed in spring–summer (Fig. 1). The distribution of the three plant

species was uneven in the wetland. *C. aematorrhyncha* occupied an outer ring, whereas the inner part of the ring was occupied by both the native *E. pachycarpa* and the exotic *P. anserina*. The vegetation coverage at the beginning and at the end of the hydroperiod in 2009–2010 was estimated to be 60% *E. pachycarpa*, 30% *P. anserina*, and 10% *C. aematorrhyncha*. However, during the flooded period, the aerial part of *P. anserina* decayed and left the roots in the flooded sediments.

We observed differences in the elemental relationships in vegetal tissue when comparing the plants collected in flooded and dry plots. Under flooded conditions, the C:P ratio varied significantly between species (two-way ANOVA; $F_{(2,33)} = 14.513$, $P < 0.001$) and parts (two-way ANOVA; $F_{(1,33)} = 7.342$, $P = 0.011$). In the a posteriori Tukey's test between parts within species, there were significant differences for the exotic *P. anserina* (Tukey's test, $q_{\text{aerial vs. radicular}} = 3.754$, $P = 0.013$), and the C:P ratio was highest in the aerial parts (Fig. 2a). The C:P ratio in the roots of the exotic plant was two to three times lower (more P concentration in root) than in the two native emergent macrophytes (Tukey's test, $q_{\text{Potentilla vs. Carex}} = 5.798$, $P = 0.001$; $q_{\text{Potentilla vs. Eleocharis}} = 3.829$, $P = 0.030$, Fig. 2a). On the contrary, the aerial part of *C. aematorrhyncha* had a higher C:P ratio (less P concentration in aerial parts) than the other two plants (Tukey's test, $q_{\text{Carex vs. Potentilla}} = 4.945$, $P = 0.004$; $q_{\text{Carex vs. Eleocharis}} = 3.616$, $P = 0.042$, Fig. 2a). We observed significant differences in the C:N ratio between species (two-way ANOVA; $F_{(2,35)} = 19.039$, $P < 0.001$). In particular, *C. aematorrhyncha* exhibited the highest C:N ratio, with no differences between the other two (Tukey's test, $q_{\text{Carex vs. Potentilla}} = 7.938$, $P < 0.001$, and $q_{\text{Carex vs. Eleocharis}} = 7.078$, $P < 0.001$, Fig. 2b).

In the dry plots, we found a statistical interaction between parts and species for the C:P ratio (two-way ANOVA, $F_{(2,20)} = 6.341$, $P = 0.010$). We found that *E. pachycarpa* exhibited the lowest C:P ratio in the roots, but the differences were only significant compared to the other native species *C. aematorrhyncha* (Tukey's test, $q_{\text{Eleocharis vs. Carex}} = 4.590$, $P = 0.014$, Fig. 2c) and not to the exotic species (Tukey's test, $q_{\text{Eleocharis vs. Potentilla}} = 2.999$, $P = 0.119$, Fig. 2c). No significant differences were found between species concerning aerial parts (Tukey's test, $P > 0.05$, Fig. 2c). Only marginal differences in the C:N ratio

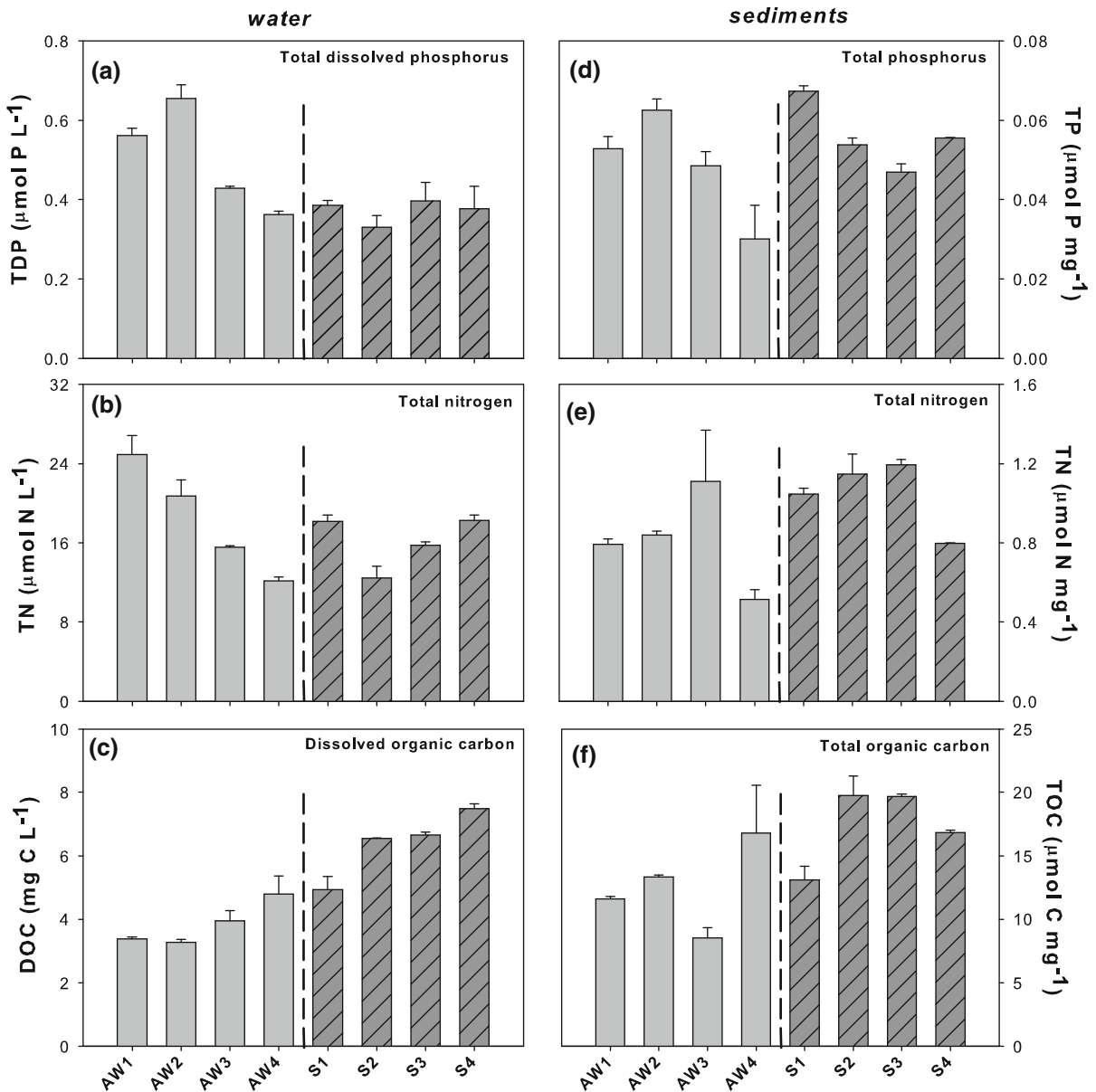


Fig. 1 (a) Total dissolved phosphorous (*TDP*), (b) total nitrogen (*TN*), and (c) dissolved organic carbon (*DOC*) in the water. (d) Total phosphorous (*TP*), (e) total nitrogen (*TN*), and (f) total carbon (*TC*) in sediments. Values are given as

average ± standard error. AW1, AW2, AW3, and AW4 are samples from autumn–winter (flooded period), and S1, S2, S3, and S4 are samples from spring–summer (dry period). The dotted lines divide both periods

were found between parts (aerial and roots) (two-way ANOVA, $F_{(1,20)} = 4.547$, $P = 0.050$) (Fig. 2d). Regarding P concentrations, we found an interaction between plots and parts, in which the aerial parts of the exotic *P. anserina* had a P concentration more than twofold higher in the dry plots compared to the flooded plots (ANCOVA $F_{(1,77)} = 15.597$, $P < 0.001$)

(Fig. 3a). On the other hand, the P concentration in roots in the flooded plots was significantly higher than in the dry ones. For the native *E. pachycarpa*, there were significant differences only for the plots (dry vs. flooded) (ANCOVA, $F_{(1,42)} = 12.778$, $P < 0.001$, Fig. 3b). In the two cases, we found no interaction between the covariate time and treatment (ANCOVA,

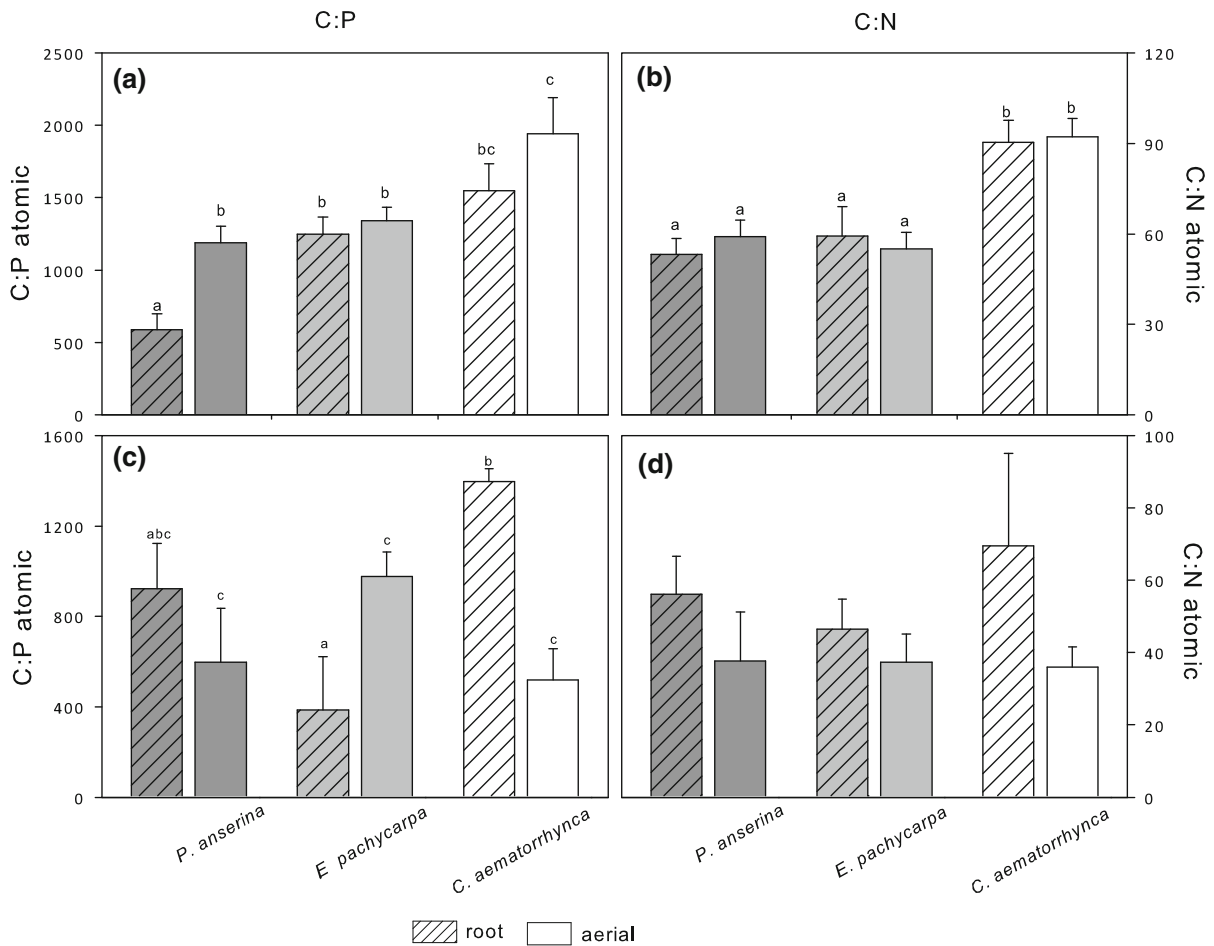
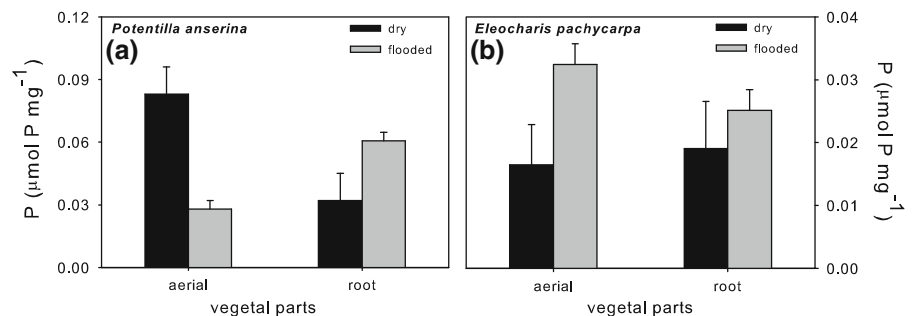


Fig. 2 Elemental relationships (C:P and C:N ratios) in roots and aerial parts in the three studied plant species (*P. anserina*, *E. pachycarpa*, and *C. aematorrhyncha*); (a) and (b) plants in

flooded plots; (c) and (d) plants in dry plots. The letters on the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) between plant parts and species

Fig. 3 Phosphorus concentration in the exotic plant *P. anserina* (a) and in the native *Eleocharis pachycarpa* (b) in the dry (dark bar) and flooded plots (white bar) and in the plant parts (aerial vs. roots)



E. pachycarpa $F_{(1,42)} = 1.978$, $P < 0.167$; *P. anserina* $F_{(1,77)} = 0.733$ $P = 0.394$).

We also observed differences in the mycorrhizal colonization, with a significant interaction between plant species and mycorrhiza type (two-way ANOVA,

$F_{(2,12)} = 26.030$, $P < 0.001$). The infection with AM was higher in *P. anserina* compared with *C. aematorrhyncha* (Tukey's test, $q_{\text{Potentilla vs. Carex}} = 5.784$, $P = 0.011$), while DSF infections were dominant in the two native species compared with the exotic

plant (Tukey's test, $q_{Potentilla \text{ vs. } Eleocharis} = 6.357$, $P = 0.007$, $q_{Potentilla \text{ vs. } Carex} = 8.564$, $P = 0.001$, Fig. 4). Considering the type of infection in each species, *E. pachycarpa* did not present any significant differences between AM and DSF infection (Tukey's test, $q_{AM \text{ vs } DSF} = 2.087$, $P = 0.184$, Fig. 4).

The composition of leachates from *E. pachycarpa* exhibited the highest nutrient (P and N) concentrations in comparison with the other two species (one-way ANOVA, $F_{(2,11)} = 198.113$, $P < 0.001$, and $F_{(2,11)} = 80.766$, $P < 0.001$, respectively; Fig. 5a, b). However, *P. anserina* presented the highest C concentration in the leachates (one-way ANOVA, $F_{(2,11)} = 80.766$, $P < 0.001$, Fig. 5c). Accordingly, the C:P and C:N ratios were lower in the leachates of *E. pachycarpa* than in the other two species (one-way ANOVA, $F_{(2,4)} = 7.538$, $P = 0.011$, one-way ANOVA, $F_{(2,4)} = 9.269$, $P = 0.011$ for P and N, Fig. 6a and b). The absorbance spectra of the leachates exhibited a unimodal pattern in the three species. *E. pachycarpa* and *C. aematorrhyncha* exhibited a maximum absorbance of approximately 250 nm, whereas *P. anserina* had the highest absorbance between 250 and 450 nm (Fig. 7a). The mean molecular weight of DOM leachates showed significant differences between the species (one-way ANOVA, $F_{(2,11)} = 60.899$, $P < 0.001$). The $a_{250}:a_{365}$ ratio indicated that *E. pachycarpa* leachates were composed of lower molecular weight molecules, while *P. anserina* showed intermediate values in comparison with the native species (Fig. 7b). Water color, measured as a_{440} ,

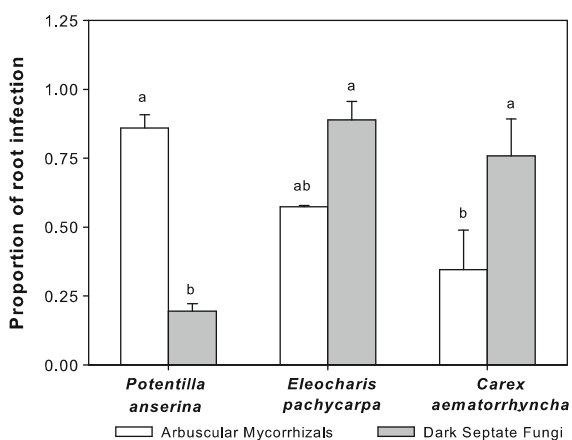


Fig. 4 Proportion of root infection in each plant species with two types of radicular symbionts. The letters on the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) between types of mycorrhiza colonizing the plant species

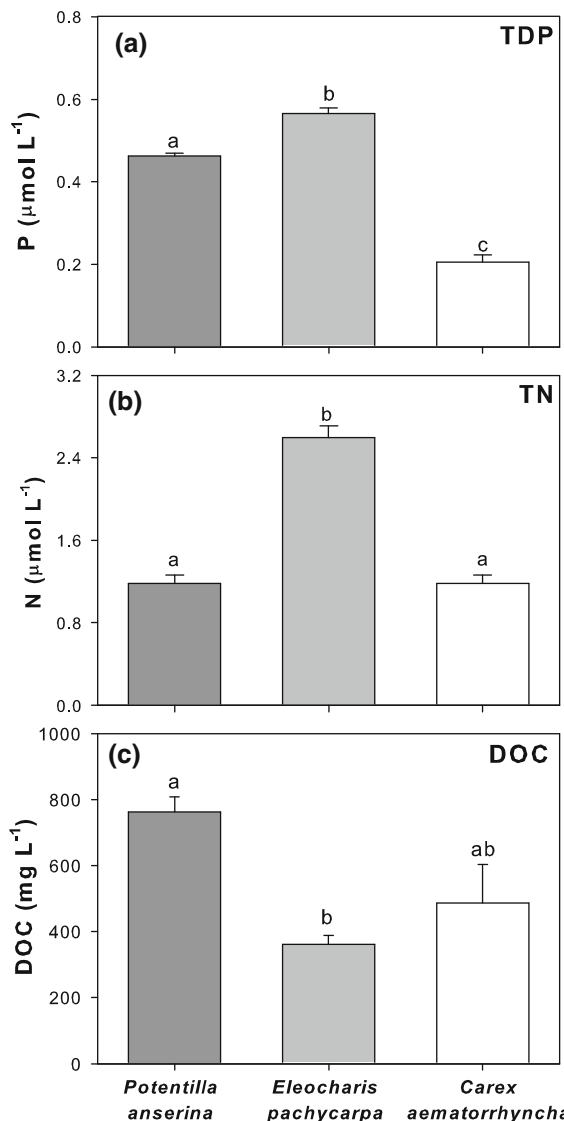


Fig. 5 Phosphorus (a), nitrogen (b), and carbon (c) in the leachates from the three studied plant species (*P. anserina*, *E. pachycarpa*, and *C. aematorrhyncha*). The letters on the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) between species

was higher in *P. anserina* leachates than in the two native species (Fig. 7b), indicating a darker color for the DOM released.

Discussion

The three studied species, dominant in the wetland, show that the elemental composition of their tissues and leachates were markedly different. The C:P ratio

Fig. 6 Elemental relationships C:P ratio (a) and C:N ratio (b) in the leachates from the three studied plant species (*P. anserina*, *E. pachycarpa*, and *C. aematorrhyncha*). The letters on the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) between species

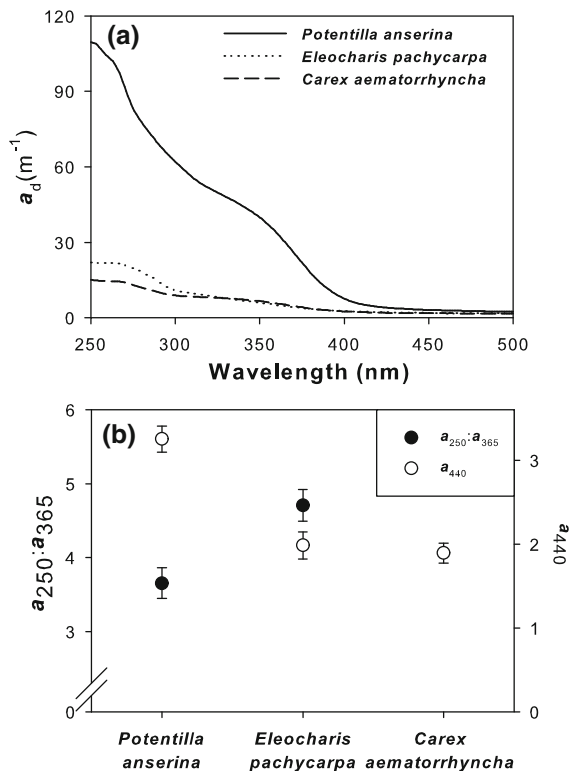
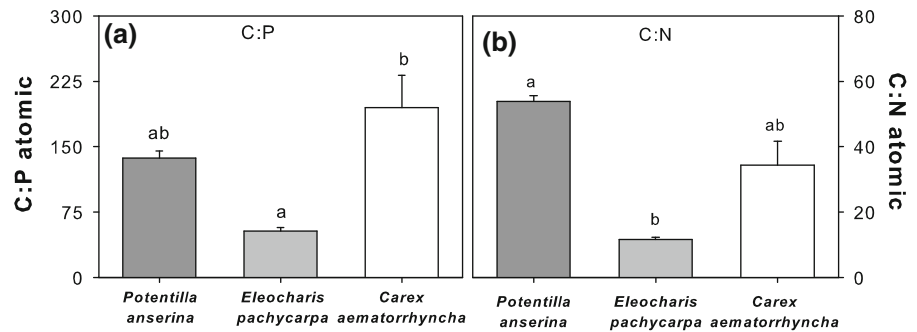


Fig. 7 Spectrophotometric absorbance curves (a) and $a_{250}:a_{365}$ ratio and a_{440} (b) in the leachates from the three studied plant species (*P. anserina*, *E. pachycarpa*, and *C. aematorrhyncha*)

in the roots of the exotic *P. anserina* was two to three times lower than the native emergent macrophytes in the flooded plot. These differences in plant tissue nutrient concentrations could be explained by basic species-specific relationships (Demars and Edwards 2007; Osborne et al. 2007; Sterner and Elser 2002). However, the presence of mycorrhizal fungi in the roots favoring nutrient uptake (Cornwell et al. 2001) is a factor that would change the elemental ratio.

In that sense, AM favors P uptake (Raffaele 1996), and its dominance in the exotic *P. anserina* roots would explain the low C:P ratio observed in the tissue of this species. On the contrary, the effects of DSF are uncertain because they could be either beneficial or damaging to plants (Jumpponen 2001). It is likely the case that the comparatively higher C-to-nutrient ratios observed in the two native species are related to the dominance of DSF among mycorrhizal fungi in the roots. On the other hand, Dunham and colleagues (Dunham et al. 2003) suggested that mycorrhizal plants have higher concentrations of N in their roots. However, we observed that the C:N ratio did not change significantly in dry and flooded plots nor among species, suggesting that N is a nutrient relatively constant in the three studied plant tissues. Our study revealed that mutualisms between mycorrhizal fungi and plants could be used by exotic plants, such as *P. anserina*, as a strategy for obtaining the nutrients necessary for growth, in particular P.

A recent study of the biological invasions related to ecological stoichiometry (González et al. 2010) proposes that under low nutrient conditions, the efficiency in the use of resources is higher, and under high nutrient conditions, a higher growth and reproductive rate could be expected with a lower C-to-nutrient ratio in the tissues. Our results indicate that the exotic *P. anserina* success under low nutrient conditions achieving a lower C:P ratio. This situation is probably due to the AM dominance in the roots and suggests that mycorrhizal mutualism is an important strategy for invasive plants in temporary aquatic systems that could result in high reproductive rates. Furthermore, we found that this invasive species makes a translocation of phosphorus during the flooding period, probably by storing P of the aerial parts in the roots. This is also supported by the fact

that *P. anserina* presented leachates with comparatively low P concentrations, but high C concentrations. The stoichiometric strategy of this invasive plant seemed to be as follows: when the wetland is dry, *P. anserina* begins to sprout; the phosphorus stored in the roots is sent to the new shoots, reducing the P in the roots (Fig. 3) and increasing their C:P ratio (Fig. 2), but when the wetland is flooded, P is sent to the roots and lowers the C:P ratio (Figs. 3 and 2). This strategy gives this species the advantage of being P enriched when the growing season begins. The nutrient concentration in the sediments did not vary along the hydroperiod; therefore, the plants had similar nutrient concentrations for growth.

Regarding the potential impact of terrestrial plant invasions in wetlands, it is important to consider the plant elemental release into the environment during flooded periods when aerial parts decay. Following cell death, a pulse of dissolved organic matter (DOM) is released from macrophytes to the aquatic environment (Bertilsson and Jones 2003). This DOM coming from leachates is one of the most important sources for bacterial community growth (Anesio et al. 1999; Bastidas Navarro et al. 2009a), and it is crucial in the transfer of matter and energy in aquatic food webs (Osborne et al. 2007). In our study, the results obtained on the composition of leachates revealed that *P. anserina* release a DOM of high molecular weight with high color and a high C-to-nutrient ratio in comparison with native macrophytes (Figs. 6 and 7). The higher absorbance detected for *P. anserina* in the range of UV (between 250 and 350 nm) indicates a higher proportion of colored organic matter released in the leachates, in contrast to natives (Fig. 7). In a recent study, Caceres and colleagues (Caceres et al. 2008) observed that an increase in nutrient supply due to the seasonal tree leaf-out causes a decrease in light availability, upsetting the balance of nutrients for primary producers, and producing a shading effect that reduces chlorophyll concentration. Because the leachates of the exotic *P. anserina* are dark in color, with a maximum absorption in the UV range, we can predict that the input of these leachates would affect phytoplanktonic algae and other algae in the wetland. At the same time, this type of DOM constitutes a UVR shield for planktonic communities (Souza et al. 2010).

On the other hand, the low molecular weight (high $a_{250}:a_{365}$ ratio) observed in the leachates of *Eleocharis pachycarpa* highlights the importance of the effect of this native species on the microbial community. The molecular weight and size of the DOM have often been considered to be an important factor influencing microbial activities, such as growth and carbon and nutrients utilization (Anesio et al. 2000; Bastidas Navarro et al. 2009a; Bastidas Navarro and Modenutti 2010). Considering the C-to-nutrient ratios, it has been suggested (Del Giorgio and Cole 1998) that the bacterial growth efficiency decreases when the C:N ratio of the substrate is greater than 10. The C:N atomic ratio in the leachate of the native *E. pachycarpa* was on average 10, while in the exotic plant and in the other native were on average 55 and 35, respectively. Consequently, changes in this ratio due to increases in *P. anserina* would affect the bacterial community by increasing N limitation. Plant community structure may be a significant modulator of DOM quality and quantity due to species-specific contributions of characteristically different DOM (Osborne et al. 2007). In this sense, the comparison of leachates and tissues of native and invasive plant species in Patagonia suggests that the differences in the elemental ratio of the plant tissues reveal distinctive strategies of the invasive species that would cause a direct impact in the wetland through the input of DOM.

In conclusion, this study points out that invasive *P. anserina* and the natives *Eleocharis pachycarpa* and *Carex aematorrhyncha* presented notable differences in plant nutrient allocation and senescence strategy. Our study reveals that *P. anserina* presented nutrient (especially phosphorus) allocation in roots and differences in mycorrhizal infection, with a predominance of arbuscular mycorrhiza, compared with native species. During flooded periods with the decay of aerial parts, the invasive plant releases dissolved organic matter of high molecular weight, high color, and a high C-to-nutrient ratio in comparison with native macrophytes. Thus, the invasion of the terrestrial plant during drought periods would, in the flooded periods, affect DOM quality release and sediment enrichment. As a consequence, significant ecological impacts would be expected that might affect planktonic and benthic communities of the

environment, including the facilitation of new invasive species.

Acknowledgments This work was supported by FONCyT PICT 2007-01256 and FONCyT PICT 2007-01258 and UNComahue B-141. FC is a CONICET fellowship and EB and BM are CONICET researchers. We also thank Marcela Bastidas Navarro, Marta Cabello and Nora Baccalá for their help in laboratory analysis, mycorrhizal identification and statistical analysis respectively.

References

- Aerts R, Chapin FSI (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv Ecol Res* 30:1–67
- Anesio MA, Denward CMT, Tranvik LJ, Graneli W (1999) Decrease bacterial growth on vascular plant detritus due to photochemical modification. *Aquat Microb Ecol* 17: 159–165
- Anesio AM, Theil-Nielsen J, Graneli W (2000) Bacterial growth on photochemically transformed leachates from aquatic and terrestrial primary producers. *Microb Ecol* 40:200–208
- APHA (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, AWWA, Washington
- Bastidas Navarro M, Modenutti BE (2010) UVR induce optical changes and phosphorous release of lake water and macrophyte leachates in shallow Andean lakes. *J Limnol* 69:112–119
- Bastidas Navarro M, Balseiro E, Modenutti B (2009a) Effect of UVR on lake water and macrophyte leachates in shallow andean-patagonian lakes: bacterial response to changes in optical features. *Photochem Photobiol* 85:332–340
- Bastidas Navarro M, Modenutti B, Callieri C, Bertoni R, Balseiro E (2009b) Balance between primary and bacterial production in North Patagonian shallow lakes. *Aquat Ecol* 43:867–878
- Bertilsson S, Jones JB (2003) Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystem: autochthonous sources. In: Findlay SEG, Sinsabaugh RL (eds) *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter*. Academic Press, San Diego, pp 3–24
- Brundrett M, Melville L, Peterson L (1994) Isolating and propagating Glomalean fungi. In: Brundrett M, Melville L, Peterson L (eds) *Practical methods in mycorrhizal research*. Mycologue Publications, Waterloo
- Caceres CE, Tessier AJ, Andreou A, Duffy MA (2008) Stoichiometric relationships in vernal pond plankton communities. *Freshw Biol* 53:1291–1302
- Cardoso BM, Chaia EE, Raffaele E (2010) Are Northwestern Patagonian “mallín” wetland meadows reservoirs of *Ochetophila trinervis* infective *Frankia*? *Symbiosis* 52:11–19
- Champion PD, Reeves P, Zealand N (2009) Factors causing dune ephemeral wetlands to be vulnerable to weed invasion. Publishing Team, Department of Conservation
- Cornwell WK, Bedford BL, Chapin CT (2001) Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus-poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *Am J Bot* 88:1824–1829
- Correa MN (ed) (1984) Escalloniaceae, Dicoliledoneae dialipétalas (Rosaceae a Leguminosae). Flora Patagónica. Colección Científica, INTA, Buenos Aires, pp 77–73
- Davis SM (1991) Growth, decomposition, and nutrient retention of *Cladium jamaicense* Crantz and *Typha domingensis* Pers. in the Florida Everglades. *Aquat Bot* 40:203–224
- Del Giorgio PA, Cole JJ (1998) Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu Rev Ecol Syst* 29:503–541
- Demars BOL, Edwards AC (2007) Tissue nutrient concentrations in freshwater aquatic macrophytes: high inter-taxon differences and low phenotypic response to nutrient supply. *Freshw Biol* 52:2073–2086
- Díaz Villanueva V, Trochine C (2005) The role of microorganisms in the diet of *Verger cf. limnophilus* (Trichoptera: Limnephilidae) larvae in a Patagonian Andean temporary pond. *Wetlands* 25:473–479
- Dunham RM, Ray AM, Inouye RS (2003) Growth, physiology, and chemistry of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Typha latifolia* seedlings. *Wetlands* 23:890–896
- Ezcurra C, Brion C (2005) Plantas del Nahuel huapi. Universidad Nacional del Comahue and Red Latinoamericana de Botánica, San Carlos de Bariloche
- González AL, Kominoski JS, Danger M, Ishida S, Iwai N, Rubach A (2010) Can ecological stoichiometry help explain patterns of biological invasions? *Oikos* 119:779–790
- Hauenstein E, Paña-Cortés F, Bertrán C, Tapia J, Schlatter R (2008) Floristic comparison and trophic condition based on indicator species in coastal lagoons of the Araucanian region, Chile. *Ecología Austral* 18:43–53
- Jumpponen A (2001) Dark septate endophytes—are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11:207–211
- Modenutti BE, Balseiro E, Dieguez MC, Queimaliños C, Albariño R (1998) Heterogeneity of fresh-water Patagonian ecosystems. *Ecología Austral* 8:155–165
- Morris DP, Zagarese H, Williamson CE et al (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol Oceanogr* 40:1381–1391
- Naiman RJ, Melillo JM (1984) Nitrogen budget of a subarctic stream altered by beaver (*Castor canadensis*). *Oecologia* 62:150–155
- Osborne TZ, Inglett PW, Reddy KR (2007) The use of senescent plant biomass to investigate relationships between potential particulate and dissolved organic matter in a wetland ecosystem. *Aquat Bot* 86:53–61
- Pace ML, Cole JJ (2002) Synchronous variation of dissolved organic carbon and color in lakes. *Limnol Oceanogr* 47:333–342
- Perez MT, Sommaruga R (2006) Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnol Oceanogr* 51:2527–2537
- Prieur-Richard AH, Lavorel S (2000) Invasions: the perspective of diverse plant communities. *Austral Ecology* 25:1–7
- Raffaele E (1996) Relationship between seed and spore banks and vegetation of a mountain flood meadow (Mallín) in Patagonia, Argentina. *Wetlands* 16:1–9

- Raffaele E (2004) Susceptibility of a Patagonian mallín flooded meadow to invasion by exotic species. *Biol Invasions* 6: 473–481
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Dane Panetta F, West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Divers Distrib* 6: 93–107
- Roehm CL (2005) Respiration in wetland ecosystems. In: del Giorgio P, Williams P (eds) *Respiration in aquatic ecosystems*. Oxford University Press, Montreal, pp 83–102
- Souza MS, Balseiro E, Laspoumaderes C, Modenutti B (2010) Effect of ultraviolet radiation on acetylcholinesterase activity in freshwater copepods. *Photochem Photobiol* 86: 367–373
- Sterner RW, Elser JJ (2002) *Ecological stoichiometry. The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, Princeton
- Valderrama JC (1981) The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Mar Chem* 10:109–122
- Van TK, Wheeler GS, Center TD (1999) Competition between *Hydrilla verticillata* and *Vallisneria americana* as influenced by soil fertility. *Aquat Bot* 62:225–233
- Ventura M, Liboriussen L, Lauridsen T, SØndergaard M, Jeppesen E (2008) Effects of increased temperature and nutrient enrichment on the stoichiometry of primary producers and consumers in temperate shallow lakes. *Freshw Biol* 53:1434–1452
- Wong PK, Liang Y, Liu NY, Qiu JW (2010) Palatability of macrophytes to the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata*: differential effects of multiple plant traits. *Freshw Biol* 55:2023–2031
- Zedler JB, Kercher S (2004) Causes and consequences of invasive plants in wetlands: opportunities, opportunists, and outcomes. *Crit Rev Plant Sci* 23:431–452
- Zedler JB, Kercher S (2005) Wetland resources: status, trends, ecosystem services, and restorability. *Ann Rev Environ Res* 30:39–74