

The “Bug-Network” – Experimental part

Preguntas de Investigación

1. ¿Cuál es el impacto de los insectos herbívoros (I), moluscos (M), y patógenos fúngicos (F) en las comunidades de plantas? ¿Existe interacción entre estos grupos?
2. ¿Cuándo se registra el mayor efecto de los tres grupos (I, M, F) en las comunidades de plantas (productividad, composición, diversidad y funcionamiento)?

Objetivos de BugNet

Las redes globales de investigación permiten testear de manera rigurosa patrones y mecanismos generales (ej. NutNet, Drought-Net). El objetivo de BugNet es investigar los consumidores y las comunidades de plantas consumidas mediante experimentos de exclusión de I, M y F en diferentes partes del mundo.

BugNet busca implementar un estudio global requiriendo mínima inversión de tiempo y recursos por cada investigador. Se trata de un estudio experimental para cuantificar las comunidades de plantas y las respuestas de los ecosistemas a los I, M y F en un amplio espectro de ecosistemas dominados por herbáceas, tales como pastizales desde los desiertos hasta la tundra, pero incluyendo también montes y arbustales mediterráneos.

Protocolo

1.1. Selección del sitio

El sitio debe ser relativamente homogéneo y estar dominado por vegetación herbácea o arbustiva. Disturbios naturales tales como fuego o ramoneo por vertebrados (ej. liebres) no necesitan ser excluidos del sitio, aunque un registro del régimen de disturbio, e idealmente una cuantificación del ramoneo, son requeridos. Se prefieren sitios que no sean pastoreados por Ganado. Sitios expuestos a Ganado pueden ser incluidos siempre y cuando sean cercados. En este caso, el sitio debería ser segado cada cierto tiempo para así evitar el establecimiento de especies leñosas. Pastoreo leve (es decir, de baja carga animal) no necesita ser controlado. Durante el experimento, el sitio debería ser manejado igual que las áreas circundantes. Por ejemplo, si las pasturas son segadas un par de veces al año, el sitio experimental también debería hacerlo. En ese caso, debe

asegurarse de **planificar las mediciones en el peak de producción de biomasa** (usualmente, antes del segado).

1.2. Estableciendo el Experimento

El experimento tendrá un diseño de bloques aleatorios con **3 bloques, 8 tratamientos, y 3 réplicas por tratamiento** (N = 24 parcelas experimentales, Fig. 1). Cada parcela experimental tendrá una superficie de 5 x 5 m, y estará separada de la siguiente parcela experimental del mismo bloque, por 1 m de distancia. La parcela experimental de 25 m² será subdividida en 4 subparcelas de 2.5 x 2.5 m (A, B, C, D), con una de ellas dedicadas al muestreo focal, una a estudios adicionales, y dos para investigación futura de la red (ej. exclusión de oomycetes, tratamiento de calor, tratamiento de sequía...). La posición de los tratamientos en los 3 bloques debe ser asignada aleatoriamente. Las subparcelas destinadas a los diferentes usos también deben ser asignadas aleatoriamente. La subparcela destinada al muestreo focal será subdividida en 4 cuadrantes de 1m x 1m (i, ii, iii, iv); el cuadrante ubicado más cercanamente al centro de la parcela será destinado a la evaluación de composición de especies (cover, i). Los otros 3 cuadrantes serán destinado a muestreos destructivos tales como biomasa vegetal, o daño por herbívoros y patógenos (sólo en el año 3, ver Fig. 1). Para cuantificar el impacto de los diferentes grupos de consumidores (I, M, F), éstos será excluidos o reducidos mediante biocidas. Los tratamientos involucrarán la remoción de grupos individuales, ej insectos, moluscos, y hongos, en todas las combinaciones posibles (exclusión de un grupo, dos grupos, todos los grupos o ningún grupo -control-), resultando en un total de 8 tratamientos (Fig. 1).

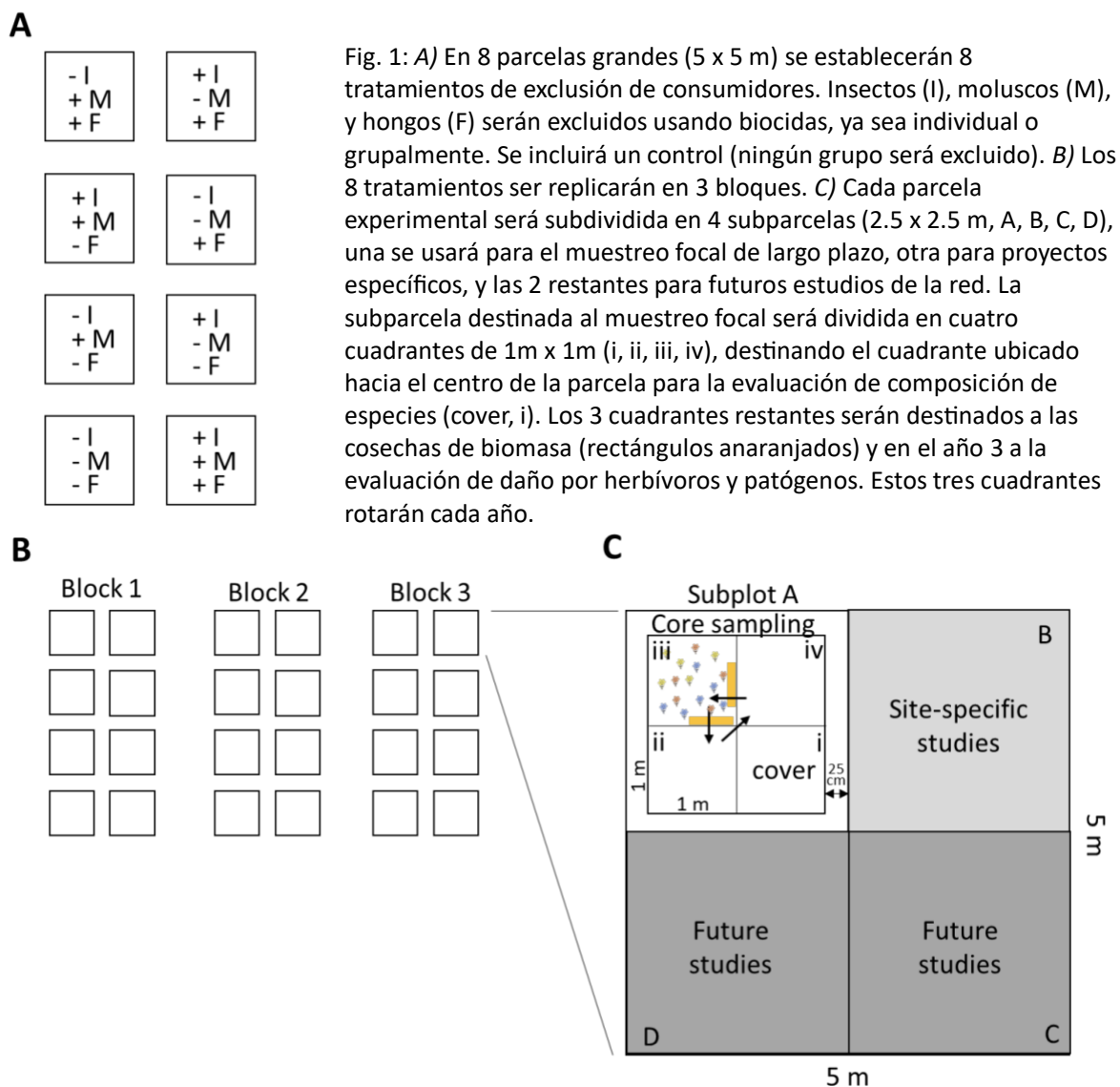


Fig. 1: A) En 8 parcelas grandes (5 x 5 m) se establecerán 8 tratamientos de exclusión de consumidores. Insectos (I), moluscos (M), y hongos (F) serán excluidos usando biocidas, ya sea individual o grupalmente. Se incluirá un control (ningún grupo será excluido). B) Los 8 tratamientos ser replicarán en 3 bloques. C) Cada parcela experimental será subdividida en 4 subparcelas (2.5 x 2.5 m, A, B, C, D), una se usará para el muestreo focal de largo plazo, otra para proyectos específicos, y las 2 restantes para futuros estudios de la red. La subparcela destinada al muestreo focal será dividida en cuatro cuadrantes de 1m x 1m (i, ii, iii, iv), destinando el cuadrante ubicado hacia el centro de la parcela para la evaluación de composición de especies (cover, i). Los 3 cuadrantes restantes serán destinados a las cosechas de biomasa (rectángulos anaranjados) y en el año 3 a la evaluación de daño por herbívoros y patógenos. Estos tres cuadrantes rotarán cada año.

1.3. Aplicación de los Tratamientos

Para controlar a los insectos (I), usaremos **Lambda-Cyhalothrin (e.g. Karate Zeon, Syngenta)**, un insecticida no sistémico y de amplio espectro que se usa frecuentemente en estudios de exclusión de insectos y que tiene muy escasos efectos no deseados. Para controlar los hongos foliares usaremos una combinación de **azoxystrobin y difenoconazol** (el azoxystrobin inhibe la respiración mitocondrial fúngica, el Difenconazol interrumpe la síntesis de ergosterol, un componente de la membrana celular fúngica, ej. una mezcla de **Score Profi y Ortiva, Syngenta**). **Ambos pesticidas serán aplicados (rociados) al inicio de la estación de crecimiento y luego cada 4-6 semanas hasta el final de la estación de crecimiento.** Para el control de moluscos

usaremos molusquicida en pellet, basado en fosfato de hierro (ej. Limax Ferro, Maag, o cualquier otro producto basado en fosfato de hierro (ej. Sluggo), a veces también llamado fosfato de hierro (FePO_4); éste será aplicado al mismo momento que los demás pesticidas. El número de aplicaciones será mayor en regiones con una estación de crecimiento larga. Esto se recomienda ya que los consumidores estarán activos más tiempo y nos queremos asegurar de que los tratamientos sean efectivos y logren reducir la abundancia. No obstante, se recomienda chequear las regulaciones locales del sitio de estudio y asegurarse de no aplicar más pesticida del que la normativa permite. Podría suceder que en algunos países algunos biocidas no estén permitidos. Si este es el caso, por favor contáctenos para discutir alternativas. Los biocidas pueden no eliminar completamente la infestación, pero reducirán significativamente el ataque de enemigos sobre plantas y constituyen la única aproximación experimental para evaluar la importancia de los herbívoros invertebrados (M, I) y patógenos (F) en comunidades naturales. Revise detenidamente el [protocolo](#) detallado sobre aplicación de pesticida. La dosis recomendada en el protocolo es para vegetación de baja estatura (< 50 cm). Si el experimento se realiza en un sitio más productivo, la dosis debería incrementarse. Asegúrese de reportar esto en su planilla de datos.

1.4. Mediciones por sitio – datos de Línea Base (previos a la aplicación de los tratamientos)

Para caracterizar los diferentes sitios que conformarán este estudio global, varias mediciones de suelo deberían ser realizadas **antes de la aplicación de los tratamientos**. Esto permitirá evaluar la relación entre el impacto de diferentes variables (latitud, altitud, fertilidad del suelo), e informar sobre la dependencia de las interacciones bióticas con relación al contexto.

Muestras de suelo

Se colectarán **tarugos de suelo** con el fin de evaluar diferentes características. En cada una de las 24 parcelas, colecte dos tarugos (taladro de suelo 2.5 x 10 cm) y homogenice en suelo en una única muestra por sitio (es decir, mezcle las 48 muestras). Por favor tamice el suelo usando un tamiz de 2 mm de malla. Los suelos deberían ser secados al aire y enviados a los coordinadores de Proyecto ([ver Soil Processing, Labelling and Mailing protocol](#) para más detalles y para acceder a formularios de envío de muestras). Allí, C orgánico total, N total y stock de P, así como también el pH, serán medidos en la muestra recibida.

Almacenamiento de Largo Plazo en el suelo (no obligatorio)

Además, nos gustaría obtener información de la comunidad microbiana a escala de cada parcela. La comunidad microbiana del suelo probablemente cambiará en respuesta

a los tratamientos. Para poder analizar este cambio en cierto momento, es necesario contar con información de las condiciones previas al tratamiento. Nosotros por lo tanto te animamos a que almacenes una muestra de suelo por parcela antes de la aplicación de los tratamientos, en un freezer. Sin embargo, esta actividad no es obligatoria y tú puedes participar de esta red si no quieres realizar esta actividad.

Colecta tarugos de suelo (2.5 x 10 cm) de 5 puntos aleatorios por parcela y homogeneiza las 5 muestras en una muestra por parcela. Asegúrate de limpiar adecuadamente el taladro de suelo toda vez que cambies de parcela. De la muestra de cada parcela, coloca 50g en una bolsa Ziploc rotulada a -20°C, y 5g a -80°C (si tienes acceso a ese tipo de freezer). No olvide rotular las bolsas correctamente, ya que podrían quedar en el freezer por algunos años antes de que queramos analizar la comunidad microbiana.

1.5. Mediciones anuales por parcela

Estas mediciones deberían realizarse cada año, al momento de mayor producción de biomasa.

Composición de especies de la comunidad

Una vez por año, estime el porcentaje de cobertura de cada especie de planta en cada uno de las 24 parcelas; realice esta estimación en la subparcela destinada al muestreo focal, específicamente en el cuadrante ubicado hacia el centro de la parcela (Fig. 1, i, cover). La cobertura de cada especie de planta enraizada dentro del cuadrante será estimada con una precisión de hasta el 1% (para coberturas de hasta 20%) y con una precisión de 5% para coberturas entre 20-100%. Asigne 0.1% o 0.5% a especies muy raras que tengan menos de 1% de cobertura. Estime también el porcentaje de cobertura para especies leñosas que estén en el dosel, briofitas, líquenes, hojarasca (litter), suelo desnudo, y rocas si estuviesen presentes (ver [datasheet](#)). La cobertura total típicamente va a exceder el 100% porque la cobertura de especies es estimada independientemente para cada especie.

Para reducir el sesgo en el ensayo de cobertura, es importante entrenarse ubicando piezas de papel de diferente tamaño sobre el cuadrante: ej. 10cm x 30cm = 3 %, 10cm x 10cm = 1 %, 3.1cm x 3.2cm = 0.1%, 31cm x 32cm = 10 % ...

En sistemas en los cuales la composición de especies cambia significativamente durante el año, o que tienen un régimen de dos cortes anuales, recomendamos que la composición sea evaluada dos veces, una al principio de verano y otra al final del verano. De esta manera podremos evaluar las diferencias en fenología y capturar la cobertura máxima de cada especie.

Biomasa aérea

Para cuantificar el impacto de los consumidores en la productividad (top-down control), corte todo el material vegetal aéreo hasta 2 cm encima del suelo, en dos bandas de 10cm x 50 cm ubicadas en el cuadrante correspondiente de la subparcela destinada al muestreo focal (ii, iii, iv, Fig. 1). Si el cuadrante ha sido segado en el último muestreo, la cosecha de biomasa debería realizarse en un cuadrante diferente (ver Fig. 1).

Si ud. trabaja en sistemas de muy baja productividad, que no son segados, y en el cual la remoción de biomasa podría ser evidente aún después de 3 años, entonces considere no solapar las bandas para cosecha de biomasa, en la medida de lo posible (ver ejemplo de posiciones de bandas para cosecha de biomasa, Fig. 2).

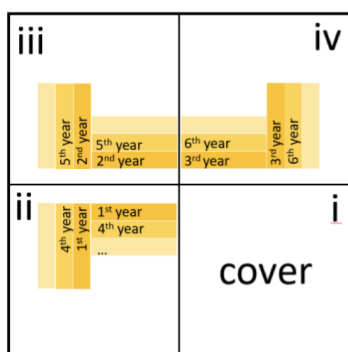


Fig. 2: En sistemas muy improductivos, en los que las plantas crecen muy lento y la remoción de biomasa en una banda podría ser evidente luego de 3 años, considere no solapar las bandas por el mayor tiempo posible.

El muestreo debería ser hecho en el momento de mayor producción de biomasa (este momento va a variar entre sitios y deberá ser definido por los investigadores locales). Si su sitio es segado dos veces al año, la biomasa debería ser colectada dos veces al año, para estimar correctamente la productividad (antes de las cortas). Colecte la biomasa total aérea, séquela y pésela (las dos submuestras por parcela pueden ser combinadas). Envíe una submuestra de ca. 20 g de peso seco por parcela (las dos bandas pueden combinarse) correspondiente al muestreo de biomasa, a los coordinadores del proyecto ([ver Sample Processing and Labelling Protocol](#)) una vez al año. Sería ideal que la biomasa sea molida a polvo, pero si ello no es posible corte la biomasa en trozos y envíenos una submuestra bien mezclada.

Nosotros mediremos luego varias características foliares (N y P foliares, contenido de fibra, etc.), con el fin de monitorear cambios en calidad en respuesta a los tratamientos. Podríamos querer evaluar el microbioma de la filósfera en cierto punto (el microbioma de la superficie de las hojas). Si ud. trabaja en arbustales la biomasa de los arbustos será estimada mediante ecuaciones alométricas. Para cada especie de arbusto, mida la altura y el diámetro del dosel de 20 individuos de tamaño contrastante, ubicados fuera del experimento. Córtelos, séquelos, y péselos. Si los arbustos forman grandes parches y no

es posible aislar los individuos, simplemente colecte 20 “unidades muestrales” de diámetro y altura conocidos, y colecte la biomasa de estas unidades muestrales (ver [datasheet](#)). Para estimar la biomasa parda y la biomasa verde de cada arusto, separe las hojas de la biomasa leñosa. Para algunas especies esto podría funcionar mejor una vez que las hojas están secas. Ahora mida la altura y el diámetro de todos los arbusto en la subparcela destinada al muestreo focal, en el mismo cuadrante donde está midiendo cobertura (Fig. 1, cover, i).

1.6 Mediciones únicas de rasgos

En cada sitio, varios rasgos de plantas -altura, área foliar específica (SLA) y contenido foliar de materia seca (LDMC) – serán medidos una única vez para caracterizar las comunidades de plantas. Estos rasgos son cercanamente relacionados a dos ejes ppales de variación funcional, el tamaño de las plantas y sus partes, y el espectro económico de recursos (Wright et al. 2004, Díaz et al. 2016). Estos rasgos serán medidos de acuerdo a protocolos de Garnier et al. 2001.

La altura, el SLA y el LDMC de todas las especies de plantas en un sitio deberán ser medidos. Esto permitirá testear si la respuesta de plantas a la exclusión de enemigos sigue un patrón esperado según las estrategias de defensa (ej. crecimiento defensa-tradeoff). Para cada especie de planta presente en un sitio, 5 individuos por sitio deberían ser aleatoriamente muestreados para mediciones de altura, SLA y LDMC. La altura puede ser medida directamente en el sitio. Para SLA y LDMC, colecte los 5 individuos elegidos aleatoriamente y colóquelos en una bolsa plástica rotulada dentro de un cooler. Si es posible, los individuos colectados deberán tener > 5 hojas sin ningún síntoma de daño, ya que idealmente los rasgos serán medidos en hojas no dañadas (vea [protocolo detallado para medir SLA y LDMC](#)). **Estas mediciones pueden realizarse en cualquier momento del experimento, antes del cuarto año.**

1.7. Campañas de muestreos especiales por parcela y mediciones adicionales (measurement Add-ons)

En cierto momento le pediremos algunas mediciones adicionales. Por ejemplo, en el tercer año del experimento (tercer año de aplicación del tratamiento) le pediremos medir el daño por herbivoría y la infección por patógenos en todas las parcelas (ver abajo). En el tercer o cuarto año, deberá medir la biomasa de raíces de plantas en pie (presentes) (ver abajo) y en cierto momento planeamos evaluar la comunidad de invertebrados de cada parcela. Además, algunas mediciones accesorias han comenzado a realizarse o se realizarán en el futuro (mollusc addon, decomposition addon). Existe

<https://www.bug-net.org/experimental-study/#11-selection-of-sites>

también la posibilidad de proponer y liderar mediciones accesorias y nosotros animamos a los participantes a que lo hagan (ver Add-on proposal). Además, sostendremos varios talleres y grupos de discusión donde podremos desarrollar estas ideas de manera conjunta. Abajo encontrará una breve descripción de las mediciones y un link a los protocolos detallados.

[Daño por herbívoros e infección fúngica](#)

Al tercer año de experimento, le pediremos medir el daño por herbívoros (M, I) y la infección por hongos (F) en cada parcela (24). Si su sistema es muy productivo y es segado regularmente, el daño y la infección deberán ser medidos en el pequeño cuadrante dedicado a cobertura (small plot i). Si su sistema es muy improductivo, y el remover los individuos para evaluar el daño o infección podría influir significativamente en la vegetación, entonces mida el daño por herbívoros y la infección fúngica en uno de los otros cuadrantes destinados al muestreo destructivo (ii, iii, iv), o alternativamente mida el daño en el cuadrante destinado a evaluación de cobertura sin remover los individuos. Ud. encontrará los protocolos detallados sobre cómo evaluar el daño por herbivoría y la infección por patógenos aquí.

[Biomasa de Raíces](#)

En el año 3 o 4 del experiment, se deberá medir la biomasa radicular "viva". Para hacer esto, tome un tarugo de suelo de 5cm de diámetro y 30 cm de profundidad por parcela, y separe las raíces. Seque y pese la biomasa de raíz e ingrese los datos en su [planilla anual](#).

[Decomposition Add-on](#)

Pronto tendremos disponible un protocolo para participar en un estudio complementario de descomposición usando la aproximación de bolsitas de té.

[Mollusc sampling Add-on](#)

Pronto tendremos disponible un protocolo para participar en un estudio complementario de moluscos.