



Universidad Nacional del Comahue

Centro Regional Universitario Bariloche

¿Cuáles son los atributos que favorecen el establecimiento de pináceas
invasoras y su posterior invasión en la región introducida?

Trabajo de Tesis para optar por el grado de Doctor en Biología

2020

Ing. Agr. Jaime Moyano

Doctorando

Dr. Martín A. Nuñez

Director

Dr. Mariano A. Rodriguez Cabal

Codirector

Agradecimientos

A Martin, por haberme dado esta gran oportunidad de hacer un doctorado e incontables oportunidades de crecimiento en el mundo académico

A Mariano por guiarme en este camino y estar disponible para lo que necesitara

A Nahuel, Mariana, Agostina y Tiño por toda su ayuda a lo largo de estos años

A Flor y Tere por estar siempre dispuestas a ayudarme con la estadística

A Ariel, Gabriela, Luciana, Nicolás, Pablo y Patricia por todo su apoyo técnico

A Jorgelina, Lucía y Paula por su trabajo como jurado de mi tesis

A Marcela y Gustavo, por toda la ayuda desde el depto. de posgrado del CRUB

A mis profesores en los cursos del doctorado, por enseñarme tanto

A la Comisión del Doctorado por todo su trabajo

A CONICET por haberme otorgado la beca

A Jose y Alejo, sin ellos hoy no estaría aca

A mis padres, que siempre me apoyaron incondicionalmente

A Ale, quien me mostró la Patagonia, y así, definió el norte de mi profesión

A Juan, por todas las charlas sobre todo

A Adolfo Moretti, por ser tan generoso con su conocimiento

A Noemí, por ser siempre una guía y una buena amiga

Al INTA y a Isla Victoria, por sus semillas de pinos

A los Gauchos Patagónicos, por las horas corriendo juntos en la montaña para despeja

Resumen

La prevención de las invasiones biológicas es la forma más efectiva de reducir sus impactos negativos. Si bien se ha avanzado mucho en la identificación de atributos que favorecen la invasión de plantas se conoce poco sobre los mecanismos detrás de estos atributos. Esto limita nuestra capacidad de predecir y prevenir las invasiones. En esta tesis proponemos evaluar mecanismos detrás de atributos que favorecen la invasión de plantas. Nos enfocamos en dos mecanismos que, si bien se ha sugerido que cumplen un rol importante en las invasiones biológicas, no se han evaluado en detalle como posibles causas del grado de invasividad de diferentes especies de plantas. La depredación de semillas es una de las principales barreras para el establecimiento de plantas y la preferencia de los consumidores por diferentes tipos de semillas puede crear un filtro selectivo para la invasión de plantas. De esta manera, en primer lugar evaluamos la depredación de semillas como filtro selectivo al establecimiento de Pinaceae que difieren en su capacidad invasiva. A su vez, se espera que las plantas más invasoras sean menos dependientes de mutualismos y existe evidencia que la ausencia de mutualistas puede impedir la invasión de plantas. En este sentido, el mutualismo entre plantas y hongos micorrícicos cobra especial importancia debido a que la gran mayoría de las especies de plantas no pueden sobrevivir sin hongos micorrícicos apropiados. Así, en segundo lugar estudiamos como afecta la interacción entre dispersión de semillas, depredación de semillas y disponibilidad de inóculo de hongos micorrícicos en el éxito del establecimiento de *Pinus ponderosa*. Además, evaluamos la dependencia de 34 especies del género *Pinus* al mutualismo con ectomicorrizas. Finalmente, estudiamos la relación entre la capacidad (y necesidad) que tienen las plantas de formar un mutualismo con hongos micorrícicos y su éxito en la naturalización (establecimiento de una población viable) fuera de su área de distribución nativa. Los resultados de este proyecto muestran que los depredadores de semillas prefieren consumir las Pinaceae más invasoras, lo que

indica que este mecanismo no favorece el establecimiento de dichas especies. Por otro lado, considerando su interacción con la dispersión de semillas, la depredación de semillas puede explicar por qué algunas Pinaceae no se establecen fuera del área plantada. También encontramos evidencia que las especies de *Pinus* que dependen más del mutualismo con micorrizas son más invasoras, indicando que la formación de mutualismos es un posible mecanismo que favorece la invasión de plantas. A su vez, las plantas que pueden formar micorrizas, pero a su vez pueden vivir sin ellas son las que más se establecen fuera de su rango nativo. Los resultados de esta tesis destacan la importancia de las interacciones negativas (depredación) y las interacciones positivas (mutualismos) como mecanismos que vinculan atributos de plantas con el éxito en el establecimiento y en la invasión de especies no nativas.

Abstract

Preventing biological invasions is the most effective way to reduce their negative impacts. Although there has been great progress identifying invasive traits we still know very little about the mechanisms behind these traits. This limits our ability to predict and prevent invasions. In this thesis we propose to evaluate the mechanisms behind the traits of invasive plants. Here we focus on two mechanisms that have been proposed to have a key role in biological invasions, but have not been studied in detail as possible drivers of plant species invasiveness. Seed predation is one of the major barriers for plant establishment and seed consumer's preference may create a selective filter for plant invasion. Therefore, we first evaluate seed predation as a selective filter for Pinaceae establishment that differ in their invasiveness. Further, invasive plants are expected to be less dependent on mutualisms and evidence shows that the lack of mutualists can hinder plant invasions. In this regard, the mutualistic interaction between plants and mycorrhizal fungi is key since the great majority of plant species cannot survive without appropriate mycorrhizal fungi.

Then, we study how seed dispersal, seed predation, and mycorrhizal fungal inoculum availability affect the success of *Pinus ponderosa* establishment. In addition, we evaluate the dependence of 34 species of the *Pinus* genus on the mutualism with ectomycorrhizal fungi. Finally, we study the relationship between the capacity (and requirement) of plants to form a mutualism with mycorrhizal fungi and their naturalization (establishment of a viable population) success outside their native range. The results of this project show that seed predators prefer to consume the more invasive Pinaceae, indicating that this mechanism does not favor the establishment of such species. On the other hand, considering its interaction with seed dispersal, seed predation may explain why some Pinaceae do not establish outside the planted area. We also find evidence that *Pinus* species that depend more on the mutualism with mycorrhizal fungi are more invasive, indicating that the formation of mutualisms may be a mechanism that favors plant invasion. In turn, plants that can form a mutualism with mycorrhizal fungi but can also live without them show the highest naturalization success outside their native range. The results of this thesis highlight the importance of negative interactions (predation) and positive interactions (mutualisms) as mechanisms that link plant traits to the successful establishment and invasion of non-native species.

Indice

Capítulo 1: Introducción general	8
Capítulo 2: La depredación de semillas no explica el éxito de la invasión de pinos	14
2.1 Resumen.....	15
2.2 Introducción	16
2.3 Materiales y Métodos	19
2.3.1 Sitio de estudio	19
2.3.2 Estado invasivo de las especies	20
2.3.3 Experimentos de cafetería.....	21
2.3.4 Atributos de semilla.....	23
2.3.5 Análisis estadísticos	24
2.4 Resultados	26
2.5 Discusión	31
Capítulo 3: La interacción entre presión de propágulos, depredación de semillas y hongos ectomicorrícicos en la invasión de plantas	38
3.1 Resumen.....	39
3.2 Introducción	40
3.3 Metodología	42
3.3.1 Sitio de estudio	42
3.3.2 Presión de propágulos vs. depredación de semillas	43
3.3.3 Ausencia de mutualistas	45
3.3.4 Análisis estadístico	47
3.4 Resultados	49
3.4.1 Presión de propágulos vs. depredación de semillas	49
3.4.2 Ausencia de mutualistas	52
3.5 Discusión	54
Capítulo 4: Árboles altamente invasores son más dependientes de mutualismos	59
4.1 Resumen.....	60
4.2 Introducción	61
4.3 Metodología	63
4.4 Resultados	71
4.5 Discusión	79

Capítulo 5: Los patrones de naturalización de plantas muestran que las plantas micorrícicas facultativas tienen más probabilidades de éxito fuera de su área de distribución nativa	86
5.1 Resumen.....	87
5.2 Introducción	88
5.3 Metodología.....	92
5.3.1 Base de datos	92
5.3.2 Análisis estadísticos	95
5.4 Resultados	98
5.5 Discusión	106
Capítulo 6: Discusión general	113
Bibliografía	117
Material suplementario.....	133
Material suplementario del Capítulo 2.....	133
Material suplementario del Capítulo 4.....	139
Material suplementario Capítulo 5.....	143
Artículos de respaldo.....	154
Artículo del Capítulo 2.....	154
Artículo del Capítulo 3.....	167
Artículo del Capítulo 4.....	181
Artículo del Capítulo 5.....	190

Capítulo 1: Introducción general

Junto con la destrucción de hábitat y el cambio climático, las invasiones biológicas representan una de las causas más importantes del cambio global (Díaz et al. 2020). Los impactos negativos que generan representan un costo de miles de millones de dólares anuales a nivel global (Pimentel et al. 2005; Simberloff 2013). De especial importancia son las invasiones de plantas, que generan grandes impactos en diversos ecosistemas alrededor del mundo (Levine et al. 2003; Vilà et al. 2011). La prevención es la forma más eficaz de reducir los impactos de las invasiones biológicas (Simberloff 2013). Desafortunadamente, la prevención es un objetivo difícil de alcanzar.

Nuestra capacidad de prevenir invasiones biológicas está limitada por nuestro conocimiento de este proceso. Necesitamos identificar las especies invasoras antes de permitir su ingreso a una nueva región. Si bien se ha avanzado mucho en la identificación de atributos que promueven la invasión de plantas (Pyšek y Richardson 2007; van Kleunen et al. 2010), nuestro conocimiento sobre los mecanismos detrás de estos atributos todavía es muy limitado. Mientras no podamos establecer una relación causal entre un atributo y la capacidad invasiva de una especie, es posible que estemos enfocados en atributos que simplemente correlacionan con invasividad (i.e. no la confieren) (van Kleunen et al. 2010). De esta manera no solo es importante identificar los atributos de especies invasoras sino también los mecanismos por los cuales dichas especies son tan exitosas fuera de su rango nativo.

Se han propuesto numerosas mecanismos que podrían explicar por qué algunas especies se vuelven invasoras (Catford et al. 2009). Por ejemplo, la introducción de ciertas especies en mayor número (mayor presión de propágulos) (Lockwood et al. 2005), la liberación de enemigos naturales (Keane y Crawley 2002), la ocurrencia de disturbios (Sher y Hyatt 1999) y la existencia de

nichos vacíos (Hierro et al. 2005) podrían favorecer la invasión de algunas especies. Algunos de estos mecanismos tienen mayor grado de apoyo de evidencia empírica que otros (Jeschke 2014).

Para que una especie se vuelva invasora fuera de su rango nativo debe superar una serie de barreras a lo largo de tres etapas: introducción, establecimiento e invasión (Figura 1.1) (Blackburn et al. 2011; Richardson et al. 2000b). Diferentes procesos influyen sobre el éxito de las especies no-nativas en cada una de las etapas de este proceso de invasión (Dawson et al. 2009; Milbau and Stout 2008; Moodley et al. 2013; Moodley et al. 2016; Rojas-Sandoval and Acevedo-Rodríguez 2015; Theoharides and Dukes 2007; Williamson 2006). Así, es posible identificar atributos y mecanismos que favorecen el establecimiento, así como atributos y mecanismos que favorecen la invasión de plantas introducidas.

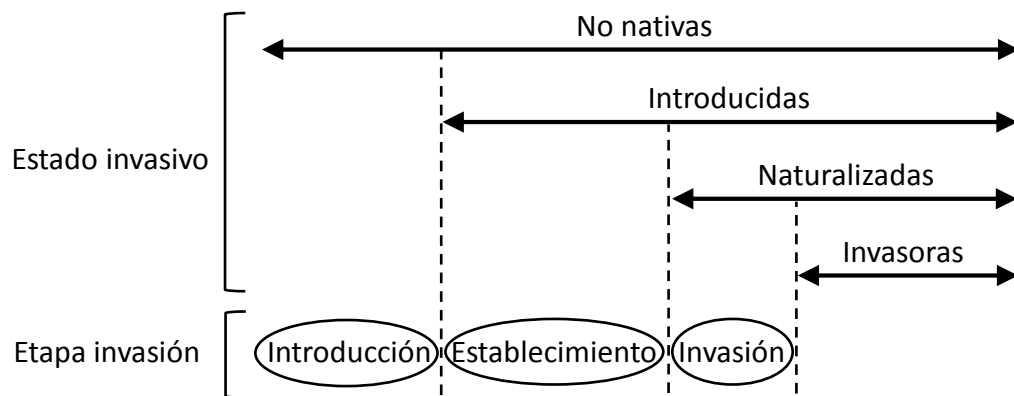


Figura 1.1: Diferentes etapas del proceso de invasión y las correspondientes estados invasivos propuestos según el marco conceptual de Blackburn et al. (2011)

La depredación de semillas es uno de las principales barreras para el establecimiento de plantas (Janzen 1969; Hulme 1994; Larios 2017). Existe evidencia que la depredación de semillas tiene un efecto importante sobre la invasión de plantas no nativas (Hulme 1998; Moles et al. 2003; Nuñez et al. 2008; Connolly et al. 2014). La preferencia de los depredadores por determinados tipos de semillas puede crear un filtro selectivo, reduciendo el establecimiento de las especies más

consumidas, e indirectamente favoreciendo a las especies menos preferidas (Hulme and Borelli 1999; Pearson et al. 2011; Connolly et al. 2014; Muschetto et al. 2015; Larios et al. 2017). De esta manera, es posible que la depredación de semillas nos ayude a explicar por qué algunas especies son más exitosas durante el proceso de invasión.

La hipótesis de la “maleza ideal” postula que las plantas invasoras dependen menos de mutualismos (Baker 1965). En concordancia con esta hipótesis, algunos estudios sugieren que las especies que dependen más de polinizadores (Burns et al. 2011, Pysek et al. 2011, Rodger et al. 2013, Razanajatovo et al. 2016), dispersores de semillas (Richardson et al. 2000a) y asociaciones micorrícicas (Vogelsang et al. 2004, Vogelsang y Bever 2009) son menos invasoras. Sin embargo, no hay estudios que cuantifiquen la dependencia de mutualismos a lo largo de un gradiente de invasividad de plantas. Esta dependencia de mutualismos podría ser un mecanismo por el cual algunas especies de plantas se vuelven invasoras mientras que otras no.

La familia Pinaceae es un sistema de estudio ideal para evaluar los mecanismos detrás de los atributos que favorecen el establecimiento y la invasión de plantas porque incluye numerosas especies que han sido plantadas a gran escala en todo el mundo, algunas de las cuales se han convertido en invasoras y otras no (Richardson et al. 1994; Simberloff et al. 2010; Essl et al. 2011; Richardson and Rejmánek 2011). Existe evidencia que la depredación de semillas puede reducir selectivamente el establecimiento de pináceas fuera de su rango nativo (Nuñez et al. 2008). A su vez, las especies de esta familia forman un mutualismo obligado con hongos ectomicorrícicos (Mikola et al 1970, Koele et al. 2012), y la ausencia de dichos hongos puede impedir la invasión de pináceas (Nuñez et al 2009). Varios estudios han identificado atributos que favorecen el establecimiento (McGregor et al. 2012; Perret et al. 2019) y la invasión (Richardson et al. 1990; Rejmánek and Richardson 1996; Grotkopp et al. 2002; Richardson and Rejmánek 2004, Rejmanek et al. 2005) de especies en esta familia. Si bien se han identificado correlaciones consistentes entre

diferentes atributos y la capacidad de invasión de pináceas, es necesario conocer los mecanismos detrás de estos atributos para entender mejor las causas de las invasiones biológicas. Sin embargo son escasos los estudios que han evaluado los mecanismos por los cuales algunas especies de esta familia se han establecido exitosamente o se han vuelto invasoras fuera de su rango nativo (pero vease Grotkopp et al. (2002) y Bellingham et al. (2004)).

En esta tesis proponemos evaluar mecanismos detrás de atributos de establecimiento y mecanismos detrás de atributos de invasión de plantas. Para esto nos centramos en la depredación de semillas y en el mutualismo entre plantas y hongos micorrícicos como procesos clave en el establecimiento y la invasión de plantas. De esta manera, en el Capítulo 2 evaluamos la depredación de semillas como filtro selectivo al establecimiento de Pinaceae que difieren en su capacidad invasiva. En general se espera que las semillas más grandes sean más consumidas debido a su alto contenido energético (MacArthur and Pianka 1966; Hofmann et al. 1995; Blate et al. 1998). De esta manera esperamos encontrar que las especies de semilla más pequeña (las especies más invasoras (Rejmánek y Richardson 1996)) sean menos consumidas por depredadores nativos. Contrariamente a lo esperado, mostramos que los consumidores de semillas prefieren las semillas más pequeñas, evidencia que la depredación de semillas no es un proceso que favorezca el establecimiento de las especies de semilla pequeña. Los resultados de este estudio fueron publicados en la revista *Oecología* (Moyano et al. 2019a).

En el capítulo 3 estudiamos como afecta la interacción entre diferentes procesos el éxito del establecimiento de *Pinus ponderosa*, una especie ampliamente plantada en Patagonia pero no invasora en dicha región. A lo largo de un gradiente de dispersión de semillas de *P. ponderosa*, evaluamos la depredación de semillas y la disponibilidad de hongos ectomicorrícicos (mutualistas obligados de especies de la familia Pinaceae). A su vez, mediante un ensayo en cámara de cultivo estudiamos el efecto la disponibilidad de hongos ectomicorrícicos sobre el crecimiento y

supervivencia de plántulas de *P. ponderosa*. Encontramos que los depredadores nativos consumen la totalidad de semillas dispersadas a distancias mayores de 25 m desde el límite de la plantación de *P. ponderosa*. A su vez, la disponibilidad de inóculo de hongos ectomicorrícicos disminuye a medida que aumenta la distancia desde la plantación de *P. ponderosa*. Sin embargo, esta menor disponibilidad de inóculo no afecta el crecimiento ni la supervivencia de plántulas de *P. ponderosa*, en los primeros 200 m desde el límite de la plantación. De esta manera, la depredación de semillas parece ser el mecanismo limitante en el establecimiento de *P. ponderosa* por fuera de los límites de las plantaciones forestales. Este trabajo fue publicado en la revista *Neobiota* (Moyano et al. 2019b).

En el capítulo 4 evaluamos, mediante un meta-análisis, la dependencia de 34 especies del género *Pinus* al mutualismo con ectomicorrizas. Estudios previos han concluido que las especies invasoras tienen una menor dependencia de mutualismos. Contrario a lo esperado (Richardson et al. 2000a), nuestro trabajo muestra que las especies más invasoras dependen más del mutualismo con micorrizas. Este resultado refleja la importancia de las interacciones positivas como mecanismo que explica el éxito de algunas especies fuera de su rango nativo. Los resultados de este estudio fueron publicados en la revista *Ecology* (Moyano et al. 2020b).

En el capítulo 5 estudiamos la relación entre la capacidad (y necesidad) que tienen las plantas de formar un mutualismo con hongos micorrícicos y su éxito en la naturalización (establecimiento de una población viable) fuera de su área de distribución nativa. Para este capítulo ampliamos nuestro sistema de estudio al conjunto de plantas vasculares con el objetivo de evaluar cómo afecta la dependencia de micorrizas a la capacidad de invasión de las plantas, más allá de la familia Pinaceae. Para 1981 especies de plantas comparamos la capacidad de naturalización entre diferentes condiciones micorrícicas: no micorrícicas (nunca forman

micorrizas), micorrícicas facultativas (pueden formar micorrizas pero también vivir sin ellas) y micorrícicas obligadas (necesitan formar micorrizas para sobrevivir). A su vez, dentro de las plantas micorrícicas obligadas estudiamos el éxito de naturalización para diferentes tipos micorrícicos: arbusculares, ectomicorrícicas, ericoides, orquioides y duales (aquellas que forman tanto micorrizas arbusculares como ectomicorrizas). En las micorrizas arbusculares las hifas del hongo penetran las células de la raíz de la planta, formando vesículas y arbusculos. En las ectomicorrizas las hifas no penetran las células de la raíz. En las micorrizas orquioides el hongo penetra las células de la raíz de las orquídeas formando bobinas. Finalmente, en las micorrizas ericoides el hongo penetra las células de la raíz de las ericáceas para formar ovillos (Smith y Read 2008). Los resultados de este trabajo muestran que las plantas micorrícicas facultativas se naturalizan en un mayor número de regiones que las plantas micorrícicas obligadas, y éstas últimas se naturalizan más que las plantas no micorrícicas. Este resultado muestra que la flexibilidad de poder vivir sin micorrizas junto con la capacidad de aprovechar este mutualismo, cuando está disponible, favorecen la naturalización de plantas. Además, encontramos que las plantas micorrícicas arbusculares y las duales son los tipos micorrícicos con el mayor éxito en la naturalización fuera de su rango nativo. Posiblemente la baja especificidad de hongos micorrícicos arbusculares aumenta la disponibilidad de hongos micorrícicos apropiados para estas plantas fuera de su área de distribución nativa. Los resultados de este trabajo fueron publicados en la revista *Ecography* (Moyano et al. 2020a).

Capítulo 2: La depredación de semillas no explica el éxito de la invasión de pinos

La sección que sigue es una versión levemente modificada de un artículo publicado en *Oecologia*:

Moyano J, Chiuffo MC, Nuñez MA, Rodríguez-Cabal MA (2019) Seed predation does not explain pine invasion success. *Oecologia* 189: 981-991

El uso de “nosotros” en este capítulo se refiere a mis co-autores y yo. Como primer autor yo era responsable de este artículo.

2.1 Resumen

Por qué algunas especies de plantas no nativas invaden y otras no es una pregunta central en ecología. El éxito de la invasión de plantas se ha asociado con atributos de las especies. Sin embargo, tenemos un conocimiento limitado de los mecanismos que relacionan estos atributos con el potencial de invasión. Los patrones generales de resistencia biótica por depredación de semillas pueden proporcionar un mecanismo que ayude a separar las plantas invasoras de las no invasoras. La depredación de las semillas es una barrera importante contra el establecimiento de muchas especies de plantas. Por lo tanto, puede crear un filtro selectivo contra el establecimiento de plantas no nativas basado en los atributos relacionados con la tasa de depredación de semillas. En dos experimentos de cafetería de depredación de semillas en un ecosistema de estepa de la Patagonia (Argentina) proporcionamos semillas de 16 especies de la familia Pinaceae (no nativas) cubriendo una variación de 300 veces en el peso de la semilla, una variación de 200 veces en el volumen de la semilla y una variación de 75 veces en la dureza de la semilla. Semillas de menor peso y volumen fueron más removidas que semillas más pesadas y más grandes. La dureza de la semilla no fue un predictor significativo, mientras que el volumen de la semilla fue el mejor predictor de la preferencia de los depredadores. Sin embargo, para las especies de esta familia el tamaño pequeño de la semilla es el predictor más importante de la capacidad de invasión: especies de semilla pequeña son más invasoras. Nuestros resultados muestran que la depredación de la semilla no limita el éxito de la invasión de las pináceas. En nuestro sistema, las especies que tienen semillas más pequeñas (es decir, más invasoras) son consumidas preferentemente por los depredadores de semillas. El peso de la semilla no fue el mejor predictor de las tasas de granívora, a pesar de ser el atributo de la semilla en el que se han centrado la mayoría de los estudios. Nuestra capacidad para predecir futuras invasiones y comprender el éxito de las mismas podría

beneficiarse de otros estudios que se centren en los mecanismos que subyacen a los atributos de especies invasoras.

2.2 Introducción

Tras varias décadas de investigación en el campo de las invasiones biológicas, la pregunta de por qué algunas especies de plantas invaden y otras fallan sigue sin respuesta (van Kleunen et al. 2015). De las muchas especies de plantas introducidas en una nueva región, de forma intencionada o accidental, sólo una pequeña proporción (1%) se convierte en invasora (Caley et al. 2008; Williamson y Fitter 1996). Aunque Simberloff (2013) afirmó que la influencia del contexto y la idiosincrasia es frecuentemente tan importante que dificulta nuestra capacidad de predecir la identidad de futuras plantas invasoras, otros estudios han tratado de dilucidar qué atributos separan a las especies de plantas invasoras de las no invasoras. Por ejemplo, Rejmánek y Richardson (1996) encontraron que un pequeño tamaño de la semilla, un corto período juvenil y un corto intervalo entre años de semillazón están asociados con las especies leñosas invasoras. Grotkopp et al. (2002) encontraron que, para pinos, una mayor tasa de crecimiento relativo, un mayor área foliar específica, un menor peso de semillas y un corto período entre generaciones favorecía la capacidad de invasión. Sin embargo, todavía no conocemos los mecanismos que vinculan estos atributos con el potencial de invasión, y sin una relación causal entre los atributos y la capacidad de invasión podríamos estar enfocados en los atributos que sólo están correlacionados con la capacidad de invasión y no con la causa (van Kleunen et al. 2010).

El éxito de la invasión de las plantas se ha asociado a la capacidad de superar la resistencia biótica impuesta por la comunidad nativa (Connolly et al. 2014; Nuñez et al. 2008). Entre los componentes de la resistencia biótica, la depredación de las semillas desempeña un papel

fundamental como filtro para el establecimiento de las plantas (Hulme 1994; Janzen 1969; Larios et al. 2017). Los depredadores de semillas pueden crear una presión selectiva sobre las diferentes especies de plantas de una comunidad alimentándose de un grupo específico de especies y, por consiguiente, reduciendo su reclutamiento (Connolly et al. 2014; Hulme y Borelli 1999; Larios et al. 2017; Muschetto et al. 2015; Pearson et al. 2011). La depredación de semillas puede ocurrir antes o después de la dispersión de las mismas, pero esta última, llevada a cabo en gran medida por pequeños mamíferos generalistas, es la fuente más importante de resistencia biótica a las invasiones de plantas (Connolly et al. 2014; Hulme 1998; Moles et al. 2003; Nuñez et al. 2008). Los pequeños mamíferos tienden a preferir semillas grandes (Brewer 2001; Gómez 2004; Nuñez et al. 2008; Pearson et al. 2011; Wang y Ives 2017). Una explicación de este patrón de preferencia es que podría ser más eficiente para un depredador de semillas buscar unas pocas semillas grandes en lugar de muchas semillas pequeñas (Blate et al. 1998; Hoffmann et al. 1995; MacArthur y Pianka 1966). Si bien la mayoría de los estudios se centran en el peso de la semilla para caracterizar el tamaño de la semilla, el volumen de la semilla también podría influir sobre la preferencia de los mamíferos pequeños, ya que algunos pueden estar limitados por el tamaño de sus aparatos bucales (Rey et al. 1997; Wheelwright 1985; Wheelwright 1993; Zhang y Zhang 2008). La resistencia a la fractura de la cubierta de las semillas (en adelante, la dureza de las semillas) también puede influir en la preferencia de los mamíferos pequeños (Fricke y Wright 2016; Moles et al. 2003), ya que puede ser necesaria mucha energía para romper la cubierta y masticar algunas semillas (Zhang y Zhang 2008). La resistencia específica de las semillas (la relación entre la dureza de la semilla y el peso de la semilla) (Fricke y Wright 2016) está relacionada con la cantidad de energía que un pequeño mamífero tendría que invertir por cada gramo de alimento obtenido (Blate et al. 1998; Hoffmann et al. 1995; MacArthur y Pianka 1966). Por lo tanto, los experimentos

que incluyen una amplia gama de atributos de las semillas pueden ayudar a dilucidar cuál de estos atributos podría explicar mejor los patrones de invasión de las plantas.

La familia Pinaceae es un sistema de estudio ideal para identificar los atributos de especies invasoras porque incluye muchas especies que han sido ampliamente plantadas en todo el mundo, con especies que se han vuelto invasoras y especies que no (Essl et al. 2011; Richardson y Rejmánek 2011; Richardson et al. 1994; Simberloff et al. 2010). Pinaceae es uno de los taxones más invasivos a nivel mundial, con especies como *Pinus radiata* (pino de Monterrey), que es nativo de América del Norte y se ha convertido en invasor en pastizales, fynbos y estepas en ocho regiones diferentes del mundo (Rejmánek y Richardson 2013). A su vez, esta familia incluye aproximadamente 250 especies, que abarcan una gama muy amplia de atributos morfológicos (Chave et al. 2009; McGregor et al. 2012; Niinemets 2010; Richardson 2006; Rueda et al. 2017). Además, muchos estudios sobre Pinaceae han demostrado que el tamaño de la semilla es uno de los mejores predictores de su capacidad invasiva: las especies de Pinaceae con semillas pequeñas son más invasoras (Grotkopp et al. 2002; Rejmánek y Richardson 1996; Richardson et al. 2000a; Richardson et al. 1990; Richardson y Rejmánek 2004). Una hipótesis detrás de este patrón es que las especies de Pinaceae de semillas pequeñas producen más semillas, lo cual contribuye a un mayor crecimiento poblacional y una mayor distancia de dispersión, aumentando su distribución más rápidamente (Rejmánek 1996). Sin embargo, si existe un vínculo mecanicista entre la intensidad de depredación de las semillas y la capacidad de invasión en las Pinaceae, debería basarse en una relación directa entre el tamaño de la semilla y la tasa de depredación en esta familia: las semillas más pequeñas, al ser menos consumidas, sobrevivirían de manera desproporcionada en comparación con semillas grandes, contribuyendo a su éxito de invasión.

En este estudio, evaluamos la selección ejercida a través de la depredación de semillas sobre los atributos de semillas de Pinaceae. Específicamente, utilizamos 16 Pinaceae no nativas, que mostraron una variación de 300 veces en el peso de la semilla, una variación de 200 veces en el volumen de la semilla y una variación de 75 veces en la dureza de la semilla, en un ecosistema de estepa en el noroeste de la Patagonia para responder a dos preguntas relacionadas: a) ¿Actúa la depredación de la semilla como un filtro que explica el éxito y el fracaso de la invasión de Pinaceae? b) ¿es el peso de la semilla el atributo que mejor explica el patrón de preferencia de la depredación de semillas? Esperabamos que las especies de Pinaceae con semillas más grandes (volumen de semillas) y más pesadas (mayor peso de semillas) fueran más consumidas y, por lo tanto, fueran menos invasoras. También esperabamos que las semillas más duras serían más consumidas porque las semillas más grandes y más pesadas tienen mayor dureza (Fricke y Wright 2016) y aunque los depredadores requieren más energía para romperlas, su recompensa sería mayor (Blate et al. 1998; Hoffmann et al. 1995; MacArthur y Pianka 1966).

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Sitio de estudio

Este estudio se llevó a cabo en un ecosistema de estepa en el noroeste de la Patagonia, Argentina (40° 59' 53" S; 71° 05' 13" O; 750 m.s.n.m.). La precipitación media anual es de 580 mm y la temperatura media anual es de 8,6°C (Estación meteorológica en el área de estudio, Estancia San Ramón). La cobertura vegetal es de aproximadamente el 60%, y está dominada por los pastos perennes *Pappostipa speciosa* y *Festuca pallescens* (Anchorena y Cingolani 2002). Los animales de

este ecosistema incluyen muchos mamíferos pequeños como *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *Eligmodontia morgani*, *Oligoryzomys longicaudatus*, *Phyllotis xanthopygus* cuya dieta incluye semillas, frutos e insectos (Pardiñas y Teta 2013; Pearson 1995; Pearson 1983). El ecosistema de estepa cubre una gran parte de la Patagonia y es uno de los ecosistemas más susceptibles a las invasiones de Pinaceae (Richardson et al. 1994; Simberloff et al. 2010). Las plantaciones de Pinaceae han reemplazado grandes áreas de este ecosistema nativo (Schlichter y Laclau 1998) y se han convertido en una fuente de semillas para las invasiones. En la región de estudio para Pinaceae no existe evidencia de dispersión secundaria de semillas por animales (Chiuffo et al. 2018; Nuñez et al. 2008).

2.3.2 Estado invasivo de las especies

Utilizamos tres categorías para definir el estado invasivo de cada especie, basadas en un estudio global de Pinaceae invasoras realizado por Essl et al. (2010) (Tabla 2.1). Clasificamos las especies sin registro de invasión como "No invasivas", las especies con registros de invasión en una o dos regiones del mundo como "Algo invasivas" y las especies con registros de invasión en tres o más regiones como "Invasivas". Aquí definimos región como un área con clima similar, que cubre entre 25.000 y 500.000 km², siguiendo la definición de Essl et al. (2010). Un criterio similar fue utilizado por Grotkopp y otros (2004) para definir el estado de invasión de *Pinus*. También definimos el estado invasivo en nuestra región de estudio para las especies que se plantan localmente a gran escala para comprobar que era coherente con el estado invasivo a nivel global (CIEFAP 2017). En este caso, el estado de invasión de cada especie se definió de acuerdo con estudios regionales. Se clasificaron las especies que no han invadido desde las plantaciones como "No invasivas", las especies que sólo rara vez han invadido desde las plantaciones como "Algo invasivas" y las

especies que han invadido frecuentemente desde las plantaciones como "Invasivas" (Franzese et al. 2017; Raffaele et al. 2016; Sarasola et al. 2006).

2.3.3 Experimentos de cafetería

Para evaluar el papel de la depredación de semillas en la invasión de Pinaceae no nativas, realizamos dos experimentos de tipo cafetería utilizando semillas de 16 especies no nativas pertenecientes a 4 géneros diferentes de la familia Pinaceae y una conífera nativa, *Austrocedrus chilensis* (familia Cupressaceae) (Tabla 1). Un experimento de tipo cafetería consiste en ofrecer una variedad de alimentos para evaluar un patrón de preferencias (Abbott 1962; Lobo et al. 2009; Martell 1979). Elegimos *A. chilensis* porque es el único árbol nativo que crece y se regenera en este ecosistema de estepa. Esto nos permitió comparar las características de las semillas y la depredación de una especie nativa con una colección de especies no nativas. Obtuvimos las semillas de las diferentes especies en viveros comerciales o recolectando conos de las plantaciones de la Isla Victoria (Simberloff et al. 2002) (Tabla 1). Almacenamos las semillas a 5°C antes de los experimentos. Realizamos estos experimentos durante el pico de producción y dispersión de semillas de Pinaceae y *A. chilensis* en la Patagonia (mayo-junio de 2017, otoño austral) (Krugman y Jenkinson 2008). Utilizamos guantes descartables de látex para manipular las semillas con el fin de evitar que éstas tuvieran olor humano. Como la preferencia de las especies de depredadores de semillas podría verse influida por efectos asociativos (Holt y Kotler 1987), llevamos a cabo dos experimentos diferentes. En el primer experimento ("Palitos mono-especie"), se pegaron diez semillas de la misma especie a dos palitos de madera (dos conjuntos de cinco semillas) y se colocaron en orden aleatorio dentro de una parcela de 2 m² (un total de 34 palitos y

170 semillas por parcela). Con este diseño experimental tratamos de evitar la susceptibilidad asociativa entre especies, es decir, cuando la semilla de una especie atrae al depredador y éste continúa comiéndose el resto de las semillas sólo por proximidad, borrando todos los efectos de preferencia (Holt y Kotler 1987). En el segundo experimento ("Palitos multi-especies") se pegó una semilla de cada una de las 17 especies a uno de dos palitos en orden aleatorio y se colocó dentro de una parcela de 2 m² (20 palitos y 170 semillas por parcela). Con este diseño experimental, los depredadores pudieron encontrar todos los diferentes tipos de semillas y elegir entre ellas. Fijamos los palitos al suelo con estacas metálicas para evitar que los depredadores de semillas los removieran y pegamos las semillas a los palitos con un pegamento no tóxico y sin olor. Como las semillas se pegaban a un palito y no hay evidencia de dispersión secundaria de semillas por animales en este sistema, consideramos la remoción de las semillas como una prueba de la depredación de las semillas (Nuñez et al. 2008). Evaluamos la depredación de las semillas 1, 2, 8, 15 y 29 días después de instalar los experimentos. Además, monitoreamos las semillas usando cámaras trampa (Bushnell® Trophy Cam Infrarrojo) para registrar los depredadores de semillas tanto diurnos como nocturnos. Cada sistema de cámaras consistía en una cámara totalmente automática combinada con un detector de movimiento infrarrojo pasivo. Instalamos un total de 5 cámaras frente a los depósitos de semillas (es decir, el 25% de las parcelas fueron monitoreadas) y las colocamos a 1 m de las semillas.

Tabla 2.1: Especies incluidas en los experimentos y su peso de semilla, volumen de semilla, dureza de semilla, dureza específica de semilla, origen, estado invasivo a nivel mundial, estado invasivo en la región de estudio y superficie plantada en la región de estudio. En el caso de la conífera nativa no se define el estado invasivo porque nos centramos aquí en las coníferas invasivas no nativas. El estado invasivo en la región de estudio no está definido para las especies que no están plantadas a gran escala localmente porque no hay suficiente información sobre el comportamiento invasivo de estas especies localmente. Los datos de la superficie plantada a nivel regional se obtuvieron de un censo forestal regional (CIEFAP 2017). El desvío estándar se indica entre paréntesis. El asterisco (*) indica la conífera nativa.

Especie	Peso (mg)	Volumen (μL)	Dureza (N)	Dureza específica (N/mg)	Origen semilla	Estado invasivo (Global)	Estado invasivo (Región estudio)	Área plantada (Región estudio)
<i>Austrocedrus chilensis</i> *	3.5 (0.09)	5.4 (0.53)	4.4 (1.30)	1.26 (0.38)	Rodal nativo	-	-	-
<i>Pinus contorta</i>	7 (0.27)	8.4 (1.31)	11.3 (2.39)	1.61 (0.35)	Vivero comercial	Invasora	Invasora	4979
<i>Larix decidua</i>	8.4 (0.23)	12.1 (0.65)	33 (8.16)	3.93 (1.04)	Plantación forestal	Algo invasora	-	-
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	13.2 (0.22)	19.3 (1.16)	7.8 (3.42)	0.59 (0.25)	Vivero comercial	Invasora	Invasora	1309
<i>Pinus halepensis</i>	24.6 (1.13)	29 (1.63)	14.9 (4.08)	0.61 (0.16)	Vivero comercial	Invasora	-	-
<i>Pinus radiata</i>	30.1 (2.16)	30.9 (2.02)	26 (15.56)	0.86 (0.53)	Vivero comercial	Invasora	Invasora	1089
<i>Abies nobilis</i>	30.9 (1.28)	51 (1.79)	4.6 (3.23)	0.15 (0.10)	Plantación forestal	No invasora	-	-
<i>Pinus taeda</i>	33.1 (1.50)	32.6 (2.27)	18.7 (3.57)	0.56 (0.13)	Vivero comercial	No invasora	No invasora	103
<i>Abies concolor</i>	39.3 (2.24)	67 (2.28)	9.9 (8.57)	0.25 (0.21)	Plantación forestal	No invasora	-	-
<i>Pinus elliotii</i>	45.6 (1.64)	54.5 (2.42)	38.2 (11.01)	0.84 (0.23)	Vivero comercial	Invasora	-	-
<i>Pinus pinaster</i>	56.6 (2.14)	58 (4.83)	40.2 (17.53)	0.71 (0.31)	Vivero comercial	Invasora	-	-
<i>Pinus ponderosa</i>	59.6 (7.59)	73.5 (6.58)	54.8 (14.36)	0.92 (0.27)	Vivero comercial	Algo invasora	Algo invasora	98927
<i>Abies magnifica</i>	94.8 (5.54)	198 (8.37)	50.4 (11.50)	0.53 (0.12)	Plantación forestal	No invasora	-	-
<i>Pinus jeffreyi</i>	97.8 (2.61)	129.3 (6.13)	64.9 (11.36)	0.66 (0.12)	Vivero comercial	No invasora	No invasora	701
<i>Pinus canariensis</i>	138.2 (6.38)	159 (15.06)	69.2 (34.73)	0.50 (0.25)	Vivero comercial	Algo invasora	-	-
<i>Pinus cembro</i>	278.1 (9.02)	385 (17.16)	120.0 (21.18)	0.43 (0.08)	Plantación forestal	No invasora	-	-
<i>Pinus pinea</i>	1087.2 (74.56)	1083 (122.48)	337.5 (58.74)	0.31 (0.04)	Vivero comercial	Algo invasora	-	-

2.3.4 Atributos de semilla

2.3.4.1 Tamaño de semilla - Para evaluar la importancia del tamaño de la semilla en los patrones de depredación para las especies de coníferas seleccionadas, utilizamos dos atributos diferentes: el peso y el volumen de semilla. Con el objetivo de medir el peso promedio de semilla por especie, utilizamos una balanza de precisión para pesar diez muestras de 100 semillas. Para estimar el volumen medio de las semillas individuales, pusimos muestras de 100 semillas en tubos de ensayo de 10 mL (para las semillas más pequeñas) o muestras de 50 semillas en tubos de ensayo de 20 mL

(para las semillas más grandes) que contenían agua y medimos la variación del nivel de agua (Amin et al. 2004; Anandu et al. 2018; Dutta et al. 1988; Leopold 1983; Oje y Ugbor 1991). Las mediciones de volumen se realizaron en menos de 10 segundos para evitar que las semillas absorbieran agua (Amin et al. 2004). Se repitió este procedimiento diez veces para cada especie.

2.3.4.2 Dureza de semilla - Para medir la dureza de las semillas, comprimimos semillas individuales entre placas metálicas planas a una velocidad constante de 0,5 mm por minuto (Máquina universal de pruebas Instron 5567). Medimos la fuerza (Newtons) con una célula de carga que mide hasta 1000 N y usamos estos datos para evaluar el punto en el que cada semilla se rompió (punto de rotura). Repetimos este procedimiento diez veces para cada especie. Obtuvimos la dureza de la semilla (fuerza máxima) como la fuerza máxima ejercida sobre la semilla antes de que se rompiera. También obtuvimos la dureza específica de la semilla como la relación entre la dureza de semilla y el peso de semilla (Fricke y Wright 2016).

2.3.5 Análisis estadísticos

Para evaluar si la depredación de semillas seguía un patrón de preferencia según los atributos de la semilla, utilizamos modelos de regresión lineal generalizados (GLM). Calculamos la depredación de semillas como la proporción de semillas que se habían consumido en cada fecha de seguimiento (1, 2, 8, 15 y 29 días) (Orrock et al. 2015). Para determinar si el tipo de experimento ("Palitos mono-especie" vs. "Palitos multi-especie") tenía un efecto significativo en la depredación de semillas, utilizamos este factor como variable predictiva. Para evaluar el efecto de los atributos

de la semilla también incluimos como variables predictivas el peso, el volumen, la dureza y la dureza específica de la semilla. Incluimos la interacción entre el tipo de experimento y cada atributo de la semilla para evaluar si la relación entre la depredación de la semilla y los atributos de la semilla era diferente entre los dos tipos de experimentos. Repetimos los análisis descriptos anteriormente incluyendo sólo las especies de *Pinus* para evaluar los patrones de preferencia dentro de un solo género. Asumimos una distribución binomial, utilizando GLMs y la función de enlace logit. Analizamos cada fecha de monitoreo por separado. Nos interesaba comparar el poder de predicción de cada atributo de la semilla porque cada atributo tiene una importancia biológica diferente con respecto a la depredación de la semilla. A este respecto, evaluar estos atributos de la semilla sería una contribución novedosa e importante de nuestro estudio. Probamos los cuatro atributos de la semilla (peso de la semilla, volumen de la semilla, dureza de la semilla y dureza específica de la semilla) como factores independientes. Sin embargo, debido a que estaban altamente correlacionados (coeficientes de correlación de Spearman: peso de la semilla vs. volumen de la semilla = 0,98, peso de la semilla vs. dureza de la semilla = 0,87, volumen de la semilla vs. dureza de la semilla = 0,82) o una variable compuesta (dureza específica de la semilla) no incluimos diferentes atributos de la semilla en el mismo modelo, sino que construimos diferentes modelos de regresión para cada atributo (regresiones simples). Utilizamos una transformación logarítmica del peso de la semilla, el volumen de la semilla y la dureza de la semilla para aumentar la linealidad de las regresiones (James 2016). Utilizamos el análisis de la devianza para evaluar la cantidad de variación total explicada por cada una de las variables predictivas (pseudo r^2) (Nagelkerke 1991) utilizando el paquete "BabylorEdPsych" (Beaujean 2012). Para comparar la depredación de semillas entre las diferentes categorías de estado invasivo (Tabla 1) construimos modelos logísticos con el estado invasivo como variable categórica predictiva. Además, para comparar la depredación de semillas entre los diferentes géneros construimos

modelos logísticos con el género como una variable categórica predictiva. Para todos los análisis utilizamos el software estadístico R 3.4.0 (R Core Team 2018).

2.4 Resultados

Las especies de este estudio abarcaron una amplia gama de atributos de la semilla, con un peso medio de la semilla de cada especie que osciló entre 3.5 y 1087 mg, un volumen de la semilla de 5.4 a 1083 μl y una dureza de la semilla de 4.4 a 137.5 N (Tabla 2.1). Encontramos que la depredación de la semilla disminuye a medida que aumentan el peso y el volumen de la semilla (Figura 2.1 y Figura S2.1). Específicamente, la depredación de semillas fue mayor para las especies con las semillas más pequeñas (tanto en términos de peso como de volumen). Quince días después de establecer los experimentos, *Pinus contorta*, la especie de semilla más pequeña, fue consumida el doble que la especie con la semilla más grande, *Pinus pinea* (Figura 2.1). La depredación de las semillas tendió a disminuir con el aumento de la dureza de las semillas ($p = 0.060$ a los 8 días), pero esta relación no fue significativa. Además, la depredación de semillas aumentó con la dureza específica (cociente entre dureza de semilla y peso de semilla). La especie con la mayor dureza específica, *Larix decidua*, fue consumida 3 veces más que la especie con la menor dureza específica, *Abies nobilis*. El volumen de la semilla fue el atributo de la semilla que mejor predijo la depredación de semillas (mayor R^2 ; Figura 2.1). Las tres especies de *Abies* son la excepción a este patrón, ya que fueron depredadas mucho menos que otras especies de similar peso y volumen (Figura 2.1 y Figura S2.1). La especie nativa, *Austrocedrus chilensis*, fue consumida al mismo nivel que otras especies (no nativas) con semilla de similar peso y volumen. La relación entre la depredación de semillas y los atributos de las semillas fue más fuerte a los 8 y 15 de comenzado el experimento, probablemente porque en las fechas 1 y 2 la depredación era todavía

muy baja (8.85%), mientras que en la fecha 29 la depredación de semillas ya era demasiado alta (87.24%), por lo que algunas especies ya habían sido completamente depredadas (Tabla S2.1).

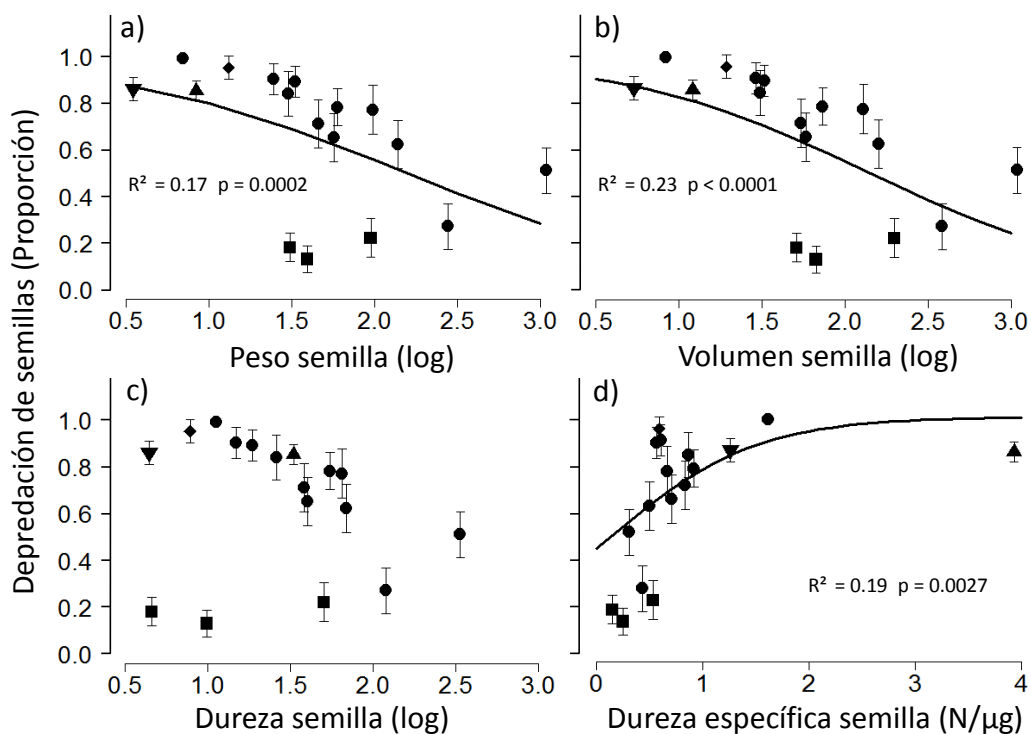


Figura 2.1: Regresión logística entre la depredación de semillas y a) el peso de la semilla, b) el volumen de la semilla, c) la dureza de la semilla y d) la dureza específica de la semilla para el diseño experimental "Palitos mono-especie" a los 15 días de la instalación del experimento. Cada género se indica con una forma diferente: *Pinus* (círculo ●), *Pseudotsuga* (diamante ◆), *Abies* (cuadrado ■), *Larix* (triángulo ▲), *Austrocedrus* (triángulo invertido ▼). Los puntos indican valores medios y la medida de la variabilidad es el error estándar. Las líneas de regresión, los valores de R^2 y p sólo se muestran para las regresiones significativas ($p < 0.05$)

El patrón de preferencia de depredación de semillas fue el mismo entre los dos tipos de experimentos ("Palitos mono-especie" vs. "Palitos multi-especie"). Elegimos mostrar sólo los resultados del diseño experimental de "Palitos mono-especie" (Figura 2.1) porque es menos susceptible a los efectos asociativos, que podrían confundir el patrón de preferencia de los depredadores de semillas. Los resultados del otro diseño experimental ("Palitos multi-especie"), que no difieren de los mostrados aquí, están disponibles en el Material Suplementario (Tabla

S2.1). No encontramos un efecto significativo del tipo de experimento en la depredación de las semillas para ninguna fecha ni ningún atributo de las semillas, excepto la dureza específica de las semillas en la fecha 15 (Tabla S2.2). Además, la relación entre la depredación de semillas y los atributos de la semilla es la misma para ambos experimentos, excepto por la dureza específica de las semillas en las fechas 8 y 15 (Tabla S2.1). Esto significa que, en casi todos los casos, el patrón de preferencia de semillas se mantuvo constante, ya sea que todas las especies se agruparan en un solo palito o se separaran en palitos diferentes. En las fechas 8, 15 y 29 del experimento la depredación de semillas fue mayor para las especies "invasoras" que para las especies "algo invasoras" ($p < 0.005$; Figura 2.2 y Tabla S2.3). En las mismas fechas la depredación de semillas fue mayor para las especies "algo invasoras" que para las especies "no invasoras" ($p < 0.005$; Figura 2.2 y Tabla S2.3). Además, la depredación de semillas fue significativamente menor para las especies de *Abies* que para las especies pertenecientes a cualquier otro género en las fechas 8, 15 y 29 ($p < 0.005$; Figura 2.3 y Tabla S2.4). Las cámaras trampa registraron sólo pequeños mamíferos consumiendo semillas. No se detectaron aves comiendo semillas. En nuestros videos, fue posible identificar a los roedores nativos *Oligoryzomys longicaudatus* y *Eligmodontia morgani* como los principales consumidores de semillas.

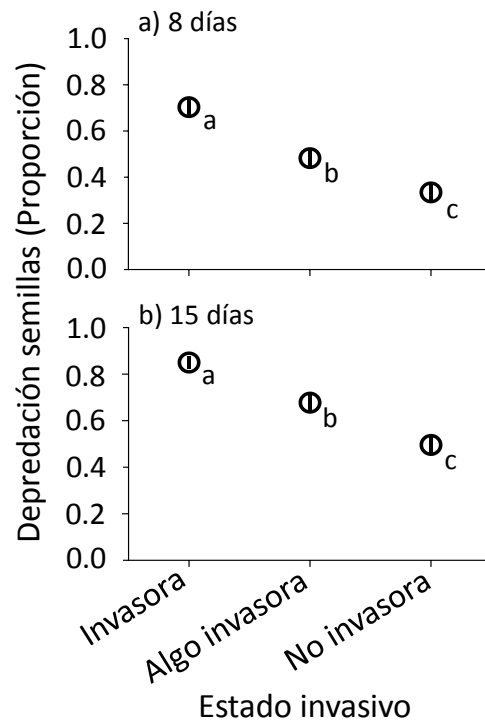


Figura 2.2: Depredación de semillas a) 8 y b) 15 días después de la instalación del experimento para diferentes estados invasivos de las especies incluidas: "invasora", "algo invasora" y "no invasora". Los puntos indican los valores medios y la medida de la variabilidad es el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estados invasivos.

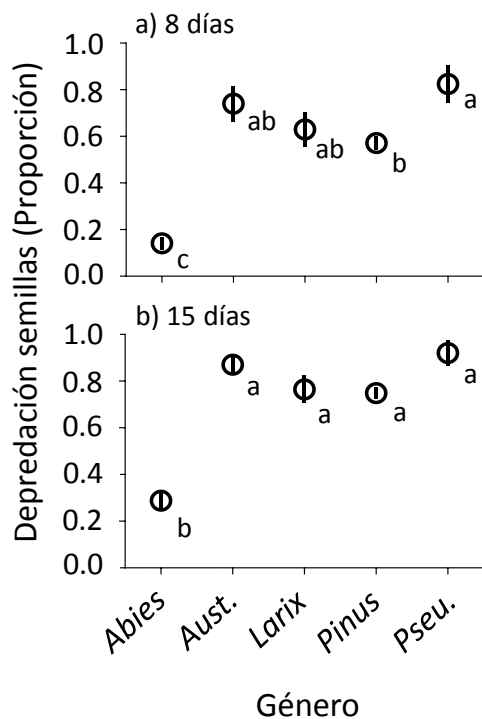


Figura 2.3: Depredación de semillas a) 8 y b) 15 días después de la instalación del experimento para los diferentes géneros incluidos: *Abies*, *Austrocedrus*, *Larix*, *Pinus* y *Pseudotsuga*. Los puntos indican valores promedio y la medida de variabilidad es el error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los géneros.

Quando sólo incluimos las especies de *Pinus* en los análisis, los resultados fueron muy similares en cada fecha de monitoreo (Tabla S2.1). La depredación de semillas disminuyó a medida que el peso, el volumen y la dureza de las semillas aumentaron. Además, la depredación de semillas aumentó a medida que la dureza específica de las semillas aumentó. Una diferencia es que cuando sólo se consideran las especies de *Pinus*, la relación entre la depredación de semillas y la dureza de las mismas se vuelve significativa. Otra diferencia es que el peso, el volumen y la dureza de la semilla tienen un poder de predicción muy similar cuando sólo se consideran las especies de *Pinus* (Tabla S2.1). El patrón de preferencia de depredación de semillas fue el mismo entre los dos tipos de experimentos, con muy pocas excepciones (Tabla S2.2).

2.5 Discusión

Contrario a nuestras predicciones, nuestros resultados muestran que la depredación de semillas no limita el éxito de la invasión de Pinaceae en la Patagonia. Los depredadores de semillas prefieren depredar semillas pequeñas (peso y volumen de semilla), que tienden a ser de las especies más invasoras (Rejmánek y Richardson 1996). Además, la depredación de semillas fue mayor para las especies clasificadas como invasoras según los registros mundiales de invasión (Essi et al. 2010). Además, las especies con mayor dureza específica de semilla también tienden a ser preferidas por los consumidores de semillas. Entre los atributos de la semilla evaluados en este estudio el volumen de la semilla es el que mejor explica la preferencia de los depredadores de semillas, mientras que la dureza de semilla fue un mal predictor de la preferencia cuando consideramos a las coníferas en su conjunto.

El volumen de la semilla fue el mejor predictor de la preferencia de los depredadores de semillas, incluso cuando la mayoría de los estudios se centran en el peso de la semilla como indicador de la preferencia de los depredadores. La teoría predice que los depredadores eligen entre semillas con diferente peso de semilla dependiendo de la cantidad de nutrientes y energía que se puede obtener de una sola semilla (Blate et al. 1998; Hoffmann et al. 1995; MacArthur y Pianka 1966; Wang et al. 2014). En este contexto, se espera un mayor consumo de semillas más pesadas. De hecho, las semillas de las especies de Pinaceae varían ampliamente en cuanto a su contenido de nutrientes y calorías (Grodzinski y Sawicka-Kapusta 1970; Long 1934), que es el beneficio que perciben los consumidores de semillas. Sin embargo, contrario a nuestras expectativas, los depredadores de semillas prefirieron las semillas de menor peso, lo que significa un menor beneficio por semilla. Una posible explicación de este patrón es que el peso de tejido

defensivo de la semilla aumenta con el peso de la semilla (Moles et al. 2003). Además, el peso de la semilla puede correlacionar con otros atributos de la semilla que tienen una mayor influencia en el comportamiento selectivo de los depredadores de la semilla. Por ejemplo, el peso de la semilla está positivamente correlacionada con el volumen de la semilla para las especies incluidas en nuestro estudio (coeficiente de correlación de Spearman = 0.98). Contrario a nuestras predicciones, los depredadores de semillas prefirieron especies con menor volumen de semillas. Una posible explicación es que el tamaño de sus aparatos bucales limita las opciones de dieta de los depredadores de semillas en este sistema (Rey et al. 1997; Wheelwright 1985; Wheelwright 1993; Zhang y Zhang 2008). Si la comunidad de depredadores de semillas estaba compuesta por muchas especies diferentes, como en nuestra región de estudio (Pardiñas y Teta 2013; Pearson 1995; Pearson 1983), entonces podemos esperar alguna variación en el tamaño de sus partes bucales y algunas especies probablemente tendrán bocas demasiado pequeñas para comer semillas muy grandes. El consumo de semillas para las especies de semillas más grandes, *Pinus pinea* y *P. cembro*, fue de aproximadamente el 60% al final del experimento. Esto muestra que al menos algunas especies de depredadores de semillas fueron capaces de consumir las semillas de estas especies, pero es probable que muchos otros sólo pudieron comer semillas más pequeñas. Los modelos que incluyen el volumen de semillas fueron los de mayor poder predictivo (Figura 2.1 y Tabla S2.1), lo que sugiere que este atributo (que explica hasta el 23% de la depredación de las semillas) es un mejor predictor de la preferencia de los depredadores que el peso de semilla (que explica hasta el 17% de la depredación de las semillas), el atributo de la semilla que se estudia habitualmente (Brewer 2001; Connolly et al. 2014; Gómez 2004; Jansen et al. 2002; Nuñez et al. 2008; Pearson et al. 2011; Wang y Ives 2017).

La dureza de las semillas resultó un mal predictor de la preferencia semillas. Este resultado muestra que la dureza de las semillas puede tener una importancia secundaria como atributo que

explica la depredación de las semillas. Aunque Fricke y Wright (2016) argumentan que comer semillas más duras requeriría más energía, reduciendo el beneficio neto para el depredador, no encontramos pruebas concluyentes que la dureza de las semillas por sí sola genere la preferencia de los depredadores de semillas para las especies incluidas en nuestro estudio. En este sentido, la dureza de la semilla no fue un fuerte impulsor por sí mismo, pero relacionado al peso de la semilla (dureza específica de la semilla) encontramos un aumento en la influencia de este atributo en la depredación de semillas. Los depredadores prefirieron las semillas con una mayor dureza específica. A este respecto, Fricke y Wright (2016) encontraron que la alta dureza específica es una ventaja de las semillas pequeñas porque se requiere más energía por gramo para romperlas y esta defensa mecánica no implica una inversión adicional. Sin embargo, nuestros resultados proporcionan pruebas que una mayor dureza específica puede no aportar ninguna ventaja a las semillas pequeñas, lo que pone en duda la importancia de ese atributo. Aunque algunos estudios sólo han examinado el peso de la semilla (Brewer 2001; Connolly et al. 2014; Gómez 2004; Jansen et al. 2002; Nuñez et al. 2008; Pearson et al. 2011; Wang y Ives 2017; pero véase Moles et al. 2003), nuestra evaluación de diferentes atributos de la semilla nos permitió encontrar diferentes explicaciones alternativas de por qué se prefieren algunas especies a otras. Además, en el caso de la dureza de la semilla y la dureza específica, la evaluación de diferentes atributos de la semilla nos permitió probar la hipótesis sobre los patrones de preferencia de las semillas propuesta por Fricke y Wright (2016).

Considerar las diferencias entre los géneros puede ayudar a entender la depredación de las semillas dentro de la familia Pinaceae. Por un lado, las tres especies de *Abies* sufrieron niveles muy bajos de depredación (Figura 2.3), y no caen dentro de los patrones de preferencia ni del peso ni del volumen de la semilla (Figura 2.1 y Figura S2.1). Al igual que en estudios anteriores, las semillas de *Abies* fueron menos preferidas por los mamíferos pequeños en comparación con otras

especies de Pinaceae (Abbott 1962; Di Pierro et al. 2011; Lobo et al. 2009; Rubino et al. 2012). Este patrón podría explicarse por los altos niveles de compuestos secundarios que se encuentran en las semillas de *Abies*, por ejemplo, terpenos como el limoneno (Bucyanayandi et al. 1990; Ibrahim et al. 2011; Rubino et al. 2012). Lobo et al. (2009) incluso sugirieron que la depredación de las semillas después de la dispersión no afectaría a la regeneración de las especies de *Abies* porque los depredadores de semillas las evitan. Estos resultados sobre *Abies* ponen de relieve el hecho que la selección de semillas por parte de los depredadores no puede entenderse simplemente por variables como el tamaño de las semillas, incluso cuando se trabaja dentro de una familia de plantas. Por otra parte, cuando se consideran sólo las especies de *Pinus*, la depredación de las semillas se predijo bastante bien ya sea por el peso, el volumen o la dureza de la semilla. El hecho que la dureza de la semilla se convirtiera en un buen predictor de la depredación de la semilla se debe probablemente a la ausencia de las especies de *Abies* en este conjunto de datos. El considerar un solo género mejoró nuestra capacidad de predecir la depredación de las semillas (Tabla S2.1) pero también podría limitar la posibilidad de predecir la depredación de las semillas para otros taxones invasores (por ejemplo, usar la dureza de las semillas como predictor de la depredación de las semillas para las especies de *Abies* podría ser inadecuado). Por otra parte, las semillas de la especie nativa, *Austrocedrus chilensis*, a pesar de pertenecer a una familia de plantas diferente, se consumían tanto como las semillas de las especies de Pinaceae de similar peso, volumen y dureza de semilla comparables. En este sentido, la preferencia de depredación de semillas no era diferente entre esta especie nativa y las especies de coníferas no nativas. Es posible que los depredadores de semillas en este sistema seleccionen su alimento en función de propiedades físicas (peso, volumen, dureza) o químicas (compuestos secundarios), pero no estén particularmente adaptados al consumo de semillas de plantas nativas.

El patrón de preferencia de las semillas no fue modificado por el tipo de experimento. Los efectos asociativos pueden tener diferente magnitud según el recurso, los depredadores y la escala considerada (Barbosa et al. 2009; Emerson et al. 2012; Ostoja et al. 2013a; Ostoja et al. 2013b). En estudios anteriores se han encontrado pruebas de resistencia asociativa (Hay 1986; Holt 1977; Ostoja et al. 2013a; Ostoja et al. 2013b; Pfister y Hay 1988; Tahvanainen y Root 1972), proceso por el cual la depredación de semillas de una especie disminuye con la presencia de semillas de otras especies. Otros han encontrado pruebas del proceso opuesto, la susceptibilidad asociativa (Emerson et al. 2012; Hjalten et al. 1993; Holt y Kotler 1987). Nuestros resultados muestran que ninguno de estos procesos ocurre en este sistema. La falta de susceptibilidad asociativa en nuestro sistema puede explicarse por la incapacidad de los depredadores para consumir semillas grandes, incluso en la proximidad de las semillas más preferidas (Rey et al. 1997; Wheelwright 1985; Wheelwright 1993; Zhang y Zhang 2008). En conjunto, nuestros resultados sugieren que ambas metodologías ("Palitos mono-especie" y "Palitos multi-especie") son apropiadas para examinar la depredación selectiva de semillas en nuestro sistema.

El marcado patrón de preferencia de semillas que encontramos en este estudio sugiere que existe un filtro selectivo para el establecimiento de especies no nativas. Según este patrón, las especies con semillas pequeñas (bajo peso y volumen) son preferidas por los mamíferos pequeños en este sistema y su reclutamiento podría verse limitado por la depredación. Es interesante que la mayoría de los trabajos sobre características invasoras han encontrado pruebas de que las especies con semillas más pequeñas tienden a ser más invasoras (Grotkopp et al. 2002; Hamilton et al. 2005; Moodley et al. 2013; Rejmánek y Richardson 1996). Además, las especies clasificadas como invasoras según los registros históricos de invasión son preferidas por los depredadores de semillas (Figura 2.2). La aparente contradicción entre el estado invasivo de las especies y nuestros resultados podría indicar que hay otros mecanismos detrás del potencial invasor de las especies

con semillas pequeñas, como la fecundidad natural (es decir, las semillas producidas por árbol por año) (van Kleunen et al. 2010), incluso hasta el punto que los depredadores nativos pueden saciarse, y la disponibilidad de semillas es más que suficiente para el reclutamiento. El alto nivel de consumo de semillas que encontramos aquí (aproximadamente el 90%) pone de relieve la importancia del número de semillas como estrategia para escapar de la depredación. Para las especies con mayor fecundidad hay una mayor probabilidad de que al menos una pequeña proporción de semillas no sean depredadas, por lo que el establecimiento será más probable para estas especies. Podría ser que nuestro diseño experimental no haya captado el diferente grado de disponibilidad de semillas de diferentes tamaños, sobreestimando la disponibilidad de semillas pequeñas que naturalmente tenderían a ser enterradas rápidamente en el suelo (donde el acceso sería más difícil para los consumidores). Otra posibilidad es que hemos subestimado otras fuentes de depredación de las semillas, como las aves y los insectos. Sin embargo, la importancia de los pequeños mamíferos en la depredación de semillas de Pinaceae está en consonancia con un estudio anterior realizado en la misma región (Nuñez et al. 2008). Se ha informado que los invertebrados son importantes consumidores de semillas en este sistema, pero para semillas mucho más pequeñas (siendo las semillas más pesadas 100 veces más livianas que las semillas más pesadas en nuestro estudio) (Pirk y Lopez de Casenave 2017).

El efecto de la depredación de las semillas en el reclutamiento de plantas podría ser compensado mediante diferentes mecanismos (Crawley 2000; Garren y Strauss 2009; Ortega et al. 2012; Swope y Parker 2010). Por ejemplo, el reclutamiento puede estar limitado por el micrositio, en lugar de estar limitado por la disponibilidad de semillas (Louda 1983). Además, una alta mortalidad denso-dependiente de las plántulas puede reducir los efectos de la depredación de las semillas (Crawley 1997). Por último, cuando crecen en altas densidades, las plantas adultas tienden a crecer menos y a producir menos semillas (Wood y Andersen 1990). En este sentido, el

efecto de la depredación de las semillas a nivel de la población puede no ser lo suficientemente fuerte como para explicar el comportamiento invasivo de las diferentes especies de plantas. Por otro lado, el acopio de semillas por roedores podría resultar en dispersión secundaria de semillas de Pinaceae, pero hasta ahora no se ha encontrado evidencia de dispersión secundaria de semillas de dichas especies en esta región (Nuñez et al. 2008, Chiuffo et al. 2018).

En conclusión, encontramos que la depredación de semillas no es un mecanismo que ayude a explicar el éxito de las especies invasoras de Pinaceae (o *Pinus*). Las especies que tienen semillas más pequeñas (peso y volumen de la semilla), y que son altamente invasoras en todo el mundo, son más consumidas por los depredadores de semillas. Además, el peso de la semilla, el atributo de la semilla en el que se centran la mayoría de los estudios (Brewer 2001; Connolly et al. 2014; Gómez 2004; Jansen et al. 2002; Nuñez et al. 2008; Pearson et al. 2011; Wang y Ives 2017) no fue el mejor predictor de la preferencia de los depredadores de semillas, cuando consideramos las coníferas en su conjunto. Considerando otros atributos de la semilla, como el volumen de la semilla, mejoró nuestra capacidad de predecir la depredación de semillas. La dureza de la semilla resultó ser un mal predictor de la depredación de semillas de Pinaceae, pero casi tan bueno como el peso o el volumen de la semilla de *Pinus*. En conjunto, este estudio ayuda a entender los mecanismos detrás del establecimiento de plantas no nativas en la estepa patagónica.

Capítulo 3: La interacción entre presión de propágulos, depredación de semillas y hongos ectomicorrícicos en la invasión de plantas

La sección que sigue es una versión levemente modificada de un artículo publicado en Neobiota:

Moyano J, Chiuffo MC, Policelli N, Nuñez MA, Rodriguez-Cabal MA (2019) The interplay between propagule pressure, seed predation and ectomycorrhizal fungi in plant invasion. *Neobiota* 42: 45-58

El uso de “nosotros” en este capítulo se refiere y mis co-autores y yo. Como primer autor yo era responsable de este artículo.

3.1 Resumen

Hay muchas hipótesis que pretenden explicar el éxito de las invasiones biológicas, pero la evaluación de hipótesis aisladas puede limitar nuestro entendimiento del proceso de invasión. Aquí evaluamos la interacción entre la presión de propágulos, la depredación de semillas y la disponibilidad de mutualistas en el éxito de la invasión de una especie de pino, *Pinus ponderosa*. Evaluamos los efectos independientes e interactivos de la presión de propágulos y la depredación de las semillas a distancias crecientes desde una plantación de *P. ponderosa*. Además, debido a que los pinos son mutualistas obligados con hongos ectomicorrícicos (EM) y las invasiones de pinos fallan en ausencia de sus simbiosomas EM, evaluamos la disponibilidad de hongos EM a través de un bioensayo de cámara de crecimiento. En este bioensayo medimos la colonización de las raíces por los hongos EM con muestras de suelo recogidas a diferentes distancias de la plantación. Encontramos que la presión de los propágulos supera la depredación de las semillas sólo en el límite de la plantación de pinos, mientras que la depredación de semillas supera la presión de los propágulos a 25 m y a mayores distancias de la plantación. También encontramos que la colonización de las raíces por EM disminuye con la distancia desde la plantación. Sin embargo, hasta 200 m desde la plantación se colonizaron las raíces de los pinos, lo que sugiere que los hongos EM pueden no ser limitantes para la invasión a la escala de este experimento. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la depredación de las semillas puede estar limitando la invasión de *P. ponderosa* en la región de estudio, ya que la presión de propágulos sólo supera la depredación de las semillas en el límite de la plantación. Aquí proporcionamos pruebas de cómo una fuerte resistencia biótica puede suprimir una invasión, independientemente de la variación en la presión de propágulos y la disponibilidad de mutualistas.

3.2 Introducción

Durante décadas los ecólogos han tratado de explicar por qué algunas poblaciones de especies introducidas se convierten en invasoras mientras que otras no (Elton 1958; Lockwood et al. 2013). Existen numerosas hipótesis que tratan de explicar los mecanismos que subyacen a las invasiones biológicas (Catford et al. 2009). La hipótesis de la presión de propágulos postula que el aumento del número de individuos liberados en una región en la que no son nativos aumenta la probabilidad de éxito de la invasión (Lockwood et al. 2005). Esta hipótesis parece estar más respaldada por pruebas empíricas que la mayoría de las demás hipótesis propuestas en la biología de las invasiones (Blackburn et al. 2015; Lamarque et al. 2011; Simberloff 2009) y, por lo tanto, puede ser la hipótesis con más consenso (Jeschke 2014). Otra hipótesis importante es la hipótesis de la resistencia biótica (Elton 1958), que establece que los competidores, depredadores, herbívoros y patógenos de la comunidad residente reducen la probabilidad de invasión (Levine et al. 2004). La depredación de semillas es uno de los principales filtros para el establecimiento de plantas (Hulme 1994; Janzen 1969; Larios et al. 2017) y, por consiguiente, una importante barrera a las invasiones de plantas (Connolly et al. 2014; Nuñez et al. 2008; Pearson et al. 2011). Los estudios sobre la interacción entre la presión de los propágulos y la resistencia biótica determinaron que la influencia de la presión de los propágulos en el éxito de la invasión es más importante para los altos niveles de resistencia biótica (Jones et al. 2017; von Holle y Simberloff 2005).

Junto con la resistencia biótica y la presión de propágulos, la ausencia de mutualistas es una de las limitaciones más importantes para la invasión de plantas no nativas (Dickie et al. 2017;

Traveset y Richardson 2014). Más de un tercio de las plantas leñosas invasoras forman interacciones mutualistas con simbiontes micorrícicos, más de dos tercios forman interacciones con dispersores de semillas y la gran mayoría son polinizadas por animales (Traveset y Richardson 2014). Si una planta posee un mutualismo obligado, la ausencia de los mutualistas en la región donde la planta es introducida actuará como un fuerte filtro para el éxito de la invasión (Dickie et al. 2017; Traveset y Richardson 2014). Aunque se reconoce la importancia de los diferentes mecanismos en los procesos de invasión, la mayoría de los estudios sobre invasiones biológicas se centran en una única hipótesis sin considerar la posible interacción entre los diferentes mecanismos. En consecuencia, no se comprende cómo interactúan los diferentes procesos para determinar el éxito o el fracaso de la invasión (Pearson et al. 2018).

Los pinos son un sistema ideal para estudiar el papel de la presión de propágulos, la depredación de semillas y la ausencia de mutualistas en su éxito de invasión. El papel de la presión de propágulos puede estudiarse fácilmente porque los pinos producen un gran número de semillas que tienen dispersión anemófila (viento) cubriendo grandes distancias, aunque la mayor proporción cae cerca de la planta parental, creando un gradiente de presión de los propágulos (Nathan et al. 2011). El papel de la resistencia biótica, a través de la depredación de semillas, puede evaluarse fácilmente ya que las semillas de los pinos no nativos son muy consumidas por los depredadores de semillas generalistas nativos (Chiuffo et al. 2018; Nuñez et al. 2008). Además, los pinos forman un mutualismo obligado con hongos ectomicorrícicos (EM) (Koele et al. 2012) y la invasión de pinos fracasa en ausencia de sus simbiontes EM (Nuñez et al. 2009), por lo que el efecto de la ausencia de mutualismos puede evaluarse directamente. Además, los hongos EM se dispersan desde la fuente de la invasión, creando un gradiente de abundancia decreciente de simbiontes fúngicos (Collier y Bidartondo 2009; Hayward et al. 2015; Horton 2017).

El objetivo de este estudio fue probar la importancia relativa de tres mecanismos (presión de propágulos, depredación de semillas y ausencia de mutualistas) en la invasión de *Pinus ponderosa* en el norte de la Patagonia argentina. Aquí, evaluamos la depredación de semillas en un gradiente de disponibilidad de semillas que asemeja al patrón natural de dispersión de semillas a diferentes distancias de una plantación de *P. ponderosa*. Además, para comprobar si la ausencia de mutualistas del suelo altamente co-evolucionados podría explicar el fracaso de la invasión de pinos, realizamos un bioensayo en cámara de crecimiento con inóculo de suelo obtenido a diferentes distancias cada vez mayores de la plantación de pinos. Específicamente, hicimos la siguiente pregunta: ¿qué es más importante para determinar el éxito de la invasión de *P. ponderosa*, la presión de propágulos, la depredación de las semillas, la disponibilidad de simbiontes EM o la interacción entre estos mecanismos? La evaluación de la importancia relativa de los diferentes mecanismos de invasión es clave para identificar las causas de las invasiones de plantas. Además, la evaluación de la interacción entre los diferentes mecanismos ayuda a comprender cómo interactúan los diferentes procesos para determinar el éxito o el fracaso de la invasión (Pearson et al. 2018).

3.3 Metodología

3.3.1 Sitio de estudio

Desarrollamos este experimento en un ecosistema de estepa en el norte de la Patagonia (40° 59' 53" S; 71° 05' 13" O) porque este tipo de ecosistemas se encuentra entre los más frecuentemente invadidos por pinos no nativos (Richardson et al. 1994). En la Patagonia, grandes zonas de estepa

han sido sustituidas por plantaciones de pino durante las últimas décadas (CIEFAP 2017), y esas plantaciones ahora son fuente de semillas para las invasiones. *P. ponderosa* es la especie más plantada en la región, cubriendo más del 90% de la superficie forestal (CIEFAP 2017). Sin embargo, *P. ponderosa* sólo es raramente invasora en esta región (Sarasola et al. 2006). La depredación de semillas post-dispersión de pinos en este sistema es llevada a cabo en gran medida por los roedores nativos *Oligoryzomys longicaudatus* y *Eligmodontia morgani* (Chiuffo et al. 2018). No hay evidencia de dispersión secundaria de semillas de *P. ponderosa* por parte de los animales de la región de estudio (Chiuffo et al. 2018; Nuñez et al. 2008). En el sitio de estudio, la precipitación media anual es de 580 mm, concentrada durante el otoño y el invierno (marzo-septiembre), y la temperatura media anual es de 8,6° C (estación meteorológica de la estancia San Ramón). La cobertura vegetal es de aproximadamente el 60%, siendo *Pappostipa speciosa* y *Festuca pallescens* las especies vegetales dominantes (Anchorena y Cingolani 2002). La plantación de *P. ponderosa* estudiada tiene una edad aproximada de 40 años, cubre una superficie cercana a las 15 ha y tiene una densidad de aprox. 300 individuos/ha. El ambiente aledaño a la plantación es un pastizal de estepa en buenas condiciones generales, sin ningún uso productivo (además del forestal) desde la instalación de la mencionada plantación de *P. ponderosa*.

3.3.2 Presión de propágulos vs. depredación de semillas

Para evaluar los efectos de la presión de propágulos y la depredación de semillas en la supervivencia de las mismas, colocamos 18 transectas cada 50 metros orientadas según la dirección de los vientos predominantes (paralelas entre sí) y perpendiculares a una plantación de *P. ponderosa*. En cada transecta, instalamos parcelas a 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 m desde el

límite de la plantación. La distancia máxima de muestreo fue definida según la máxima distancia de invasión de pinos en sitios similares. Para separar los efectos de la distancia de la plantación y la disponibilidad de semillas, utilizamos dos diseños experimentales diferentes con diferentes densidades de semillas (variables y fijas). En el experimento de "Densidad variable" simulamos la dispersión natural de las semillas en nueve transectas. El propósito del experimento de "Densidad variable" es evaluar la proporción de la dispersión de semillas que es consumida por los depredadores de semillas a diferentes distancias de la plantación de pinos. Dado que no se dispone de datos sobre la producción y la dispersión de semillas en nuestro lugar de estudio, obtuvimos datos de la bibliografía. Para ello nos basamos en datos de 7 estudios, cubriendo 18 sitios a lo largo del rango nativo de *P. ponderosa* (lo cual incluye una gran variedad de ambientes) en rodales de entre 30 y 90 años de edad, cubriendo un período de medición de entre 3 y 24 años para cada sitio (Barrett et al. 1979; Krannitz y Duralia 2004). Concretamente, utilizamos datos sobre el porcentaje de semillas que alcanzan diferentes distancias desde el borde de una plantación de *P. ponderosa* y construimos el modelo de regresión que mejor describiera la variación de la dispersión de semillas con la distancia de la plantación. Para ajustar este modelo de dispersión utilizamos una función exponencial negativa la cual es apropiada para describir la dispersión de semillas por viento (Clark et al. 2005; Lustenhouwer et al. 2017). Basándonos en este modelo de dispersión colocamos 100, 50, 30, 16, 10, 6 y 2 semillas por m² a 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 m de la plantación respectivamente (Figura 3.1). En el experimento "Densidad fija" colocamos 20 semillas por m² a 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 m de la plantación en cada una de las nueve transectas. Elegimos poner 20 semillas por m² porque representa un valor intermedio entre la media (30 semillas/m²) y la mediana (16 semillas/m²) de la lluvia de semillas en todos los niveles de distancia. El propósito del experimento "Densidad fija" es evaluar el efecto de la distancia desde la plantación de pinos sobre la depredación de semillas. Pegamos las semillas a palitos de

helado con un adhesivo sin olor no tóxico y fijamos los palitos al suelo con estacas para evitar que los depredadores de semillas se los llevaran. Usamos guantes de látex descartables para manipular las semillas con el fin de evitar que éstas tengan olor humano. Consideramos que la remoción de las semillas era una prueba de depredación de las semillas (Chiuffo et al. 2018; Nuñez et al. 2008). En total, colocamos 2013 semillas y 1473 palitos. Realizamos este estudio durante el otoño (mayo 2017) que es el período en que las semillas de pino están disponibles de forma natural (Krugman y Jenkinson 2008) y en el que la abundancia de roedores tiende a alcanzar su máximo nivel (Guthmann et al. 1997). Evaluamos la remoción de las semillas 30 días después de instalar el experimento.

3.3.3 Ausencia de mutualistas

Para comprobar si la ausencia de hongos EM está limitando la invasión de *P. ponderosa*, realizamos un bioensayo en cámara de crecimiento. Recogimos $\sim 100 \text{ cm}^3$ de suelo de cada una de las siete distancias (0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 m) de la plantación en cada una de las nueve transectas de "Densidad variable" utilizados para el experimento de campo. Los suelos se recogieron a finales del otoño de 2017, justo después del pico de la temporada de fructificación de los hongos. Se excavaron muestras de suelo de cada sitio utilizando una cuchara esterilizada con etanol, colocadas en sobres de monedas, y se almacenaron a 4°C para ser utilizadas al día siguiente después de la recolección. Quitamos pequeñas rocas y raíces gruesas y usamos estos suelos para inocular nuestros tratamientos. Como sustrato para todas las macetas (inoculadas y controles) utilizamos una mezcla de tierra y arena a 50:50 que había sido esterilizada en autoclave dos veces (Wolf y Skipper 1994). Para los tratamientos distribuimos al azar los suelos de diferentes

distancias con el fin de inocular las macetas de 12 cm de profundidad en bandejas de plástico esterilizadas con etanol. Para detectar la inoculación inadvertida de hongos EM en la cámara de crecimiento, localizamos al azar 12 macetas llenas sólo con la mezcla de tierra y arena esterilizada. Utilizamos un total de 75 macetas (nueve por cada una de siete distancias y 12 estériles) distribuidas aleatoriamente en cinco bandejas que se rotaban una vez a la semana dentro de la cámara de crecimiento para evitar los efectos de la heterogeneidad micro ambiental de luz y temperatura dentro de la cámara. En cada maceta sembramos cuatro semillas de *P. ponderosa*. Las semillas de *P. ponderosa* las obtuvimos en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA - Estación Experimental del Bolsón). Realizamos un tratamiento de pre-germinación en agua fría durante 48 horas. Las semillas flotantes (semillas vanas) fueron descartadas y el resto se almacenaron a 2-5 °C durante tres semanas (Krugman y Jenkinson 2008). Antes de ser sembradas, esterilizamos las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Durante el experimento se añadió agua ad libitum, y no se añadieron nutrientes a las macetas. La luz y la temperatura se mantuvieron constantes. Utilizamos un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura fue de 25 °C durante los períodos de luz y de 10 °C durante los períodos de oscuridad. Sólo se dejó en la maceta la primera planta que emergió, el resto se cortó a nivel del suelo evitando la alteración del mismo. Durante el período de crecimiento se registró la supervivencia (número de plántulas vivas/total de plántulas) para cada distancia y para los controles estériles. Después de seis meses del inicio del experimento cosechamos las plantas. Medimos la altura del brote. Enjuagamos cuidadosamente las plántulas limpias de tierra adherida, las separamos en componente aéreo y raíces, y las colocamos en un sobre para ser secadas en un horno a 65°C durante 2 días. Medimos la biomasa de las fracciones de componente aéreo y raíz, secas, por separado utilizando una balanza electrónica con una precisión de 0,0001 g. Antes del secado, examinamos cuidadosamente el sistema de raíces de cada plántula de *P. ponderosa* bajo

un microscopio de disección para determinar el grado de colonización ectomicorrícica (basado en características morfológicas). Se colocaron las raíces en una placa de petri y se registró el número de puntas de raíces finas colonizadas y no colonizadas por hongos ectomicorrícicos.

3.3.4 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de las diferentes variables predictivas sobre la depredación de las semillas, utilizamos regresiones logísticas. Calculamos la depredación de semillas, la variable respuesta, como la proporción de semillas que se habían consumido (Orrock et al. 2015). Para determinar si la distancia de la plantación y el tipo de transecta tenían un efecto significativo sobre la depredación de semillas, los consideramos como factores fijos. Debido a que nuestro diseño experimental incluía unidades experimentales anidadas en transectas, utilizamos la "transecta" como factor aleatorio (Bolker et al. 2009). Para evaluar si la relación entre la depredación de semillas y la distancia a la plantación difería entre las transectas de "Densidad fija" y las transectas de "Densidad variable", incluimos en nuestros modelos la interacción entre las variables "distancia" y "tipo de transecta". Para comparar la depredación de semillas entre diferentes niveles de distancia construimos modelos logísticos con la depredación de semillas como variable respuesta y el nivel de distancia como variable categórica fija. Luego comparamos la depredación de la semilla de cada nivel de distancia con todos los niveles de distancia restantes. Para comparar la presión de los propágulos con la depredación de semillas en cada nivel de distancia también construimos modelos logísticos con la depredación de la semilla como una variable categórica fija. En este caso incluimos un nivel de distancia "ficticio" con un 100% de depredación de la semilla (proporción igual a 1) para representar la presión de propágulos. Luego comparamos la

depredación de semillas de este nivel de distancia "ficticio" con la depredación de semillas en los niveles de distancia 0, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 m de la plantación de pinos. Las diferencias significativas indicarían que la presión de propágulos es más alta que la depredación de la semilla, mientras que ninguna diferencia significativa indicaría que la depredación de la semilla es tan alta como la presión de propágulos. Para todos nuestros modelos asumimos una distribución binomial, utilizando modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) basados en la aproximación de Laplace y una función de enlace logit (paquete lme4, función glmer) (Bates et al. 2015). Utilizamos el análisis de la devianza para evaluar la cantidad de variación total explicada por cada uno de los factores fijos (pseudo R^2).

Para evaluar el efecto del inóculo micorrícico de distancias cada vez mayores desde la plantación, analizamos cada variable respuesta (supervivencia, altura del tallo, biomasa y colonización de las raíces) por separado. Para las variables de respuesta con distribución binomial (supervivencia y colonización de raíces) utilizamos el ajuste GLMM por máxima probabilidad y una función de enlace logit (paquete lme4, función glmer) (Bates et al. 2015). Para aquellas variables con una distribución binomial que presentaban sobredispersión, incluimos un efecto aleatorio a nivel de observación para modelar la sobredispersión (Harrison 2014). Para las variables respuesta con distribución normal (altura de los tallos y biomasa) utilizamos un modelo lineal de efectos mixtos ajustado por la máxima verosimilitud residual (REML) (paquete nlme, función lme) (Pinheiro et al. 2017). En todos los casos incluimos en el modelo la "distancia" como factor fijo y la "transecta" como factor aleatorio. Para abordar el efecto de la colonización de las raíces en el crecimiento de las plantas, comparamos la biomasa aérea (biomasa seca de tallos y hojas) de las plántulas colonizadas con las no colonizadas mediante ANOVA ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R 3.4.0 (R Core Team 2018).

3.4 Resultados

3.4.1 Presión de propágulos vs. depredación de semillas

Encontramos que la depredación de semillas fue mayor a partir de los 25m de la plantación ($p = 0.0080$, Figura 3.1, Tabla 3.1 y 3.2). La presión de propágulos fue mayor que la depredación de la semilla sólo en el borde de la plantación (0 m) y la depredación de las semillas superó la presión de propágulos a distancias de 25 m y más lejos de la plantación (Tabla 3.3). La depredación de semillas fue entre un 30 y un 40 % más baja en el borde de la plantación que en las distancias de 25 m y más lejos de la plantación (Figura 3.1). Además, no encontramos ningún efecto del tipo de transecta (“Densidad fija” vs. “Densidad variable”) sobre la depredación de semillas ($p = 0.2756$). La relación entre la depredación de semillas y la distancia de la plantación fue la misma para ambos tipos de transectas, como lo demuestra la ausencia de interacción entre “distancia” y “tipo de transecta” ($p = 0.4648$). Con las transectas de “Densidad fija” ofrecimos un 25, 100, 230% y 900% más de semillas de las que estarían disponibles naturalmente a 75, 100, 150 y 200 m de la plantación, respectivamente, pero aún así los depredadores de semillas consumieron el 97, 98, 88 y 100% de las semillas ofrecidas, respectivamente.

Tabla 3.1. Parámetros de la regresión logística para la depredación de semillas de *P. ponderosa* a una distancia cada vez mayor de la plantación. a) Efectos fijos de la distancia de la plantación, el tipo de transecta y la interacción entre la distancia y el tipo de transecta. Los efectos significativos ($p < 0.05$) se muestran en negrita. b) Efectos aleatorios de la transecta ($n = 9$). Se muestra el valor promedio de los interceptos.

a)

Efectos fijos	Estimador	Error Estandar	z	p
Distancia	0.036	0.0134	2.656	0.0080
Tipo de transecta	-0.849	0.7791	1.090	0.2756
Distancia * Tipo de transecta	-0.015	0.0203	0.731	0.4648

b)

Efectos aleatorios	Intercepto promedio	Desvío estándar
Transecta	1.475	0.000

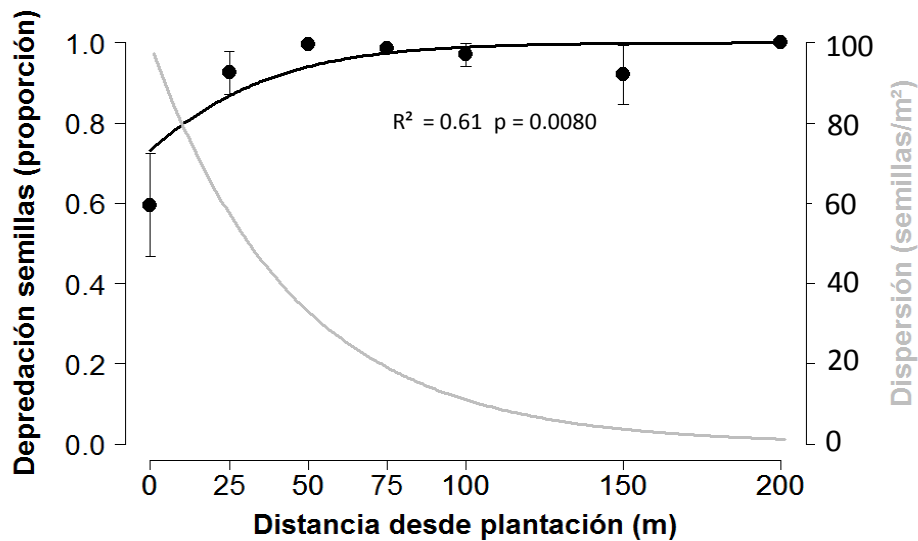


Figura 3.1: Dispersión de semillas (línea sólida gris) y depredación de semillas (puntos negros y línea sólida negra) de *P. ponderosa* a una distancia creciente desde la plantación. Los puntos muestran los valores medios (+ EE) de depredación de semillas para cada distancia.

Tabla 3.2. Comparaciones por pares de los niveles de depredación de semillas entre diferentes distancias de la plantación de pinos. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran en negrita.

Comparación por pares	p
0 vs 25 m	0.0396
0 vs 50 m	0.0397
0 vs 75 m	0.0312
0 vs 100 m	0.0291
0 vs 150 m	0.0441
0 vs 200 m	0.0438
25 vs 50 m	0.4273
25 vs 75 m	0.5187
25 vs 100 m	0.6585
25 vs 150 m	0.9311
25 vs 200 m	0.4090
50 vs 75 m	0.8348
50 vs 100 m	0.6705
50 vs 150 m	0.3914
50 vs 200 m	0.9541
75 vs 100 m	0.8175
75 vs 150 m	0.4724
75 vs 200 m	0.7925
100 vs 150 m	0.6011
100 vs 200 m	0.6359
150 vs 200 m	0.3758

Tabla 3.3. Comparaciones por pares entre la presión de los propágulos y la depredación de semillas para cada nivel de distancia de la plantación de pinos. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran en negrita.

Comparación por pares	Distancia (m)	p
Presión de propágulos vs depredación de semillas	0	0.0438
	25	0.4090
	50	0.9541
	75	0.7925
	100	0.6359
	150	0.3758
	200	1.0000

3.4.2 Ausencia de mutualistas

La colonización de las raíces por hongos EM disminuyó con la distancia de la plantación ($p = 0.0139$, Figura 3.2, Tabla 3.4). La media de la colonización de las raíces por hongos EM en el borde de la plantación de pinos fue de aproximadamente el 90%, mientras que disminuyó a aproximadamente al 40% en la distancia más lejana a la plantación evaluada aquí (200 m). Sin embargo, no encontramos diferencias en el crecimiento de las plántulas (altura de los tallos y biomasa) o en la supervivencia con la distancia a la plantación (p altura = 0.6387; p biomasa = 0.9911; p supervivencia = 0.4830). Cuando agrupamos todos los niveles de distancia y comparamos las plántulas colonizadas por hongos EM (con un rango de 10% a 100% de colonización de raíces) con las plántulas no colonizadas (correspondientes al suelo estéril y con 0% de colonización de raíces) encontramos diferencias en la biomasa de las plántulas que favorecían a las plántulas colonizadas ($p = 0.0400$, Figura 3.3). Finalmente, las raíces de las plántulas que crecían en suelos estériles no fueron colonizadas por los hongos EM, lo cual demuestra que no hubo inoculación inadvertida en la cámara de crecimiento.

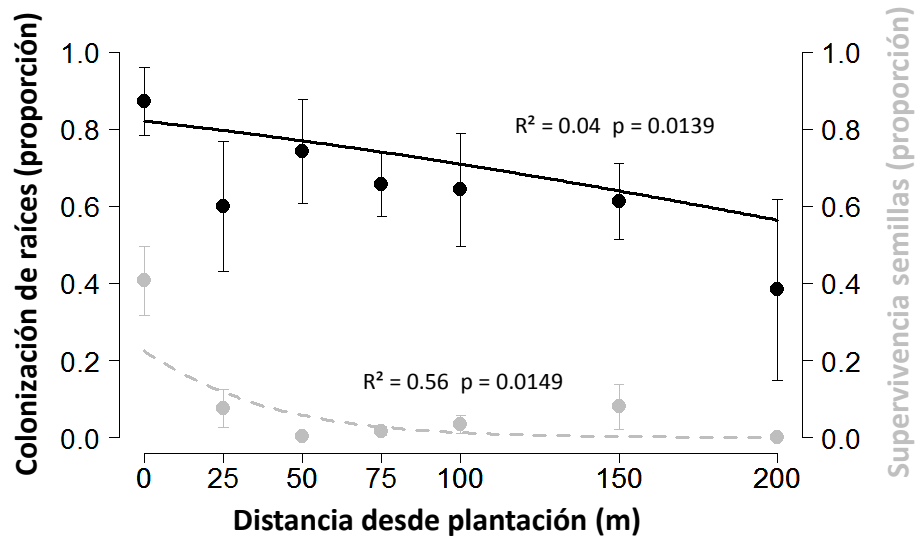


Figura 3.2. Colonización de ápices radiculares por hongos EM en el bioensayo de la cámara de crecimiento (en negro) y supervivencia de las semillas de la depredación de *P. ponderosa* en el experimento de campo (en gris) a una distancia cada vez mayor de la plantación. Los puntos muestran los valores medios (+ EE) para cada distancia.

Tabla 3.4. Parámetros de la regresión logística para la colonización de las raíces por hongos EM a una distancia cada vez mayor de la plantación de pinos. a) Efectos fijos de la distancia de la plantación. Los efectos significativos ($p < 0.05$) se muestran en negrita. b) Efectos aleatorios de la transecta ($n = 9$), y la observación incluida debido a la sobredispersión. Se muestran los promedios de los interceptos.

a)

Efectos fijos	Estimador	Error estándar	z	p
Distancia	-0.012	0.0050	-2.460	0.0139

b)

Efecto aleatorio	Intercepto promedio	Desvío estándar
Transecta	2.064	0.396
Observación	2.027	1.554

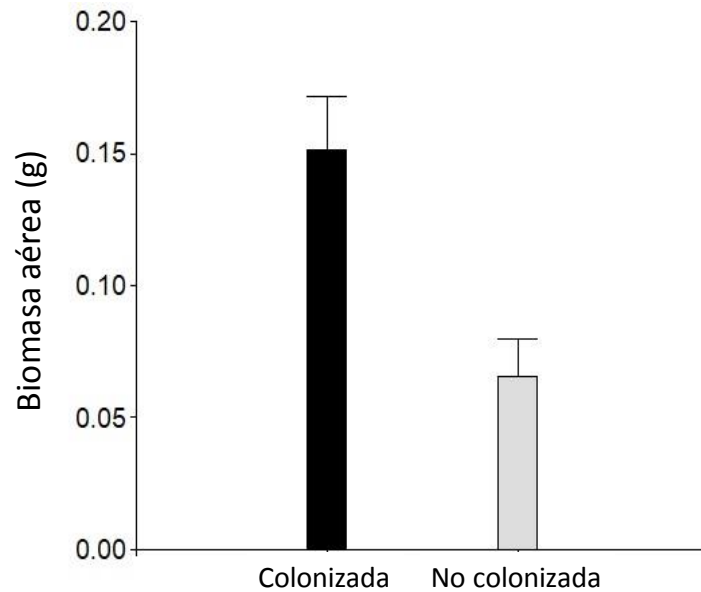


Figura 3.3. Biomasa aérea media (+ SE) de las plántulas colonizadas (n=41; barra negra) y no colonizadas por hongos EM (n=3; barra gris) después de seis meses de crecimiento.

3.5 Discusión

Nuestros resultados proporcionan evidencia empírica que la depredación de semillas puede ser el mecanismo biótico más importante que limita las invasiones de *P. ponderosa* en este sistema. Los depredadores de semillas consumieron cerca del 95% de las semillas dispersadas fuera de la plantación de pinos, limitando así la disponibilidad de semillas. La presión de propágulos varió en un amplio rango, desde 100 semillas/m² en el borde de la plantación hasta 2 semillas/m² a una distancia de 200 m de la plantación, sin embargo, sólo en el borde de la plantación la presión de propágulos superó a la depredación de las semillas. A distancias de 25 m y más lejos de la plantación de pinos, la depredación de semillas superó la presión de propágulos. Esto es particularmente claro cuando consideramos la depredación de semillas en las transectas de densidad fija: a distancias de la plantación superiores a 75 m la depredación de semillas fue entre

un 25% y un 900% más alta que la presión de propágulos. Este patrón de supervivencia de las semillas no depredadas sugiere que el reclutamiento anual de las plántulas de *P. ponderosa* se limita a los primeros 25 m de la fuente de la semilla. En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia de cómo la resistencia biótica de los enemigos naturales generalistas puede impedir una invasión.

En este estudio, encontramos que la probabilidad de depredación de las semillas de pino aumenta a partir de los 25 m desde la plantación (Figura 3.1). Esto encaja con el patrón de reclutamiento de plántulas descrito por McCanny (1985). Esta mortalidad de semillas con densidad inversa puede explicarse por la saciedad del depredador (Janzen 1971), cuando los depredadores se sacian por las mayores densidades de semillas cerca de las plantas adultas (Augspurger y Kitajima 1992). La saciedad de los depredadores cerca de la plantación de pinos tiene sentido cuando se considera el gradiente de disminución de la disponibilidad de semillas con el aumento de la distancia de la plantación (Figura 3.1). Una explicación alternativa es que la actividad de los depredadores nativos es menor cerca de las plantaciones de pinos porque es un tipo de hábitat muy diferente de la estepa. La baja cobertura de la vegetación del sotobosque en las plantaciones de pinos (Paritsis y Aizen 2008) significa que los pequeños mamíferos (principales depredadores de las semillas de pino en esta región) (Chiuffo et al. 2018; Nuñez et al. 2008) tienen pocos hábitats protegidos para refugiarse de los depredadores. Por lo tanto, los pequeños mamíferos reducirían el riesgo de ser depredados al pasar menos tiempo buscando alimento en el sotobosque de las plantaciones de pinos que en la vegetación adyacente de baja estatura. El patrón de depredación de semillas observado puede no reflejar la probabilidad de establecimiento e invasión de *P. ponderosa* porque hay muchos otros factores y procesos involucrados entre la supervivencia de las semillas y el éxito de la invasión, como las condiciones abióticas y bióticas que afectan germinación de las semillas y la emergencia y supervivencia de plántulas (Blackburn et al.

2011; Carrillo-Gavilán y Vilà 2010; Richardson et al. 2000b). Sin embargo, si los depredadores de semillas son capaces de consumir la mayor parte de la producción de semillas de una población de plantas, entonces su probabilidad de convertirse en invasores se reduciría en gran medida (Pearson et al. 2012), especialmente si se consideran los filtros adicionales antes del éxito de la invasión (Blackburn et al. 2011; Carrillo-Gavilán et al. 2012; Richardson et al. 2000b). Solo encontramos semillas dispersadas naturalmente en el límite de la plantación (distancia cero de las transectas) y en densidades (sem/m²) comparables con nuestras parcelas más cercanas a la plantación. Por esta razón, creemos que esta disponibilidad natural de semillas sólo podría haber afectado el consumo de semillas de nuestro experimento en la distancia cero, reduciendo el consumo de semillas en nuestras parcelas ubicadas en el límite de la plantación. Si ese fuera el caso, entonces es posible que hayamos subestimado el consumo de semillas en el límite de la plantación. De esta manera, el consumo de semillas “real” sería mayor al que nosotros estimamos en el campo, reforzando nuestro principal resultado que indica que la depredación de semillas está limitando el establecimiento de *P. ponderosa*.

Nuestros resultados también muestran que la abundancia de hongos EM no está limitando la supervivencia y el crecimiento de las plántulas de pino en el rango de distancia evaluado. Encontramos un gradiente de disminución progresiva de la colonización de las raíces con el aumento de la distancia de la plantación (Figura 3.2), lo cual es consistente con los resultados de otro estudio en sitios de pastizales aledaños a plantaciones de *P. ponderosa* en la misma región (Salgado Salomón et al. 2011). Sin embargo, este gradiente de colonización de raíces no afectó la supervivencia o el crecimiento de las plántulas. Otros estudios han encontrado importantes efectos de la abundancia y composición de hongos EM en el establecimiento de plántulas de pino (Hayward et al. 2015; Nuñez et al. 2009; Urcelay et al. 2017) pero trabajando con rangos de distancia más amplios. Por ejemplo, Nuñez et al. (2009) encontraron efectos de los hongos EM en

el establecimiento de plántulas de *P. ponderosa* trabajando con una distancia de 1000 m de la plantación. Los niveles más bajos de colonización de las raíces a mayores distancias de la plantación de pinos pueden tener un efecto significativo en el crecimiento de las plántulas. En este sentido, encontramos que sólo cuando las plántulas no estaban colonizadas (0% de colonización de raíces) su crecimiento se veía afectado negativamente (Figura 3.3). Sin embargo, si la supervivencia de semillas a la depredación está limitada a partir de una distancia de 25 m de la plantación (Figura 3.2), la importancia de las limitaciones a mayores distancias puede no ser fundamental para explicar la invasión en los primeros cientos de metros de las plantaciones, pero puede ser extremadamente importante para eventos raros pero potencialmente claves de dispersión a larga distancia. Otra posibilidad es que la duración del bioensayo no haya sido lo suficientemente larga como para mostrar el efecto de la colonización de las raíces en el crecimiento de las plántulas. Por ejemplo, Nuñez et al. (2009) encontraron efectos de la colonización de raíces de *P. ponderosa* en el crecimiento de las plántulas en un experimento de invernadero que duró 9 meses. Sin embargo, en una cámara de crecimiento el efecto de los hongos EM sobre el crecimiento de las plántulas de pino debería ser claro a los 6 meses, como se ha demostrado en otros estudios de igual (Hazard et al. 2017) o menor duración (Alberton y Kuyper 2009). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la disponibilidad de hongos EM no está limitando la invasión de *P. ponderosa* en nuestro sistema de estudio, sino que la comunidad de depredadores de semillas está detrás del patrón observado de bajos niveles de invasión para *P. ponderosa*.

Nuestro estudio muestra que la resistencia biótica puede ser extremadamente importante en las invasiones de plantas, incluso más importante que la presión de propágulos (asumiendo que nuestras estimaciones de la producción y dispersión de semillas de *P. ponderosa* reflejan la presión de propágulos en este sistema) y la ausencia de mutualistas. Por el contrario, una revisión

de las hipótesis en ecología de invasiones encontró más evidencia empírica para la hipótesis de la presión de propágulos que para la hipótesis de la resistencia biótica (Jeschke 2014). En nuestro sistema de estudio y considerando una presión de propágulos estimada, la resistencia biótica supera la presión de propágulos fuera de la plantación, limitando en gran medida la invasión de *P. ponderosa*. Por lo tanto, nuestro estudio destaca el papel de la resistencia biótica en las invasiones de plantas.

Capítulo 4: Árboles altamente invasores son más dependientes de mutualismos

La sección que sigue es una versión levemente modificada de un artículo publicado en Ecology:

Moyano J, Rodriguez-Cabal MA, Nuñez MA (2020) Highly invasive tree species are more dependent on mutualisms. Ecology 101: e02997

El uso de “nosotros” en este capítulo se refiere a mis co-autores y yo. Como primer autor yo era responsable de este artículo.

4.1 Resumen

Se ha propuesto que las especies invasoras deberían depender menos de los mutualismos, porque su propagación se vería entonces menos limitada por la disponibilidad de mutualistas. Probamos esta idea con el género *Pinus*, cuyo grado de invasión se conoce a nivel de especie, estando ésta alta y negativamente relacionada al tamaño de la semilla, y que forma asociaciones mutualistas obligadas con hongos ectomicorrícicos (EM). La dependencia micorrícica se define como el grado en que una planta necesita los hongos micorrícicos para mostrar el máximo crecimiento. En este sentido, utilizamos la respuesta de crecimiento de la planta a los hongos micorrícicos para estimar la dependencia micorrícica. Evaluamos la respuesta de las especies de *Pinus* a los hongos EM utilizando 1206 contrastes publicados sobre 34 especies, y comparamos estos datos con datos sobre la capacidad de invasión de las especies de *Pinus*. Sorprendentemente, encontramos que el crecimiento de las especies con semillas más pequeñas se benefició más de los hongos mutualistas EM, lo que indica una mayor dependencia a los mutualismos de las especies más invasoras. Una mayor dependencia de los hongos EM podría formar parte de una estrategia en la que las especies de semillas pequeñas producen más semillas que pueden dispersarse más lejos, y se establecen sólo si se ven facilitadas por hongos EM. Por el contrario, las especies de semillas grandes mostraron una menor dependencia de los hongos EM, lo que puede explicarse por su mayor contenido de reservas en semillas que les confieren mayor tolerancia a las condiciones de estrés durante el establecimiento. Sin embargo, la dispersión limitada de las semillas más grandes puede restringir la propagación de estas especies. Presentamos pruebas contundentes en contra de la hipótesis en la ecología de que las especies que dependen más de los mutualistas son menos propensas a la invasión, y sugerimos que en ciertas circunstancias una mayor dependencia de los mutualistas puede aumentar la capacidad de invasión.

4.2 Introducción

Predecir qué especies tienen más probabilidades de invadir cuando se introducen en una nueva región representa un gran desafío para la ecología moderna. Sin embargo, sigue siendo difícil comprender por qué algunas especies de plantas se convierten en invasoras mientras que otras no lo son (Seebens et al. 2016; van Kleunen et al. 2015). La hipótesis de la "maleza ideal" postula que las especies de plantas invasoras deberían depender menos de las interacciones mutualistas (Baker 1965). Varios estudios han sugerido que las especies de plantas que dependen más de los mutualismos son menos propensas a invadir (Richardson et al. 2000a). Por lo tanto, se propone que las especies de plantas que dependen más de los polinizadores (Burns et al. 2011; Pyšek et al. 2011; Razanajatovo et al. 2016; Rodger et al. 2013), de los dispersores de semillas (Richardson y otros 2000) y de las asociaciones micorrícicas (Vogelsang y Bever 2009; Vogelsang et al. 2004) son menos invasoras.

Si bien hay casos en que las interacciones con mutualistas pueden facilitar la invasión de plantas (Milton et al. 2007, Padrón et al. 2011, Řezáčová et al. 2020), la dependencia de mutualistas generalmente limita la invasión de plantas (Richardson et al. 2000a). Es posible que no haya dependencia entre las plantas y mutualistas, en cuyo caso la invasión de esas plantas no está limitada por la presencia de esos mutualistas (Baker 1965; Rodger et al. 2013). Por ejemplo, las especies altamente invasoras *Atriplex spp.* y *Hakea spp.* en Sudáfrica (Henderson 2007) y *Brassica spp.* en América del Norte (Oduor et al. 2015) son plantas no micorrícicas (Traveset y Richardson 2014). También muchas plantas invasoras se autopolinizan, entre ellas *Alliaria petiolata*, *Bromus tectorum*, *Carpobrotus edulis*, *Hypericum perforatum* y *Mesembryanthemum crystallinum*

(Richardson et al. 2000a). Algunas plantas pueden depender facultativamente de los mutualismos, por lo que pueden seguir estableciéndose e invadiendo en ausencia de sus mutualistas (Traveset y Richardson 2014). Por ejemplo, el 90% de las plantas leñosas invasoras no dependen exclusivamente de dispersores animales (Traveset y Richardson 2014). Por último, algunas plantas dependen en gran medida de mutualistas y sólo invaden en presencia de ellos (Richardson et al. 2000a). Por ejemplo, de las 60 especies de *Ficus* introducidas en Florida sólo 3 se han convertido en invasoras, y sólo después de la introducción de sus avispa polinizadoras altamente específicas (McKey y Kaufmann 1991; Nadel et al. 1992; Ramírez 1988). Si bien muchos estudios han respaldado este patrón general de mayores limitaciones para la invasión de especies de plantas con menor dependencia de los mutualismos, ningún estudio ha cuantificado aún la dependencia de los mutualismos a lo largo de un gradiente de capacidad de invasión de plantas.

El género *Pinus* es un sistema de estudio ideal para evaluar la dependencia de las plantas invasoras a los mutualismos. Muchas especies de este género han sido ampliamente plantadas en todo el mundo, algunas de las cuales se han convertido en invasoras y otras no (Nuñez et al. 2017; Richardson y Rejmánek 2011; Simberloff et al. 2010). Además, se han estudiado intensamente las invasiones de *Pinus* (Richardson 2006), y se ha desarrollado una métrica para cuantificar la capacidad de invasión entre las diferentes especies de pinos (índice Z) (Rejmánek et al. 2005; véase también Rejmánek y Richardson 1996). Además, las especies de pinos forman interacciones mutualistas obligadas y muy específicas con hongos EM (Koele et al. 2012; Mikola 1970), que es la asociación micorrícica del 60% de los árboles del mundo, en términos de número de individuos (Steidinger et al. 2019). El grado en que las especies de *Pinus* necesitan hongos EM para producir el máximo crecimiento se define como dependencia micorrícica (Gerdemann 1975; Janos 2007). A este respecto, la respuesta del crecimiento de *Pinus* a los hongos EM puede utilizarse para medir la dependencia micorrícica (Menge et al. 1978; Moora 2014; Plenchette et al. 1983; Tawarayama

2003). Además, al trabajar con especies del mismo género se reducen al mínimo los efectos derivados de la distancia filogenética. Aquí nos centramos en la etapa de plántulas porque: (1) las especies de pinos varían mucho en su respuesta de crecimiento a los hongos EM en la etapa de plántulas (Karst et al. 2018), (2) es la etapa más vulnerable en el ciclo de vida de una planta (Baskin y Baskin 1998; Fenner y Thompson 2005; Harper 1977), y (3) los patrones de crecimiento en la etapa de plántulas son muy buenos predictores de los patrones de crecimiento en la madurez para las especies leñosas (Cornelissen et al. 1998).

Aquí, probamos la hipótesis de que las especies de *Pinus* con mayor capacidad de invasión dependen menos de los mutualismos con hongos EM. Definimos la capacidad de invasión como el potencial de una especie para aumentar su abundancia y/o distribución cuando se introduce en una nueva región (Pyšek y Richardson 2007). Para probar esta hipótesis, compilamos una base de datos de 1206 contrastes sobre 34 especies de *Pinus* que evaluaron el crecimiento de las plántulas, con o sin inoculación de hongos EM (la respuesta micorrícica). Utilizando modelos lineales evaluamos la relación entre la capacidad de invasión de las especies de *Pinus*, medida según Rejmánek et al. (2005), y la respuesta del crecimiento de las plántulas a la inoculación de hongos EM. El peso de la semilla está entre los atributos de la planta con más evidencia que muestra una correlación con la capacidad de invasión de la planta (Hamilton et al. 2005; Moravcová et al. 2010; Novoa et al. 2016; Pyšek et al. 2015; Rejmánek 2000). Para comprender mejor la relación entre la capacidad de invasión y la dependencia de mutualismos, evaluamos la relación entre el peso de la semilla y el efecto de los hongos EM en el crecimiento de las plántulas.

4.3 Metodología

Cuantificamos la respuesta de las especies de *Pinus* a las micorrizas (Janos 2007; Smith et al. 2009) siguiendo el método de Veresoglou et al. (2018): comparando el crecimiento de las plántulas de *Pinus* con y sin hongos EM. Aunque la respuesta de las especies a las micorrizas se evalúa en condiciones altamente controladas, esta respuesta podría utilizarse como estimación de la dependencia de las plantas a las micorrizas (Gerdemann 1975; Menge et al. 1978; Moora 2014; Plenchette et al. 1983; Tawaraya 2003). Para ello se utilizamos los datos de estudios publicados para realizar un meta-análisis conforme a las directrices de PRISMA (Moher et al. 2009).

Construimos nuestra base de datos de estudios publicados comenzando con una base de datos mundial de respuesta de las plantas a los hongos micorrícicos (MycnoDB), que contiene estudios en los que se cultivaron plantas con hongos micorrícicos o sin ellos y se midió el crecimiento resultante de las plantas (Chaudhary et al. 2016). MynoDB contiene 444 contrastes de 58 artículos centrados en especies de *Pinus* (Figura 4.1). En marzo de 2019 realizamos una búsqueda bibliográfica en la base de datos de Scopus utilizando las palabras clave "pinus" O "pine*" Y "inocul*" Y "mycorrhiz*" O "ecotmyc*". Evaluamos los resultados obtenidos con esta búsqueda y las referencias en ellos para identificar 112 artículos que cumplían los siguientes requisitos: 1) comparación de la biomasa de plántulas de *Pinus* medida después de crecer con o sin inoculación de hongos EM y, 2) el estudio no estaba incluido en MynoDB. Los artículos que no incluían tratamientos de control (sin inoculación de hongos EM) no se incluyeron, ya que las comparaciones no eran posibles. Para cada estudio se obtuvo información sobre la biomasa de plántulas con y sin inoculación de hongos EM. Cuando estaban disponibles, se extrajeron datos de la biomasa total de la planta (aérea + subterránea), y si dichos datos no estaban disponibles, se incluyó sólo la biomasa aérea. Si un experimento contenía la manipulación de un factor aparte de la inoculación de hongos (por ejemplo, fertilización del sustrato, edad de las plántulas en el momento de la inoculación), los resultados se incluían en nuestra base de datos como contrastes

separados dentro del mismo experimento, siguiendo los mismos criterios que los autores de MycoDB (Chaudhary et al. 2016).

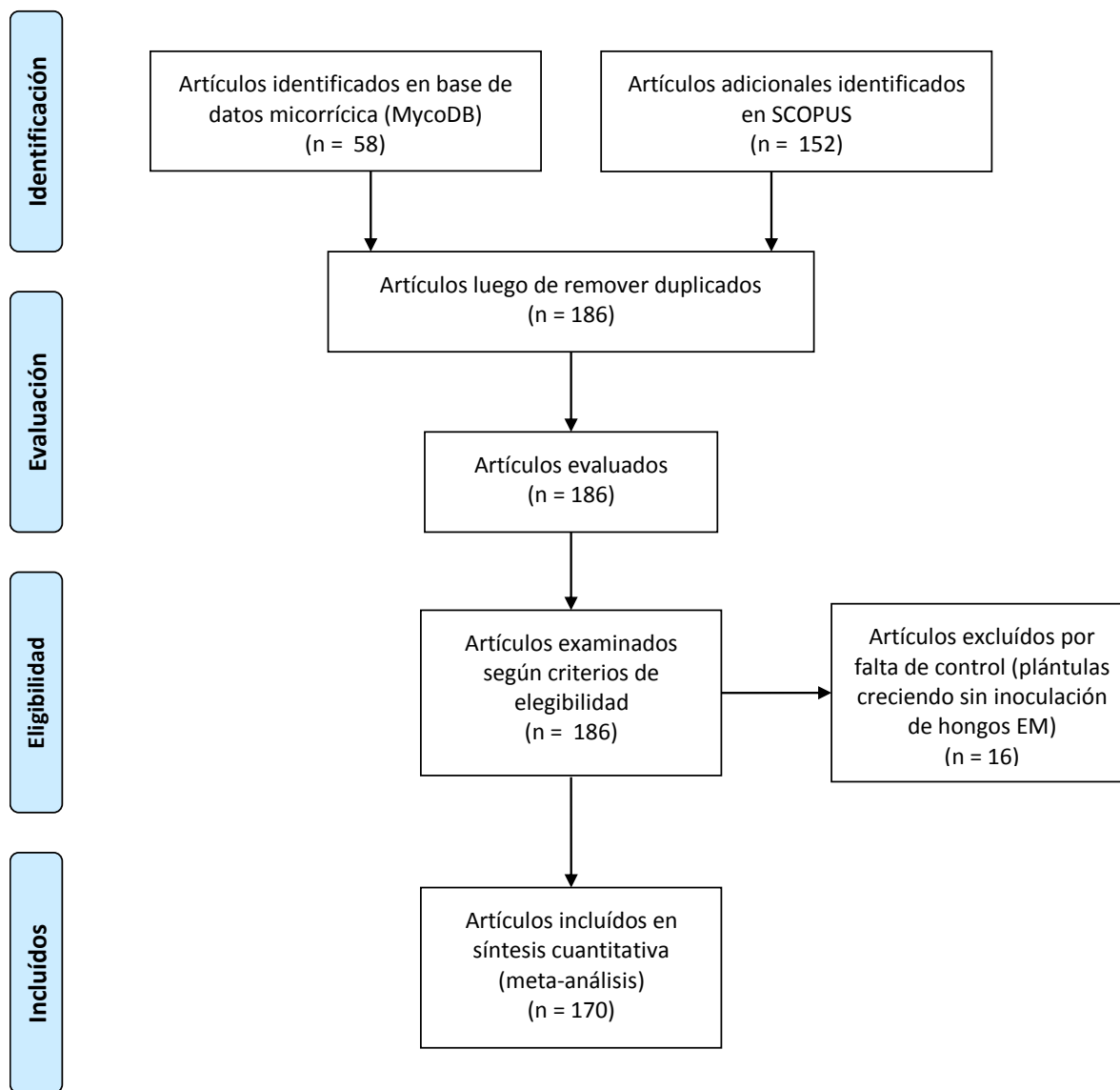


Figura 4.1: Diagrama de flujo que muestra el número de estudios identificados, examinados, seleccionados e incluidos en nuestro meta-análisis. Adaptado de Moher et al. (2009)

También extrajimos, de cada experimento, datos sobre las co-variables que esperábamos que influyeran en la respuesta de las plántulas de *Pinus* a los hongos EM: 1) si el experimento se realizó en el campo o en condiciones controladas (invernadero o cámara de crecimiento), 2) la duración del experimento, 3) si el sustrato fue fertilizado o no, 4) si las plántulas de *Pinus* fueron inoculadas con una sola especie de hongos o con múltiples especies de hongos, 5) la edad de las plántulas de *Pinus* cuando fueron inoculadas y, 6) si el experimento tuvo lugar en el área de distribución nativa o introducida de las especies de *Pinus*. Digitalizamos los datos disponibles en gráficos utilizando el Web Plot Digitizer 4.1 (Rohatgi 2018). En combinación con los contrastes anteriores de MycoDB, la base de datos final que obtuvimos consiste en 1206 contrastes de 170 artículos. De estos, 346 contrastes se realizaron en el campo y 860 tuvieron lugar bajo condiciones controladas (ya sea en un invernadero o en una cámara de crecimiento).

Calculamos un tamaño de efecto (TE) para cada estudio usando la respuesta logarítmica:

$$(1) TE = \ln (EM_P/EM_A)$$

donde EM_P es la biomasa de las plántulas en presencia de hongos EM y EM_A es la biomasa de las plántulas en ausencia de hongos EM. Calculamos un tamaño de efecto medio para cada especie de *Pinus* utilizando un promedio no ponderado de todos los contrastes de cada especie, siguiendo a (Karst et al. 2018). Un tamaño del efecto positivo indica que las plántulas de *Pinus* se benefician de la presencia de hongos EM, mientras que si el tamaño del efecto es negativo las plántulas se ven afectadas negativamente por los hongos EM. Además, el valor absoluto del tamaño del efecto es un indicador de la magnitud de la respuesta de las plántulas a la presencia de hongos EM, ya sea positiva o negativa. Por lo tanto, algunas especies de *Pinus* pueden tener una respuesta fuerte mientras que otras pueden tener una respuesta débil incluso cuando en ambos casos las plántulas se benefician de la inoculación de hongos EM (es decir, ambas respuestas son positivas).

Para cada especie de *Pinus* incluida en la base de datos (Tabla 4.1) obtuvimos información sobre los atributos de historia de vida de diferentes fuentes (Committee-for-Compilation-of-Chinese-Tree-Species-Manuals 1978; Grotkopp et al. 2004; Krugman y Jenkinson 2008; McGregor et al. 2012; Yang et al. 2018; Zhao et al. 2011). Nos interesaban los diferentes atributos que predicen la capacidad invasiva (peso de la semilla, período juvenil e intervalo entre años de semillazón) y por lo tanto se utilizaron para calcular un índice de invasión (el índice Z) (Rejmánek et al. 2005; véase también Rejmánek y Richardson 1996). El índice Z se calcula para cada especie de *Pinus* de la siguiente manera:

$$(2) \text{ índice } Z = 23.39 - 0.63 * \sqrt{PS} - 3.88 \sqrt{PJ} - 1.09 * IS$$

donde PS es el peso de la semillas, PJ es el período juvenil y IS es el intervalo entre años de semillazón para cada especie de *Pinus*. Una especie con una índice Z negativo se consideraría no invasora, mientras que una especie con un índice Z positivo se consideraría invasora. Por ejemplo, según una base de datos mundial de árboles y arbustos invasores, el 90 % de las especies de *Pinus* que se han convertido en invasoras en todo el mundo tienen una puntuación Z positiva (Rejmánek y Richardson 2013). Asimismo, cuanto más alto sea el valor del índice Z positivo, más invasora será una especie (Rejmánek et al. 2005). En este sentido, según una base de datos recientemente compilada de ocurrencias mundiales de especies de *Pinus* naturalizadas (Perret et al. 2019) el índice Z está positiva y altamente correlacionado con el número de ocurrencias naturalizadas para las 34 especies incluidas en nuestra base de datos ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.38$). Por otro lado, valores más bajos de peso de semillas corresponden a una mayor capacidad de invasión para las especies de *Pinus* (Grotkopp et al. 2002; Grotkopp et al. 2004; Rejmánek 1996; Rejmánek y Richardson 1996; Rejmánek et al. 2005; Richardson et al. 1990; Richardson et al. 1994). También extrajimos datos sobre la longitud del ala de la semilla de McGregor et al. (2012) para obtener la relación

entre el peso de la semilla y la longitud del ala de la semilla, definida como el índice de carga del ala de la semilla (Richardson et al. 1990). Este rasgo es un buen indicador de la eficacia de la dispersión de la semilla por el viento y, por lo tanto, puede ayudar a comprender por qué algunas especies de *Pinus* se propagan más rápidamente (Rejmánek 1996; Richardson et al. 1990).

Tabla 4.1: Las especies de *Pinus* incluidas en nuestro estudio y peso de la semilla (mg), capacidad de invasión (índice Z: cuanto más alto es el índice Z, más invasiva es una especie. Se espera que las especies con puntuaciones Z inferiores a cero no sean invasoras), índice de carga del ala de semilla (mg/mm, a mayor valor del índice menor capacidad de dispersión por viento), tamaño medio del efecto de la inoculación con hongos EM en el crecimiento de las plántulas, número de contrastes y desvío estándar del tamaño del efecto.

Especie	Peso semilla	Índice Z	Índice de carga del ala de semilla	Tamaño del efecto	Contrastes	Desvío estandar
<i>Pinus ayacahuite</i>	53.1	7.4	1.30	0.46	3	0.19
<i>Pinus banksiana</i>	3.5	11.3	0.23	0.23	133	0.37
<i>Pinus caribaea</i>	16.0	1.4	0.61	-0.02	39	0.30
<i>Pinus clausa</i>	6.0	11.0	0.23	0.37	2	0.13
<i>Pinus contorta</i>	3.5	13.0	0.16	0.57	36	0.59
<i>Pinus densiflora</i>	8.7	1.6	0.48	0.16	29	0.59
<i>Pinus echinata</i>	10.9	6.5	0.64	0.18	6	0.24
<i>Pinus elliotii</i>	34.7	5.1	1.33	0.41	32	0.52
<i>Pinus greggii</i>	14.1	5.5	0.88	0.49	10	0.33
<i>Pinus halepensis</i>	19.1	8.9	0.66	0.09	40	0.34
<i>Pinus jeffreyi</i>	111.8	2.5	3.61	0.06	15	0.24
<i>Pinus koraiensis</i>	522.0	-9.7	522.02	0.04	13	0.07
<i>Pinus lambertiana</i>	220.0	-14.9	7.10	-0.11	10	0.13
<i>Pinus massoniana</i>	9.5	10.0	0.43	0.74	25	0.51
<i>Pinus muricata</i>	10.0	9.8	0.48	0.36	20	0.79
<i>Pinus nigra</i>	18.6	2.0	0.81	0.15	10	0.11
<i>Pinus oocarpa</i>	15.2	6.8	1.17	0.21	7	0.14
<i>Pinus palustris</i>	88.7	-6.4	2.16	-0.08	4	0.06
<i>Pinus patula</i>	8.4	7.7	0.44	0.77	31	0.90
<i>Pinus pinaster</i>	49.0	7.8	1.89	0.00	183	0.48
<i>Pinus pinea</i>	755.0	-16.0	377.52	-0.06	49	0.23
<i>Pinus ponderosa</i>	38.0	0.1	1.23	0.15	52	0.50
<i>Pinus pseudostrobus</i>	22.2	6.6	0.85	0.70	21	0.58
<i>Pinus radiata</i>	33.1	9.6	1.58	0.65	75	0.62
<i>Pinus resinosa</i>	8.8	-0.9	0.42	0.26	24	0.50
<i>Pinus rigida</i>	7.3	8.4	0.33	0.72	10	0.25
<i>Pinus strobus</i>	17.2	5.9	0.66	0.67	10	0.45
<i>Pinus sylvestris</i>	6.9	8.5	0.33	0.13	206	0.76
<i>Pinus tabuleoformis</i>	36.0	9.5	3.27	0.36	31	0.28
<i>Pinus taeda</i>	25.4	2.8	1.21	0.26	41	0.22
<i>Pinus tecunumanii</i>	12.8	6.9	1.28	0.18	7	0.15
<i>Pinus thunbergii</i>	14.0	9.9	0.82	0.48	4	0.23
<i>Pinus virginiana</i>	8.1	11.5	0.39	0.34	2	0.34
<i>Pinus wallichiana</i>	49.9	1.2	1.61	0.36	26	0.14

Para cuantificar la importancia de la capacidad de invasión de las especies de *Pinus* (utilizando el índice Z o el peso de la semilla como estimadores de invasividad) y otras co-variables como los potenciales impulsores del efecto de los hongos EM sobre el crecimiento de las plántulas, utilizamos modelos de regresión lineal (función lm) (Chambers et al. 1990; Wilkinson y Rogers 1973). Además, para evaluar la relación entre la capacidad de dispersión de las especies de *Pinus* y la respuesta de las plántulas a los hongos EM, utilizamos el índice de carga del ala de semilla como variable predictiva (una alternativa a la capacidad de invasión de las especies), junto con otras co-variables. Probamos la independencia de todas las variables predictoras a través de la multicolinealidad, utilizando el factor de inflación de la varianza (VIF) (función VIF) (Fox y Weisberg 2010). Ninguna de las variables mostró multicolinealidad (todos los valores del VIF estaban por debajo de 2), por lo que incorporamos todas ellas en nuestros modelos. Sin embargo, es importante aclarar que nunca incluimos el índice Z, el peso de la semilla o el índice de carga del ala de la semilla en el mismo modelo, ya que el índice Z y el índice de carga del ala de la semilla se calculan en base al peso de la semilla. Comprobamos la normalidad de nuestros modelos analizando visualmente la distribución de los residuos de cada modelo (Figura S4.1a y S4.2a). Evaluamos la homogeneidad de la varianza comprobando la ausencia de patrones entre los residuos del modelo y los valores ajustados (Quinn y Keough 2002) (Figura S4.1b & S4.2b). Además, ninguno de los puntos de datos de nuestro conjunto de datos mostraba una distancia de Cook superior a 1, lo que indicaba la ausencia de casos influyentes (Cook y Weisberg 1982) (Figura S4.1c & S4.2c).

Para comprobar si hay una señal filogenética en nuestra variable respuesta utilizamos el árbol filogenético construido por McGregor (2012) y estimamos la C media de Abouheif (Abouheif 1999; Pavoine et al. 2008) (función abouheif.moran del paquete adephylo) (Jombart y Dray 2008). Para evaluar si existe un sesgo de publicación en nuestra base de datos utilizamos una prueba de

correlación de rango no paramétrica, la rho de Spearman, una potente prueba para análisis que incluyen más de 75 contrastes (Begg y Mazumdar 1994). Según esta prueba, una correlación significativa entre el tamaño del efecto y el tamaño de la muestra indicaría un sesgo de publicación. También construimos un gráfico de embudo para observar cómo la distribución de los tamaños de los efectos cambia con el tamaño de la muestra. Por último, incluimos el tamaño de la muestra (es decir, el número de réplicas) de cada contraste como variable predictiva en los modelos de regresión múltiple para tener en cuenta un posible sesgo de publicación. Realizamos todos los análisis estadísticos utilizando el programa estadístico R v.3.5.1 (R Core Team 2019).

4.4 Resultados

El efecto de la inoculación con hongos EM sobre el crecimiento de las plántulas de *Pinus* aumentó con el incremento de la invasividad de *Pinus* ($R^2 = 0.37$; $p = 0.0001$; Figura 4.2a) y disminuyó con el incremento del peso de la semilla ($R^2 = 0.24$; $p = 0.0030$; Figura 4.2b). Incluso sin considerar las cuatro especies con índice Z claramente negativo, las especies con mayor capacidad de invasión mostraron una mayor respuesta de crecimiento a los hongos EM ($R^2 = 0.16$; $p = 0.0288$; Figura 4.3). Esta respuesta de crecimiento osciló entre casi 0% para las especies de semillas grandes con baja capacidad de invasión y casi 100% de aumento de la biomasa para las especies de semillas pequeñas con alta capacidad de invasión. La respuesta de crecimiento de las plántulas a los hongos EM disminuyó con la carga del ala de la semilla ($R^2 = 0.20$; $p = 0.0072$; Figura 4.4). Incluso cuando se eliminaron los datos de las especies de *Pinus* con valores extremos de este atributo, la dependencia de las especies a los hongos EM aún disminuyó con una mayor carga del ala de la semilla ($R^2 = 0.16$; $p = 0.0244$; Figura 4.5).

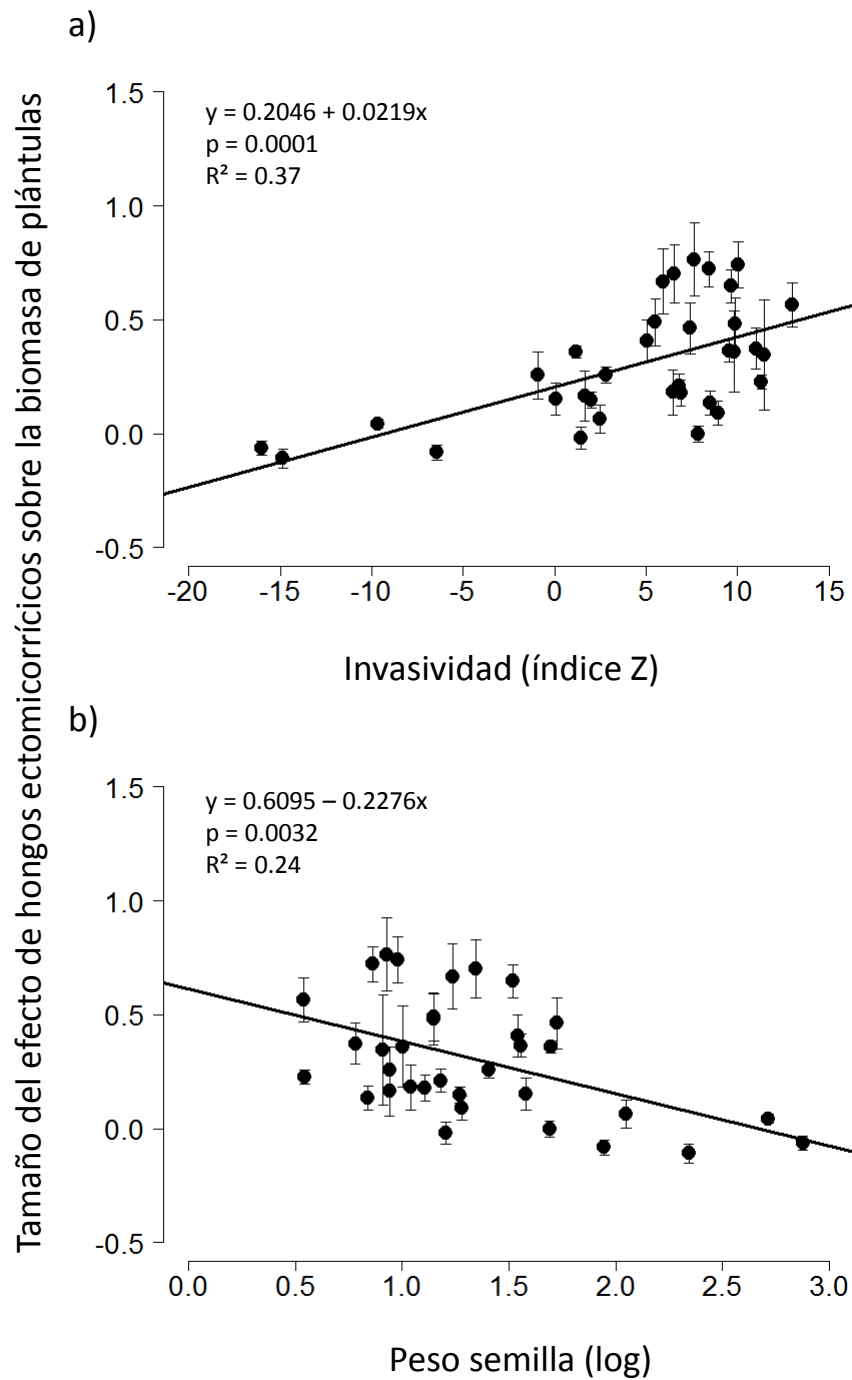


Figura 4.2: a) Regresión lineal entre el tamaño del efecto medio (\pm EE) de la inoculación con hongos ectomicorrícicos sobre la biomasa de plántulas, y la capacidad de invasión de las especies (índice Z) para 34 especies de *Pinus*. Cuanto más alto es el índice Z, más invasiva es una especie. Se espera que las especies con puntuaciones Z inferiores a cero no sean invasoras. b) Regresión lineal entre el tamaño de efecto medio (+ EE) de la inoculación con hongos EM sobre el crecimiento de

plántulas, y el peso de la semilla para 34 especies de *Pinus*. Cuanto menor sea el peso de la semilla, más invasiva es una especie. Cada punto representa una especie de *Pinus* diferente.

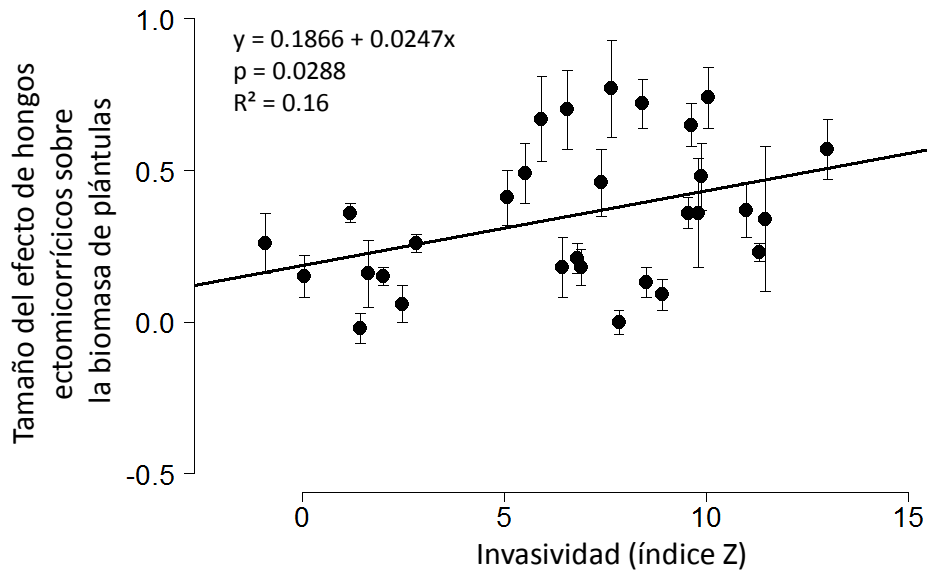


Figura 4.3: Regresión lineal entre el tamaño del efecto medio (+ SE) de la inoculación con hongos ectomicorrízicos sobre la biomasa de plántulas, y la capacidad de invasión de las especies (índice Z) para 30 especies de *Pinus*. Cuanto más alto es el índice Z, más invasiva es una especie. Cada punto representa una especie de *Pinus* diferente.

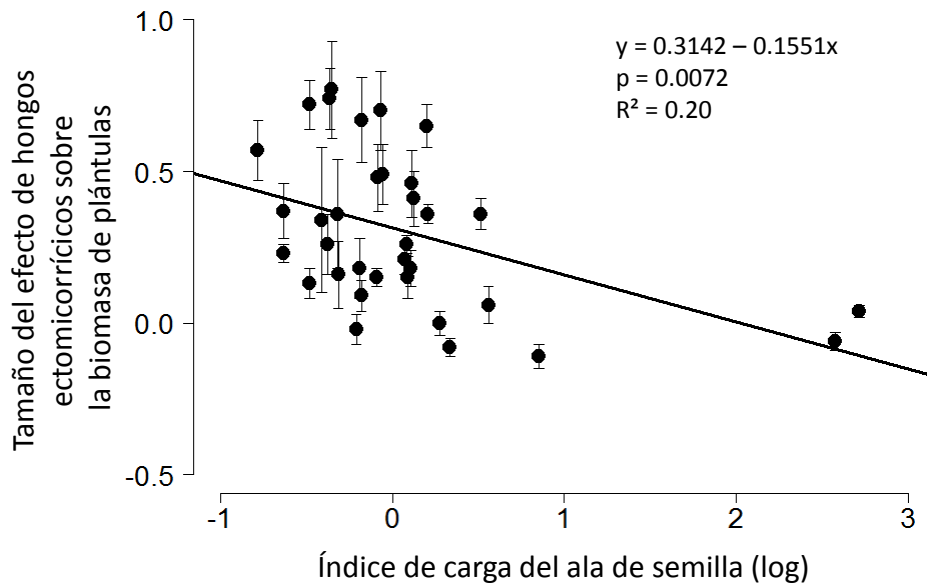


Figura 4.4: Regresión lineal entre el tamaño del efecto medio (+ SE) de la inoculación con hongos ectomicorrízicos sobre la biomasa de plántulas, y el índice de carga del ala de la semilla (relación

entre peso de la semilla y la longitud del ala) para 34 especies de *Pinus*. Cuanto más bajo es el índice de carga del ala de la semilla, más lejos puede dispersarse la semilla por el viento. Cada punto representa una especie de *Pinus* diferente.

Al tener en cuenta las condiciones de cada experimento (experimento de campo o en condiciones controladas, duración del experimento, fertilización, inoculación de una sola especie de hongos o de múltiples especies de hongos, edad de las plántulas cuando se inoculan y ubicación del experimento en el área de distribución nativa o introducida de las especies de *Pinus*) encontramos un efecto significativo de muchas co-variables. La respuesta de las plántulas a los hongos EM aumentó con la duración del experimento (Figura 4.6) y con la inoculación de múltiples especies de hongos (Figura 4.7). Por otro lado, la respuesta micorrícica de las especies disminuyó con la fertilización del suelo (Figura 4.8) y la edad de las plántulas en el momento de la inoculación (Figura 4.9). Sin embargo, la respuesta de crecimiento de las plántulas no se vio afectada por el hecho de que el experimento se llevara a cabo en condiciones controladas o en el campo (Tabla 4.2). Por último, el efecto de la ubicación del experimento en el área de distribución nativa o introducida de las especies de *Pinus* sobre la respuesta del crecimiento de las plántulas a los hongos EM no mostró resultados concluyentes (Tabla 4.2). Cuando utilizamos el índice Z como estimador de la capacidad de invasión de las especies de *Pinus*, encontramos que la respuesta en crecimiento de las plántulas aumentó en el rango nativo (Tabla 4.2a). Sin embargo, cuando utilizamos el peso de la semilla o el índice de carga del ala de la semilla como estimador para la capacidad de invasión no encontramos ningún efecto significativo de la ubicación del experimento sobre la respuesta en crecimiento de las plántulas (Tabla 4.2b y 4.2c).

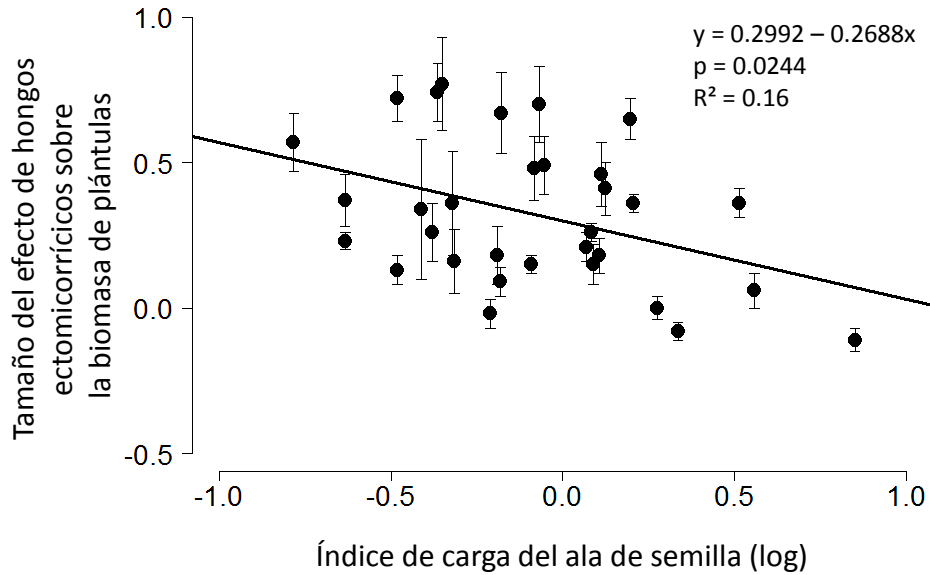


Figura 4.5: Regresión lineal entre el tamaño del efecto medio (+ SE) de la inoculación con hongos ectomicorrícicos sobre la biomasa de plántulas, y el índice de carga del ala de la semilla (relación entre peso de la semilla y la longitud del ala) para 32 especies de *Pinus*. Cuanto más bajo es el índice de carga del ala de la semilla, más lejos puede dispersarse la semilla por el viento. Cada punto representa una especie de *Pinus* diferente.

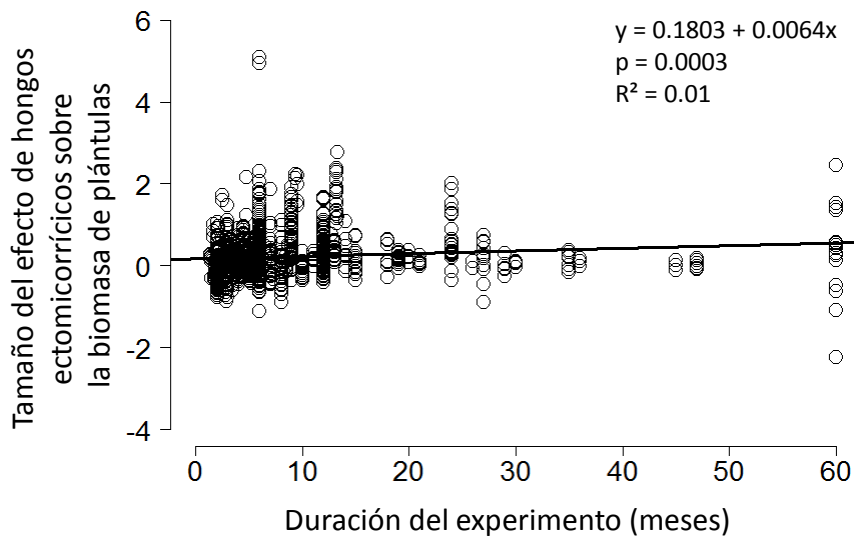


Figura 4.6: Regresión lineal entre el tamaño del efecto de la inoculación con hongos ectomicorrícicos sobre la biomasa de plántulas, y la duración del experimento para los 1206 contrastes incluidos en nuestra base de datos.

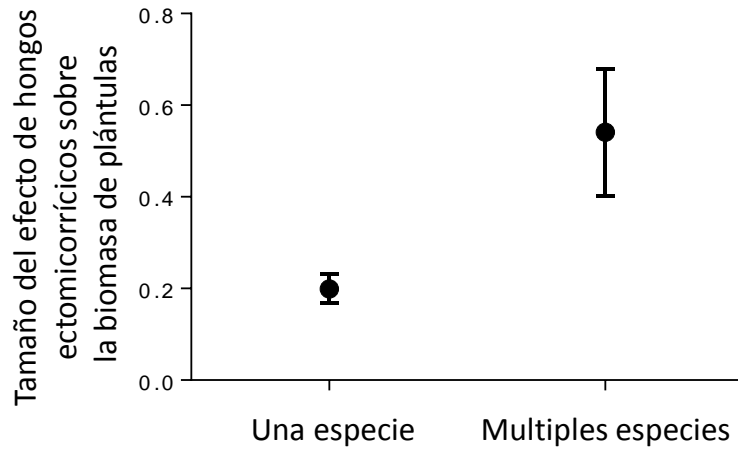


Figura 4.7: Tamaño del efecto de la inoculación con hongos ectomicorrízicos (media + 95% CI) sobre la biomasa de plántulas para los contrastes que se inocularon con una sola especie de hongos (n = 1081) y los contrastes que se inocularon con múltiples especies de hongos (n = 125).

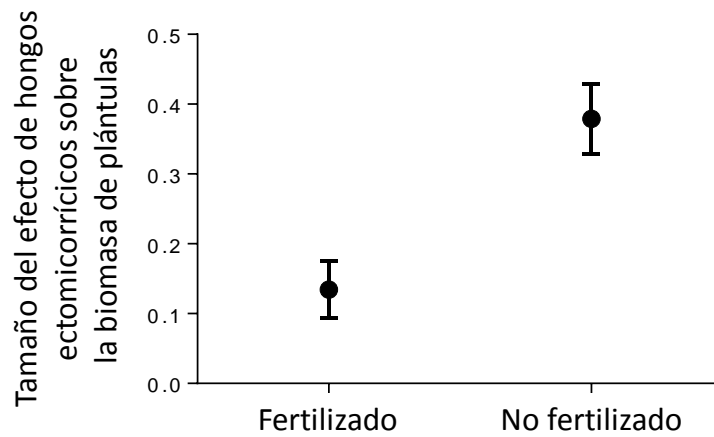


Figura 4.8: Tamaño del efecto de la inoculación con hongos ectomicorrízicos (media ± 95% CI) sobre la biomasa de plántulas para los contrastes que fueron fertilizados (n = 712) y los contrastes que no fueron fertilizados (n = 494).

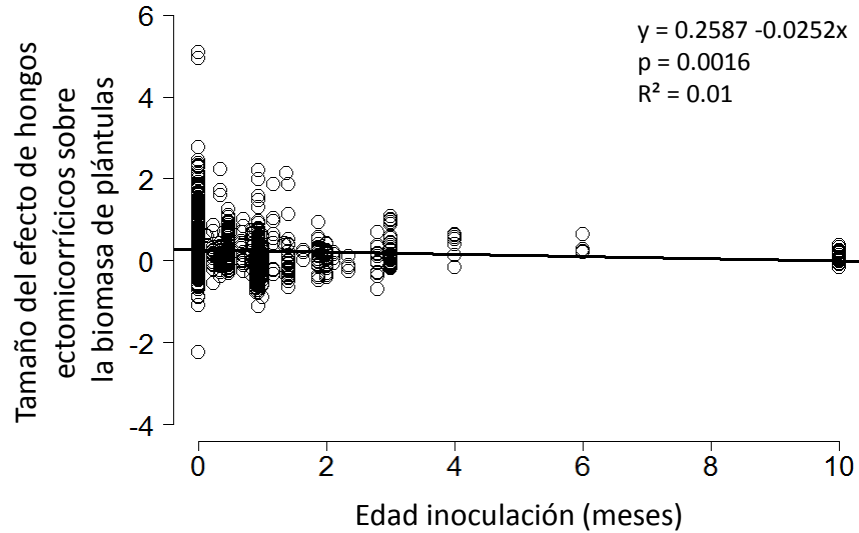


Figura 4.9: Regresión lineal entre el tamaño del efecto de la inoculación con hongos ectomicorrícicos sobre la biomasa de plántulas, y la edad de las plántulas en el momento de la inoculación para los 1206 contrastes incluidos en nuestra base de datos.

Tabla 4.2: Parámetros de la regresión lineal múltiple incluyendo la capacidad de respuesta en biomasa de plántulas de *Pinus* como variable respuesta y las siguientes variables predictivas: tipo de experimento (de campo o de laboratorio), duración del experimento, fertilización (sí o no), inoculación (una o varias especies de hongos), edad de la plántula en el momento de la inoculación, rango (nativo o introducido) y a) índice Z; b) peso de la semilla; c) índice de carga del ala de la semilla. Los efectos significativos ($p < 0,05$) se muestran en negrita.

a)

Variable	Estimate	SE	t	p value
Tipo experimento_lab	0.048	0.039	1.219	0.2230
Duración experimento	0.008	0.002	4.049	< 0.0001
Fertilización_sí	-0.152	0.034	-4.406	< 0.0001
Inoculación_una sp	-0.240	0.053	-4.499	< 0.0001
Edad inoculación	-0.023	0.008	-2.854	0.0044
Rango_Nativo	0.094	0.037	2.550	0.0109
Índice Z	0.013	0.003	4.951	< 0.0001

b)

Variable	Estimate	SE	t	p value
Tipo experimento_lab	0.055	0.040	1.370	0.1710
Duración experimento	0.007	0.002	3.700	< 0.0001
Fertilización_sí	-0.167	0.034	-4.849	< 0.0001
Inoculación_una sp	-0.242	0.054	-4.506	< 0.0001
Edad inoculación	-0.024	0.008	-3.018	0.0026
Rango_nativo	0.052	0.038	1.378	0.1683
Peso semilla	-0.093	0.030	-3.089	0.0021

c)

Variable	Estimate	SE	t	p value
Tipo experimento_lab	0.050	0.040	1.271	0.2039
Duración experimento	0.007	0.002	3.522	0.0004
Fertilización_sí	-0.165	0.034	-4.802	< 0.0001
Inoculación_una sp	-0.247	0.054	-4.612	< 0.0001
Edad inoculación	-0.025	0.008	-3.095	0.0020
Rango_nativo	0.067	0.037	1.803	0.0716
Índice carga ala	-0.076	0.023	-3.302	0.0010

* En los casos de variables categóricas con dos niveles (experimento de campo - experimento de laboratorio; sí fertilización - no fertilización; inoculación una especie - inoculación de múltiples especies de hongos; rango introducido - rango nativo) los niveles de referencia son: experimento de campo, sin fertilización, inoculación de múltiples especies de hongos y rango introducido.

Teniendo en cuenta las condiciones experimentales de cada estudio, el efecto de los hongos EM sobre el crecimiento de las plántulas de *Pinus* aún aumenta con la invasividad de *Pinus* ($p < 0.0001$; Tabla 4.2a), y disminuye con el peso de la semillas ($p = 0.0021$; Tabla 4.2b) y la carga del ala de la semilla ($p = 0.0068$, Tabla 4.2c). No encontramos evidencia que la relación filogenética entre especies influya sobre el efecto de los hongos EM sobre el crecimiento de las plántulas (C media de Abouheif = 0.116, $p = 0.159$) (Münkemüller et al. 2012). Por otro lado, encontramos evidencia de un sesgo de publicación en nuestra base de datos (Spearman's rho = -0.13; $p <$

0.0001), dado por una sobrerrepresentación de los tamaños de efecto positivo en pequeños tamaños muestrales (Figura 4.10). Sin embargo, al incluir el tamaño muestral (es decir, el número de repeticiones) como variable predictiva en nuestros modelos, para tener en cuenta este sesgo de publicación, nuestros resultados no se modificaron (Tabla S4.1).

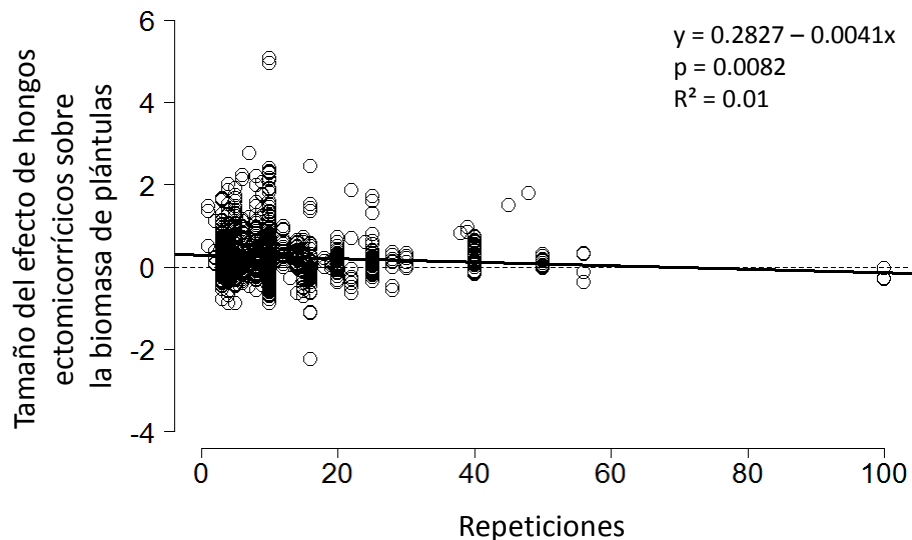


Figura 4.10: Regresión lineal (línea sólida) entre el tamaño del efecto de la inoculación con hongos ectomicorrícicos sobre la biomasa de plántulas, y el número de réplicas del contraste para los 1206 contrastes incluidos en nuestra base de datos. La línea de puntos tiene un intercepto y pendiente iguales a cero.

4.5 Discusión

Contrario a las predicciones teóricas, nuestros resultados muestran que las especies de *Pinus* que son más invasoras dependen más de mutualistas. Los hongos EM generaron mayor crecimiento de las plántulas para las especies de *Pinus* que son más invasoras (mayor índice Z y menor peso de semillas). La interacción entre las plantas y los hongos micorrícicos beneficia a las plantas, en términos de mayor absorción de agua y nutrientes, pero también tiene sus costos, en términos de una proporción de asimilación de carbono destinada a los hongos y no al crecimiento de las

plantas (Johnson et al. 1997; Johnson y Graham 2013). Una posibilidad es que el equilibrio entre los beneficios y los costos de este mutualismo varíe entre las especies de *Pinus* con diferente peso de la semilla. Las semillas más grandes tienden a tener niveles más altos de reservas y a producir plántulas más grandes, que en general tienen raíces más profundas, aumentando la absorción de agua y nutrientes sin necesidad de simbiontes (Baker 1972; Buckley 1982; Gross 1984; Harper et al. 1970; Jakobsson y Eriksson 2000; Stock et al. 1990). En consecuencia, estas plántulas pueden estar menos limitadas por la absorción de las raíces y menos beneficiadas por los hongos EM. Las especies de pinos son plantas micorrícicas obligadas (Koele et al. 2012) y como tales requieren asociaciones con hongos apropiados para sobrevivir (Brundrett y Tedersoo 2018; Smith y Read 2008). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las especies de semillas grandes pueden persistir durante largos períodos de tiempo en zonas con nulo o bajo inóculo micorrícico, ya que sus plántulas pueden sobrevivir más tiempo esperando a los hongos micorrícicos.

Maximizar el crecimiento en presencia de hongos EM podría ser un mecanismo que ayude a explicar por qué las especies de *Pinus* de semillas pequeñas son más invasoras. El tamaño de la semilla es probablemente el rasgo con más evidencia que muestra una relación con la capacidad de invasión de la planta: las especies de semillas más pequeñas son más invasoras (Hamilton et al. 2005; Moravcová et al. 2010; Pyšek et al. 2015; Rejmánek 2000). Según el compromiso entre tamaño de la semilla y número de semillas, las especies pueden producir muchas semillas pequeñas o unas pocas semillas grandes (Henery y Westoby 2001; Jakobsson y Eriksson 2000; Moles y Westoby 2006). Las especies con semillas pequeñas tienden a tener una mayor fecundidad (semillas producidas por adulto y por año), lo que forma parte de una estrategia destinada a producir suficientes propágulos para asegurar que al menos algunas semillas encuentren micrositios adecuados para el crecimiento de las plántulas (Jakobsson y Eriksson 2000). Las semillas más pequeñas tienden a producir plántulas más pequeñas, que son más

susceptibles a condiciones estresantes, como la baja disponibilidad de agua y los bajos niveles de nutrientes (Baker 1972; Buckley 1982; Leishman y Westoby 1994; Moles y Westoby 2004). Sin embargo, facilitadas por el mutualismo con hongos EM estas plántulas son más capaces de sobrevivir y crecer en estas condiciones estresantes (Rapparini y Peñuelas 2014). De esta manera, la estrategia de producir más semillas y asociarse con hongos EM promovería el establecimiento de un mayor número de plántulas que la estrategia de las especies que producen semillas más grandes (y en menor cantidad).

La capacidad de dispersión de una planta también puede estar relacionada con su dependencia del mutualismo con micorrizas. Un reciente meta-análisis demostró que las adaptaciones para la dispersión a larga distancia son más frecuentes en las plantas micorrícicas que en las no micorrícicas (Correia et al. 2018). En nuestro estudio obtuvimos un gradiente, desde una gran dependencia (especies de semillas pequeñas con una baja carga de ala de la semilla) hasta una baja dependencia (especies de semillas grandes con una alta carga de ala de la semilla). Este gradiente puede estar asociado con la capacidad de dispersión de las especies de *Pinus* que difieren en la carga alar de las semillas, donde las especies de semillas pequeñas con alas de semillas relativamente grandes se dispersan más lejos, por medio del viento, que las especies de semillas grandes con alas de semillas relativamente pequeñas (Greene y Johnson 1993; Groom 2010; Zhu et al. 2015). La capacidad de dispersión de las diferentes especies de *Pinus* puede influir en su capacidad de invasión, limitando la dispersión de las especies de semillas grandes con alas de semillas relativamente pequeñas (Rejmánek 1996). Por ejemplo, *Pinus pinea*, una de las especies con la mayor carga alar dentro del género, fue introducida en ~1750 en Sudáfrica pero nunca se convirtió en invasora (van Wilgen y Richardson 2012), posiblemente porque la dispersión de las semillas era muy limitada y las plántulas sólo se encontraban en el sotobosque de las plantaciones (van Wilgen y Siegfried 1986). Nuestro estudio muestra que las especies que se

dispersan a mayores distancias dependen más de los hongos EM. Esto es contrario a lo que esperábamos, porque la disponibilidad de adecuado inóculo micorrícico disminuye con la distancia del árbol madre (Collier y Bidartondo 2009; Hayward et al. 2015; Horton 2017; Nuñez et al. 2009). Sin embargo, cuando los vectores bióticos adecuados aumentan la dispersión micorrícica, la disponibilidad de inóculo de hongos EM puede no limitar la distancia para el establecimiento de *Pinus* (Nuñez et al. 2013; Wood et al. 2015). En este contexto, la asociación positiva entre la dispersión de las semillas y la dependencia de hongos EM puede ser ventajosa para ampliar el rango de distribución de la población de plantas (Correia et al. 2018). Además, la capacidad de dispersarse a mayores distancias puede reducir la competencia entre individuos, aumentando la probabilidad de supervivencia de cada plántula individual (Janzen 1970, Terborgh 2013, Olsson et al. 2019) y, por lo tanto, contribuyendo al crecimiento de la población (Law et al. 2003) y a su rápida expansión (Clark et al. 2001).

En concordancia con estudios anteriores, nuestros resultados muestran que la respuesta del crecimiento de las plántulas de *Pinus* a los hongos EM aumentó con la duración del experimento (Lekberg y Helgason 2018) y la inoculación de múltiples especies de hongos (Dalong et al. 2011; Perry et al. 1989). Por otra parte, la respuesta en crecimiento de las plántulas disminuyó con la fertilización del suelo, al igual que lo encontrado por Browning y Whitney (1992) y Diaz et al. (2010). Esto podría deberse a que en suelos de altos niveles de nutrientes la ventaja que aportan las micorrizas, aumentando la absorción de nutrientes, ya no es relevante. No encontramos resultados concluyentes en cuanto a la respuesta de las especies a la inoculación con hongos EM en el rango nativo en comparación con el rango introducido. A este respecto, no encontramos pruebas de una menor dependencia micorrícica de *Pinus* en su rango introducido, a diferencia de lo que se ha encontrado en otros trabajos (Pringle et al. 2009; Seifert et al. 2009).

Los indicadores indirectos de la capacidad de invasión de las especies son muy útiles, pero no se espera que ninguno de ellos prediga todas las invasiones exitosas y fallidas. En las invasiones biológicas intervienen muchos factores, lo que hace que sean extremadamente difíciles de predecir (Seebens et al. 2016; van Kleunen et al. 2015). En el caso de *Pinus*, algunos de los factores que impulsan las invasiones no están relacionados con la capacidad de invasión de las especies, sino con factores biogeográficos o humanos (Essl et al. 2010; McGregor et al. 2012). No obstante, los atributos invasores han demostrado ser buenos predictores del éxito de la invasión. Por ejemplo, todas las especies de *Pinus* con un índice Z positivo (es decir, clasificadas como invasoras) que se han introducido en nuevas regiones se han convertido en invasoras fuera de su área de distribución nativa (Grotkopp et al. 2004). Además, según una base de datos mundial de árboles y arbustos invasores, el 90% de las especies de *Pinus* que se han convertido en invasoras en todo el mundo han sido clasificadas como invasoras según el índice Z (Rejmánek y Richardson 2013). Además, de acuerdo a una base de datos recientemente compilada de ocurrencias especies de *Pinus* naturalizadas, el índice Z está alta y positivamente correlacionado con el número de sitios donde cada especie se ha naturalizado ($p < 0,0001$; $R^2 = 0,38$) (Perret et al. 2019). Sin embargo, algunas de las especies de *Pinus* consideradas no invasoras no han sido ampliamente introducidas fuera de su área de distribución nativa (Essl et al. 2010; McGregor et al. 2012), lo que da lugar a una reducción del número de oportunidades de invasión (Lockwood et al. 2005). Reconocemos que esta aproximación a la capacidad de invasión de los pinos no es un predictor perfecto del éxito de la invasión, pero la consideramos un indicador útil de la probabilidad de que una especie se convierta en invasora cuando se introduce en una nueva región.

Nuestros resultados muestran que las especies de *Pinus* que son más invasoras responden más al mutualismo con hongos EM, y este patrón puede permanecer consistente a través de otros taxones. Por ejemplo, el mismo patrón de disminución de la respuesta a las micorrizas con

aumento del peso de la semilla se encontró para especies pertenecientes a muchas familias de plantas en un bosque tropical (Janos 1980), para especies de la familia Ericaceae (Allsopp y Stock 1992) y para especies de la subclase Rosidae (Allsopp y Stock 1995). Por otro lado, Reinhart et al. (2017) no encontraron pruebas que la capacidad de invasión de las plantas estuviera asociada con la capacidad de respuesta micorrícica para las familias Poaceae y Asteraceae. Además, los resultados de nuestro estudio pueden tener implicaciones no sólo para el mutualismo entre plantas y hongos micorrícicos sino también para otros tipos de mutualismos como la polinización o la dispersión de semillas. Sin embargo, no todos los tipos de mutualismos tendrán el mismo impacto en las invasiones de plantas (Richardson et al. 2000a; Traveset y Richardson 2014). Por ejemplo, muchas plantas pueden sobrevivir y reproducirse en ausencia de sus dispersores de semillas (aunque algunas especies de plantas requieren pasar por tracto digestivo de un dispersor para que la semilla germine), mientras que para muchas plantas la reproducción se verá muy afectada en ausencia de polinizadores, y la mayoría de las plantas ni siquiera sobrevivirán sin los hongos micorrícicos apropiados (con excepción de las plantas no micorrícicas y las micorrícicas facultativas, que sólo representan el 15% de todas las plantas terrestres; Brundrett y Tedersoo 2018). Es necesario seguir investigando para evaluar la relación entre la capacidad de invasión de las plantas y la dependencia de los polinizadores y los dispersores de semillas.

En conclusión, presentamos evidencia concreta que cuestiona la hipótesis que las especies con mayor capacidad de invasión dependen menos de los mutualismos. Nuestros resultados muestran que las especies invasoras capitalizan mejor los beneficios de los mutualismos que las especies no invasoras de mismo género. Nuestro trabajo destaca la importancia de las interacciones entre plantas y hongos micorrícicos para explicar el éxito y la propagación de las especies no nativas. Este resultado puede ayudar a explicar la alta prevalencia de mutualismos como las micorrizas en plantas terrestres donde el 92% de todas las plantas están asociadas con

hongos micorrícicos (Brundrett y Tedersoo 2018). Depender en gran medida de los mutualismos para la colonización de nuevas áreas tiene claramente costos asociados, pero esos costos parecen ser superados por los beneficios obtenidos.

Capítulo 5: Los patrones de naturalización de plantas muestran que las plantas micorrícicas facultativas tienen más probabilidades de éxito fuera de su área de distribución nativa

La sección que sigue es una versión levemente modificada de un artículo publicado en *Ecography*:

Moyano J, Dickie IA, Rodríguez-Cabal MA, Nuñez MA (2020) Patterns of plant naturalization show that facultative mycorrhizal plants are more likely to succeed outside their native Eurasian ranges.

Ecography 43: 648-659

El uso de “nosotros” en este capítulo se refiere a mis co-autores y yo. Como primer autor yo era responsable de este artículo.

5.1 Resumen

La naturalización de una especie introducida es una etapa clave durante el proceso de invasión. Por lo tanto, la identificación de los atributos que favorecen la naturalización de las especies no nativas puede ayudar a comprender por qué algunas especies tienen más éxito cuando se introducen en nuevas regiones que otras. La capacidad y la necesidad de una planta de formar un mutualismo con hongos micorrícicos, junto con los tipos de asociaciones formadas, pueden desempeñar un papel central en el éxito de la naturalización de las diferentes especies de plantas. Para comprobar la relación entre el éxito de la naturalización de las plantas y sus asociaciones micorrícicas construí una base de datos compuesta por la condición micorrícica y el tipo de micorrizas de 1981 especies, abarcando 155 familias y 822 géneros de plantas de Europa y Asia, y la combiné con la base de datos más completa de especies no nativas naturalizadas de todo el mundo (GloNAF). En las regiones continentales, encontré que el número de regiones naturalizadas era más alto para las plantas micorrícicas facultativas, seguido de las micorrícicas obligadas y más bajo para las plantas no micorrícicas, lo que sugiere que la capacidad de formar micorrizas es una ventaja para las plantas introducidas. Consideramos los siguientes tipos de micorrizas: arbusculares, ectomicorrizas, ericoides y orquioides. Además, las especies micorrícicas duales eran las que incluían observaciones de micorrizas arbusculares así como observaciones de ectomicorrizas. El éxito de la naturalización fue mayor en el caso de las plantas micorrícicas arbusculares y micorrícicas duales, lo que puede estar relacionado con la baja especificidad del huésped de los hongos micorrícicos arbusculares y la consiguiente alta disponibilidad de hongos micorrícicos arbusculares. Sin embargo, este patrón de éxito en la naturalización desapareció en las islas, lo que sugiere que la capacidad de formar micorrizas puede no ser una ventaja para establecer poblaciones en regiones aisladas. En conjunto, nuestros resultados muestran que la

condición micorrícica de las plantas y el tipo de micorrizas desempeñan un papel central en el proceso de naturalización de las plantas introducidas en muchas regiones, pero que su efecto está modulado por otros factores.

5.2 Introducción

Comprender por qué algunas especies de plantas son capaces de naturalizarse y convertirse en invasoras mientras que otras fracasan es una pregunta fundamental en ecología (van Kleunen et al. 2015). Del total de especies de plantas introducidas en una nueva región una pequeña fracción se naturaliza, y de éstas solo una pequeña fracción se convierte en invasora (Caley et al. 2008; Williamson y Fitter 1996). Por lo tanto, la naturalización de una especie no nativa (es decir, cuando establece una población viable) es el primer filtro importante en el proceso de invasión de una especie que ha sido introducida (Blackburn et al. 2011; Richardson et al. 2000b). La identificación de los atributos que favorecen el éxito de la naturalización es clave para comprender por qué algunas especies de plantas se convierten en invasoras (Richardson y Pyšek 2012). Se ha propuesto que las especies que dependen de los mutualismos, como los polinizadores animales, tienen menos probabilidades de establecerse en nuevos sitios (Baker 1965; Baker 1974; Burns et al. 2011; Razanajatovo et al. 2016). Otro mutualismo que podría ser vital durante la etapa de naturalización de las plantas no nativas es la interacción entre las plantas y los hongos micorrícicos (Brundrett y Tedersoo 2018; Dickie et al. 2017; Richardson y Pyšek 2012; Smith y Read 2008). En este sentido, en el capítulo 4 encontramos que una mayor dependencia de hongos micorrícicos podría favorecer la capacidad de invasión de las plantas.

Las plantas varían ampliamente en sus asociaciones con hongos micorrícicos (es decir, la condición micorrícica de una planta). Las plantas no micorrícicas no se asocian con hongos micorrícicos y, por lo tanto, son completamente independientes de este mutualismo. Por el contrario, las plantas micorrícicas funcionalmente obligadas (en adelante "obligadas") requieren de asociaciones con hongos micorrícicos apropiados para sobrevivir en los ecosistemas naturales. Por último, las plantas micorrícicas facultativas forman micorrizas pero pueden, en algunas condiciones, sobrevivir sin micorrizas (Brundrett y Tedersoo 2018; Smith y Read 2008). Además, hay diferentes tipos de micorrizas: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, micorrizas orquióides y micorrizas ericoides (Brundrett 2009; Brundrett y Tedersoo 2018; Moora 2014; van der Heijden et al. 2015). En las micorrizas arbusculares las hifas del hongo penetran las células de la raíz de la planta, formando vesículas y arbusculos. En las ectomicorrizas las hifas no penetran las células de la raíz. En las micorrizas orquióides el hongo penetra las células de la raíz de las orquídeas formando bobinas. Finalmente, en las micorrizas ericoides el hongo penetra las células de la raíz de las ericáceas para formar ovillos (Smith y Read 2008). A su vez, las plantas micorrícicas duales son aquellas que incluyen individuos que se asocian con hongos micorrícicos arbusculares, individuos que se asocian con hongos ectomicorrícicos e individuos que se asocian con ambos (Adjoud-Sadadou y Halli-Hargas 2017; Chilvers et al. 1987; Harley y Smith 1983; Teste et al. 2019). Cuando una especie vegetal se introduce en una nueva región, el tipo de micorrizas que forma puede afectar a la probabilidad de encontrar hongos micorrícicos adecuados (Nuñez y Dickie 2014).

Las plantas pueden naturalizarse en una región introducida sin estar limitadas por la falta de hongos micorrícicos por diferentes vías (Nuñez y Dickie 2014). En primer lugar, una planta puede no depender de las micorrizas por ser una especie no micorrícica o micorrícica facultativa (15 % de todas las plantas terrestres) (Brundrett y Tedersoo 2018). No depender de las micorrizas

hace posible que estas especies tengan éxito en entornos en los que no pueden encontrar hongos micorrícicos (Nuñez y Dickie 2014). Se ha propuesto que en la mayoría de las situaciones se dispone de hongos micorrícicos y que las plantas no micorrícicas están en desventaja en comparación con las especies micorrícicas (Richardson et al. 2000a). Sin embargo, en algunos casos estas interacciones mutualistas pueden verse perturbadas por la falta de simbiontes (Dickie et al. 2017), por ejemplo en islas aisladas (Carlquist 1974; Trøjelsgaard et al. 2015). Además, las plantas no micorrícicas pueden tener una ventaja competitiva en lugares muy perturbados (Delavaux et al. 2019). Por otra parte, las plantas micorrícicas facultativas pueden tener éxito tanto en ausencia de hongos micorrícicos como cuando se dispone de estos simbiontes (Smith y Read 2008), lo que puede permitir a las especies micorrícicas facultativas progresar en un contexto más amplio. Las plantas también pueden formar nuevas asociaciones con hongos micorrícicos, ya sean simbiontes nativos o no nativos (Dickie et al. 2010), aunque esto puede ser difícil de evaluar porque la distribución nativa de la mayoría de los hongos es poco conocida (Pringle y Vellinga 2006). Se han encontrado nuevas asociaciones para el eucalipto ectomicorrícico (Tedersoo et al. 2007), y para las pináceas ectomicorrícicas (Bahram et al. 2013; Moeller et al. 2015). La formación de asociaciones novedosas también puede ser posible para las plantas micorrícicas arbusculares, ya que los hongos micorrícicos arbusculares no tiene especificidad con respecto a sus hospederos (van der Heijden et al. 2015).

Las plantas no nativas también pueden formar asociaciones con simbiontes familiares (cosmopolitas). Por ejemplo, se ha sugerido que más del 40% de los hongos micorrícicos arbusculares tienen esa distribución transcontinental (Moora et al. 2011; Stürmer et al. 2018; pero véase Bruns y Taylor 2016). Además, las plantas pueden co-invasión con los hongos micorrícicos de su rango nativo (Dickie et al. 2010). La co-invasión parece ser la vía más probable para las plantas ectomicorrícicas y orquioides, cuyos simbiontes pueden requerir hospedadores específicos (Dickie

et al. 2017; van der Heijden et al. 2015). La capacidad de dispersión de los hongos, que es muy variable entre las especies de hongos (Peay et al. 2012), es particularmente importante para la vía de co-invasión porque las plantas sólo se establecerán en lugares donde sus simbiontes se hayan dispersado. A este respecto, puede ocurrir que muchas especies de hongos ectomicorrícicos se dispersen más fácilmente que los hongos micorrícicos arbusculares porque producen cuerpos fructíferos (esporocarpos) que mejoran la dispersión de esporas fúngicas (Tedersoo et al. 2010), especialmente cuando esos esporocarpos son consumidos por los dispersores bióticos (Nuñez et al. 2013; Wood et al. 2015). El número de posibilidades disponibles para las diferentes especies de plantas varía según su condición micorrícica y tipo de micorrizas que forma. A este respecto, las plantas que dependen más de las micorrizas y que forman interacciones mutualistas específicas con sus simbiontes pueden estar más limitadas cuando se introducen en una nueva región y es menos probable que se naturalicen (Nuñez y Dickie 2014).

En este capítulo evaluamos la relación entre el éxito de la naturalización de las plantas y su condición micorrícica y tipo de micorrizas que forman. Específicamente, construimos y analizamos una base de datos de condición micorrícica (no micorrícica, obligada y facultativa) y el tipo de micorrizas (micorrícico arbuscular, ectomicorrícica, micorrícica ericoide, micorrícica orquioide y micorrícica dual) para 1981 especies de plantas vasculares (abarcando 155 familias y 822 géneros) y combinamos este registro con la base de datos más completa sobre plantas no nativas naturalizadas (GloNAF) (van Kleunen et al. 2019). GloNAF incluye información sobre la ocurrencia y la identidad de especies de plantas exóticas naturalizadas en diferentes regiones de todo el mundo. Dado que las plantas micorrícicas facultativas pueden tener éxito tanto en ausencia de hongos micorrícicos como cuando éstos están disponibles, esperamos que tengan un mayor éxito de naturalización que las especies micorrícicas obligadas y que las especies no micorrícicas. Además, nos preguntamos si la especificidad del hongo micorrícico favorece o dificulta el éxito de

la naturalización de la planta. Predecimos que las plantas micorrícicas arbusculares, cuyos simbiontes son menos específicos (van der Heijden et al. 2015), se han naturalizado más que los otros tipos de plantas. Además, para evaluar la influencia del tipo de región en los patrones de éxito de la naturalización analizamos nuestros datos para las regiones continentales y para las regiones insulares por separado. Debido a una menor disponibilidad de hongos micorrícicos por la menor proporción de plantas micorrícicas nativas en islas (Delavaux et al. 2017), esperamos que las plantas no micorrícicas muestren un mayor éxito de naturalización en las islas.

5.3 Metodología

5.3.1 Base de datos

Recopilamos información sobre la condición micorrícica y el tipo de micorrizas de diferentes fuentes: una base de datos sobre la ocurrencia de micorrizas en especies de plantas vasculares en Europa oriental y el norte de Asia (Akhmetzhanova et al. 2012), una base de datos sobre asociaciones micorrícicas de especies de plantas en Europa central (Hempel et al. 2013), una base de datos sobre asociaciones micorrícicas de plantas en toda Europa (Bueno et al. 2017) y una base de datos sobre la ocurrencia de micorrizas en plantas vasculares de Europa y el norte de Asia (Correia et al. 2018). Verificamos las entradas en varias bases de datos y sus referencias citadas para reducir al mínimo los errores. Incluimos tres condiciones micorrícicas: no micorrícica, micorrícica obligada y micorrícica facultativa. Clasificamos cada especie vegetal en una condición micorrícica según las observaciones de las asociaciones micorrícicas (o la ausencia de asociaciones micorrícicas) directamente en las raíces de las plantas, a nivel de planta individual, siguiendo un enfoque utilizado repetidamente en estudios anteriores (Bueno et al. 2017; Correia et al. 2018;

Hempel et al. 2013; Menzel et al. 2017). Las especies no micorrícicas eran las que incluían sólo observaciones (en plantas individuales) de ausencia de asociaciones micorrícicas, y las especies micorrícicas obligadas eran las que incluían sólo observaciones de asociaciones micorrícicas. Las especies facultativas eran las que incluían observaciones de asociaciones micorrícicas (ya sea con hongos micorrícicos arbusculares o ectomicorrícicos) así como observaciones de ausencia de asociaciones micorrícicas. Se consideró un mínimo de dos observaciones independientes de cada condición micorrícica (asociaciones micorrícicas y ausencia de asociaciones micorrícicas) para clasificar una especie como micorrícica facultativa a fin de reducir la influencia de los errores del observador. El número de especies con observaciones de asociaciones micorrícicas de ericoideas facultativas o de orquioideas facultativas era demasiado bajo para considerarlas en nuestros análisis. Es importante señalar que estas tres condiciones micorrícicas sólo indican el estado observado de colonización de las raíces y no incluyen información sobre la funcionalidad, como la dependencia micorrícica. Hubo algunos conflictos entre bases de datos, causadas por Correia et al. (2018), que no incluían las categorías de ectomicorrizas facultativas y micorrizas duales. A este respecto, Correia et al. (2018) consideraron como plantas ectomicorrícicas obligadas aquellas con observaciones de este tipo de micorrizas, sin tener en cuenta las especies ectomicorrícicas facultativas (ectomicorrícicas - no micorrícicas) o las especies micorrícicas duales (arbusculares - ectomicorrícicas). Por lo tanto, comprobamos todas las especies de plantas clasificadas como ectomicorrícicas obligadas según Correia et al. (2018) en su fuente de datos original y en otras bases de datos micorrícicas para evaluar si alguna especie de planta fue clasificada originalmente como ectomicorrícica facultativa o como micorrícica dual.

Basándonos en la literatura consideramos cinco tipos de micorrizas dentro del estado micorrícico obligado: micorrícica arbuscular, ectomicorrícica, micorrícica ericoide, micorrícica orquioide y micorrícica dual (Correia et al. 2018; Moora 2014; Smith y Read 2008). Las especies

micorrícicas duales eran las que incluían observaciones de micorrizas arbusculares así como observaciones de ectomicorrizas (al menos dos observaciones independientes de cada tipo de micorriza). El número de especies de plantas con observaciones de asociaciones micorrícicas duales que incluían tipos micorrícicos de ericoides u orquioides era demasiado bajo para considerarlas en nuestros análisis. Estandarizamos los nombres de las especies de acuerdo con “The Plant List” (www.theplantlist.org) utilizando la función TPL del paquete "taxonstand" (Cayuela et al. 2012).

Utilizamos los datos sobre la naturalización de las especies de plantas vasculares de la base de datos GloNAF versión 1.2 (van Kleunen et al. 2019). La base de datos GloNAF es la fuente de datos más completa sobre especies de plantas exóticas vasculares naturalizadas. Esta base de datos incluye información de 13.939 taxones y 1029 regiones, basada en 210 fuentes de datos (van Kleunen et al. 2019). Una región se define aquí como la zona geográfica más pequeña para la que se dispone de una lista de especies de plantas exóticas. Del número total de regiones se considera un subconjunto de 648 como regiones continentales y un subconjunto de 381 como regiones insulares. Tanto las regiones continentales como las insulares varían ampliamente en cuanto a su superficie. Los nombres de las especies que figuran en la base de datos de GloNAF ya están normalizados de acuerdo a “The Plant List”. Combinamos nuestra base de datos sobre la condición micorrícica y el tipo de micorrizas con la base de datos GloNAF. De las 3719 especies de nuestra base de datos sobre micorrizas, 1981 se registraron como naturalizadas en al menos una región según la base de datos GloNAF. Para estas 1981 especies calculamos el éxito de la naturalización como el número de regiones en las que cada especie se reporta como naturalizada. Esto sería un indicador de la tendencia a la propagación, o de la capacidad de invasión, de una especie de planta perteneciente a un grupo particular. También calculamos el éxito de la naturalización como el área donde cada especie se naturaliza (sumando las áreas de todas las

regiones donde la especie se reporta como naturalizada) para evaluar si obtenemos los mismos patrones de éxito de la naturalización.

5.3.2 Análisis estadísticos

Para evaluar la relación entre el éxito en la naturalización de las plantas (como el número de regiones naturalizadas) y la condición micorrícica y tipo de micorrizas de las plantas, utilizamos modelos filogenéticos lineales. Ajustamos las regresiones lineales filogenéticas usando el paquete "phylolm" (Ho y Ane 2014). Utilizando las regresiones filogenéticas, podemos realizar análisis que tengan en cuenta la relación filogenética entre las especies para separar el efecto de la filogenia del efecto de otras variables predictivas. Para evaluar si los patrones de éxito de la naturalización se vieron afectados por las diferencias de superficie entre las regiones, repetimos los análisis utilizando la superficie en la que se ha naturalizado la especie. Como variables predictivas utilicé el estado micorrícico o el tipo de micorriza. También incluimos el número de referencias para cada condición micorrícica y cada tipo de micorriza como variable predictiva para tener en cuenta un posible sesgo en las bases de datos de micorrizas. Para evaluar si los patrones de éxito de la naturalización varían con el tipo de región, repetimos nuestros análisis sólo considerando las regiones continentales y sólo considerando las regiones insulares. Finalmente, para probar el efecto de la condición micorrícica tendiendo el cuento el tipo de micorrizas, utilizamos tres subconjuntos diferentes de datos: 1) plantas micorrícicas arbusculares, 2) plantas ectomicorrícicas y 3) plantas micorrícicas duales. Dentro de cada subconjunto comparamos el éxito de la naturalización de las plantas micorrícicas obligadas frente a las facultativas. En otras palabras, comparamos el éxito de la naturalización de: 1) plantas micorrícicas arbusculares obligadas vs.

plantas micorrícicas arbusculares facultativas, 2) plantas ectomicorrícicas obligadas vs. plantas ectomicorrícicas facultativas, y 3) plantas micorrícicas duales obligadas vs. plantas micorrícicas duales facultativas.

Para ajustar estas regresiones filogenéticas construimos un árbol filogenético que incluye las 1981 especies de plantas incluidas tanto en nuestra base de datos de micorrizas como en la base de datos GloNAF utilizando un superárbol para plantas vasculares construido por Zanne et al. (2014), que fue corregido y ampliado por (Qian y Jin 2016). Para construir el árbol filogenético utilizamos la función "S.PhyloMaker" implementada para el paquete "fitools" (Qian y Jin 2016; Revell 2012). Probamos los supuestos del modelo y estos fueron válidos en todos los casos. Usamos una transformación logarítmica de la variable de respuesta (ya sea el número de regiones naturalizadas o el área naturalizada) para lograr la normalidad, como recomienda Mundry (2014). Evaluamos la homogeneidad de la varianza para cada modelo, comprobando que no había un patrón claro entre los residuos del modelo y los valores ajustados (Quinn y Keough 2002). Además, ninguna de las especies de plantas del conjunto de datos mostraba una distancia de Cook superior a 1, lo que indica la ausencia de casos influyentes (Cook y Weisberg 1982).

Las bases de datos sobre condición micorrícica de las plantas incluyen errores a una tasa estimada cercana al 10% (Brundrett y Tedersoo 2018), lo que puede tener importantes repercusiones en los resultados obtenidos de los análisis basados en esas bases de datos (Dickie et al. 2007). De particular importancia son las fuentes sesgadas de errores porque pueden tener una fuerte influencia en los resultados. Una fuente sesgada de errores que afecta a la clasificación de la condición micorrícica de las plantas es el número de observaciones por especie vegetal: las especies vegetales con más observaciones tienen más probabilidades de ser clasificadas como micorrícicas facultativas (Dickie et al. 2017). Las plantas micorrícicas facultativas sólo pueden

identificarse cuando la misma especie vegetal incluye tanto observaciones de la condición micorrícica obligada como observaciones la condición no micorrícica (Smith y Read 2008). Por lo tanto, las plantas con una sola observación sólo pueden ser micorrícicas obligadas o no micorrícicas. Por otra parte, es probable que las plantas con muchas observaciones se consideren micorrícicas facultativas debido a los errores de observación (Dickie et al. 2017). Por ejemplo, una planta micorrícica arbuscular puede ser clasificada erróneamente como no micorrícica por un nuevo observador y la probabilidad de estos errores aumenta con el número de observaciones.

En estudios anteriores no se ha corregido por estos errores o bien se ha comprobado la sensibilidad de los resultados a los errores añadiendo ruido aleatorio a la asignación de la condición micorrícica (Bueno et al. 2017). Este enfoque no tiene en cuenta los sesgos provocados por el aumento en el número de observaciones. Sugerimos que incluir directamente el número de referencias en los modelos estadísticos es un enfoque robusto para tratar este sesgo. Para evaluar la presencia de sesgos debidos a un número diferente de observaciones por especie de planta en nuestra base de datos hemos ajustado las regresiones logísticas. Utilizamos el número de referencias (como aproximación al número de observaciones) para cada especie de planta como variable predictiva y la probabilidad de ser clasificado como micorrícica facultativa como variable de respuesta. Si el número de referencias aumentara la probabilidad de ser facultativo tendríamos una fuente sesgada de errores. Además, las especies de plantas que se han propagado ampliamente fuera de su área de distribución nativa tendrían más probabilidades de ser encontradas en los estudios y, por lo tanto, tendrían más referencias. En consecuencia, las especies vegetales que se han propagado más ampliamente tendrían más probabilidades de ser clasificadas como micorrícicas facultativas. Para evaluar el efecto del número de referencias en el éxito de la naturalización (ya sea el número de regiones naturalizadas o el área naturalizada) de las especies de plantas, incluimos directamente el número de referencias como variable predictiva en

nuestras regresiones filogenéticas lineales. Por lo tanto, si encontráramos que el número de referencias era una fuente de sesgo y que afectaba al éxito de la naturalización de las plantas, podríamos abordar esta cuestión incluyendo el número de referencias como una variable predictiva en nuestros modelos. Entonces, el número de referencias para cada especie de planta y la condición micorrícica y tipo micorrícico eran las variables predictivas, mientras que el éxito de la naturalización era la variable de respuesta en nuestros modelos. De esta manera podíamos evaluar el efecto de la condición micorrícica y tipo micorrícico, y al mismo tiempo tener en cuenta el efecto del número de referencias. Realizamos todos los análisis utilizando el software R v 3.5.1 (R Core Team 2018).

5.4 Resultados

En nuestra base de datos la gran mayoría de las especies de plantas formaron micorrizas (80%), incluyendo 631 especies de plantas (17%) clasificadas como micorrizas facultativas y 2358 especies de plantas (63%) clasificadas como micorrizas obligadas. Clasificamos 730 especies de plantas (20%) como no micorrícicas (Figura 5.1a). La condición micorrícica obligada incluía 1926 especies micorrícicas arbusculares (82%), 250 ectomicorrícicas (11%), 92 micorrícicas orquioides (3%), 45 micorrícicas ericoides (2%) y 45 especies de plantas micorrícicas duales (2%) (Figura 5.1b). La proporción de especies naturalizadas que pertenecen a cada condición micorrícica mostró una alta variabilidad entre regiones, desde casos de 100% micorrícica facultativa, hasta 100% micorrícica obligada e incluso unos pocos casos en que las únicas especies naturalizadas eran no micorrícicas (Figura 5.2).

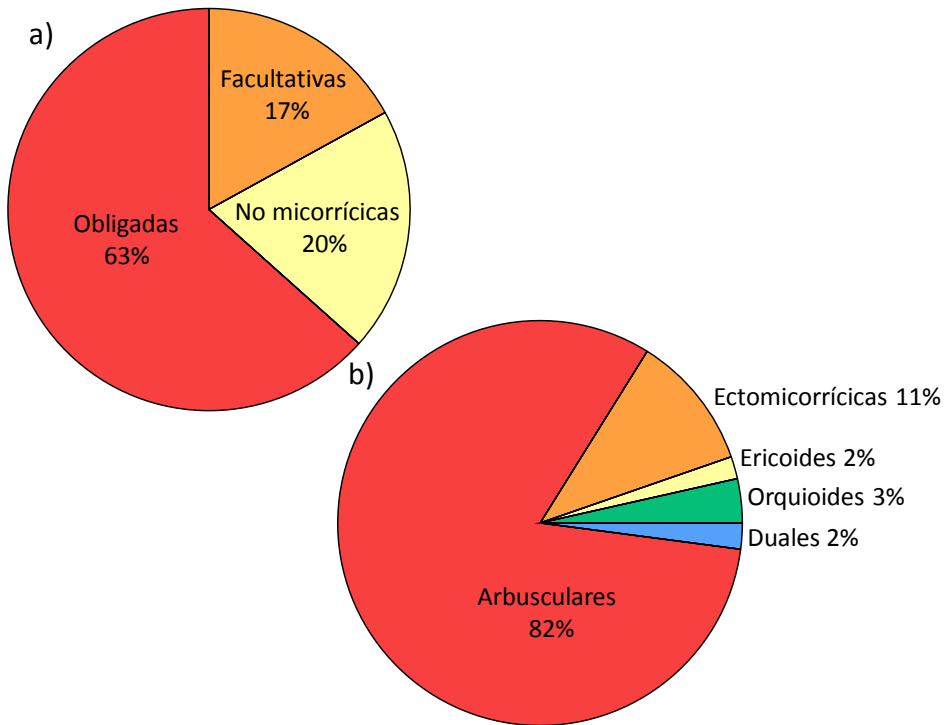
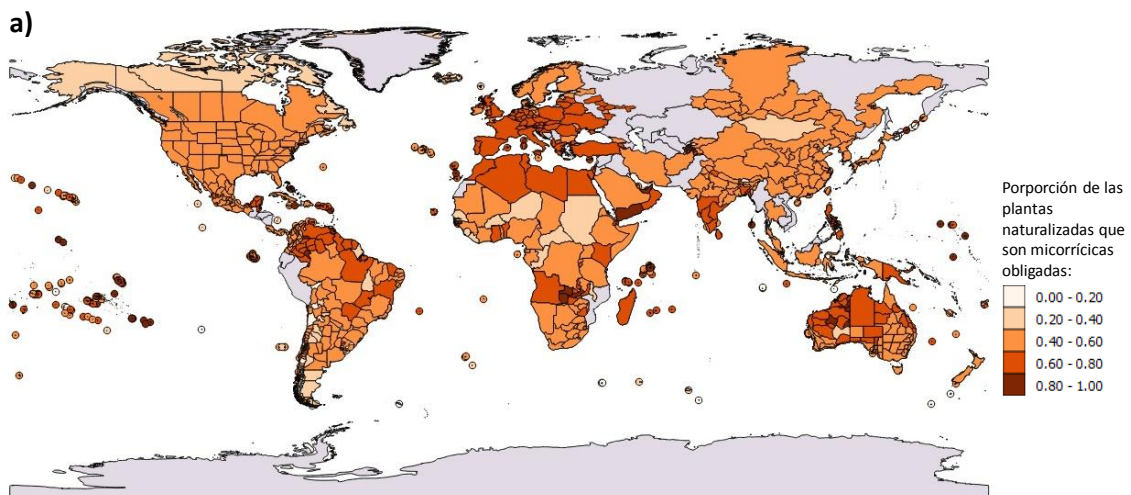


Figura 5.1: Porcentaje de especies vegetales que corresponden a cada a) condición micorrícica (n = 3719) y b) tipo micorrícico dentro de la condición micorrícica obligada (n = 2358).



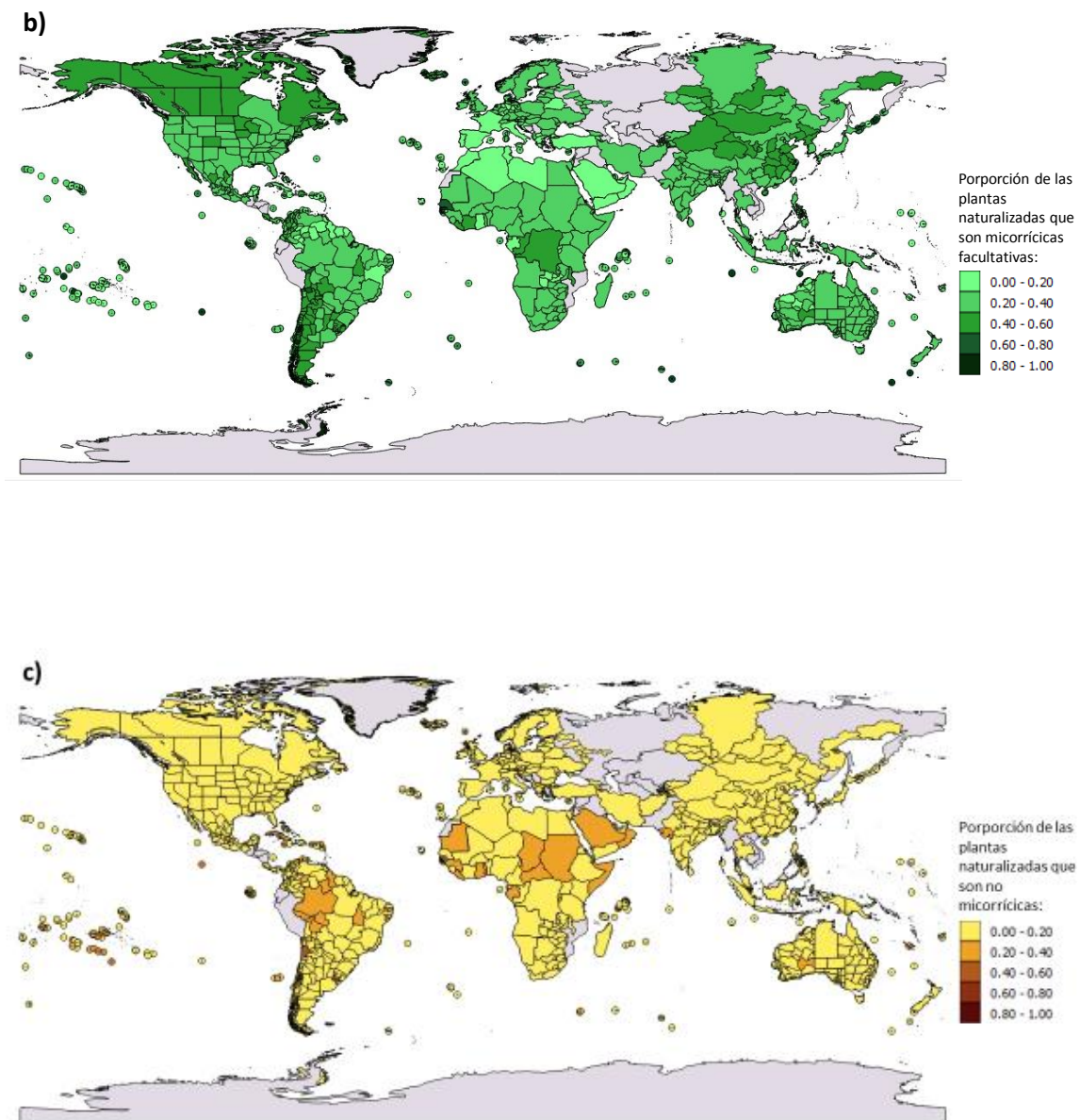
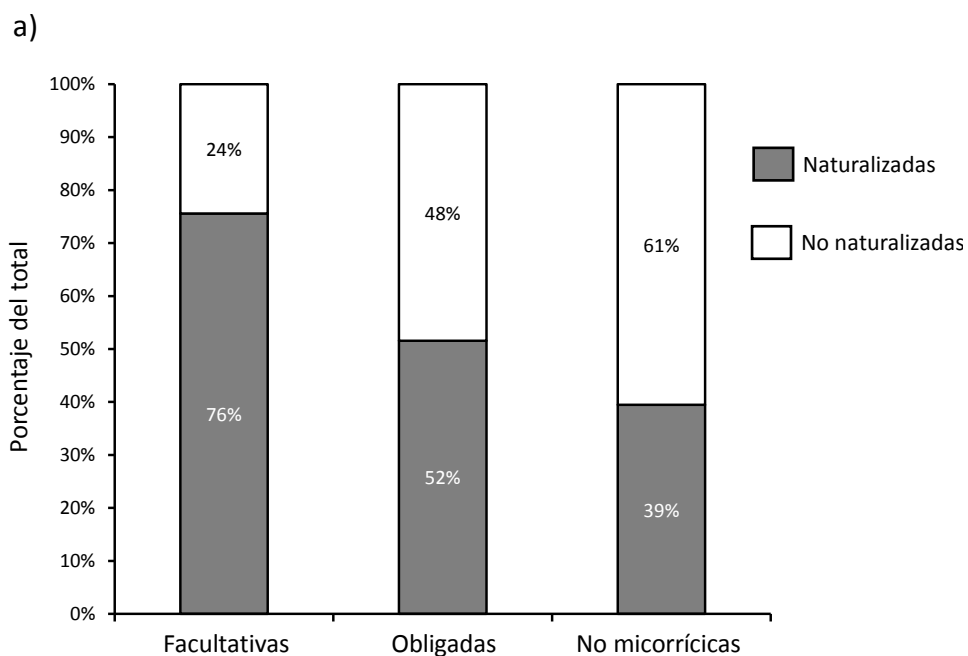


Figura 5.2: Mapa mundial que muestra la proporción de especies naturalizadas que son a) micorrícicas obligadas, b) micorrícicas facultativas y c) no micorrícicas para todas las regiones incluidas en nuestro estudio. Coloreamos cada región según una escala graduada. En el caso de las islas pequeñas usamos puntos de color. Las regiones sin datos son grises.

La proporción de especies vegetales que se han naturalizado fuera de su área de distribución nativa varió mucho entre las diferentes condiciones micorrícicas y tipos de micorrizas (Figura 5.3). En lo que respecta a la condición micorrícica, el 76% de las plantas micorrícicas facultativas, el 52% de las plantas micorrícicas obligadas y el 39% de las plantas no micorrícicas se han naturalizado en al menos una región (Figura 5.3a). En cuanto al tipo de micorrizas, el 69% de las plantas micorrícicas duales, el 54% de las micorrícicas arbusculares, el 45% de las ectomicorrícicas, el 38% de las micorrícicas ericoides y el 16% de las micorrícicas orquioides se han naturalizado fuera de su rango nativo (Figura 5.3b). Al considerar los tipos de micorrizas dentro de la condición micorrícica facultativa, el 81% de las especies micorrícicas duales facultativas, el 76% de las especies micorrícicas arbusculares facultativas y el 64% de las especies ectomicorrícicas facultativas se han naturalizado fuera de su rango nativo (Figura 5.3c).



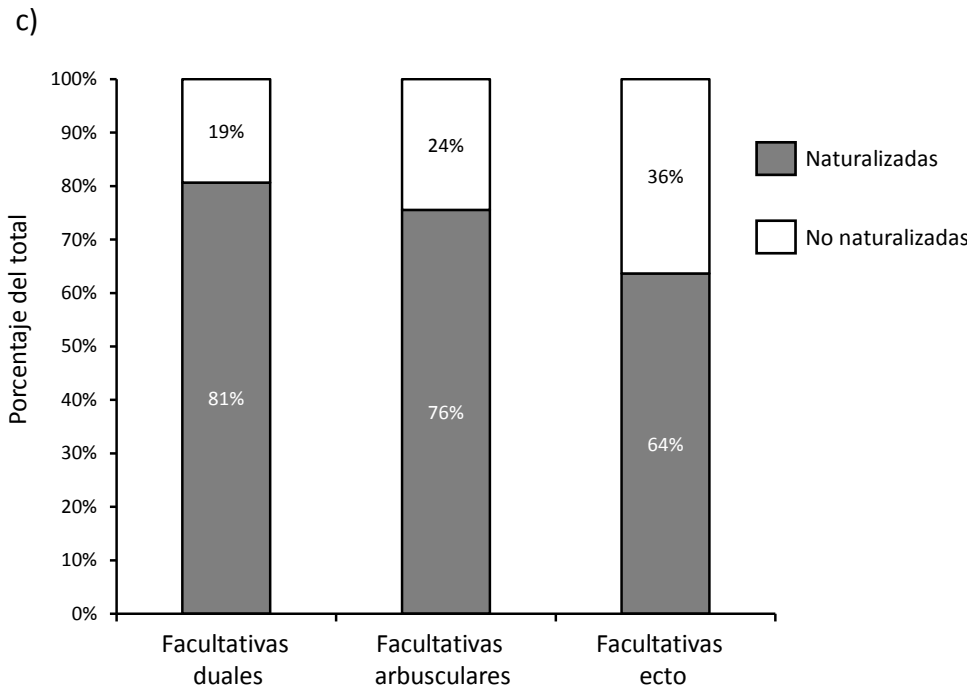
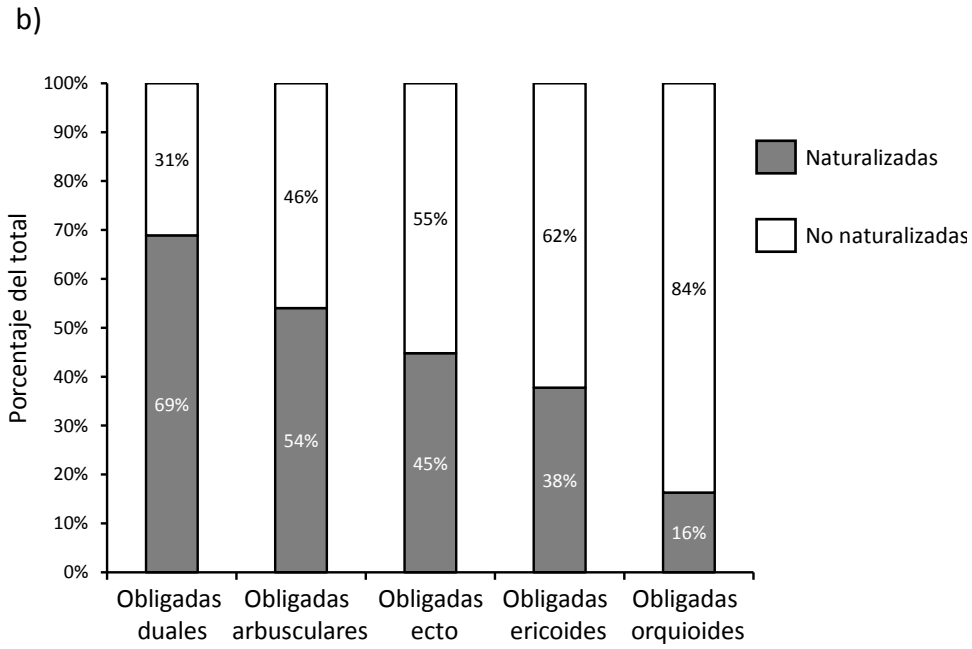


Figura 5.3: Porcentaje de especies que se han naturalizado fuera de su área de distribución nativa y especies que no lo han hecho para cada a) condición micorrízica: micorrízica facultativo (n = 631), micorrízica obligada (n = 2358) y no micorrízica (n = 730); b) tipos micorrízicos dentro de la condición micorrízica obligada: micorrízica dual (n = 45), micorrízica arbuscular (n = 1926), ectomicorrízica (250), micorrízica ericoide (n = 45), micorrízica orquioide (n = 92); y c) tipos

micorrícicos dentro de la condición micorrícica facultativa: micorrícica dual ($n = 31$), micorrícica arbuscular ($n = 589$) y ectomicorrícica ($n = 11$).

Según las regresiones filogenéticas lineales (incluido el número de referencias por especie como variable predictiva), el número de regiones naturalizadas fue mayor para las plantas micorrícicas facultativas, 41% menor para las plantas micorrícicas obligadas ($p = 0.0001$) y 45% menor para las plantas no micorrícicas ($p < 0.0001$; Figura 5.4a). Si considero sólo las regiones continentales, se mantiene este patrón de éxito de la naturalización según la condición micorrícica (Figura 5.4b). Sin embargo, cuando considero sólo las regiones insulares, las diferencias entre los estados micorrícicos se reducen y sólo las plantas no micorrícicas muestran un menor éxito de naturalización que las plantas micorrícicas facultativas (Figura 5.4c). En cuanto al tipo de micorrizas, el número de regiones naturalizadas fue mayor para las plantas micorrícicas arbusculares y las micorrícicas duales, y progresivamente menor para las ectomicorrícicas, las micorrícicas orquioide y finalmente las micorrícicas ericoideas, en orden (Figura 5.5a). Si considero únicamente las regiones continentales, se mantiene esta patrón de éxito de la naturalización según el tipo de micorrizas (Figura 5.5b). Sin embargo, al considerar sólo las regiones insulares no encuentro ninguna diferencia en el número de regiones naturalizadas entre los tipos de micorrizas (Figura 5.5c). La probabilidad de que una especie vegetal se clasificara como micorrícica facultativa aumentó con el número de referencias por especie ($p < 0.0001$). Además, un mayor número de referencias por especie se correlacionó con un mayor número de regiones naturalizadas ($p = 0.0024$; Tabla 5.1). Por lo tanto, para tener en cuenta este sesgo incluimos el número de referencias por especie vegetal en nuestros modelos de regresión.

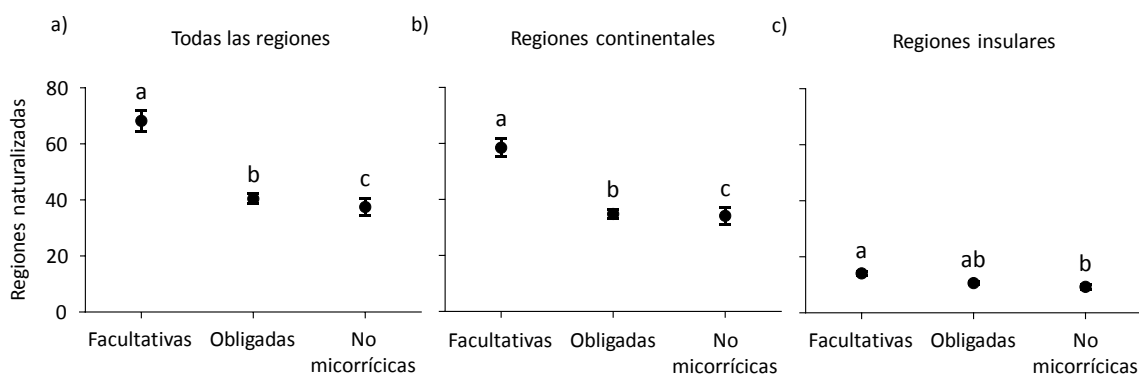


Figura 5.4: Número medio (+ EE) de regiones naturalizadas para especies vegetales de diferente condición micorrícica: micorrícicas facultativas, micorrícicas obligadas y no micorrícicas, incluyendo a) todas las regiones, b) regiones continentales y c) regiones insulares. Las letras indican los resultados de las comparaciones utilizando la regresión lineal filogenética. Letras iguales indican valores que no son significativamente diferentes después de tener en cuenta la relación filogenética, el número de regiones naturalizadas y el número de referencias para cada especie. Los estimadores de la regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales, incluyendo la condición micorrícica como variable predictiva, están en la Figura S5.2.

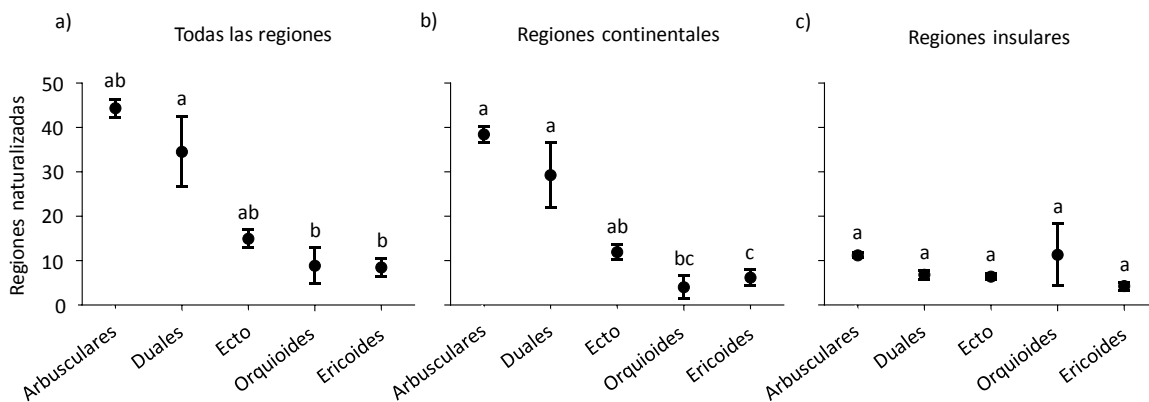


Figura 5.5: Número medio (+ EE) de regiones naturalizadas para especies vegetales de diferentes tipos micorrícicos: micorrícicas arbusculares, micorrícicas duales, ectomicorrícicas, micorrícicas ericoides y micorrícicas orquioide, incluyendo a) todas las regiones, b) regiones continentales y c) regiones insulares. Las letras indican los resultados de las comparaciones utilizando la regresión lineal filogenética. Letras iguales indican valores que no son significativamente diferentes después de tener en cuenta la relación filogenética, el número de regiones naturalizadas y el número de referencias para cada especie. No hay diferencias significativas entre las plantas micorrícicas ericoides y los demás tipos de micorrizas porque todas las especies micorrícicas ericoides pertenecen a la misma familia. Para los grupos de baja variabilidad genética, como las plantas micorrícicas ericoides, nuestro modelo filogenético no es capaz de separar el efecto del tipo de

micorrizas del efecto de la relación filogenética. Algo similar ocurre con las plantas micorrícicas orquioideas, que incluyen sólo dos familias de plantas. Los estimadores de regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales que incluyen el tipo de micorriza como variable predictiva están en la Figura S5.3.

Tabla 5.1: Parámetros de la regresión lineal filogenética para el número de regiones naturalizadas según la condición micorrícica (facultativa, obligada y no micorrícica), el número de referencias y su interacción. Los efectos significativos ($p < 0.05$) se muestran en negrita. Para la variable predictiva condición micorrícica, que tiene tres niveles, el nivel de referencia es micorrícica facultativa (y se incluye en el intercepto del modelo). El efecto de los otros dos niveles (obligada y no micorrícica) se muestra en la tabla.

Variables predictoras	Estimador	Error estandar	t	p
Referencias	0.0294	0.0097	3.0366	0.0024
Condición_Obligada	-0.4662	0.1213	-3.8438	0.0001
Condición_No micorrícica	-1.1186	0.1881	-5.9463	< 0.0001
Referencias * Condición_Obligada	0.0015	0.0116	0.1278	0.8983
Referencias * Condición_No micorrícica	0.2018	0.0798	2.5287	0.0115

Cuando comparamos el éxito de la naturalización de las plantas micorrícicas arbusculares obligadas frente a las plantas micorrícicas arbusculares facultativas, las plantas ectomicorrícicas obligadas frente a las plantas ectomicorrícicas facultativas, y las plantas micorrícicas duales obligadas frente a las plantas micorrícicas facultativas encontramos los siguientes resultados: el número de regiones naturalizadas era un 37% mayor para las plantas micorrícicas arbusculares facultativas que para las micorrícicas arbusculares obligadas ($p < 0.0001$; Figura S5.1a), un 56% más alto para las ectomicorrícicas facultativas que para las obligadas ($p = 0.0238$; Figura S5.1b) y no encontramos ninguna diferencia entre las micorrícicas duales facultativas y las obligadas ($p = 0.6364$; Figura S5.1c). Al considerar sólo las regiones continentales, estos patrones de éxito de la naturalización se mantuvieron constantes. Sin embargo, al considerar sólo las regiones insulares sólo encuentro diferencias entre las plantas micorrícicas arbusculares facultativas y las plantas

micorrícicas arbusculares obligadas. Realizamos todos los análisis anteriores utilizando el área naturalizada por especie de planta (calculada como la suma de las áreas de las regiones en las que la especie fue reportada como naturalizada) como variable de respuesta en los modelos y encontramos los mismos resultados que antes (Figura S5.5-S5.7). Por lo tanto, podemos asumir que las diferencias en el área de cada región de la base de datos no introduce ningún sesgo en los resultados.

5.5 Discusión

Los resultados de este estudio muestran que el éxito de la naturalización de las plantas se vio afectado por la condición micorrícica y el tipo de micorrizas de las plantas en las regiones continentales de todo el mundo. Las plantas micorrícicas facultativas, que pueden crecer sin micorrizas pero que también pueden aprovechar este mutualismo cuando está disponible (Moora 2014; Smith y Read 2008), tuvieron más éxito fuera de su área de distribución nativa que las especies de plantas micorrícicas obligadas y que las no micorrícicas. Comparando dentro de los tipos de micorrizas, las plantas micorrícicas facultativas también mostraron un mayor éxito de naturalización que las plantas micorrícicas obligadas (aunque no cuando se comparan las plantas micorrícicas duales facultativas con las duales obligadas). Las plantas no micorrícicas mostraron el menor éxito de naturalización, lo que sugiere que la capacidad de formar micorrizas es una ventaja para las plantas introducidas. Sin embargo, otros aspectos de las plantas no micorrícicas, como sus nichos ecológicos más estrechos (Correia et al. 2018; Gerz et al. 2018), pueden estar explicando, en parte, estos resultados. Comparando los tipos de micorrizas, el éxito de la naturalización fue mayor para las plantas micorrícicas arbusculares y micorrícicas duales, como se esperaba, debido a la menor especificidad de los hongos micorrícicos arbusculares con respecto a sus hospedadores

(Smith y Read 2008; van der Heijden et al. 2015). Por otra parte, este patrón de éxito de la naturalización resulta mucho menos claro en las regiones insulares. Una posible explicación es que las islas oceánicas remotas pueden carecer de hongos micorrícicos debido a las limitaciones de dispersión (Peay et al. 2012). Por lo tanto, sin disponibilidad de inóculo fúngico, las plantas micorrícicas pueden no tener una ventaja sobre las plantas no micorrícicas. Las islas oceánicas son también lugares donde las aves marinas hacen grandes aportes de nutrientes, lo que puede reducir la dependencia de las plantas sobre las micorrizas (Otero et al. 2018).

Las plantas micorrícicas facultativas, que no requieren hongos micorrícicos, pero que tienen la capacidad de formar micorrizas (Moora 2014; Smith y Read 2008), fueron las que tuvieron más éxito fuera de su área de distribución nativa tanto para las regiones continentales como para las insulares. El amplio rango geográfico y ecológico de plantas micorrícicas facultativas en comparación con otras condiciones micorrícicas (Gerz et al. 2018; Hempel et al. 2013) podría explicar por qué las plantas que pertenecen a esta condición tienen tanto éxito. De hecho, un amplio rango de distribución nativo es un atributo de la planta que se ha asociado frecuentemente con el éxito de la naturalización (Bucharova y van Kleunen 2009; Hanspach et al. 2008; Maurel et al. 2016; McGregor et al. 2012; Moodley et al. 2013; Procheş et al. 2012; Razanajatovo et al. 2016). Nuestros resultados concuerdan con un estudio reciente en el que se determinó que las plantas micorrícicas facultativas son los invasores más exitosos en Alemania, en comparación con otras condiciones micorrícicas (Menzel et al. 2017). Las plantas micorrícicas facultativas pueden tener la capacidad de establecer poblaciones sostenibles (naturalización) en nuevas regiones sin la presencia de hongos micorrícicos (Smith y Read 2008). Es necesario seguir investigando la dinámica de las poblaciones de plantas facultativas con o sin hongos micorrícicos para evaluar los mecanismos del éxito de estas plantas fuera de su área de distribución nativa.

La condición micorrícica con menor éxito de naturalización en las regiones continentales fueron las plantas no micorrícicas. Estudios anteriores, examinados por Pringle et al. (2009), han demostrado que una alta proporción de plantas naturalizadas no son micorrícicas. Sin embargo, a nivel mundial las plantas micorrícicas representan la mayoría (60%) de las especies naturalizadas en las regiones continentales (Delavaux et al. 2019). En consecuencia, encontramos que las plantas micorrícicas, tanto facultativas como obligatorias, tuvieron más éxito de naturalización que las plantas no micorrícicas en las regiones continentales. El mutualismo con los hongos micorrícicos aporta importantes beneficios a las plantas hospederas: mejor acceso al agua (Augé 2001), nutrientes (Delavaux et al. 2017; Smith y Read 2008) y protección contra los patógenos (Delavaux et al. 2017; Veresoglou y Rillig 2012). En este sentido, la capacidad de formar asociaciones micorrícicas puede ampliar el nicho realizado de las plantas hospederas (Bruno et al. 2003; Gerz et al. 2018; Hempel et al. 2013; Rodríguez-Cabal et al. 2012), lo cual ayuda a las plantas micorrícicas a prosperar y dominar en muchos tipos de hábitats en todo el mundo (Brundrett y Tedersoo 2018). De esta manera, las plantas no micorrícicas tienen nichos ecológicos más estrechos que las plantas micorrícicas (Correia et al. 2018; Gerz et al. 2018) y son exitosas en tipos de hábitats limitados, en particular los hábitats acuáticos, secos, fríos, salinos, pobres en nutrientes o perturbados (Brundrett 2009; Gerz et al. 2016; Lambers y Teste 2013; Miller 2005; Peat y Fitter 1993; Soudzilovskaia et al. 2017; Swaty et al. 2016). Por otra parte, en estudios anteriores se ha encontrado una proporción menor de plantas nativas micorrícicas en regiones insulares (Delavaux et al. 2019; Hemmes y Desjardin 2008; Koske et al. 1992), lo que sugiere un filtro micorrícico producido por el aislamiento geográfico (Delavaux et al. 2019). Sin embargo, en lo que respecta a las especies de plantas naturalizadas en islas a escala mundial, más del 65% son micorrícicas, lo que sugiere que el aumento de la dispersión de hongos micorrícicos inducido por el hombre ha eliminado este filtro micorrícico en las islas (Delavaux et al. 2019). De acuerdo con

esto, encontramos que, en las islas, las plantas micorrícicas facultativas tuvieron más éxito de naturalización que las plantas no micorrícicas.

Las plantas micorrícicas arbusculares obligadas tuvieron menos éxito que las plantas micorrícicas arbusculares facultativas fuera de su rango nativo, tanto en regiones continentales como insulares. La ventaja de las plantas micorrícicas arbusculares facultativas sobre las plantas micorrícicas arbusculares obligadas es que las primeras pueden tener éxito en ausencia de hongos micorrícicos (Smith y Read 2008). Sin embargo, dado el bajo endemismo de los hongos micorrícicos arbusculares (Davison et al. 2015; pero véase Bruns y Taylor 2016) y su baja especificidad de huésped (van der Heijden et al. 2015), esperábamos que las plantas micorrícicas arbusculares obligadas introducidas tuvieran tanto éxito como las plantas micorrícicas arbusculares facultativas. Nuestros resultados sugieren que las plantas micorrícicas arbusculares facultativas introducidas tienen un mayor éxito de naturalización que las plantas micorrícicas arbusculares obligatorias. Esto sería contrario a la idea de que las plantas micorrícicas arbusculares obligadas introducidas no están limitadas por sus socios fúngicos porque la mayoría de los hongos micorrícicos arbusculares tienen una distribución cosmopolita y una baja especificidad de huésped (Davison et al. 2015; Pringle et al. 2009; Richardson et al. 2000a). Una posible explicación de esta pauta es que, aunque no hay pruebas de la especificidad del huésped para los hongos micorrícicos arbusculares, hay muchos informes sobre la preferencia de huéspedes de los hongos micorrícicos arbusculares y la selectividad de los mismos (Helgason et al. 1998; Kiers et al. 2000; Klironomos 2000; Sanders y Fitter 1992; Torrecillas et al. 2012; van der Heijden et al. 1998; Vandenkoornhuyse et al. 2003) y muchas especies de hongos micorrícicos arbusculares tienen distribuciones restringidas (Bruns y Taylor 2016; Stürmer et al. 2018). Reconocemos que otros atributos, no considerados en este estudio, están influyendo en el éxito de la naturalización de las plantas micorrícicas arbusculares facultativas y obligadas, como la altura de la planta, el tamaño de la

semilla (Pyšek et al. 2015), la capacidad de autofecundación (Razanajatovo et al. 2016) y la tasa de germinación de las semillas (van Kleunen y Johnson 2007). Curiosamente, no encontramos ninguna diferencia en el número de regiones naturalizadas entre las plantas micorrícicas duales facultativas y las duales obligadas. Puede ser que la flexibilidad de la asociación con hongos tanto arbusculares como ectomicorrícicos dé a las plantas micorrícicas duales una ventaja significativa y la ventaja adicional de ser micorrícicas facultativas tenga menor importancia. Por ejemplo, las plantas micorrícicas duales pueden tener una mayor absorción de nutrientes y una mayor supervivencia y crecimiento en comparación con las plantas arbusculares obligadas o las plantas ectomicorrícicas obligadas (Teste et al. 2019). Además, las plantas micorrícicas duales pueden adquirir los beneficios de un tipo de micorriza en regiones donde falta el inóculo fúngico del otro tipo de micorriza (Teste et al. 2019).

Las plantas micorrícicas duales y las micorrícicas arbusculares estaban entre los tipos de micorrizas más exitosos en el establecimiento a través de múltiples rangos en las regiones continentales, pero no encontramos evidencia de que fueran más exitosas que las plantas ectomicorrícicas después de corregir por el efecto de la filogenia. Hubiéramos esperado que la menor especificidad de huésped y la distribución geográfica más amplia de los hongos micorrícicos arbusculares (Davison et al. 2015; Pringle et al. 2009; Tedersoo et al. 2012; pero véase Bruns y Taylor 2016) favoreciera su éxito de naturalización sobre el de las especies ectomicorrícicas. Sin embargo, el éxito de la naturalización de las plantas ectomicorrícicas no fue significativamente menor, según nuestros modelos. Una posibilidad es que la alta capacidad de dispersión de los hongos ectomicorrícicos (Peay et al. 2012) compense las posibles limitaciones de su mayor especificidad de huésped (van der Heijden et al. 2015). Otra posibilidad es que el nicho ecológico más amplio de las especies ectomicorrícicas favorezca el éxito de su naturalización (Gerz et al. 2018). Además, podría ser que haya diferencias en el éxito de la naturalización que se explican por

los atributos de las plantas relacionados con la filogenia. Por ejemplo, la gran mayoría de las plantas ectomicorrícicas son especies leñosas. La falta de diferencias en el éxito de la naturalización entre los tipos de micorrizas en las regiones insulares puede reflejar que la ausencia de hongos micorrícicos en ciertas regiones aisladas. Por lo tanto, sin sus compañeros fúngicos, las plantas micorrícicas arbusculares y duales pueden no tener una ventaja sobre otros tipos de micorrizas.

Las plantas micorrícicas ericoides y orquioides siempre estuvieron en el extremo inferior del éxito de la naturalización fuera de su rango nativo en las regiones del continente. Una posible explicación es que estas asociaciones micorrícicas están menos distribuidas geográficamente que las asociaciones ectomicorrícicas (Soudzilovskaia et al. 2017). En consecuencia, la disponibilidad de hongos apropiados para las asociaciones micorrícicas de ericoides y orquioides puede ser más restringida geográficamente. Otra posibilidad es que una mayor especificidad en las asociaciones entre las plantas micorrícicas de orquioides y sus socios fúngicos limite su establecimiento en nuevos entornos (Dickie et al. 2017; Pyšek 1998). Por otro lado, es posible que tanto las plantas micorrícicas ericoides como las plantas micorrícicas orquioides no se hayan introducido en nuevas regiones con la misma intensidad y la misma escala que las plantas arbusculares o ectomicorrícicas. Este menor esfuerzo de introducción reduciría inevitablemente su probabilidad de naturalización (Lockwood et al. 2005). No obstante, como cada uno de estos tipos de micorrizas está filogenéticamente limitado a un solo grupo, no podemos descartar explicaciones relacionadas con la filogenia.

Estos resultados muestran que en las regiones continentales la condición micorrícica facultativa está positivamente asociada con el éxito de la naturalización. De hecho, las plantas micorrícicas facultativas, que pueden vivir en ausencia de sus compañeros fúngicos pero que

también tienen la capacidad de aprovechar estos simbioses, fueron las que tuvieron más éxito de naturalización en las regiones continentales fuera de su área de distribución nativa. Sin embargo, en las regiones insulares un hubo diferencias en el éxito de la naturalización de plantas con diferente condición micorrícica o tipo de micorriza, posiblemente debido a la presencia poco consistente de hongos micorrícicos en islas remotas. Los patrones de éxito de la naturalización que nuestro aquí pueden ayudar a comprender por qué algunas especies de plantas se naturalizan fuera de su área de distribución nativa mientras que otras fracasan.

Capítulo 6: Discusión general

Las invasiones biológicas son una de las principales causas del cambio global (Díaz et al. 2020). La forma más efectiva de evitar sus impactos negativos es prevenir las invasiones (Simberloff 2013). Sin embargo, nuestro conocimiento de los mecanismos que favorecen las diferentes etapas del proceso de invasión es todavía muy limitado para permitirnos predecir futuras invasiones (van Kleunen et al. 2010). En esta tesis evaluamos dos mecanismos que tienen una influencia clave en las invasiones biológicas: la depredación de semillas (Hulme 1998; Moles et al. 2003; Nuñez et al. 2008; Connolly et al. 2014) y la dependencia de mutualismos (Richardson et al. 2000, Vogelsang et al. 2004, Vogelsang and Bever 2009, Burns et al. 2011, Pyšek et al. 2011, Rodger et al. 2013, Razanajatovo et al. 2016). Ambos mecanismos podrían favorecer el establecimiento y la invasión de algunas especies de plantas. Para esto nos enfocamos en la familia Pinaceae (Capítulos 2, 3 y 4) ya que se trata de un sistema de estudio ideal para estudiar mecanismos de invasión (ver Introducción General). Luego ampliamos nuestro sistema de estudio al conjunto de las plantas vasculares (Capítulo 5) para evaluar mecanismos de invasión más allá de la familia Pinaceae.

Encontramos que a depredación de semillas resultó mayor para las Pinaceae más invasoras (Capítulo 2), indicando que hay otros mecanismos detrás del éxito de éstas especies o bien algunos aspectos de este mecanismo que no he considerado. Según el compromiso entre tamaño y número de semillas es esperable que las Pinaceae que tienen semillas más pequeñas, y son más invasoras, produzcan una mayor cantidad de semillas (Henery y Westoby 2001; Jakobsson y Eriksson 2000; Moles y Westoby 2006). De esta manera, aunque las Pinaceae más invasoras sean más preferidas por los consumidores de semillas, su mayor producción de semillas podría saciar a los depredadores permitiendo su establecimiento. En consecuencia, cuando tuvimos en cuenta la producción y dispersión de semillas de una Pinaceae no invasora (*Pinus ponderosa*), encontramos

que el consumo de semillas no permitiría el establecimiento de esta especie a una distancia mayor a 25 m de la plantación (Capítulo 3). De esta manera, la depredación de semillas sería un mecanismo que permite explicar la falla en el establecimiento de algunas Pinaceae no invasoras.

La depredación de semillas puede ser más limitante que la disponibilidad de hongos micorrícicos para el establecimiento de Pinaceae (Capítulo 3), pero estos resultados se basan en datos de una sola especie: *Pinus ponderosa*. En este aspecto, cuando evaluamos la respuesta en crecimiento de plántulas de *Pinus* (familia Pinaceae) a la inoculación con hongos micorrícicos encontramos que la magnitud de este efecto era dependiente del tipo de especie de *Pinus* considerada: especies más invasoras presentaron mayores respuestas (Capítulo 4). Es posible que si se evalúa el efecto conjunto de la depredación de semillas y de la disponibilidad de inóculo fúngico en otras especies de Pinaceae obtengamos otros resultados, por ejemplo un mayor peso de las micorrizas sobre el establecimiento de Pinaceae.

Mientras que la dependencia de micorrizas podría favorecer la invasión (Capítulo 4) también una mayor dependencia de micorrizas podría disminuir el establecimiento de plantas (Capítulo 5). Es posible que este efecto opuesto de la dependencia de micorrizas sobre diferentes etapas del proceso de invasión se deba a que las causas que favorecen el éxito en una etapa pueden no ser las mismas que favorecen el éxito en otra etapa (Dawson et al. 2009; Milbau y Stout 2008; Moodley et al. 2013; Moodley et al. 2016; Rojas-Sandoval y Acevedo-Rodríguez 2015; Theoharides y Dukes 2007; Williamson 2006). De esta manera, aunque parezca contradictorio, es posible que la dependencia de micorrizas disminuya el establecimiento pero favorezca la invasión de plantas. Otra explicación posible es que a diferentes escalas se vean diferentes patrones. Mientras que evaluamos la relación entre capacidad invasiva y dependencia de micorrizas para 34 especies del género *Pinus*, todas micorrícicas obligadas, evaluamos la relación entre capacidad de

establecimiento y dependencia de micorrizas para 1981 especies de plantas vasculares (cubriendo 822 géneros y 155 familias de plantas), incluyendo especies micorrícicas obligadas, especies micorrícicas facultativas y especies no micorrícicas. Así, es posible que la dependencia de micorrizas influya de diferentes formas el proceso de invasión sobre diferentes condiciones micorrícicas. A su vez, es posible que esta aparente contradicción se deba a que por un lado estimamos dependencia a las micorrizas mediante la respuesta en crecimiento de las plántulas a la inoculación con hongos micorrícicos, y por otro lado estimamos dependencia a través de la condición micorrícica de la especie. Si bien se trata de características relacionadas (Moora 2014), la respuesta micorrícica y la condición micorrícica pueden tener diferentes implicancias sobre el proceso de invasión de plantas (Dickie et al. 2017).

Los resultados de esta tesis doctoral destacan la importancia de las interacciones negativas (depredación) y las interacciones positivas (mutualismos) como mecanismos que vinculan atributos de plantas con el éxito en el establecimiento y en la invasión de especies no nativas. En este sentido, hemos puesto a prueba diferentes hipótesis de invasión, encontrando apoyo empírico para algunas y rechazando otras. A su vez, hemos trabajado a diferentes escalas, desde una escala local hasta una escala global, y con diferentes sistemas de estudio, desde una especie hasta el conjunto de plantas vasculares. Entre nuestros principales resultados encontramos que la preferencia de consumidores de semillas no explica el diferente éxito de invasión de pináceas, pero al considerar la producción y dispersión de semillas la depredación de semillas podría explicar por qué algunas pináceas no invaden. Además, encontramos que las pináceas más invasoras dependen más del mutualismo con hongos micorrícicos, mientras que entre las plantas vasculares aquellas especies que pueden formar micorrizas pero también pueden vivir sin ellas son las que más se naturalizan fuera de su rango nativo. Estos resultados contribuyen a nuestro entendimiento del proceso de invasión, y en particular aportan evidencia de posibles mecanismos

detrás de atributos de invasión, ayudando a responder la pregunta: ¿Por qué algunas especies se vuelven invasoras y otras no?

Bibliográfia

- Abbott HG (1962) Tree Seed Preferences of Mice and Voles in the Northeast. *Journal of Forestry* 60:97-99
- Abouheif E (1999) A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative data. *Evolutionary Ecology Research* 1:895-909
- Adjoud-Sadadou D, Halli-Hargas R (2017) Dual mycorrhizal symbiosis: an asset for eucalypts out of Australia? *Canadian Journal of Forest Research* 47:500-505
- Akhmetzhanova AA, Soudzilovskaia NA, Onipchenko VG, Cornwell WK, Agafonov VA, Selivanov IA, Cornelissen JHC (2012) A rediscovered treasure: mycorrhizal intensity database for 3000 vascular plant species across the former Soviet Union. *Ecology* 93:689-690
- Alberton O, Kuyper TW (2009) Ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus sylvestris* seedlings respond differently to increased carbon and nitrogen availability: implications for ecosystem responses to global change. *Global Change Biology* 15:166-175
- Allsopp N, Stock WD (1992) Mycorrhizas, seed size and seedling establishment in a low nutrient environment. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds) *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB, Wallingford, UK, pp 59-64
- Allsopp N, Stock WD (1995) Relationships between Seed Reserves, Seedling Growth and Mycorrhizal Responses in 14 Related Shrubs (Rosidae) from a Low-Nutrient Environment. *Functional Ecology* 9:248-254
- Amin MN, Hossain MA, Roy KC (2004) Effects of moisture content on some physical properties of lentil seeds. *Journal of Food Engineering* 65:83-87
- Anandu P, Sangeetha K, Sanjana P, Santhosh R, Mahendran R (2018) Physical properties of infrared (IR) assisted hot air dried nutmeg (*Myristica fragrans*) seeds. *Journal of Food Processing and Preservation* 42:e13359
- Anchorena J, Cingolani A (2002) Identifying habitat types in a disturbed area of the forest-steppe ecotone of Patagonia. *Plant Ecology* 158:97-112
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42
- Augspurger CK, Kitajima K (1992) Experimental studies of seedling recruitment from contrasting seed distributions. *Ecology* 73:1270-1284
- Bahram M, Kõljalg U, Kohout P, Mirshahvaladi S, Tedersoo L (2013) Ectomycorrhizal fungi of exotic pine plantations in relation to native host trees in Iran: evidence of host range expansion by local symbionts to distantly related host taxa. *Mycorrhiza* 23:11-19
- Baker HG (1965) Characteristics and modes of origin of weeds. The genetics of colonizing species, Burns, H. G. Stebbins, G. L. edn. Academic Press, New York
- Baker HG (1972) Seed Weight in Relation to Environmental Conditions in California. *Ecology* 53:997-1010
- Baker HG (1974) The Evolution of Weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5:1-24
- Barbosa P, Hines J, Kaplan I, Martinson H, Szczepaniec A, Szendrei Z (2009) Associational Resistance and Associational Susceptibility: Having Right or Wrong Neighbors. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:1-20
- Barrett JW, Forest PN, Station RE, Service USF (1979) *Silviculture of ponderosa pine in the Pacific Northwest: the state of our knowledge*. Dept. of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station: for sale by the Supt. of Docs., U.S. Govt. Print. Off.

- Baskin CC, Baskin JM (1998) *Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination*. Elsevier,
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. 2015 67:48
- Beaujean A (2012) BaylorEdPsych: R package for Baylor University educational psychology quantitative courses. R package version 0.5. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=BaylorEdPsych>,
- Begg CB, Mazumdar M (1994) Operating Characteristics of a Rank Correlation Test for Publication Bias. *Biometrics* 50:1088-1101
- Bellingham PJ, Duncan RP, Lee WG, Buxton RP (2004) Seedling growth rate and survival do not predict invasiveness in naturalized woody plants in New Zealand. *Oikos* 106:308-316
- Blackburn TM, Lockwood JL, Cassey P (2015) The influence of numbers on invasion success. *Molecular Ecology* 24:1942-1953
- Blackburn TM, Pyšek P et al. (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 26:333-339
- Blate GM, Peart DR, Leighton M (1998) Post-Dispersal Predation on Isolated Seeds: A Comparative Study of 40 Tree Species in a Southeast Asian Rainforest. *Oikos* 82:522-538
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White J-SS (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 24:127-135
- Brewer SW (2001) Predation and Dispersal of Large and Small Seeds of a Tropical Palm. *Oikos* 92:245-255
- Browning MHR, Whitney RD (1992) The influence of phosphorus concentration and frequency of fertilization on ectomycorrhizal development in containerized black spruce and jack pine seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 22:1263-1270
- Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320:37-77
- Brundrett MC, Tedersoo L (2018) Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220:1108-1115
- Bruno JF, Stachowicz JJ, Bertness MD (2003) Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution* 18:119-125
- Bruns TD, Taylor JW (2016) Comment on “Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism”. *Science* 351:826-826
- Bucharova A, van Kleunen M (2009) Introduction history and species characteristics partly explain naturalization success of North American woody species in Europe. *Journal of Ecology* 97:230-238
- Buckley R (1982) Seed Size and Seedling Establishment in Tropical Arid Dunecrest Plants. *Biotropica* 14:314-315
- Bucyanayandi J-D, Bergeron J-M, Menard H (1990) Preference of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) for conifer seedlings: Chemical components and nutritional quality of bark of damaged and undamaged trees. *Journal of Chemical Ecology* 16:2569-2579
- Bueno CG, Moora M et al. (2017) Plant mycorrhizal status, but not type, shifts with latitude and elevation in Europe. *Global Ecology and Biogeography* 26:690-699
- Burns JH, Ashman T-L, Steets JA, Harmon-Threatt A, Knight TM (2011) A phylogenetically controlled analysis of the roles of reproductive traits in plant invasions. *Oecologia* 166:1009-1017

- Caley P, Groves RH, Barker R (2008) Estimating the invasion success of introduced plants. *Diversity and Distributions* 14:196-203
- Carlquist SJ (1974) *Island biology*. Columbia University Press,
- Carrillo-Gavilán A, Espelta JM, Vilà M (2012) Establishment constraints of an alien and a native conifer in different habitats. *Biological Invasions* 14:1279-1289
- Carrillo-Gavilán MA, Vilà M (2010) Little evidence of invasion by alien conifers in Europe. *Diversity and Distributions* 16:203-213
- Catford JA, Jansson R, Nilsson C (2009) Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. *Diversity and Distributions* 15:22-40
- Cayuela L, Granzow-de la Cerda Í, Albuquerque FS, Golicher DJ (2012) taxonstand: An R package for species names standardisation in vegetation databases. *Methods in Ecology and Evolution* 3:1078-1083
- Chambers J, Hastie T, Pregibon D (1990) Statistical Models in S. In: Momirović K, Mildner V (eds) *Compstat: Proceedings in Computational Statistics, 9th Symposium held at Dubrovnik, Yugoslavia, 1990*. Physica-Verlag HD, Heidelberg, pp 317-321. doi:10.1007/978-3-642-50096-1_48
- Chave J, Coomes D, Jansen S, Lewis SL, Swenson NG, Zanne AE (2009) Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology Letters* 12:351-366
- Chilvers GA, Lapeyrie FF, Horan DP (1987) Ectomycorrhizal vs Endomycorrhizal Fungi Within the Same Root System. *The New Phytologist* 107:441-448
- Chiuffo MC, Moyano J, Rodríguez-Cabal MA, Nuñez MA (2018) Seed predation of non-native species along a precipitation gradient. *Plant Ecology* 219:1307-1314
- CIEFAP (2017) *Inventario nacional de plantaciones forestales: Región Patagónica*. Ministerio de Agroindustria, Argentina
- Clark CJ, Poulsen JR, Bolker BM, Connor EF, Parker VT (2005) Comparative seed shadows of bird-, monkey-, and wind-dispersed trees. *Ecology* 86:2684-2694
- Clark JS, Lewis M, Horvath L (2001) Invasion by extremes: population spread with variation in dispersal and reproduction. *The American Naturalist* 157:537-554
- Collier FA, Bidartondo MI (2009) Waiting for fungi: the ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal of Ecology* 97:950-963
- Committee-for-Compilation-of-Chinese-Tree-Species-Manuals (1978) *China's main tree species for afforestation techniques*. China Forestry Publishing House, Beijing, China
- Connolly B, Pearson D, Mack R (2014) Granivory of invasive, naturalized, and native plants in communities differentially susceptible to invasion. *Ecology* 95:1759-1769
- Cook RD, Weisberg S (1982) *Residuals and influence in regression*. New York: Chapman and Hall,
- Cornelissen J, Castro-Diez P, Carnelli A (1998) Variation in relative growth rate among woody species. Inherent variation in plant growth Physiological mechanisms and ecological consequences Backhuys, Leiden:363-392
- Correia M, Heleno R, Vargas P, Rodríguez-Echeverría S (2018) Should I stay or should I go? Mycorrhizal plants are more likely to invest in long-distance seed dispersal than non-mycorrhizal plants. *Ecology Letters* 21:683-691
- Crawley MJ (1997) Plant-herbivore dynamics. In: Crawley MJ (ed) *Plant ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 401-474
- Crawley MJ (2000) Seed predators and plant population dynamics. In: Gallagher RS (ed) *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities, vol 2*. CABI International, pp 167-182

- Dalong M, Luhe W, Guoting Y, Liqiang M, Chun L (2011) Growth response of *Pinus densiflora* seedlings inoculated with three indigenous ectomycorrhizal fungi in combination. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:1197-1203
- Davison J, Moora M et al. (2015) Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349:970-973
- Dawson W, Burslem DFRP, Hulme PE (2009) Factors explaining alien plant invasion success in a tropical ecosystem differ at each stage of invasion. *Journal of Ecology* 97:657-665
- Delavaux CS, Smith-Ramesh LM, Kuebbing SE (2017) Beyond nutrients: a meta-analysis of the diverse effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plants and soils. *Ecology* 98:2111-2119
- Delavaux CS, Weigelt P et al. (2019) Mycorrhizal fungi influence global plant biogeography. *Nature Ecology & Evolution* 3:424-429
- Di Pierro E, Ghisla A, Wauters LA, Molinari A, Martinoli A, Gurnell J, Tosi G (2011) The effects of seed availability on habitat use by a specialist seed predator. *European Journal of Wildlife Research* 57:585-595
- Diaz G, Carrillo C, Honrubia M (2010) Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. *Annals of Forest Science* 67:405-405
- Díaz S, Settele J et al. (2020) Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services.
- Dickie IA, Bolstridge N, Cooper JA, Peltzer DA (2010) Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187:475-484
- Dickie IA, Bufford JL et al. (2017) The emerging science of linked plant–fungal invasions. *New Phytologist* 215:1314-1332
- Dickie IA, Thomas MM, Bellingham PJ (2007) On the perils of mycorrhizal status lists: the case of *Buddleja davidii*. *Mycorrhiza* 17:687-688
- Dutta SK, Nema VK, Bhardwaj RK (1988) Physical properties of gram. *Journal of Agricultural Engineering Research* 39:259-268
- Elton CS (1958) *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. University of Chicago Press,
- Emerson SE, Brown JS, Whelan CJ, Schmidt KA (2012) Scale-dependent neighborhood effects: shared doom and associational refuge. *Oecologia* 168:659-670
- Essl F, Mang T, Dullinger S, Moser D, Hulme PE (2011) Macroecological drivers of alien conifer naturalizations worldwide. *Ecography* 34:1076-1084
- Essl F, Moser D, Dullinger S, Mang T, Hulme P (2010) Selection for commercial forestry determines global patterns of alien conifer invasions *Biodiversity Research* 16:911-921
- Fenner M, Thompson K (2005) *The Ecology of Seeds*. Cambridge University Press,
- Fox J, Weisberg S (2010) *An R companion to applied regression*. Sage Publishing, Thousand Oaks, CA
- Franzese J, Urrutia J, García RA, Taylor K, Pauchard A (2017) Pine invasion impacts on plant diversity in Patagonia: invader size and invaded habitat matter. *Biological Invasions* 19:1015-1027
- Fricke EC, Wright SJ (2016) The mechanical defence advantage of small seeds. *Ecology Letters*:n/a-n/a
- Garren JM, Strauss SY (2009) Population-level compensation by an invasive thistle thwarts biological control from seed predators. *Ecological Applications* 19:709-721
- Gerdemann J (1975) Vesicular–arbuscular mycorrhizae. In: Torrey G, Clarkson D (eds) *The development and function of roots*. Academic, London, pp 575-591

- Gerz M, Bueno CG, Zobel M, Moora M (2016) Plant community mycorrhization in temperate forests and grasslands: relations with edaphic properties and plant diversity. *Journal of Vegetation Science* 27:89-99
- Gerz M, Guillermo Bueno C, Ozinga WA, Zobel M, Moora M (2018) Niche differentiation and expansion of plant species are associated with mycorrhizal symbiosis. *Journal of Ecology* 106:254-264
- Gómez JM (2004) BIGGER IS NOT ALWAYS BETTER: CONFLICTING SELECTIVE PRESSURES ON SEED SIZE IN QUERCUS ILEX. *Evolution* 58:71-80
- Greene DF, Johnson EA (1993) Seed mass and dispersal capacity in wind-dispersed diaspores. *Oikos* 67:69-74
- Grodzinski W, Sawicka-Kapusta K (1970) Energy Values of Tree-Seeds Eaten by Small Mammals. *Oikos* 21:52-58
- Groom P (2010) Implications of terminal velocity and wing loading on Hakea (Proteaceae) seed dispersal. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 93:175
- Gross KL (1984) Effects of seed size and growth form on seedling establishment of six monocarpic perennial plants. *Journal of Ecology* 72:369-387
- Grotkopp E, Rejmánek M, Rost TL (2002) Toward a causal explanation of plant invasiveness: seedling growth and life-history strategies of 29 pine (*Pinus*) species. *The American Naturalist* 159:396-419
- Grotkopp E, Rejmánek M, Sanderson MJ, Rost TL, Soltis P (2004) Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses. *Evolution* 58:1705-1729
- Guthmann N, Lozada M, Monjeau JA, Heinemann K (1997) Population dynamics of five sigmodontine rodents of northwestern Patagonia. *Acta Theriologica* 42:143-152
- Hamilton MA, Murray BR, Cadotte MW, Hose GC, Baker AC, Harris CJ, Licari D (2005) Life-history correlates of plant invasiveness at regional and continental scales. *Ecology Letters* 8:1066-1074
- Hanspach J, Kühn I, Pyšek P, Boos E, Klotz S (2008) Correlates of naturalization and occupancy of introduced ornamentals in Germany. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 10:241-250
- Harley JL, Smith SE (1983) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London
- Harper JL (1977) *Population biology of plants*. Academic Press,
- Harper JL, Lovell PH, Moore KG (1970) The shapes and sizes of seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1:327-356
- Harrison XA (2014) Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ* 2:e616
- Hay ME (1986) Associational Plant Defenses and the Maintenance of Species Diversity: Turning Competitors Into Accomplices. *The American Naturalist* 128:617-641
- Hayward J, Horton TR, Nuñez MA (2015) Ectomycorrhizal fungal communities coinvasive with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytologist* 208:497-506
- Hazard C, Kruitbos L, Davidson H, Taylor AF, Johnson D (2017) Contrasting effects of intra- and interspecific identity and richness of ectomycorrhizal fungi on host plants, nutrient retention and multifunctionality. *New Phytologist* 213:852-863
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394:431
- Hemmes DE, Desjardin DE (2008) Annotated list of Boletes and Amanita in the Hawaiian Islands. *North American Fungi* 3:167-176

- Hempel S, Götzenberger L, Kühn I, Michalski SG, Rillig MC, Zobel M, Moora M (2013) Mycorrhizas in the Central European flora: relationships with plant life history traits and ecology. *Ecology* 94:1389-1399
- Henderson L (2007) Invasive, naturalized and casual alien plants in southern Africa: a summary based on the Southern African Plant Invaders Atlas (SAPIA). *Bothalia* 37:215-248
- Henery ML, Westoby M (2001) Seed mass and seed nutrient content as predictors of seed output variation between species. *Oikos* 92:479-490
- Hierro JL, Maron JL, Callaway RM (2005) A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology* 93:5-15
- Hjalten J, Danell K, Lundberg P (1993) Herbivore Avoidance by Association: Vole and Hare Utilization of Woody Plants. *Oikos* 68:125-131
- Ho LST, Ane C (2014) A linear-time algorithm for Gaussian and non-Gaussian trait evolution models. *Systematic biology* 63:397-408
- Hoffmann LA, Redente EF, McEwen LC (1995) Effects of Selective Seed Predation by Rodents on Shortgrass Establishment. *Ecological Applications* 5:200-208
- Holt RD (1977) Predation, apparent competition, and the structure of prey communities. *Theoretical Population Biology* 12:197-229
- Holt RD, Kotler BP (1987) Short-Term Apparent Competition. *The American Naturalist* 130:412-430
- Horton TR (2017) Spore dispersal in ectomycorrhizal fungi at fine and regional scales. In: Tedersoo L (ed) *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Springer International Publishing, Cham, pp 61-78. doi:10.1007/978-3-319-56363-3_3
- Hulme PE (1994) Post-dispersal seed predation in grassland: its magnitude and sources of variation. *Journal of Ecology* 82:645-652
- Hulme PE (1998) Post-dispersal seed predation: consequences for plant demography and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1:32-46
- Hulme PE, Borelli T (1999) Variability in post-dispersal seed predation in deciduous woodland: relative importance of location, seed species, burial and density. *Plant Ecology* 145:149-156
- Ibrahim MA, Kainulainen P, Aflatuni A, Tiilikkala K, Holopainen JK (2011) Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limenone and its suitability for control of insect pests. *Journal of Agricultural and Food Science in Finland* 10:243-259
- Jakobsson A, Eriksson O (2000) A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. *Oikos* 88:494-502
- James S (2016) *An Introduction to Data Analysis using Aggregation Functions in R*. Springer International Publishing,
- Janos DP (1980) Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae Affect Lowland Tropical Rain Forest Plant Growth. *Ecology* 61:151-162
- Janos DP (2007) Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* 17:75-91
- Jansen P, Bartholomeus M, Bongers F, Elzinga JA, Ouden J, den, van wieren S (2002) The Role of Seed Size in Dispersal by a Scatter-hoarding Rodent. In: Levey DJ, Silva WR, Galetti M (eds) *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation*. CABI International, pp 209-225
- Janzen DH (1969) Seed-Eaters Versus Seed Size, Number, Toxicity and Dispersal. *Evolution* 23:1-27

- Janzen DH (1970) Herbivores and the Number of Tree Species in Tropical Forests. *The American Naturalist* 104:501-528.
- Janzen DH (1971) Seed predation by animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2:465-492
- Jeschke JM (2014) General hypotheses in invasion ecology. *Diversity and Distributions* 20:1229-1234
- Johnson NC, Graham J-H, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575-585
- Johnson NC, Graham JH (2013) The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant and Soil* 363:411-419
- Jombart T, Dray S (2008) adephylo: exploratory analyses for the phylogenetic comparative method.
- Jones ML, Ramoneda J, Rivett DW, Bell T (2017) Biotic resistance shapes the influence of propagule pressure on invasion success in bacterial communities. *Ecology* 98:1743-1749
- Karst J, Burns C et al. (2018) Tree species with limited geographical ranges show extreme responses to ectomycorrhizas. *Global Ecology and Biogeography* 27:839-848
- Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* 17:164-170
- Kiers ET, Lovelock CE, Krueger EL, Herre EA (2000) Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecology Letters* 3:106-113
- Klironomos J (2000) Host-specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial Biosystems: New Frontiers* 1:845-851
- Koele N, Dickie IA, Oleksyn J, Richardson SJ, Reich PB (2012) No globally consistent effect of ectomycorrhizal status on foliar traits. *New Phytologist* 196:845-852
- Koske RE, Gemma JN, Flynn T (1992) Mycorrhizae in Hawaiian Angiosperms: A Survey with Implications for the Origin of the Native Flora. *American Journal of Botany* 79:853-862
- Krannitz PG, Duralia TE (2004) Cone and seed production in *Pinus ponderosa*: a review. *Western North American Naturalist* 64:208-218
- Krugman SL, Jenkinson JL (2008) Pinaceae - Pine family. In: Bonner FT, Karraft RP (eds) *The woody plant seed manual*. Agriculture handbook vol 727. USDA Forest Service, Washington DC, pp 809-847
- Lamarque LJ, Delzon S, Lortie CJ (2011) Tree invasions: a comparative test of the dominant hypotheses and functional traits. *Biological Invasions* 13:1969-1989
- Lambers H, Teste FP (2013) Interactions between arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal plants: do non-mycorrhizal species at both extremes of nutrient availability play the same game? *Plant, Cell & Environment* 36:1911-1915
- Larios L, Pearson DE, Maron JL (2017) Incorporating the effects of generalist seed predators into plant community theory. *Functional Ecology* 31:1856-1867
- Law R, Murrell DJ, Dieckmann U (2003) Population growth in space and time: spatial logistic equations. *Ecology* 84:252-262
- Leishman MR, Westoby M (1994) The role of seed size in seedling establishment in dry soil conditions -- Experimental evidence from semi-arid species. *Journal of Ecology* 82:249-258
- Lekberg Y, Helgason T (2018) In situ mycorrhizal function – knowledge gaps and future directions. *New Phytologist* 220:957-962
- Leopold AC (1983) Volumetric Components of Seed Imbibition. *Plant Physiology* 73:677-680
- Levine JM, Adler PB, Yelenik SG (2004) A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions. *Ecology Letters* 7:975-989

- Levine JM, Vilà M, D'Antonio CM, Dukes JS, Grigulis K, Lavorel S (2003) Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:775-781
- Lobo N, Duong M, Millar JS (2009) Conifer-seed preferences of small mammals. *Canadian Journal of Zoology* 87:773-780
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 20:223-228
- Lockwood JL, Hoopes MF, Marchetti MP (2013) *Invasion Ecology*. Wiley,
- Long FL (1934) Application of Calorimetric Methods to Ecological Research. *Plant Physiology* 9:323-337
- Louda SM (1983) Seed predation and seedling mortality in the recruitment of a shrub, *Haplopappus venetus* (Asteraceae), along a climatic gradient. *Ecology* 64:511-521
- Lustenhouwer N, Moran EV, Levine JM (2017) Trait correlations equalize spread velocity across plant life histories. *Global Ecology and Biogeography* 26:1398-1407
- MacArthur RH, Pianka ER (1966) On Optimal Use of a Patchy Environment. *The American Naturalist* 100:603-609
- Martell AM (1979) Selection of conifer seeds by deer mice and red-backed voles. *Canadian Journal of Forest Research* 9:201-204
- Maurel N, Hanspach J, Kühn I, Pyšek P, van Kleunen M (2016) Introduction bias affects relationships between the characteristics of ornamental alien plants and their naturalization success. *Global Ecology and Biogeography* 25:1500-1509
- McCanny SJ (1985) Alternatives in parent-offspring relationships in plants. *Oikos* 45:148-149
- McGregor KF (2012) Quantifying invasion risk: the genus *Pinus* as a model system. Lincoln University
- McGregor KF, Watt MS, Hulme PE, Duncan RP (2012) What determines pine naturalization: species traits, climate suitability or forestry use? *Diversity and Distributions* 18:1013-1023
- McKey D, Kaufmann S Naturalization of exotic *Ficus* species (Moraceae) in south Florida. In: Center TD, Doren RF, Hofsetter RL, Myers RL, Whiteaker LD (eds) *Proceedings of the Symposium on Exotic Pest Plants*. Technical Report NPS/NREVER/NRTR-91/06, Washington, DC, 1991. United States Department of Interior - National Park Service, pp 221-236
- Menge JA, Johnson ELV, Platt RG (1978) Mycorrhizal dependency of several *Citrus* cultivars under three nutrient regimes. *New Phytologist* 81:553-559
- Menzel A, Hempel S et al. (2017) Mycorrhizal status helps explain invasion success of alien plant species. *Ecology* 98:92-102
- Mikola P (1970) Mycorrhizal inoculation in afforestation. *International review of forestry research* 3:123-196
- Milbau A, Stout JC (2008) Factors Associated with Alien Plants Transitioning from Casual, to Naturalized, to Invasive. *Conservation Biology* 22:308-317
- Miller RM (2005) The Nonmycorrhizal Root: A Strategy for Survival in Nutrient-Impoverished Soils. *The New Phytologist* 165:655-658
- Milton SJ, Wilson JRU, Richardson DM, Seymour CL, Dean WRJ, Iponga DM, Proches Ş (2007) Invasive alien plants infiltrate bird-mediated shrub nucleation processes in arid savanna. *Journal of Ecology* 95:648-661
- Moeller HV, Dickie IA, Peltzer DA, Fukami T (2015) Mycorrhizal co-invasion and novel interactions depend on neighborhood context. *Ecology* 96:2336-2347
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of internal medicine* 151:264-269

- Moles AT, Warton DI, Westoby M (2003) DO SMALL-SEEDED SPECIES HAVE HIGHER SURVIVAL THROUGH SEED PREDATION THAN LARGE-SEEDED SPECIES? *Ecology* 84:3148-3161
- Moles AT, Westoby M (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology* 92:372-383
- Moles AT, Westoby M (2006) Seed size and plant strategy across the whole life cycle. *Oikos* 113:91-105
- Moodley D, Geerts S, Richardson DM, Wilson JRU (2013) Different Traits Determine Introduction, Naturalization and Invasion Success In Woody Plants: Proteaceae as a Test Case. *PLOS ONE* 8:e75078
- Moodley D, Procheş Ş, Wilson JRU (2016) A global assessment of a large monocot family highlights the need for group-specific analyses of invasiveness. *AoB PLANTS* 8
- Moora M (2014) Mycorrhizal traits and plant communities: perspectives for integration. *Journal of Vegetation Science* 25:1126-1132
- Moora M, Berger S et al. (2011) Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing. *Journal of Biogeography* 38:1305-1317
- Moravcová L, Pyšek P, Jarošík V, Havlíčková V, Zákavský P (2010) Reproductive characteristics of neophytes in the Czech Republic: traits of invasive and non-invasive species. *Preslia* 82:365-390
- Moyano J, Chiuffo MC, Nuñez MA, Rodriguez-Cabal MA (2019a) Seed predation does not explain pine invasion success. *Oecologia* 189:981-991
- Moyano J, Chiuffo MC, Policelli N, Nuñez MA, Rodriguez-Cabal MA (2019b) The interplay between propagule pressure, seed predation and ectomycorrhizal fungi in plant invasion. *NeoBiota* 42:45-58
- Moyano J, Dickie IA, Rodriguez-Cabal MA, Nuñez MA (2020a) Patterns of plant naturalization show that facultative mycorrhizal plants are more likely to succeed outside their native Eurasian ranges. *Ecography* 43:648-659
- Moyano J, Rodriguez-Cabal MA, Nuñez MA (2020b) Highly invasive tree species are more dependent on mutualisms. *Ecology* 101:e02997
- Mundry R (2014) Statistical Issues and Assumptions of Phylogenetic Generalized Least Squares. In: Garamszegi LZ (ed) *Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology: Concepts and Practice*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 131-153. doi:10.1007/978-3-662-43550-2_6
- Muschetto E, Mazia N, Cueto GR, Busch M (2015) Are rodents a source of biotic resistance to tree invasion in Pampean grasslands? Tree seed consumption under different conditions. *Austral Ecology* 40:255-266
- Nadel H, Frank JH, Knight Jr R (1992) Escapees and accomplices: the naturalization of exotic *Ficus* and their associated faunas in Florida. *Florida Entomologist*:29-38
- Nagelkerke NJ (1991) A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* 78:691-692
- Nathan R, Horvitz N, He Y, Kuparinen A, Schurr FM, Katul GG (2011) Spread of North American wind-dispersed trees in future environments. *Ecology Letters* 14:211-219
- Niinemets Ü (2010) A review of light interception in plant stands from leaf to canopy in different plant functional types and in species with varying shade tolerance. *Ecological Research* 25:693-714

- Novoa A, Rodríguez J, López-Nogueira A, Richardson DM, González L (2016) Seed characteristics in Cactaceae: Useful diagnostic features for screening species for invasiveness? *South African Journal of Botany* 105:61-65
- Nuñez MA, Chiuffo MC et al. (2017) Ecology and management of invasive Pinaceae around the world: progress and challenges. *Biological Invasions* 19:3099-3120
- Nuñez MA, Dickie IA (2014) Invasive belowground mutualists of woody plants. *Biological Invasions* 16:645-661
- Nuñez MA, Hayward J, Horton TR, Amico GC, Dimarco RD, Barrios-Garcia MN, Simberloff D (2013) Exotic mammals disperse exotic fungi that promote invasion by exotic trees. *PLoS one* 8:e66832
- Nuñez MA, Horton TR, Simberloff D (2009) Lack of belowground mutualisms hinders Pinaceae invasions. *Ecology* 90:2352-2359
- Nuñez MA, Simberloff D, Relva MA (2008) Seed predation as a barrier to alien conifer invasions. *Biological Invasions* 10:1389-1398
- Oduor AMO, Gómez JM, Herrador MB, Perfectti F (2015) Invasion of *Brassica nigra* in North America: distributions and origins of chloroplast DNA haplotypes suggest multiple introductions. *Biological Invasions* 17:2447-2459
- Oje K, Ugbor EC (1991) Some physical properties of oilbean seed. *Journal of Agricultural Engineering Research* 50:305-313
- Olsson O, Nuñez-Iturri G, Smith HG, Ottosson U y Effiom EO (2019) Competition, seed dispersal and hunting: what drives germination and seedling survival in an Afrotropical forest? *AoB Plants* 11.
- Orrock JL, Borer ET et al. (2015) A continent-wide study reveals clear relationships between regional abiotic conditions and post-dispersal seed predation. *Journal of Biogeography* 42:662-670
- Ortega YK, Pearson DE, Waller LP, Sturdevant NJ, Maron JL (2012) Population-level compensation impedes biological control of an invasive forb and indirect release of a native grass. *Ecology* 93:783-792
- Ostoja SM, Schupp E, Klinger R (2013a) Seed harvesting by a generalist consumer is context-dependent: Interactive effects across multiple spatial scales. vol 122. doi:10.2307/41937703
- Ostoja SM, Schupp EW, Durham S, Klinger R (2013b) Seed harvesting is influenced by associational effects in mixed seed neighbourhoods, not just by seed density. *Functional Ecology* 27:775-785
- Otero XL, De La Peña-Lastra S, Pérez-Alberti A, Ferreira TO, Huerta-Diaz MA (2018) Seabird colonies as important global drivers in the nitrogen and phosphorus cycles. *Nature Communications* 9:246
- Padrón B, Nogales M, Traveset A, Vilà M, Martínez-Abraín A, Padilla DP, Marrero P (2011) Integration of invasive *Opuntia* spp. by native and alien seed dispersers in the Mediterranean area and the Canary Islands. *Biological Invasions* 13:831-844
- Pardiñas UFJ, Teta P (2013) Holocene stability and recent dramatic changes in micromammalian communities of northwestern Patagonia. *Quaternary International* 305:127-140
- Paritsis J, Aizen MA (2008) Effects of exotic conifer plantations on the biodiversity of understory plants, epigeal beetles and birds in *Nothofagus dombeyi* forests. *Forest Ecology and Management* 255:1575-1583
- Pavoine S, Ollier S, Pontier D, Chessel D (2008) Testing for phylogenetic signal in phenotypic traits: new matrices of phylogenetic proximities. *Theoretical population biology* 73:79-91

- Pearson DE, Callaway RM, Maron JL (2011) Biotic resistance via granivory: establishment by invasive, naturalized, and native asters reflects generalist preference. *Ecology* 92:1748-1757
- Pearson DE, Ortega YK, Eren Ö, Hierro JL (2018) Community assembly theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 33:313-325
- Pearson DE, Potter T, Maron JL (2012) Biotic resistance: exclusion of native rodent consumers releases populations of a weak invader. *Journal of Ecology* 100:1383-1390
- Pearson O (1995) Annotated keys for identifying small mammals living in or near Nahuel-Huapi National Park or Lanin National Park, Southern Argentina. *Mastozoología Neotropical* 2:99-148
- Pearson OP (1983) Characteristics of a Mammalian Fauna from Forests in Patagonia, Southern Argentina. *Journal of Mammalogy* 64:476-492
- Peat HJ, Fitter AH (1993) The distribution of arbuscular mycorrhizas in the British flora. *New Phytologist* 125:845-854
- Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH, Bruns TD (2012) Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* 21:4122-4136
- Perret DL, Leslie AB, Sax DF (2019) Naturalized distributions show that climatic disequilibrium is structured by niche size in pines (*Pinus* L.). *Global Ecology and Biogeography* 28:429-441
- Perry DA, Margolis H, Choquette C, R. M, Trappe JM (1989) Ectomycorrhizal mediation of competition between coniferous tree species. *New Phytologist* 112:501-511
- Pfister CA, Hay ME (1988) Associational Plant Refuges: Convergent Patterns in Marine and Terrestrial Communities Result from Differing Mechanisms. *Oecologia* 77:118-129
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52:273-288
- Pinheiro J, Bates D, DebROy S, Sarkar D, Heisterkamp S, van Willigen B, Maintainer R (2017) Package 'nlme'. Linear and nonlinear mixed effects models.
- Pirk GI, Lopez de Casenave J (2017) Ant interactions with native and exotic seeds in the Patagonian steppe: Influence of seed traits, disturbance levels and ant assemblage. *Plant Ecology* 218:1255-1268
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V (1983) Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70:199-209
- Pringle A, Bever JD, Gardes M, Parrent JL, Rillig MC, Klironomos JN (2009) Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:699-715
- Pringle A, Vellinga EC (2006) Last Chance to Know? Using Literature to Explore the Biogeography and Invasion Biology of the Death Cap Mushroom *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr. :Fr.) Link. *Biological Invasions* 8:1131-1144
- Procheş Ş, Wilson JRU, Richardson DM, Rejmánek M (2012) Native and naturalized range size in *Pinus*: relative importance of biogeography, introduction effort and species traits. *Global Ecology and Biogeography* 21:513-523
- Pyšek P (1998) Is There a Taxonomic Pattern to Plant Invasions? *Oikos* 82:282-294
- Pyšek P, Jarošík V et al. (2011) Successful invaders co-opt pollinators of native flora and accumulate insect pollinators with increasing residence time. *Ecological Monographs* 81:277-293
- Pyšek P, Manceur AM et al. (2015) Naturalization of central European plants in North America: species traits, habitats, propagule pressure, residence time. *Ecology* 96:762-774

- Pyšek P, Richardson DM (2007) Traits Associated with Invasiveness in Alien Plants: Where Do we Stand? In: Nentwig W (ed) Biological Invasions. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 97-125. doi:10.1007/978-3-540-36920-2_7
- Qian H, Jin Y (2016) An updated megaphylogeny of plants, a tool for generating plant phylogenies and an analysis of phylogenetic community structure. *Journal of Plant Ecology* 9:233-239
- Quinn GP, Keough MJ (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, Cambridge. doi:DOI: 10.1017/CBO9780511806384
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Raffaele E, Nuñez MA, Eneström J, Blackhall M (2016) Fire as mediator of pine invasion: evidence from Patagonia, Argentina. *Biological Invasions* 18:597-601
- Ramírez W (1988) *Ficus microcarpa* L., *F. benjamina* L. and other species introduced in the New World, their pollinators (Agaonidae) and other fig wasps. *Revista de Biología Tropical* 36:441-446
- Rapparini F, Peñuelas J (2014) Mycorrhizal Fungi to Alleviate Drought Stress on Plant Growth. In: Miransari M (ed) *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume 1. Springer New York, New York, NY, pp 21-42. doi:10.1007/978-1-4614-9466-9_2
- Razanajatovo M, Maurel N et al. (2016) Plants capable of selfing are more likely to become naturalized. *Nature Communications* 7:13313
- Reinhart KO, Lekberg Y, Klironomos J, Maherali H (2017) Does responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi depend on plant invasive status? *Ecology and evolution* 7:6482-6492
- Rejmánek (2000) Invasive plants: approaches and predictions. *Austral Ecology* 25:497-506
- Rejmánek M (1996) A theory of seed plant invasiveness: The first sketch. *Biological Conservation* 78:171-181
- Rejmánek M, Richardson DM (1996) What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* 77:1655-1661
- Rejmánek M, Richardson DM (2013) Trees and shrubs as invasive alien species – 2013 update of the global database. *Diversity and Distributions* 19:1093-1094
- Rejmánek M, Richardson DM, Higgins SI, Pitcairn MJ, Grotkopp E (2005) Ecology of invasive plants: state of the art. *SCOPE-Scientific Committee on Problems of the Environment international councils of scientific unions* 63:104
- Revell LJ (2012) phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* 3:217-223
- Rey PJ, Gutiérrez JE, Alcántara J, Valera F (1997) Fruit size in wild olives: implications for avian seed dispersal. *Functional Ecology* 11:611-618
- Řezáčová V, Řezáč M, Gryndlerová H, Wilson GWT, Michalová T (2020) Arbuscular mycorrhizal fungi favor invasive *Echinops sphaerocephalus* when grown in competition with native *Inula conyzae*. *Scientific Reports* 10:20287
- Richardson DM (2006) Pinus: a model group for unlocking the secrets of alien plant invasions? *Preslia* 78:375-388
- Richardson DM, Allsopp N, D'Antonio CM, Milton SJ, Rejmanek M (2000a) Plant invasions—the role of mutualisms. *Biological Reviews* 75:65-93
- Richardson DM, Cowling RM, Le Maitre DC (1990) Assessing the risk of invasive success in Pinus and Banksia in South African mountain fynbos. *Journal of Vegetation Science* 1:629-642
- Richardson DM, Pyšek P (2012) Naturalization of introduced plants: ecological drivers of biogeographical patterns. *New Phytologist* 196:383-396

- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ (2000b) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 6:93-107
- Richardson DM, Rejmánek M (2004) Conifers as invasive aliens: a global survey and predictive framework. *Diversity and Distributions* 10:321-331
- Richardson DM, Rejmánek M (2011) Trees and shrubs as invasive alien species – a global review. *Diversity and Distributions* 17:788-809
- Richardson DM, Williams PA, Hobbs RJ (1994) Pine Invasions in the Southern Hemisphere: Determinants of Spread and Invasibility. *Journal of Biogeography* 21:511-527
- Rodger JG, Kleunen M, Johnson SD (2013) Pollinators, mates and Allee effects: the importance of self-pollination for fecundity in an invasive lily. *Functional Ecology* 27:1023-1033
- Rodriguez-Cabal MA, Barrios-Garcia MN, Nuñez MA (2012) Positive interactions in ecology: filling the fundamental niche. *Ecology* 93:37-41
- Rohatgi A (2018) WebPlotDigitizer 4.1 edn., <https://automeris.io/WebPlotDigitizer>
- Rojas-Sandoval J, Acevedo-Rodríguez P (2015) Naturalization and invasion of alien plants in Puerto Rico and the Virgin Islands. *Biological Invasions* 17:149-163
- Rubino FM, Martinoli A et al. (2012) Food choice of Eurasian red squirrels and concentrations of anti-predatory secondary compounds. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 77:332-338
- Rueda M, Godoy O, Hawkins BA (2017) Spatial and evolutionary parallelism between shade and drought tolerance explains the distributions of conifers in the conterminous United States. *Global Ecology and Biogeography* 26:31-42
- Salgado Salomón ME, Barroetaveña C y Rajchenberg M (2011) Do pine plantations provide mycorrhizal inocula for seedlings establishment in grasslands from Patagonia, Argentina? *New Forests* 41:191-205.
- Sanders IR, Fitter AH (1992) Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. *Mycological Research* 96:415-419
- Sarasola M, Rusch V, Schlichter T, Ghersa C (2006) Tree conifers invasion in steppe areas and *Austrocedrus chilensis* forests in NW Patagonia. *Ecologia Austral* 16:143-156
- Schlichter T, Laclau P (1998) Ecotono estepa-bosque y plantaciones forestales en la Patagonia norte. *Ecologia Austral* 8:285-296
- Seebens H, Schwartz N, Schupp PJ, Blasius B (2016) Predicting the spread of marine species introduced by global shipping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:5646-5651
- Seifert EK, Bever JD, Maron JL (2009) Evidence for the evolution of reduced mycorrhizal dependence during plant invasion. *Ecology* 90:1055-1062
- Sher AA, Hyatt LA (1999) The Disturbed Resource-Flux Invasion Matrix: A New Framework for Patterns of Plant Invasion. *Biological Invasions* 1:107-114
- Simberloff D (2009) The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:81-102
- Simberloff D (2013) *Invasive Species: What Everyone Needs to Know*. OUP USA,
- Simberloff D, Nuñez MA et al. (2010) Spread and impact of introduced conifers in South America: Lessons from other southern hemisphere regions. *Austral Ecology* 35:489-504
- Simberloff D, Relva MA, Nuñez M (2002) Gringos En El Bosque: Introduced Tree Invasion in a Native *Nothofagus/Austrocedrus* Forest. *Biological Invasions* 4:35-53
- Smith FA, Grace EJ, Smith SE (2009) More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 182:347-358

- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd edition edn. Academic press, London, UK
- Soudzilovskaia NA, Vaessen S, van't Zelfde M, Raes N (2017) Global Patterns of Mycorrhizal Distribution and Their Environmental Drivers. In: Tedersoo L (ed) Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Springer International Publishing, Cham, pp 223-235. doi:10.1007/978-3-319-56363-3_11
- Steidinger BS, Crowther TW et al. (2019) Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature* 569:404-408
- Stock WD, Pate JS, Delfs J (1990) Influence of Seed Size and Quality on Seedling Development Under Low Nutrient Conditions in Five Australian and South African Members of the Proteaceae. *Journal of Ecology* 78:1005-1020
- Stürmer SL, Bever JD, Morton JB (2018) Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): a phylogenetic perspective on species distribution patterns. *Mycorrhiza* 28:587-603
- Swaty R, Michael HM, Deckert R, Gehring CA (2016) Mapping the potential mycorrhizal associations of the conterminous United States of America. *Fungal Ecology* 24:139-147
- Swope SM, Parker IM (2010) Widespread seed limitation affects plant density but not population trajectory in the invasive plant *Centaurea solstitialis*. *Oecologia* 164:117-128
- Tahvanainen JO, Root RB (1972) The influence of vegetational diversity on the population ecology of a specialized herbivore, *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia* 10:321-346
- Tawaraya K (2003) Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* 49:655-668
- Tedersoo L, Bahram M et al. (2012) Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21:4160-4170
- Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217-263
- Tedersoo L, Suvi T, Beaver K, Kõljalg U (2007) Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from the native *Vateriaopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist* 175:321-333
- Terborgh J (2013) Using Janzen–Connell to predict the consequences of defaunation and other disturbances of tropical forests. *Biological Conservation* 163:7-12.
- Teste FP, Jones MD, Dickie IA (2019) Dual-mycorrhizal plants: their ecology and relevance. *New Phytologist* 0
- Theoharides KA, Dukes JS (2007) Plant invasion across space and time: factors affecting nonindigenous species success during four stages of invasion. *New Phytologist* 176:256-273
- Torrecillas E, Alguacil M, Roldán A (2012) Host preferences of AM fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Applied and environmental microbiology:AEM*. 01287-01212
- Traveset A, Richardson DM (2014) Mutualistic interactions and biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45:89-113
- Trøjelsgaard K, Jordano P, Carstensen DW, Olesen JM (2015) Geographical variation in mutualistic networks: similarity, turnover and partner fidelity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282:20142925

- Urcelay C, Longo S, Geml J, Tecco PA, Nouhra E (2017) Co-invasive exotic pines and their ectomycorrhizal symbionts show capabilities for wide distance and altitudinal range expansion. *Fungal Ecology* 25:50-58
- van der Heijden MGA, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79:2082-2091
- van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205:1406-1423
- van Kleunen M, Dawson W, Maurel N (2015) Characteristics of successful alien plants. *Molecular Ecology* 24:1954-1968
- van Kleunen M, Johnson SD (2007) Effects of self-compatibility on the distribution range of invasive European plants in North America. *Conservation Biology* 21:1537-1544
- van Kleunen M, Pyšek P et al. (2019) The Global Naturalized Alien Flora (GloNAF) database. *Ecology* 100:e02542
- van Kleunen M, Weber E, Fischer M (2010) A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. *Ecology Letters* 13:235-245
- van Wilgen BW, Richardson DM (2012) Three centuries of managing introduced conifers in South Africa: Benefits, impacts, changing perceptions and conflict resolution. *Journal of Environmental Management* 106:56-68
- van Wilgen BW, Siegfried WR (1986) Seed dispersal properties of three pine species as a determinant of invasive potential. *South African Journal of Botany* 52:546-548
- Vandenkoornhuysen P, Ridgway K, Watson I, Fitter A, Young J (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12:3085-3095
- Veresoglou SD, Rillig MC (2012) Suppression of fungal and nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi. *Biology Letters* 8:214-217
- Veresoglou SD, Rillig MC, Johnson D (2018) Responsiveness of plants to mycorrhiza regulates coexistence. *Journal of Ecology* 106:1864-1875
- Vilà M, Espinar JL et al. (2011) Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology Letters* 14:702-708
- Vogelsang KM, Bever JD (2009) Mycorrhizal densities decline in association with nonnative plants and contribute to plant invasion. *Ecology* 90:399-407
- Vogelsang KM, Bever JD, Griswold M, Schultz PA (2004) The use of mycorrhizal fungi in erosion control applications. Final Report for Caltrans Sacramento (California): California Department of Transportation Contract:150
- von Holle B, Simberloff D (2005) Ecological resistance to biological invasions overwhelmed by propagule pressure. *Ecology* 86:3212-3218
- Wang B, Ives AR (2017) Tree-to-tree variation in seed size and its consequences for seed dispersal versus predation by rodents. *Oecologia* 183:751-762
- Wang Z, Cao L, Zhang Z (2014) Seed traits and taxonomic relationships determine the occurrence of mutualisms versus seed predation in a tropical forest rodent and seed dispersal system. *Integrative Zoology* 9:309-319
- Wheelwright NT (1985) Fruit-Size, Gape Width, and the Diets of Fruit-Eating Birds. *Ecology* 66:808-818
- Wheelwright NT (1993) Fruit size in a tropical tree species: variation, preference by birds, and heritability. *Vegetatio* 107:163-174
- Wilkinson GN, Rogers CE (1973) Symbolic Description of Factorial Models for Analysis of Variance. *Journal of the Royal Statistical Society Series C (Applied Statistics)* 22:392-399

- Williamson M (2006) Explaining and predicting the success of invading species at different stages of invasion. *Biological Invasions* 8:1561-1568
- Williamson M, Fitter A (1996) The Varying Success of Invaders. *Ecology* 77:1661-1666
- Wolf DC, Skipper HD (1994) Soil sterilization. In: *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*. vol *methodsofsoilan2*. pp 41-51
- Wood DM, Andersen MC (1990) The Effect of Predispersal Seed Predators on Colonization of *Aster ledophyllus* on Mount St. Helens, Washington. *The American Midland Naturalist* 123:193-201
- Wood JR, Dickie IA, Moeller HV, Peltzer DA, Bonner KI, Rattray G, Wilmshurst JM (2015) Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. *Journal of Ecology* 103:121-129
- Yang X, Li S et al. (2018) Demographic strategies of a dominant tree species in response to logging in a degraded subtropical forest in Southeast China. *Annals of Forest Science* 75:84
- Zanne AE, Tank DC et al. (2014) Three keys to the radiation of angiosperms into freezing environments. *Nature* 506:89-92
- Zhang H, Zhang Z (2008) Endocarp thickness affects seed removal speed by small rodents in a warm-temperate broad-leaved deciduous forest, China. *Acta Oecologica* 34:285-293
- Zhao H, Peng S, Chen Z, Wu Z, Zhou G, Wang X, Qiu Z (2011) Abscisic acid in soil facilitates community succession in three forests in China. *Journal of chemical ecology* 37:785-793
- Zhu J, Liu M, Xin Z, Zhao Y, Liu Z (2015) Which factors have stronger explanatory power for primary wind dispersal distance of winged diaspores: the case of *Zygophyllum xanthoxylon* (Zygophyllaceae)? *Journal of Plant Ecology* 9:346-356

Material suplementario

Material suplementario del Capítulo 2

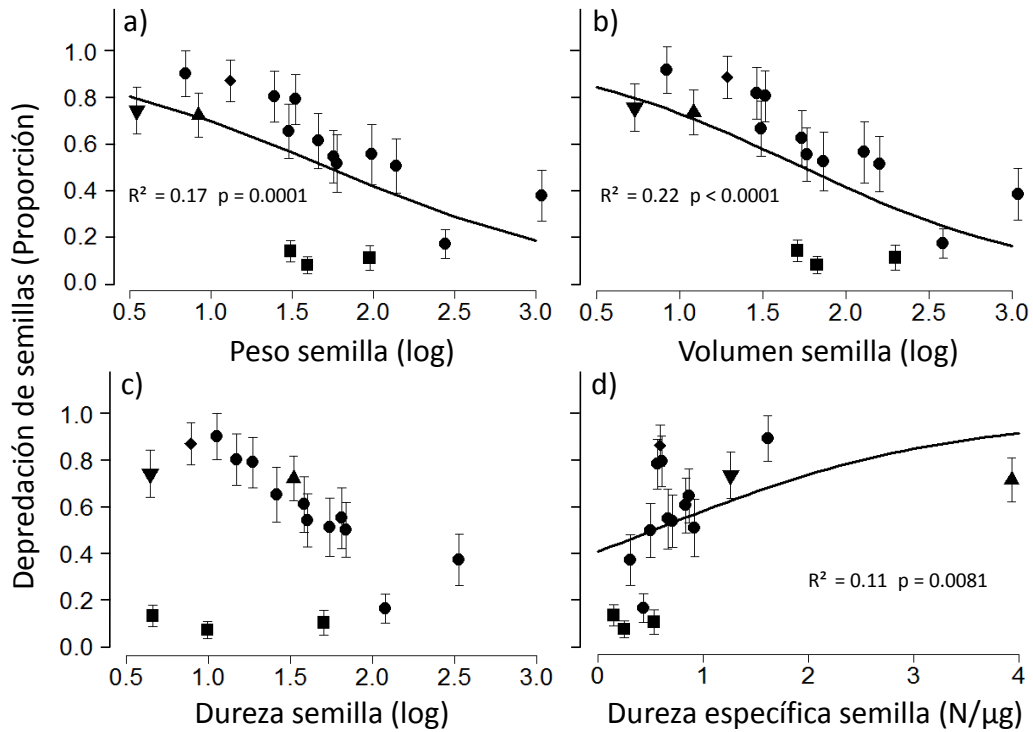


Figura S2.1: Regresión logística entre la depredación de semillas y a) el peso de la semilla, b) el volumen de la semilla, c) la dureza de la semilla y d) la dureza específica de la semilla para el diseño experimental "Palitos mono-especie" a los 8 días de la instalación del experimento. Cada género se indica con una forma diferente: *Pinus* (círculo ●), *Pseudotsuga* (diamante ◆), *Abies* (cuadrado ■), *Larix* (triángulo ▲), *Austrocedrus* (triángulo invertido ▼). Los puntos indican valores medios y la medida de la variabilidad es el error estándar. Las líneas de regresión, los valores de R^2 y p sólo se muestran para las regresiones significativas ($p < 0.05$)

Tabla S2.1: Parámetros de regresión para diferentes modelos (diferente atributo de la semilla como variable predictiva) y para diferentes diseños experimentales, ya sea incluyendo todas las especies de Pinaceae y *Austrocedrus chilensis* o sólo las especies de *Pinus*. Los efectos significativos ($p < 0.05$) se muestran en negrita.

Días	Atributo de semilla	Pinaceae & <i>A. chilensis</i>				<i>Pinus</i>			
		"Palitos mono-especie"		"Palitos multi-especie"		"Palitos mono-especie"		"Palitos multi-especie"	
		R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p
1	Peso	0.01	0.3660	0.08	0.1170	0.01	0.4640	0.10	0.1710
	Volumen	0.02	0.2702	0.10	0.0966	0.01	0.4700	0.11	0.1550
	Dureza	0.00	0.7499	0.06	0.1930	0.01	0.4770	0.12	0.1610
	Dureza específica	0.00	0.6170	0.01	0.6700	0.01	0.5114	0.04	0.3215
2	Peso	0.05	0.0767	0.12	0.0478	0.05	0.1460	0.17	0.0702
	Volumen	0.07	0.0470	0.14	0.0388	0.06	0.1300	0.18	0.0659
	Dureza	0.02	0.2500	0.08	0.1010	0.05	0.1460	0.18	0.0756
	Dureza específica	0.01	0.4230	0.01	0.5440	0.03	0.2240	0.08	0.1410
8	Peso	0.17	0.0001	0.12	0.0006	0.21	0.0007	0.18	0.0010
	Volumen	0.22	< 0.0001	0.15	0.0001	0.22	0.0005	0.18	0.0010
	Dureza	0.04	0.0601	0.04	0.0521	0.22	0.0005	0.18	0.0008
	Dureza específica	0.11	0.0081	0.03	0.0744	0.12	0.0130	0.10	0.0170
15	Peso	0.17	0.0002	0.08	0.0058	0.26	0.0004	0.17	0.0019
	Volumen	0.23	< 0.0001	0.11	0.0014	0.27	0.0003	0.16	0.0024
	Dureza	0.02	0.2014	0.02	0.1889	0.25	0.0005	0.16	0.0026
	Dureza específica	0.19	0.0027	0.02	0.1777	0.20	0.0059	0.13	0.0187
29	Peso	0.13	0.0011	0.09	0.0163	0.22	0.0017	0.63	0.0007
	Volumen	0.20	0.0001	0.15	0.0026	0.24	0.0011	0.62	0.0012
	Dureza	0.00	0.5671	0.00	0.9282	0.21	0.0021	0.62	0.0007
	Dureza específica	0.25	0.0005	0.15	0.0197	0.19	0.0105	0.55	0.0046

Tabla S2.2: Diferentes modelos (diferente atributo de la semilla como variable predictiva), ya sea incluyendo todas las especies de Pinaceae y *Austrocedrus chilensis* o sólo las especies de *Pinus*, y el valor p para el tipo de experimento y el término de interacción (tipo de experimento * atributo de semilla). Los efectos significativos ($p < 0.05$) se muestran en negrita.

Días	Atributo de semilla	Pinaceae & <i>A. chilensis</i>		<i>Pinus</i>	
		Valor p para tipo de experimento	Valor p para interacción (tipo de experimento * atributo de semilla)	Valor p para tipo de experimento	Valor p para interacción (tipo de experimento * atributo de semilla)
1	Peso	0.9072	0.3876	0.7790	0.3880
	Volumen	0.8531	0.3919	0.7040	0.3500
	Dureza	0.8047	0.3460	0.5840	0.3360
	Dureza específica	0.1530	0.9490	0.2228	0.6615
2	Peso	0.9745	0.5438	0.7820	0.4540
	Volumen	0.9900	0.5660	0.7440	0.4380
	Dureza	0.9177	0.4837	0.6050	0.3980
	Dureza específica	0.2460	0.9980	0.3050	0.6670
8	Peso	0.6497	0.6919	0.8792	0.9366
	Volumen	0.5290	0.5610	0.7952	0.8481
	Dureza	0.9739	0.9632	0.8454	0.8924
	Dureza específica	0.4854	0.2748	0.9730	0.8830
15	Peso	0.7605	0.4598	0.9853	0.7691
	Volumen	0.5880	0.3450	0.8922	0.6844
	Dureza	0.6424	0.9409	0.9154	0.7378
	Dureza específica	0.0128	0.0367	0.5922	0.8224
29	Peso	0.3099	0.8552	0.0219	0.0824
	Volumen	0.3490	0.8840	0.0288	0.0898
	Dureza	0.3493	0.7887	0.0235	0.0726
	Dureza específica	0.0507	0.8050	0.2613	0.0502

Tabla S2.3: Comparaciones por pares de los niveles de depredación de semillas entre especies de diferente estado inasivo (invasoras, algo invasoras y no invasoras) en cada fecha desde la instalación del experimento. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran en negrita.

Días	Comparaciones por pares	p
1	Invasora vs Algo invasora	0.3130
	Invasora vs No invasora	0.2160
	Algo invasora vs No invasora	0.9360
2	Invasora vs Algo invasora	0.1274
	Invasora vs No invasora	0.0569
	Algo invasora vs No invasora	0.8800
8	Invasora vs Algo invasora	0.0018
	Invasora vs No invasora	< 0.0001
	Algo invasora vs No invasora	0.0363
15	Invasora vs Algo invasora	0.0046
	Invasora vs No invasora	< 0.0001
	Algo invasora vs No invasora	0.0117
29	Invasora vs Algo invasora	0.0062
	Invasora vs No invasora	< 0.0001
	Algo invasora vs No invasora	0.0020

Tabla S2.4: Comparaciones por pares de los niveles de depredación de semillas entre especies de diferentes géneros (*Abies*, *Austrocedrus*, *Larix*, *Pinus* y *Pseudotsuga*) en cada fecha desde la instalación del experimento. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran en negrita.

Días	Comparaciones por pares	p
1	<i>Abies vs Austrocedrus</i>	0.0647
	<i>Abies vs Larix</i>	0.3038
	<i>Abies vs Pinus</i>	0.1196
	<i>Abies vs Pseudotsuga</i>	0.0931
	<i>Austrocedrus vs Larix</i>	0.4262
	<i>Austrocedrus vs Pinus</i>	0.3811
	<i>Austrocedrus vs Pseudotsuga</i>	0.8458
	<i>Larix vs Pinus</i>	0.7536
	<i>Larix vs Pseudotsuga</i>	0.5349
	<i>Pinus vs Pseudotsuga</i>	0.5670
2	<i>Abies vs Austrocedrus</i>	0.0484
	<i>Abies vs Larix</i>	0.2644
	<i>Abies vs Pinus</i>	0.1243
	<i>Abies vs Pseudotsuga</i>	0.0365
	<i>Austrocedrus vs Larix</i>	0.4289
	<i>Austrocedrus vs Pinus</i>	0.2696
	<i>Austrocedrus vs Pseudotsuga</i>	0.8964
	<i>Larix vs Pinus</i>	0.9069
	<i>Larix vs Pseudotsuga</i>	0.3641
	<i>Pinus vs Pseudotsuga</i>	0.1890
8	<i>Abies vs Austrocedrus</i>	<0.0001
	<i>Abies vs Larix</i>	<0.0001
	<i>Abies vs Pinus</i>	<0.0001
	<i>Abies vs Pseudotsuga</i>	<0.0001
	<i>Austrocedrus vs Larix</i>	0.4557
	<i>Austrocedrus vs Pinus</i>	0.1496
	<i>Austrocedrus vs Pseudotsuga</i>	0.5169
	<i>Larix vs Pinus</i>	0.6090
	<i>Larix vs Pseudotsuga</i>	0.1740
	<i>Pinus vs Pseudotsuga</i>	0.0362
15	<i>Abies vs Austrocedrus</i>	0.0001
	<i>Abies vs Larix</i>	0.0005
	<i>Abies vs Pinus</i>	<0.0001
	<i>Abies vs Pseudotsuga</i>	0.0001
	<i>Austrocedrus vs Larix</i>	0.3958
	<i>Austrocedrus vs Pinus</i>	0.2357
	<i>Austrocedrus vs Pseudotsuga</i>	0.6092
	<i>Larix vs Pinus</i>	0.8715
	<i>Larix vs Pseudotsuga</i>	0.1971
	<i>Pinus vs Pseudotsuga</i>	0.1070
29	<i>Abies vs Austrocedrus</i>	0.0005
	<i>Abies vs Larix</i>	0.0005
	<i>Abies vs Pinus</i>	<0.0001
	<i>Abies vs Pseudotsuga</i>	0.0026
	<i>Austrocedrus vs Larix</i>	0.9142
	<i>Austrocedrus vs Pinus</i>	0.5794
	<i>Austrocedrus vs Pseudotsuga</i>	0.3964
	<i>Larix vs Pinus</i>	0.4997
<i>Larix vs Pseudotsuga</i>	0.4462	
<i>Pinus vs Pseudotsuga</i>	0.1980	

Material suplementario del Capítulo 4

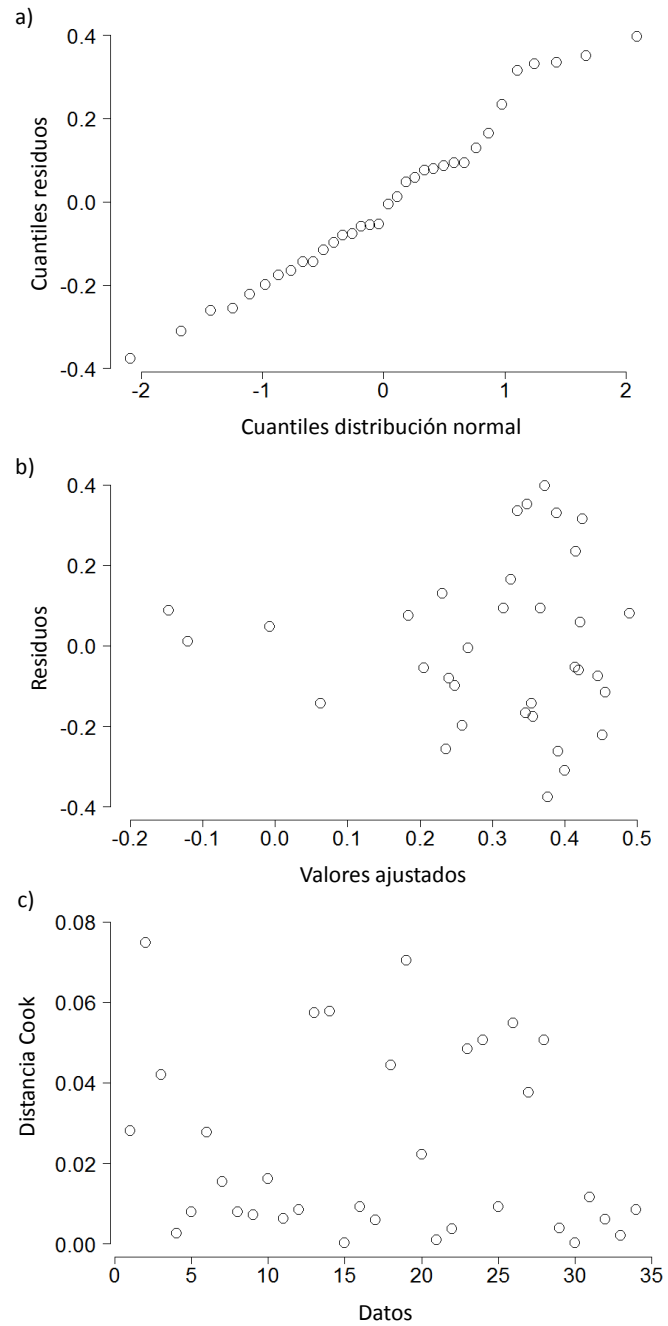


Figura S4.1: Evaluación de supuestos de regresión lineal entre la respuesta de crecimiento de las plántulas a la inoculación de hongos EM y la capacidad de invasión de las especies (índice Z) para 34 especies de *Pinus*, comprobando: a) la distribución normal, b) la homogeneidad de la varianza y c) el apalancamiento.

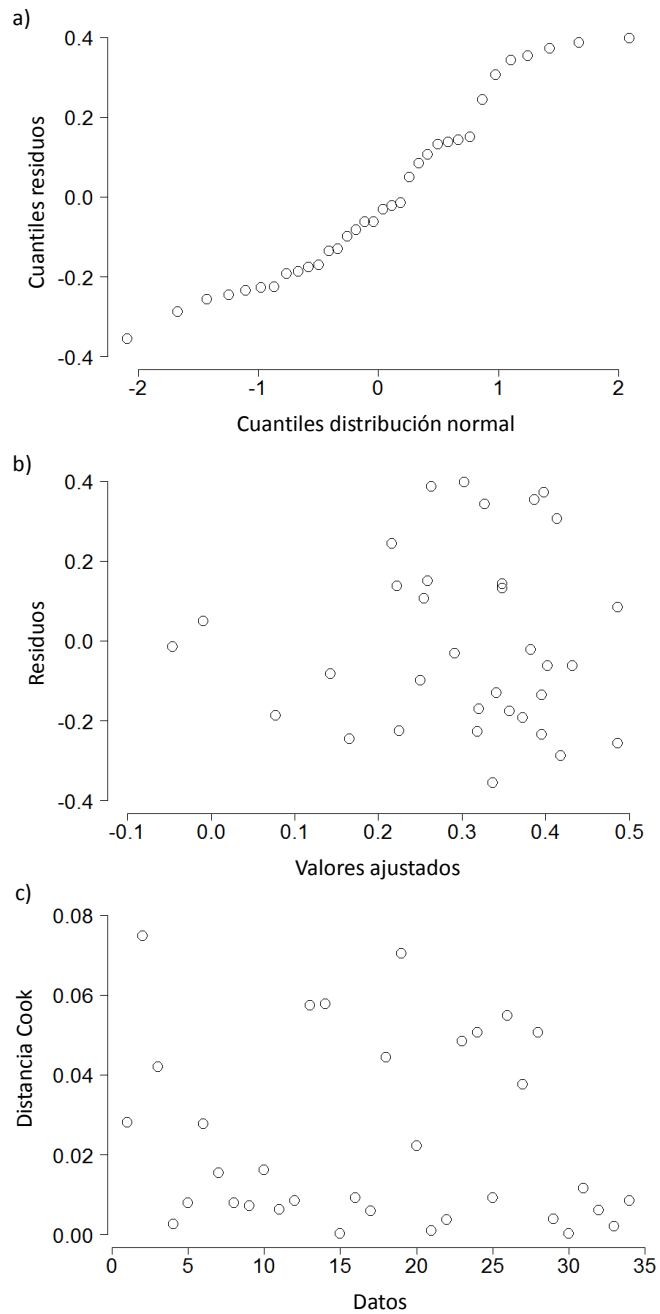


Figura S4.2: Evaluación de supuestos de regresión lineal entre la respuesta de crecimiento de las plántulas a la inoculación con hongos EM y el peso de la semilla para 34 especies de *Pinus*, comprobando: a) la distribución normal, b) la homogeneidad de la varianza y c) el apalancamiento.

Tabla S4.1: Parámetros de la regresión lineal múltiple incluyendo la capacidad de respuesta micorrícica de las plántulas de *Pinus* como variable respuesta y las siguientes variables predictivas: tipo de experimento (de campo o de laboratorio), duración del experimento, fertilización (sí o no), inoculación (una o varias especies de hongos), edad de la plántula en el momento de la inoculación, rango (nativo o introducido), número de réplicas por estudio (para tener en cuenta el sesgo de publicación) y a) índice Z; b) peso de la semilla; c) índice de carga del ala de la semilla. Los efectos significativos ($p < 0.05$) se muestran en negrita.

Variable	Estimador	EE	t	p
Tipo experimento_lab	0.036	0.039	0.907	0.3648
Duración experimento	0.008	0.002	4.083	< 0.0001
Fertilización_sí	-0.153	0.034	-4.452	< 0.0001
Inoculación_una sp	-0.237	0.053	-4.444	< 0.0001
Edad inoculación	-0.022	0.008	-2.737	0.0063
Rango_nativo	0.100	0.037	2.708	0.0069
Repeticiones	-0.003	0.002	-2.110	0.0351
Índice Z	0.012	0.003	4.555	< 0.0001

b)

Variable	Estimador	EE	t	p
Tipo experimento_lab	0.039	0.041	0.967	0.3339
Duración experimento	0.007	0.002	3.747	< 0.0001
Fertilización_sí	-0.168	0.034	-4.888	< 0.0001
Inoculación_una sp	-0.239	0.054	-4.458	< 0.0001
Edad inoculación	-0.023	0.008	-2.879	0.0041
Rango_nativo	0.064	0.038	1.671	0.0949
Repeticiones	-0.004	0.002	-2.346	0.0191
Peso semilla	-0.080	0.031	-2.624	0.0088

c)

Variable	Estimador	EE	t	p
Tipo experimento_lab	0.037	0.040	0.938	0.3482
Duración experimento	0.007	0.002	3.614	0.0003
Fertilización_sí	-0.164	0.034	-4.766	< 0.0001
Inoculación_una sp	-0.242	0.054	-4.528	< 0.0001
Edad inoculation	-0.023	0.008	-2.920	0.0036
Rango_nativo	0.078	0.037	2.100	0.0360
Repeticiones	-0.004	0.001	-2.752	0.0060
Índice carga ala	-0.063	0.023	-2.716	0.0067

* En los casos de variables categóricas con dos niveles (experimento de campo - experimento de laboratorio; sí fertilización - no fertilización; inoculación una especie - inoculación de múltiples especies de hongos; rango introducido - rango nativo) los niveles de referencia son: experimento de campo, sin fertilización, inoculación de múltiples especies de hongos y rango introducido.

Material suplementario Capítulo 5

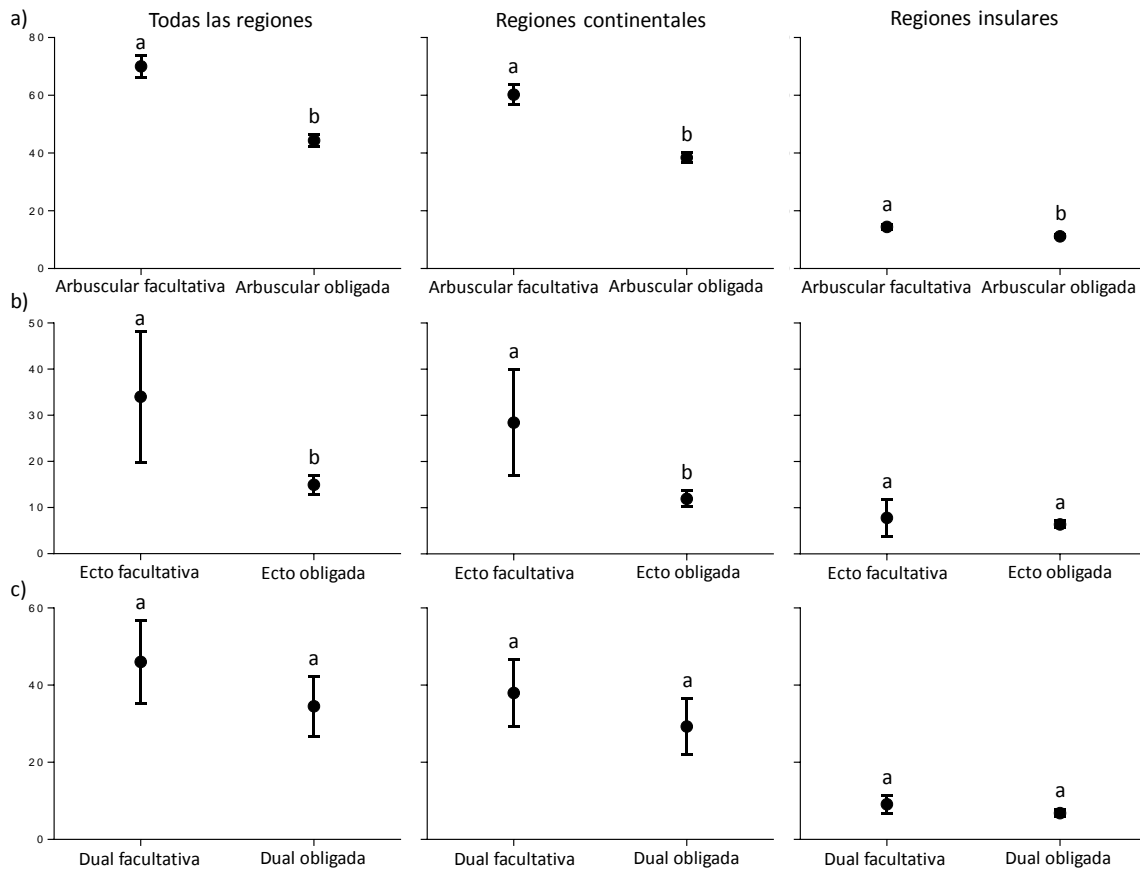


Figura S5.1: Número medio (+EE) de regiones naturalizadas para las especies vegetales a) micorrícicas arbusculares facultativas y micorrícicas arbusculares obligadas, b) ectomicorrícicas facultativas y ectomicorrícicas obligadas, y c) micorrícicas duales facultativas y micorrícicas duales obligadas. La primera columna de los gráficos corresponde a los modelos que incluyen todas las regiones, la segunda columna a los modelos que incluyen sólo las regiones continentales y la tercera columna a los modelos que incluyen sólo las regiones insulares. Las letras indican los resultados de las comparaciones utilizando la regresión lineal filogenética. Letras iguales indican valores que no son significativamente diferentes después de tener en cuenta la relación filogenética, el número de regiones naturalizadas y el número de referencias para cada especie. Las estimaciones de la regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales que comparan el número de regiones naturalizadas de plantas a) micorrícicas arbusculares facultativas y micorrícicas arbusculares obligadas, b) ectomicorrícicas facultativas y ectomicorrícicas obligadas, y c) micorrícicas duales facultativas y micorrícicas duales obligadas están en la Figura S5.4.

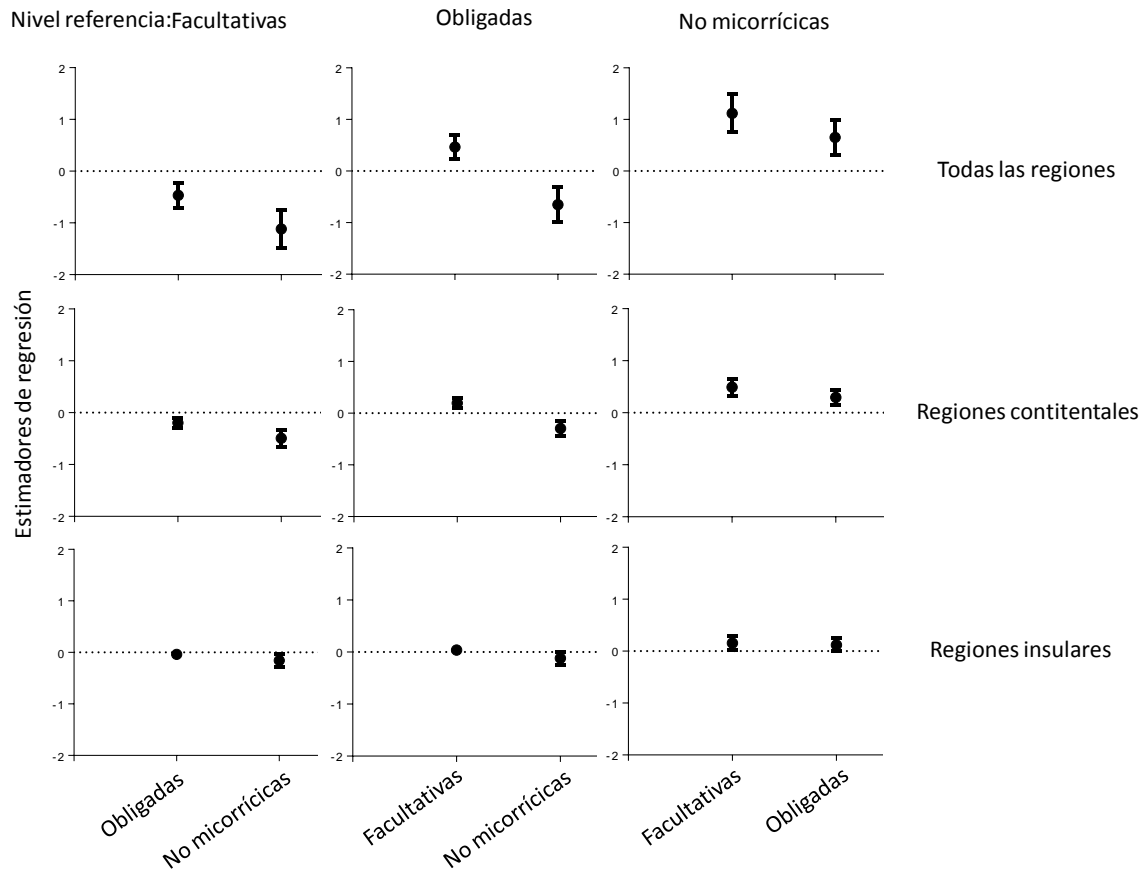
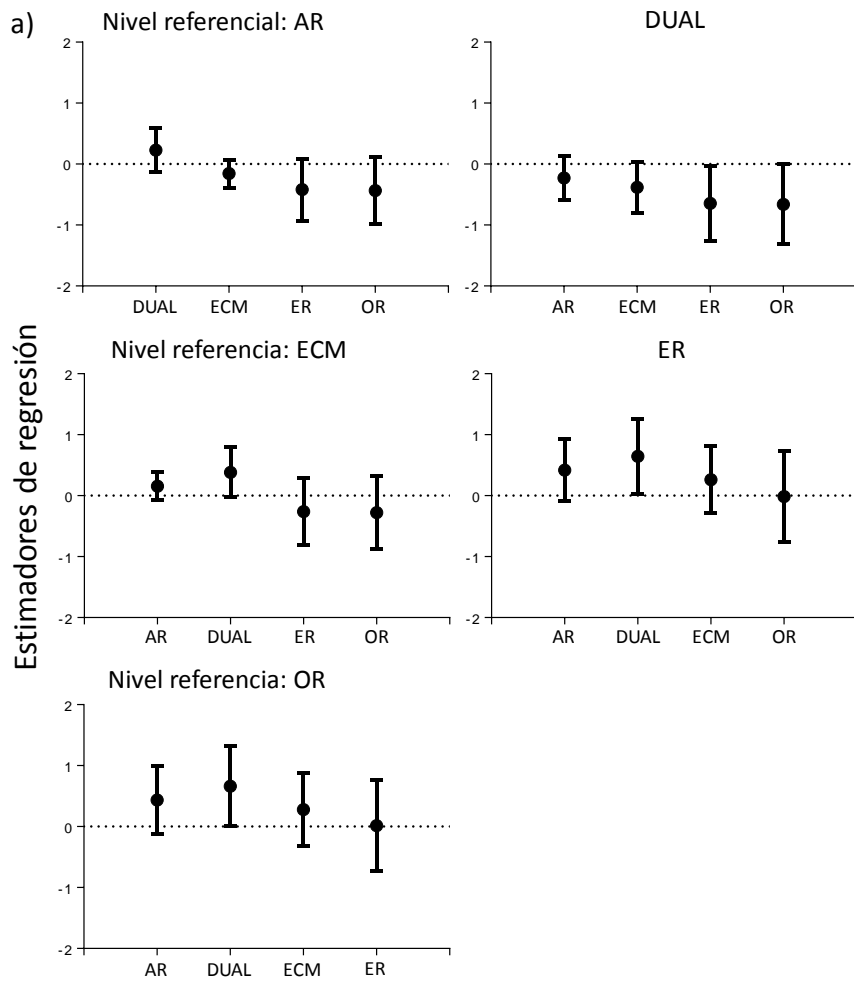
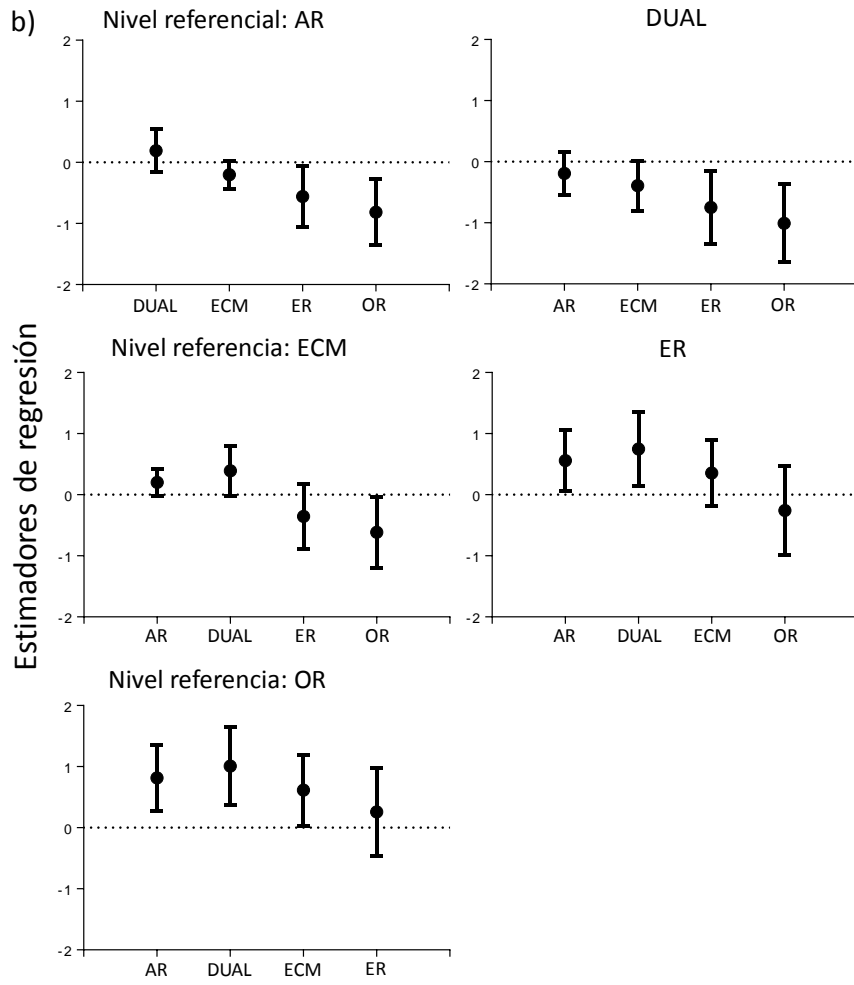


Figura S5.2: Estimadores de regresión (+ IC 95%) de nuestro modelo filogenético lineal que incluye la condición micorrízica (facultativa, obligada y no micorrízica) y el número de referencias para cada especie como variables predictoras, y el número de regiones naturalizadas como variable respuesta. La primera línea de gráficos corresponde a los modelos que incluyen todas las regiones, la segunda línea a los modelos que incluyen sólo las regiones continentales y la tercera línea a los modelos que incluyen sólo las regiones insulares. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de regiones naturalizadas entre cada condición micorrízica y el nivel de referencia, después de tener en cuenta el número de referencias por especie, se producen cuando el intervalo de confianza no incluye el cero.





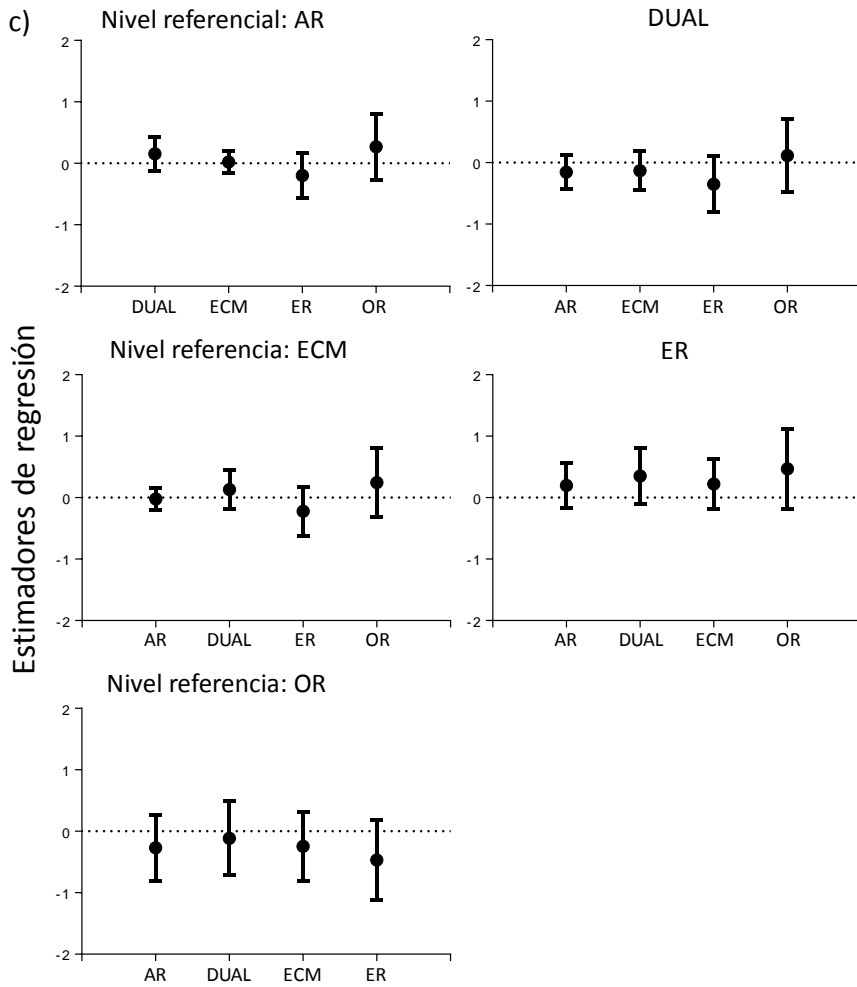


Figura S5.3: Estimadores de regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales que incluyen el tipo de micorriza (arbusculares, duales, ectomicorrícicas, orquioides y ericoides) y el número de referencias para cada especie como variables predictoras, y el número de regiones naturalizadas como variable respuesta; incluyendo a) todas las regiones, b) regiones continentales y c) regiones insulares. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de regiones naturalizadas entre cada tipo de micorriza y el nivel de referencia, tras tener en cuenta el número de referencias por especie, se producen cuando el intervalo de confianza incluye el cero. AR: arbuscular, DUAL: dual, ECM: ectomicorrícico, ER: ericoide, OR: orquioide.

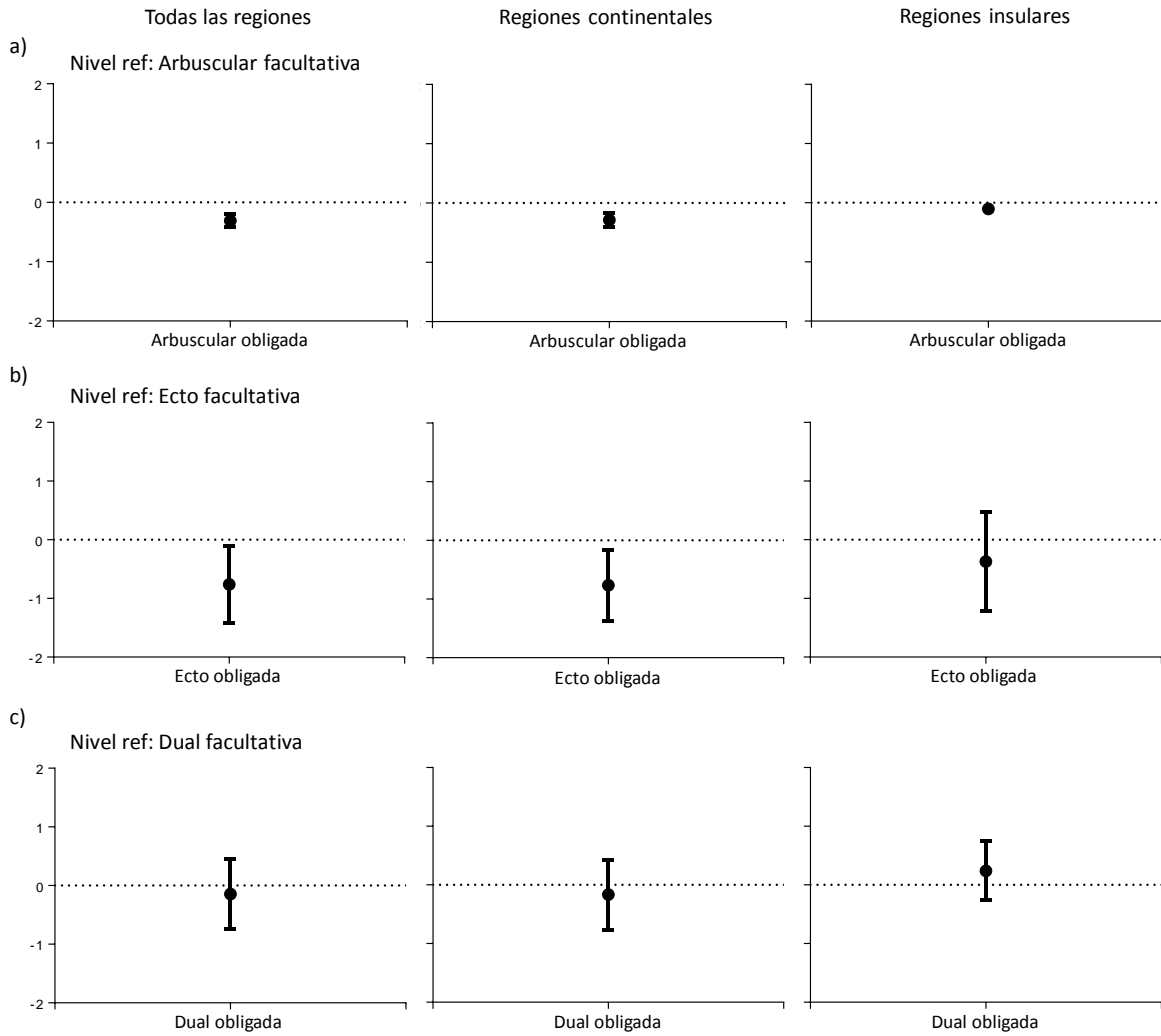


Figura S5.4: Estimadores de regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales que comparan el número de regiones naturalizadas para plantas a) micorrícicas arbusculares facultativas y micorrícicas arbusculares obligadas, b) ectomicorrícicas facultativas y ectomicorrícicas obligadas, y c) micorrícicas duales facultativas y micorrícicas duales obligadas. En la primera columna de los gráficos se muestran los resultados incluyendo todas las regiones, en la segunda columna sólo se incluyen las regiones continentales y en la tercera columna sólo se incluyen las regiones insulares. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de regiones naturalizadas para cada comparación, después de tener en cuenta el número de referencias por especie, se producen cuando el intervalo de confianza incluye el cero.

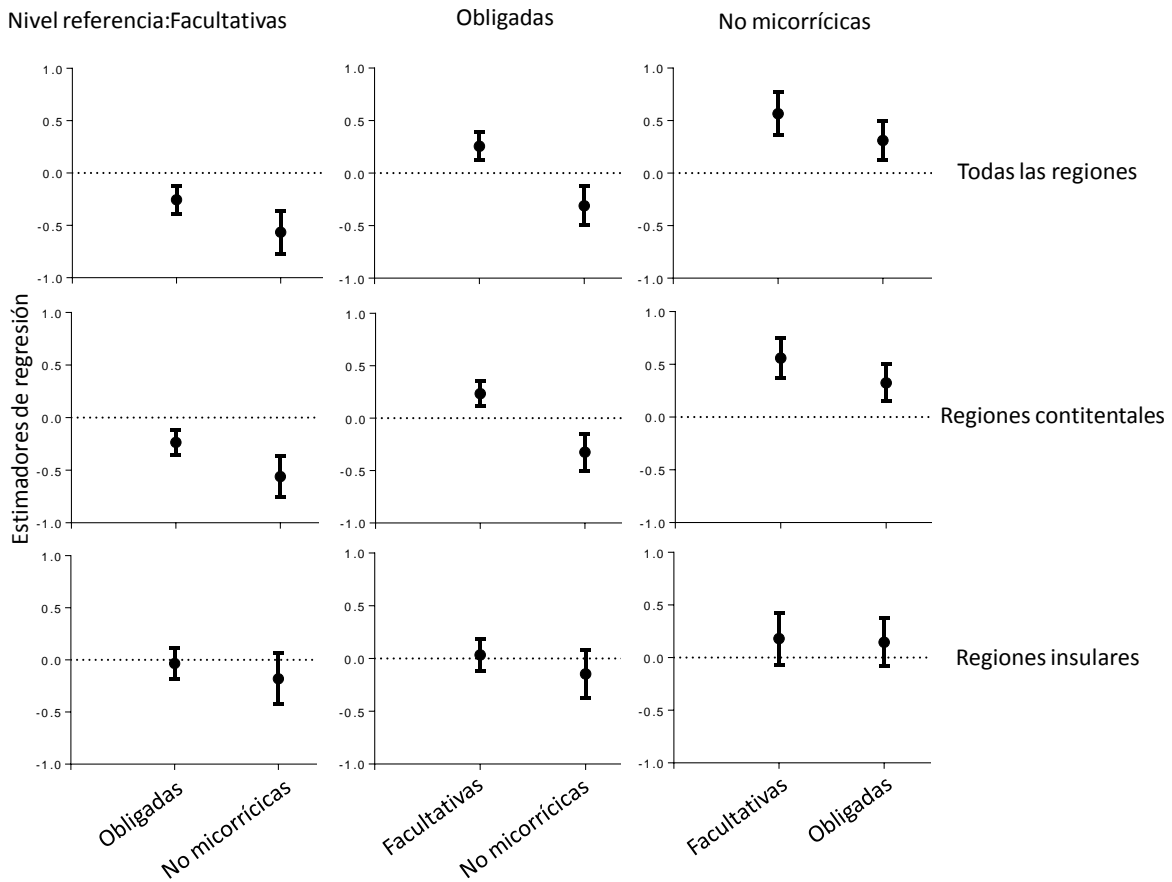
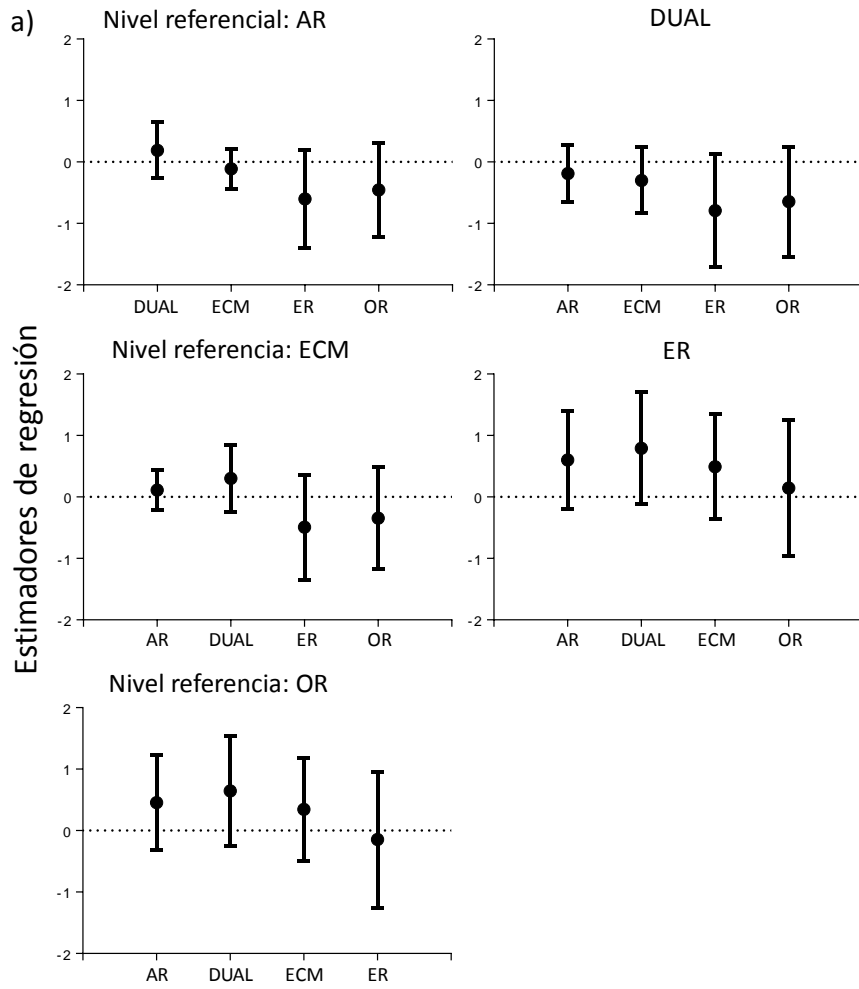
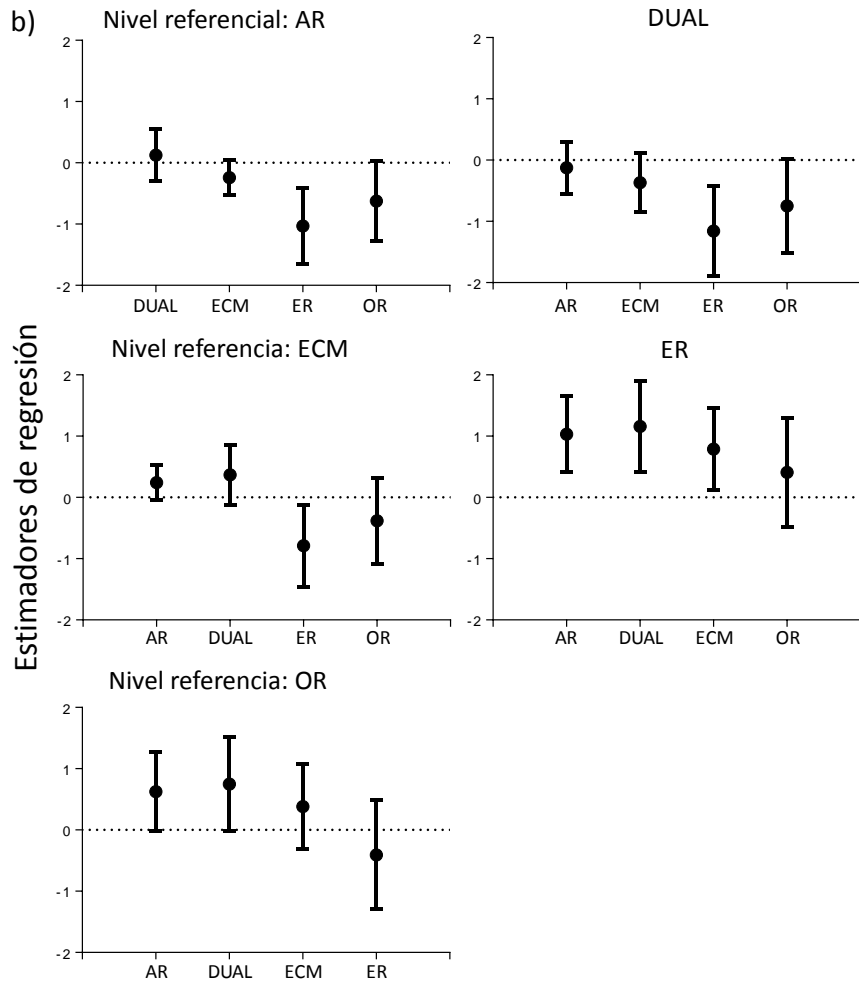


Figura S5.5: Estimadores de regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales que incluyen la condición micorrícica (facultativa, obligada y no micorrícica) y el número de referencias para cada especie como variables predictivas, y el área naturalizada como variable de respuesta. La primera línea de gráficos corresponde a los modelos que incluyen todas las regiones, la segunda línea a los modelos que incluyen sólo las regiones continentales y la tercera línea a los modelos que incluyen sólo las regiones insulares. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en el área naturalizada entre cada condición micorrícica y el nivel de referencia, después de tener en cuenta el número de referencias por especie, se producen cuando el intervalo de confianza no incluye el cero.





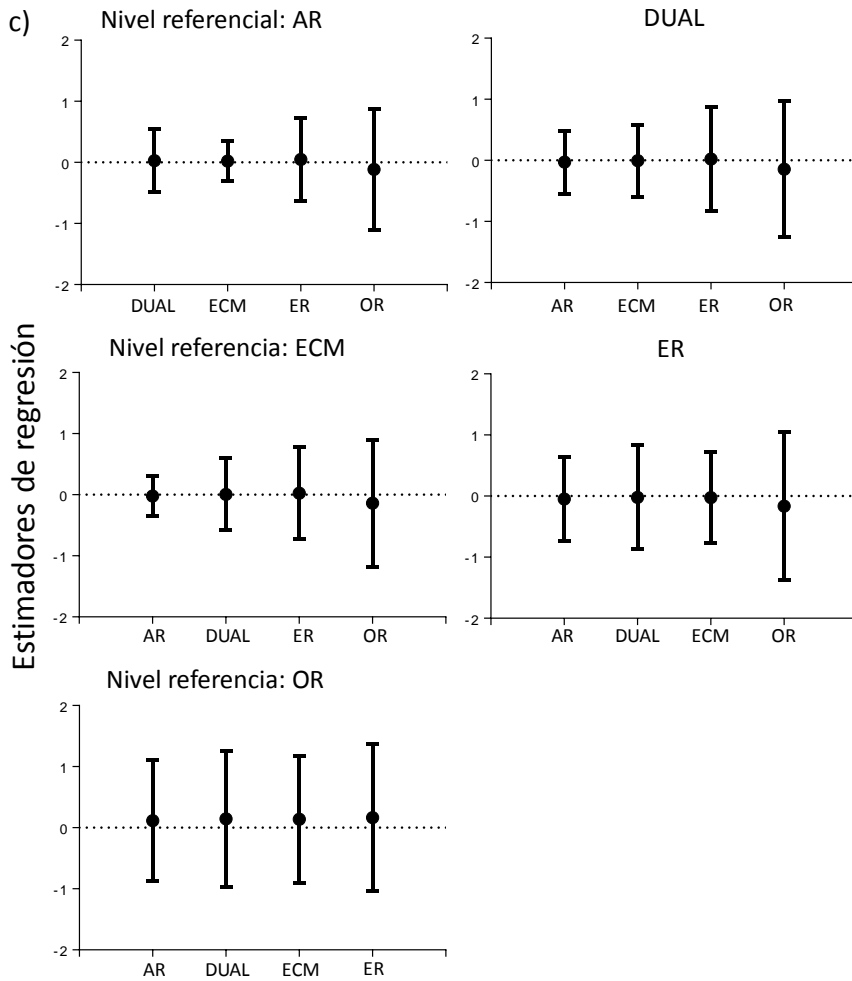


Figura S5.6: Estimadores de regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales que incluyen el tipo de micorrizas (arbusculares, duales, ectomicorrizas, orquioides y ericoides) y el número de referencias para cada especie como variables predictoras, y el área naturalizada como variable respuesta; incluyendo a) todas las regiones, b) regiones continentales y c) regiones insulares. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en el área naturalizada entre cada tipo de micorriza y el nivel de referencia, después de tener en cuenta el número de referencias por especie, se producen cuando el intervalo de confianza no incluye el cero. AR: arbuscular, DUAL: dual, ECM: ectomicorrizas, ER: ericoide, OR: orquioide.

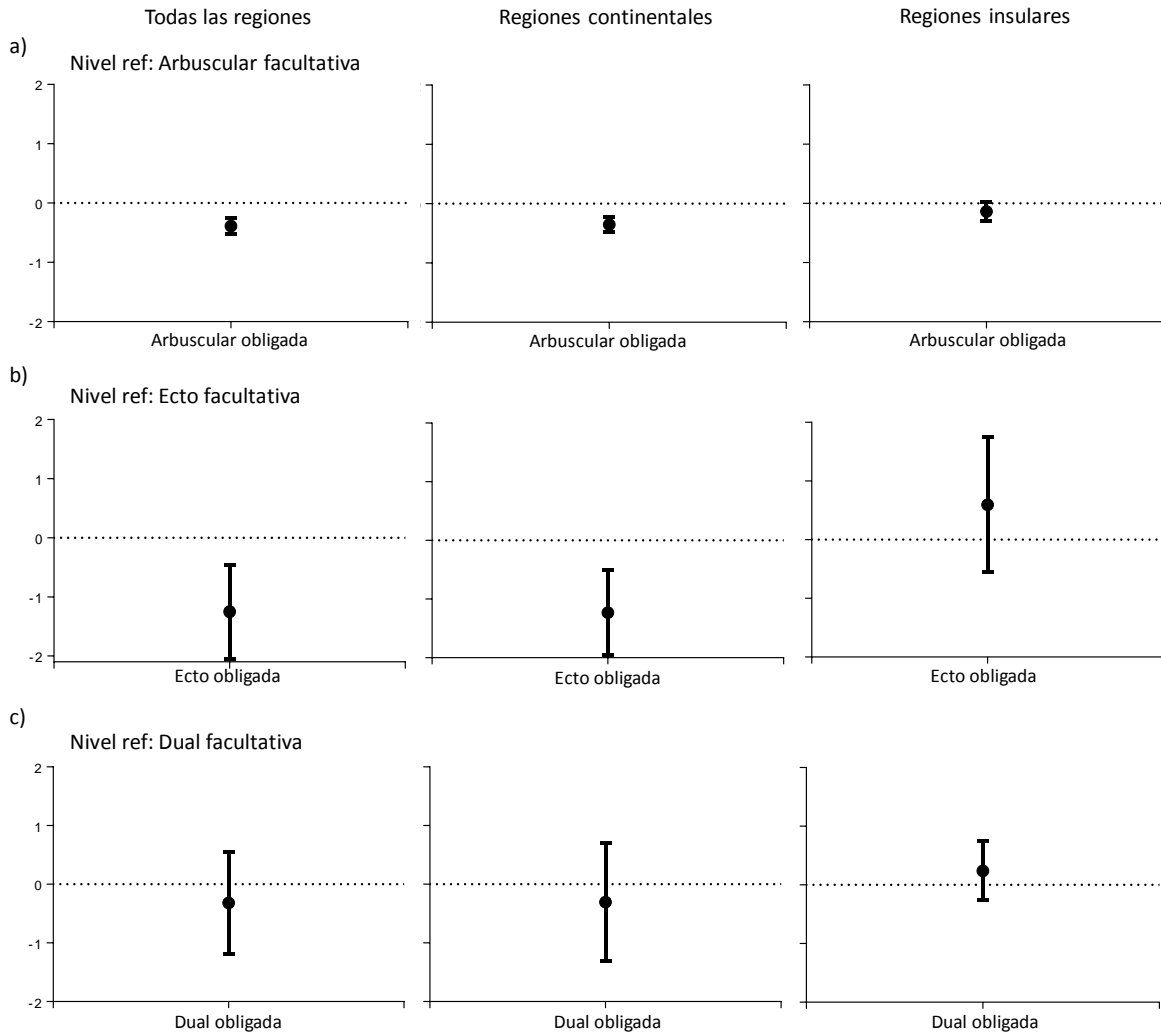


Figura S5.7: Estimadores de regresión (+ IC 95%) de nuestros modelos filogenéticos lineales que comparan el área naturalizada de las plantas a) micorrícicas arbusculares facultativas y micorrícicas arbusculares obligadas, b) ectomicorrícicas facultativas y ectomicorrícicas obligadas, y c) micorrícicas duales facultativas y micorrícicas duales obligadas. En la primera columna de los gráficos se muestran los resultados incluyendo todas las regiones, en la segunda columna sólo se incluyen las regiones continentales y en la tercera columna sólo se incluyen las regiones insulares. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en el área naturalizada para cada comparación, después de tener en cuenta el número de referencias por especie, se producen cuando el intervalo de confianza incluye el cero.

*Seed predation does not explain pine
invasion success*

**Jaime Moyano, Mariana C. Chiuffo,
Martín A. Nuñez & Mariano
A. Rodríguez-Cabal**

Oecologia

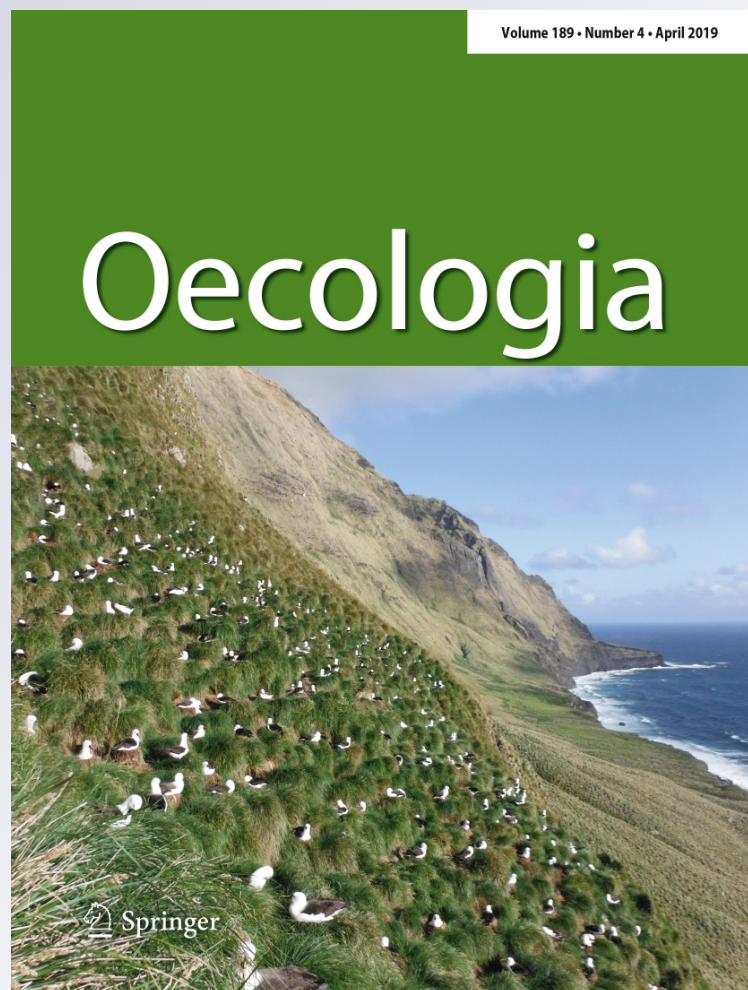
ISSN 0029-8549

Volume 189

Number 4

Oecologia (2019) 189:981-991

DOI 10.1007/s00442-019-04354-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Seed predation does not explain pine invasion success

Jaime Moyano¹ · Mariana C. Chiuffo¹ · Martín A. Nuñez¹ · Mariano A. Rodríguez-Cabal¹Received: 7 August 2018 / Accepted: 1 February 2019 / Published online: 13 March 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Why some non-native plant species invade, and others fail remains an elusive question. Plant invasion success has been associated with specific species traits. Yet, we have limited knowledge of the mechanisms relating these traits to invasion potential. General patterns of biotic resistance by seed predation may provide a mechanism that helps separate invasive from non-invasive plants. Seed predation is an important barrier against plant establishment for many plant species. It may, therefore, create a selective filter against non-native plant establishment based on plant traits related to seed predation rate. In two cafeteria-style seed predation experiments in a steppe ecosystem in Patagonia (Argentina) we provided seeds of 16 non-native Pinaceae covering a 300-fold variation in seed mass, a 200-fold variation in seed volume and 75-fold variation in seed toughness. Seed removal decreased with seed mass and seed volume. Seed toughness was not a significant predictor while seed volume was the best predictor of predators' preference. However, for species of this family small seed size is the most important predictor of species invasiveness. Our results show that seed predation does not explain Pinaceae invasive success. In our system, species that have smaller seeds (i.e., more invasive) are preferentially consumed by seed predators. Seed mass was not the best predictor of granivory rates, despite being the seed trait on which most studies have been focused. Our ability to predict future invasion and understand invasion success could benefit from other studies that focus on the mechanisms behind invasive traits.

Keywords Biotic resistance · Invasive plants · Invasive traits · *Pinus* · Seed traits

Introduction

After several decades of inquiry in the field of biological invasions, the question of why some plant species invade and others fail remains elusive (van Kleunen et al. 2015). Of the many plant species introduced to a new region, intentionally or accidentally, only a small proportion (1%) becomes invasive (Williamson and Fitter 1996; Caley et al.

2008). Although Simberloff (2013) stated that the influence of context and idiosyncrasy is frequently so important that it hinders our ability to predict the identity of future invasive plant species, other studies have tried to elucidate what traits separate invasive from non-invasive plant species. For example, Rejmánek and Richardson (1996) found that small seed size, short juvenile period, and a short interval between masting years are associated with invasive woody species. Grotkopp et al. (2002) found that pine invasiveness increased with higher seedling relative growth rate (RGR), higher specific leaf area (SLA), lower seed mass, and lower minimum generation time (MGT). Yet, we still do not know the mechanisms that link these traits to invasion potential, and without a causal relationship between traits and invasiveness we may be focusing on traits that are only correlated with invasiveness and not the cause (van Kleunen et al. 2010).

Plant invasion success has been associated with the capacity to escape from biotic resistance imposed by the native community (Nuñez et al. 2008; Connolly et al. 2014). Among the components of biotic resistance, seed predation plays a key role as a filter for plants establishment (Janzen

Communicated by Brian J. Wilsey.

Martín A. Nuñez and Mariano A. Rodríguez-Cabal are senior authors.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00442-019-04354-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jaime Moyano
mjaimo@agro.uba.ar

¹ Grupo de Ecología de Invasiones, INIBIOMA, Universidad Nacional del Comahue, CONICET, Avenida de los Pioneros 2350, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina

1969; Hulme 1994; Larios et al. 2017). Seed predators can create a selective pressure over the different plant species in a community by feeding on a specific group of species and consequently reducing their recruitment (Hulme and Borelli 1999; Pearson et al. 2011; Connolly et al. 2014; Muschetto et al. 2015; Larios et al. 2017). Seed predation can occur either before or after seed dispersal but the latter, largely carried out by generalist small mammals, is the most important source of biotic resistance to plant invasions (Hulme 1998; Moles et al. 2003; Nuñez et al. 2008; Connolly et al. 2014). Small mammals tend to prefer large seeds (Brewer 2001; Gómez 2004; Nuñez et al. 2008; Pearson et al. 2011; Wang and Ives 2017). One explanation for this preference pattern is that it might be more efficient for a seed predator to search for a few large seeds instead of many small seeds (MacArthur and Pianka 1966; Hoffmann et al. 1995; Blate et al. 1998). While most studies focus on seed mass as a proxy for seed size, seed volume could also influence small mammals' preference, since some may be limited by the size of their mouthparts (Wheelwright 1985, 1993; Rey et al. 1997; Zhang and Zhang 2008). Seed coat fracture resistance (hereafter seed toughness) may also influence small mammals' preference (Moles et al. 2003; Fricke and Wright 2016), as a lot of energy may be necessary to break through the seed coat and masticate some seeds (Zhang and Zhang 2008). Seed-specific toughness (the ratio between seed toughness and seed mass; Fricke and Wright 2016) is related to the amount of energy that a small mammal would have to invest per gram of food obtained (MacArthur and Pianka 1966; Hoffmann et al. 1995; Blate et al. 1998). Thus, experiments that include a wide range of seed traits may help to elucidate which of these traits could better explain patterns of plant invasion.

The Pinaceae family is an ideal study system to identify invasive traits because it includes many species that have been widely planted around the world, with species that have become invasive and species that have not (Richardson et al. 1994; Simberloff et al. 2010; Essl et al. 2011; Richardson and Rejmánek 2011). Pinaceae is one of the most invasive taxa globally, including species, such as *Pinus radiata* (Monterey Pine), which is native from North America and has become invasive in grasslands, fynbos, and steppes in eight different regions of the world (Rejmánek and Richardson 2013). Furthermore, this family includes approximately 250 species, covering a very wide range of several morphological traits (Richardson 2006; Chave et al. 2009; Niinemets 2010; McGregor et al. 2012; Rueda et al. 2017). Additionally, several studies on invasive traits of Pinaceae species have shown that seed size is one of the best predictors for invasive capacity; Pinaceae species with small seeds are more invasive than species with larger seeds (Richardson et al. 1990; Rejmánek and Richardson 1996; Rejmánek 2000; Grotkopp et al. 2002; Richardson and Rejmánek 2004). A hypothesis

behind the higher invasiveness of small-seeded species is that they produce more seeds so their populations grow more rapidly and they cover longer distances with seed dispersal so their distribution increases more rapidly (Rejmánek 1996). However, if there is a mechanistic link between seed predation intensity and invasiveness in the Pinaceae, it should be based on a direct relationship between seed size and predation rate in this family; smaller seeds, being less preferentially consumed, would survive disproportionately and contribute to invasive success.

In this study, we evaluated the selection exerted through seed predation on Pinaceae seed traits. Specifically, we used 16 non-native Pinaceae, which showed a 300-fold variation in seed mass, a 200-fold variation in seed volume, and 75-fold variation in seed toughness in a steppe ecosystem in northwest Patagonia to answer two related questions: (a) does seed predation act as a filter that explains Pinaceae invasive success and failure? (b) Is seed mass the trait that best explains the seed predation preference pattern? We expected that Pinaceae species with larger (seed volume) and heavier (higher seed mass) seeds would be preferentially consumed, and, therefore, less invasive. We also expected that tougher seeds would be more preyed upon because larger and heavier seeds have higher toughness (Fricke et al. 2016) and although predators require more energy to break them, their reward would be greater (MacArthur and Pianka 1966; Hoffmann et al. 1995; Blate et al. 1998).

Materials and methods

Study area

This study was conducted on a steppe ecosystem in northwest Patagonia, Argentina (40°59'53"S; 71°05'13"W; 750 m.a.s.l.). Mean annual precipitation is 580 mm and mean annual temperature is 8.6 °C (meteorological station at the study area, San Ramon ranch). Vegetation cover is approximately 60%, and it is dominated by the perennial tussock grasses *Pappostipa speciosa* and *Festuca pallescens* (Anchorena and Cingolani 2002). Animals in this ecosystem include many small mammals such as *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *Eligmodontia morgani*, *Oligoryzomys longicaudatus*, *Phyllotis xanthopygus* whose diet includes seeds, fruits, and insects (Pearson 1983; Pearson 1995; Pardiñas and Teta 2013). The steppe ecosystem covers a large portion of Patagonia and it is one of the ecosystems most susceptible to Pinaceae invasions (Richardson et al. 1994; Simberloff et al. 2010). Pinaceae plantations have replaced large areas of these native ecosystems (Schlichter and Laclau 1998) and have become a seed source for invasions. There is no evidence of secondary seed dispersal by

animals in any of the studied species in the study region (Nuñez et al. 2008).

Species invasive status

We used three categories to define global invasive status for each species based on a global survey of invasive Pinaceae species carried out by Essl et al. (2010) (Table 1). We classified species with no record of invasion as “Non-invasive”, species with records of invasion on one or two regions around the world as “Somewhat invasive” and species with

records of invasion in three or more regions as “Invasive”. Here we define region as an area with similar climate, covering between 25,000 and 500,000 km², following Essl et al. (2010) definition. A similar criterion was used by Grotkopp et al. (2004) to define invasive status for *Pinus* species. We also defined the invasive status in our study region for species that are planted on large scale locally (CIEFAP 2017) to check that it was consistent with the global invasive status for these species. In this case, invasive status of each species was defined according to regional surveys of cases of invasion. We classified species that have not invaded from

Table 1 Species included in the experiment and their individual seed mass, volume, toughness, specific toughness, origin, invasive status at a world level, invasive status in the study region and area planted in the study region

Species	Mass (mg)	Volume (μL)	Toughness (N)	Specific toughness (N/mg)	Seed origin	Invasive status (Globally)	Invasive status in study region	Area planted in study region (ha)
<i>Austrocedrus chilensis</i> ^a	3.5 (0.09)	5.4 (0.53)	4.4 (1.30)	1.26 (0.38)	Natural stand harvest	-	-	-
<i>Pinus contorta</i>	7 (0.27)	8.4 (1.31)	11.3 (2.39)	1.61 (0.35)	Commercial nursery	Invasive	Invasive	4979
<i>Larix decidua</i>	8.4 (0.23)	12.1 (0.65)	33 (8.16)	3.93 (1.04)	Plantation cone harvest	Somewhat	-	-
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	13.2 (0.22)	19.3 (1.16)	7.8 (3.42)	0.59 (0.25)	Commercial nursery	Invasive	Invasive	1309
<i>Pinus halepensis</i>	24.6 (1.13)	29 (1.63)	14.9 (4.08)	0.61 (0.16)	Commercial nursery	Invasive	-	-
<i>Pinus radiata</i>	30.1 (2.16)	30.9 (2.02)	26 (15.56)	0.86 (0.53)	Commercial nursery	Invasive	Invasive	1089
<i>Abies nobilis</i>	30.9 (1.28)	51 (1.79)	4.6 (3.23)	0.15 (0.10)	Plantation cone harvest	Non-invasive	-	-
<i>Pinus taeda</i>	33.1 (1.50)	32.6 (2.27)	18.7 (3.57)	0.56 (0.13)	Commercial nursery	Non-invasive	Non-invasive	103
<i>Abies concolor</i>	39.3 (2.24)	67 (2.28)	9.9 (8.57)	0.25 (0.21)	Plantation cone harvest	Non-invasive	-	-
<i>Pinus elliotii</i>	45.6 (1.64)	54.5 (2.42)	38.2 (11.01)	0.84 (0.23)	Commercial nursery	Invasive	-	-
<i>Pinus pinaster</i>	56.6 (2.14)	58 (4.83)	40.2 (17.53)	0.71 (0.31)	Commercial nursery	Invasive	-	-
<i>Pinus ponderosa</i>	59.6 (7.59)	73.5 (6.58)	54.8 (14.36)	0.92 (0.27)	Commercial nursery	Somewhat	Somewhat	98,927
<i>Abies magnifica</i>	94.8 (5.54)	198 (8.37)	50.4 (11.50)	0.53 (0.12)	Plantation cone harvest	Non-invasive	-	-
<i>Pinus jeffreyi</i>	97.8 (2.61)	129.3 (6.13)	64.9 (11.36)	0.66 (0.12)	Commercial nursery	Non-invasive	Non-invasive	701
<i>Pinus canariensis</i>	138.2 (6.38)	159 (15.06)	69.2 (34.73)	0.50 (0.25)	Commercial nursery	Somewhat	-	-
<i>Pinus cembro</i>	278.1 (9.02)	385 (17.16)	120.0 (21.18)	0.43 (0.08)	Plantation cone harvest	Non-invasive	-	-
<i>Pinus pinea</i>	1087.2 (74.56)	1083 (122.48)	337.5 (58.74)	0.31 (0.04)	Commercial nursery	Somewhat	-	-

For the native conifer the invasive status is not defined (dash) because we focus here on invasive non-native conifers. Invasive status in the study region is not defined (dash) for species that are not planted on large scale locally because there is not enough information on the invasive behavior of these species locally. Data of the area planted regionally was obtained from a regional forestry survey (CIEFAP 2017). Standard deviation is indicated between brackets

^aNative conifer

plantations as “Non-invasive”, species that have only rarely invaded from plantations as “Somewhat invasive” and species that have frequently invaded from plantations as “Invasive” (Sarasola et al. 2006, Raffaele et al. 2016, Franzese and Raffaele 2017).

Cafeteria experiment

To evaluate the role of seed predation on non-native Pinaceae invasion, we performed two cafeteria-style experiments using seeds from 16 non-native species belonging to 4 different genera of the Pinaceae family and one native conifer, *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae family) (Table 1). A cafeteria-style experiment consists on offering consumers alternative food sources to evaluate a preference pattern (Abbott 1962; Martell 1979; Lobo et al. 2009). We chose *A. chilensis* because it is the only native tree that grows and regenerates in this steppe ecosystem. This allowed us to compare seed characteristics and predation of a native species to a collection of non-native species. We acquired the seeds of the different species from commercial nurseries or by collecting cones from plantations on Isla Victoria (Simberloff et al. 2002; Table 1). We stored the seeds at 5 °C before the experiments. We conducted this experiment during the peak of Pinaceae and *A. chilensis* seed production and dispersal in Patagonia (May–June 2017, Austral Fall) (Krugman and Jenkinson 2008). We used latex disposable gloves to handle the seeds to avoid imparting human odor to the seeds. Since seed predators' species preference for seeds could be influenced by associational effects (Holt and Kotler 1987), we carried out two different experiments. In the first experiment (“One species sticks”), ten seeds of the same species were glued to two wooden popsicle sticks (two sets of five seeds) and placed in a random order inside a 2-m² plot (total 34 popsicle sticks and 170 seeds per plot). With this experimental design we tried to avoid associational susceptibility among species, i.e., when the seed of one species attracts the predator and then the predator continues eating the rest of the seeds just by proximity, erasing all preference effects (Holt and Kotler 1987). In the second experiment (“All species sticks”), one seed from each of the 17 species was glued to one of two sticks in a random order and placed inside a 2-m² plot (20 popsicle sticks and 170 seeds per plot). With this experimental design, predators were able to find all the different type of seeds and choose among them. We fastened sticks to the ground with metal tent stakes to prevent their removal by seed predators and we glued seeds to the sticks with a non-toxic odor-free glue. Since seeds were glued to a stick and there is no evidence for secondary seed dispersal by animals in this system, we considered seed removal as evidence of seed predation (Nuñez et al. 2008). We evaluated seed predation 1, 2, 8, 15, and 29 days after installing the experiment. Additionally, we monitored seeds

using cameras traps (Bushnell ® Trophy Cam Infrared) to record both diurnal and nocturnal seed predators. Each camera system consisted of a fully automatic camera combined with a passive infrared motion detector. We set up a total of five cameras facing the seed depots (i.e., 25% of the plots were monitored) and placed them at 1 m from the seeds.

Seed traits

Seed size

To assess the importance of seed size on seed predation patterns for the selected conifer species, we used two different proxies: seed mass and seed volume. To measure the average seed mass per species, we used a precision scale to weigh ten samples of 100 seeds. To estimate mean individual seed volume, we put samples of 100 seeds in 10 mL test tubes (for the smaller seeds) or samples of 50 seeds in 20 mL test tubes (for the bigger seeds) containing water and measured the variation in water level (Leopold 1983; Oje and Ugbor 1991; Dutta et al. 1988; Amin et al. 2004; Anandu et al. 2016). Volume measurements were performed in less than 10 s to prevent the seeds from absorbing water (Amin et al 2004). We repeated this procedure ten times for each species.

Seed toughness

To measure seed toughness, we compressed individual seeds between flat metal plates at a constant speed of 0.5 mm per min (Instron 5567 Universal Testing Machine). We measured force (Newtons) with a load cell that measures up to 1000 N and used this data to assess the point at which each seed was broken (breaking point). We repeated this procedure ten times for each species. We obtained seed toughness (peak force) as the maximum force exerted on the seed before it broke. We also obtained seed-specific toughness as the ratio between seed toughness and seed mass (Fricke and Wright 2016).

Statistical analyzes

To evaluate if seed predation followed a preference pattern according to seed traits we used generalized linear regression models. We calculated seed predation as the proportion of seeds that had been consumed on each monitoring date (1, 2, 8, 15, and 29 days) (Orrock et al. 2015). To determine if experiment type (“One species sticks” vs. “All species sticks”) had a significant effect on seed predation we used this factor as a predictive variable. To evaluate the effect of seed traits we also included seed mass, seed volume, seed toughness, and seed-specific toughness as predictive variables. We included the interaction between experiment type and each seed trait to evaluate if the relationship between

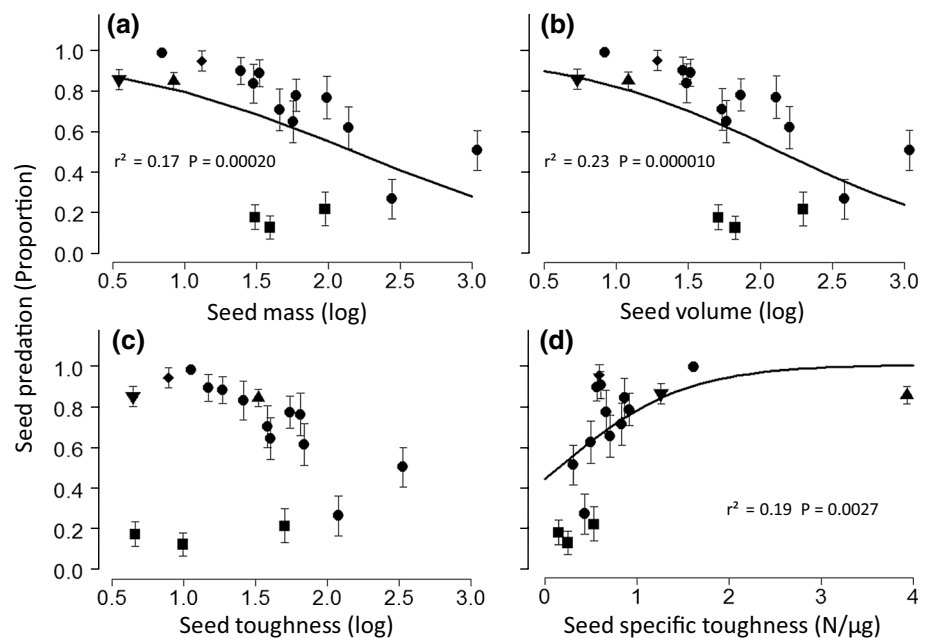
seed predation and seed traits was different between the two experiment types. We repeated the analyzes described above including only the *Pinus* species to evaluate the preference patterns within a single genus. We assumed a binomial distribution, using generalized linear models (GLMs) and logit link function. We analyzed each monitoring date separately. We were interested in comparing the predictive power of each seed trait because each trait has a different biological importance regarding seed predation. On one hand, a higher seed mass is expected to promote seed predation because it increases the benefit perceived by seed consumers (MacArthur and Pianka 1966; Hoffmann et al. 1995; Blate et al. 1998; Wang et al. 2014). On the other hand, a higher seed volume is expected to decrease seed predation because some rodents may be limited by the size of their mouthparts (Wheelwright 1985, 1993; Rey et al. 1997; Zhang and Zhang 2008). A higher seed toughness is also expected to decrease seed predation because breaking the seed coat and masticating tougher seeds would require a lot of energy (Zhang and Zhang 2008; Fricke et al. 2016). The great majority of studies on seed preference by seed predators have focused on seed mass as a predictive variable (Jansen 2002; Moles et al. 2003; Gómez 2004; Pearson et al. 2011; Connolly et al. 2014), but we believe that seed volume, seed toughness, and seed-specific toughness can be as good or even better predictors of seed preference by predators. In this regard, testing these seed traits would be a novel and important contribution of our study. We tested all four seed traits (seed mass, seed volume, seed toughness, and seed-specific toughness) as independent factors. However, because they were highly correlated (Spearman correlation coefficients: seed mass vs. seed volume = 0.98, seed mass vs. seed toughness = 0.87,

seed volume vs. seed toughness = 0.82) or a composite variable (seed specific toughness) we did not include different seed traits in the same model, but we built different regression models for each trait (simple regressions). We used a log transformation on seed mass, seed volume, and seed toughness to increase the linearity of the regressions (James 2016). We used analysis of deviance to evaluate the amount of total variation explained by each of the predictive variables (pseudo r^2 ; Nagelkerke 1991) using “BabylorEdPsych” package (Beaujean 2012). To compare seed predation among different invasive status categories (Table 1) we built logistic models with invasive status as a predictive categorical variable. Also, to compare seed predation among the different genera we built logistic models with genus as a predictive categorical variable. For all analyzes we used R 3.4.0 statistical software (R Core Team 2018).

Results

The species in our study covered a wide range in seed traits, with mean seed mass of each species ranging from 3.5 to 1087.2 mg, seed volume from 5.4 to 1083 μL , and seed toughness from 4.4 to 337.5 N (Table 1). We found that seed predation decreased as seed mass and volume increased (Fig. 1; Online Resource 1). Specifically, seed predation was highest for the species with the smallest seed (both in terms of mass and volume). 15 days after setting up the experiment *Pinus contorta*, the smallest Pinaceae, was eaten twice as much as the species with the largest seed, *Pinus pinea* (Fig. 1). Seed predation tended to decrease with seed toughness increase ($P=0.060$ on date 8) but this relationship was

Fig. 1 Logistic regression between seed predation and **a** seed mass, **b** seed volume, **c** seed toughness and **d** seed-specific toughness for experimental design “One species sticks” at 15 days after experiment installation. Each genus is indicated by a different shape: *Pinus* (closed circle), *Pseudotsuga* (closed diamond), *Abies* (closed square), *Larix* (closed triangle), *Austrocedrus* (inverted closed triangle). Dots indicate average values and the variability measure is the standard error. Regression lines, r^2 and P values are only shown for significant regressions ($P < 0.05$)



not significant. Further, seed predation increased with specific toughness. The species with the highest specific toughness, *Larix decidua*, was eaten three times more than the species with the lowest specific toughness, *Abies nobilis*. Seed volume was the seed trait that best predicted seed predation (highest r^2 ; Fig. 1). The three *Abies* species are the exception to this pattern, being preyed upon much less than other species of comparable seed mass and volume (Fig. 1; Online Resource 1). The relationship between seed predation and seed traits was strongest on dates 8 and 15, probably because on dates 1 and 2 predation was still very low (8.85%), while on date 29 seed predation was already too high (87.24%), so some species had already been completely preyed upon (Online Resource 2).

Seed predation preference pattern was the same between the two types of experiments (“One species sticks” vs. “All species sticks”). We chose to show only the results of the “One species sticks” experimental design (Fig. 1) because it is less susceptible to associational effects, which could confound the preference pattern of seed predators. The results of the other experimental design (“All species sticks”), which do not differ from the ones showed here, are available in the Electronic Supplementary Material (Online Resource 2). We found no significant effect of experiment type on seed predation for any date or any seed trait, except for seed specific toughness on date 15 (Online Resource 3). Also, the relationship between seed predation and seed traits is the same for both experiments, except for seed specific toughness on date 15 (Online Resource 3). This means that, in almost all cases, seed preference pattern remained constant whether all species were grouped together in one stick or separated on different sticks. On dates 8, 15, and 29 of the experiment seed predation was higher for “Invasive” species than for “Somewhat Invasive” species ($P < 0.005$; Fig. 2 and Online Resource 4). On the same dates seed predation was higher for “Somewhat Invasive” species than for “Non-Invasive” species ($P < 0.005$, Fig. 2 and Online Resource 4). Further, seed predation was significantly lower for *Abies* species than for species belonging to any other genus on dates 8, 15, and 29 ($P < 0.005$; Fig. 3 and Online Resource 5). Camera traps recorded only small mammals consuming the seeds. No birds were detected eating seeds. In our videos, it was possible to identify the native rodents *Oligoryzomys longicaudatus* and *Eligmodontia morgani* as the main seed consumers.

When we only included *Pinus* species in the analyzes the results were very similar on each monitoring date (Online Resource 2). Seed predation decreased as seed mass, seed volume, and seed toughness increased. Also, seed predation increased as seed-specific toughness increased. One difference is that when only *Pinus* species are considered the relationship between seed predation and seed toughness becomes significant. Another difference is that seed mass, seed volume, and seed toughness have very similar

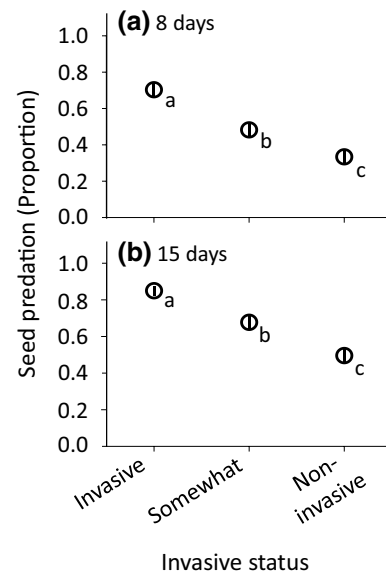


Fig. 2 Seed predation at **a** 8 and **b** 15 days after experiment installation for the different invasive statuses of the species tested here: “invasive”, “somewhat invasive”, and “non-invasive”. Dots indicate average values and the variability measure is the standard error. Different letters indicate significant differences ($P < 0.005$) between invasive statuses

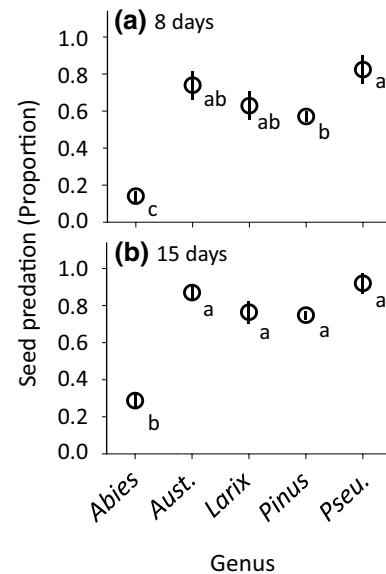


Fig. 3 Seed predation at **a** 8 and **b** 15 days after experiment installation for the different genera tested here: *Abies*, *Austrocedrus*, *Larix*, *Pinus*, and *Pseudotsuga*. Dots indicate average values and the variability measure is the standard error. Different letters indicate significant differences ($P < 0.005$) between genera

predictive power when only *Pinus* species are considered (Online Resource 2). Seed predation preference pattern was the same between the two types of experiments, with very few exceptions (Online Resource 3).

Discussion

Contrary to our expectations, our results show that seed predation does not explain Pinaceae invasive success in Patagonia. Seed predators prefer to prey upon species with smaller seeds (seed mass and seed volume), which tend to be the most invasive species as expected based on Rejmánek and Richardson (1996). Also, seed predation was higher for species classified as invasive according to global invasive records (Essl et al. 2010). Additionally, species with higher seed-specific toughness also tend to be preferred by seed predators while seed toughness was a poor predictor for seed preference. Among the seed traits evaluated on this study seed volume best explains seed predation preference.

Seed volume was the best predictor of seed predator feeding preference, even when most studies focus on seed mass as an indicator of predators' preference. Theory predicts that predators choose among seeds with different seed mass depending on the amount of nutrients and energy that can be obtained from a single seed (MacArthur and Pianka 1966; Hoffmann et al. 1995; Blate et al. 1998; Wang et al. 2014). In this context, a higher consumption of heavier seeds is expected. Indeed, seeds of Pinaceae species vary widely in nutrient and calorie content (Long 1934; Grodzinski and Sawicka-Kapusta 1970), which is the benefit perceived by seed consumers. However, contrary to our expectations seed predators preferred seeds of lower seed mass, which means a smaller benefit per seed. A possible explanation for this pattern is that seed defensive tissue mass increases with seed mass (Moles et al. 2003). Also, seed mass can be correlated with other seed traits that have a stronger influence on seed predators' selective behavior. For example, seed mass is positively correlated with seed volume for the species included in our study (Spearman correlation coefficient = 0.98). Contrary to our predictions seed predators preferred seed species with lower seed volume. An explanation for this pattern is that gape size limits diet choices for the seed predators in this system (Wheelwright 1985, 1993; Rey et al. 1997; Zhang and Zhang 2008). If the community of seed predators is composed by many different species, as in our study region (Pearson 1983; Pearson 1995; Pardiñas and Teta 2013) then we can expect some variation in gape size and some species will probably have mouthparts too small to eat very large seeds. Seed consumption for the largest seeded species, *Pinus pinea* and *P. cembra*, was ca. 60% by the end of the experiment. This shows that at least some species of seed predators were able to consume the seeds of these species, but it is likely that many others could only eat smaller seeds. The models including seed volume were the ones with best fit (Fig. 1; Online Resource 2), which

suggests that this trait (explaining up to 23% of seed predation) is a better predictor of predators' preference than seed mass (which explained up to 17% of seed predation), the seed trait usually studied (Brewer 2001; Jansen 2002; Gómez 2004; Nuñez et al. 2008; Connolly et al. 2014; Pearson et al. 2011; Wang and Ives 2017).

Seed toughness was a poor predictor of seed predation preference. This result shows that seed toughness may be of secondary importance as a trait explaining seed predation. Although Fricke and Wright (2016) argue that eating tougher seeds would require more energy, reducing the net benefit for the predator, we found no conclusive evidence that seed toughness alone drives seed predators' preference for the species included in our study. In this sense, seed toughness was not a strong driver by itself but when correlated with seed mass (seed specific toughness) we found an increase in the influence of this trait on seed predation. Seed predators preferred seed species with higher seed specific toughness. On this regard, Fricke and Wright (2016) found that high specific toughness is an advantage of small seeds because more energy per gram is required to break them and this mechanical defense does not imply an additional investment. However, our results provide evidence that higher seed-specific toughness may not bring any advantage to small seeds, casting doubt on the importance of such seed trait. While some studies have only looked at seed mass (Brewer 2001; Jansen 2002; Gómez 2004; Nuñez et al. 2008; Pearson et al. 2011; Connolly et al. 2014; Wang and Ives 2017; but see Moles et al. 2003), we found that looking into different seed traits allowed us to find different alternative explanations of why some species are preferred over others. Also, in the case of seed toughness and specific toughness, looking into different seed traits allowed us to test the hypothesis on seed preference patterns proposed by Fricke and Wright (2016).

Considering differences between genera may help understand seed predation within Pinaceae family. On one hand, all three *Abies* species suffered very low levels of predation (Fig. 3), and do not fall into the patterns of preference either of seed mass or seed volume (Fig. 1; Online Resource 1). Similar to the previous studies, *Abies* seeds were less preferred by small mammals compared to other Pinaceae species (Abbott 1962; Lobo et al. 2009; Di Pierro et al. 2011; Rubino et al. 2012). This pattern might be explained by the high levels of secondary compounds found in the *Abies* seeds, e.g., terpenes such as limonene (Bucyanayandi et al. 1990; Ibrahim et al. 2011; Rubino et al. 2012). Lobo et al. (2009) even suggested that post-dispersal seed predation would not affect regeneration of *Abies* species because seed predators avoid them. The findings on *Abies* highlight the fact that seed selection by predators cannot be simply understood by variables such as seed size, even when working within one plant family. On the other hand, when considering only *Pinus* species, seed predation was fairly well

predicted by either seed mass, seed volume or seed toughness. That seed toughness became a good predictor of seed predation is probably due to the absence of the *Abies* species on this dataset. Considering a single genus improved our ability to predict seed predation (Online Resource 2) but could also limit the possibility to predict seed predation for other invasive taxa (for example, using seed toughness as a predictor of seed predation for *Abies* species could be misleading). On the other hand, seeds of the native, *Austrocedrus chilensis*, in spite of belonging to a different plant family, were consumed as much as seeds from Pinaceae species of comparable seed mass, volume, and toughness. In this sense, seed predation preference was not different between this native species and non-native conifer species.

Seed preference pattern was not modified by experiment type. Associational effects can have different magnitude depending on the resource, the predators, and the scale considered (Barbosa et al. 2009; Emerson et al. 2012; Ostoja et al. 2013a, b). Previous studies have found evidence of associational resistance (Tahvanainen and Root 1972; Holt 1977; Hay 1986; Pfister and Hay 1988; Ostoja et al. 2013a, b), the process by which the predation of one seed species decreases with the presence of other seed species. Others have found evidence of the opposite process, associational susceptibility (Holt and Kotler 1987; Hjalten et al. 1993; Emerson et al. 2012). Our results show that none of these processes are occurring in this system. The lack of associational susceptibility in our system may be explained by predators' incapacity to consume large seeds, even in the proximity of the most preferred seeds (Wheelwright 1985, 1993; Rey et al. 1997; Zhang and Zhang 2008). Taking together our results suggest that both methodologies ("One species sticks" and "All species sticks") are appropriate to examine selective seed predation in our system.

The marked preference pattern of the seed predators in this study suggests there is a selective filter for non-native species establishment. According to this pattern, species with small seeds (low seed mass and volume) are preferred by small mammals in this system and their recruitment could be limited by seed predation. Interestingly, most work on invasive traits has found evidence that species with smaller seeds tend to be more invasive (Rejmánek and Richardson 1996; Grotkopp et al. 2002; Hamilton et al. 2005; Moodley et al. 2013). Furthermore, species categorized as invasive according to historical invasion records are preferred by seed predators (Fig. 2). The apparent contradiction between species invasive status and our results may reflect that there are other mechanisms behind the invasive potential of small-seeded species such as natural fecundity (i.e., seeds produced per tree per year; van Kleunen et al. 2010) even to the point that native predators can be satiated, and seed availability is more than enough for recruitment. The high level of seed consumption we found here (ca. 90%)

highlights the importance of seed number as a strategy to escape predation. For species with higher fecundity there is a higher chance that at least a small proportion of seeds are not preyed upon, so establishment will be more likely for these species. Another possibility is that we have underestimated other sources of seed predation, such as birds and insects. However, the importance of small mammals on Pinaceae seed removal is in accordance with a previous study in the same region (Nuñez et al. 2008). Invertebrates have been reported to be important seed consumers in this system, but for much smaller seeds (Pirk and Lopez de Casenave 2017). A third alternative is that the effect of seed predation on plant recruitment could be compensated through different mechanisms (Crawley 2000; Garren and Strauss 2009; Swope and Parker 2010; Ortega et al. 2012). For example, recruitment may be microsite limited, rather than seed limited (Louda 1983). Also, a high density-dependent mortality of seedlings may reduce the effects of seed predation (Crawley 1997). Finally, when growing in high densities adult plants tend to grow smaller and produce fewer seeds (Wood and Andersen 1990). In this sense, seed predation's effect at population level may not be strong enough to explain the invasive behavior of different plant species.

In conclusion, we found that seed predation is not a mechanism that helps explain Pinaceae (or *Pinus*) invasive species success. Species that have smaller seeds (seed mass and volume), and are highly invasive across the world, are more consumed by seed predators. Furthermore, seed mass, the seed trait on which most studies focus on (Jansen 2002; Moles et al. 2003; Gómez 2004; Pearson et al. 2011; Connolly et al. 2014) was not the single best predictor of seed predators' preference. Considering other seed traits, such as seed volume improved our ability to predict seed predation. Seed toughness proved to be a poor predictor for Pinaceae seed predation but nearly as good as seed mass or seed volume for *Pinus*. Altogether, this study helps to understand the mechanisms behind non-native plants establishment in the Patagonian steppe.

Acknowledgements This research was supported by Rufford Foundation Grant number 23089-1 and the National Agency of Scientific and Technologic Promotion (AGENCIA) grant "PICT 2014 No 0662 PRE-STAMO BID". We thank San Ramon ranch for their help in this study. We also thank Ariel Mayoral and Josefina Uijt den Bogaard for their valuable help on the field. We are very grateful with René Rodríguez, Alejandro Yawny and Graciela Bertolino from the National Centre of Atomic Energy (CNEA) for help with measurements of seed toughness and providing us access to their Instron 5567 Universal Testing Machine. We appreciate the help with the statistical analyzes provided by Florencia Tiribelli. Mauro Tammone helped with the identification of small mammals. We greatly appreciate the helpful comments from Adam Davis and Rob Gibson on an earlier version of this manuscript.

Author contribution statement JM, MC, MN, and MRC conceived the idea and JM designed the methodology with help from all the authors. JM carried out the experiments and collected the data with help from

MC. All authors participated in the discussion of the results. JM led the writing of the manuscript. MC, MN, and MRC revised the manuscript and made comments to improve it. All authors gave final approval for publication.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Abbott HG (1962) Tree seed preferences of mice and voles in the north-east. *J Forest* 60:97–99. <https://doi.org/10.1093/jof/60.2.97>
- Amin MN, Hossain MA, Roy KC (2004) Effects of moisture content on some physical properties of lentil seeds. *J Food Eng* 65:83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.12.006>
- Anandu P, Sangeetha K, Sanjana P, Santhosh R, Mahendran R (2018) Physical properties of infrared (IR) assisted hot air dried nutmeg (*Myristica fragrans*) seeds. *J Food Process Preserv* 42:e13359. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13359>
- Anchorena J, Cingolani A (2002) Identifying habitat types in a disturbed area of the forest-steppe ecotone of Patagonia. *Plant Ecol* 158:97–112
- Barbosa P, Hines J, Kaplan I, Martinson H, Szczepaniec A, Szendrei Z (2009) Associational resistance and associational susceptibility: having right or wrong neighbors. *Annu Rev Ecol Syst* 40:1–20. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120242>
- Beaujean A (2012) BaylorEdPsych: R package for Baylor University educational psychology quantitative courses. R package version 0.5. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=BaylorEdPsych>
- Blate GM, Peart DR, Leighton M (1998) Post-dispersal predation on isolated seeds: a comparative study of 40 tree species in a Southeast Asian rainforest. *Oikos* 82:522–538. <https://doi.org/10.2307/3546373>
- Brewer SW (2001) Predation and dispersal of large and small seeds of a tropical palm. *Oikos* 92:245–255
- Bucyanayandi J-D, Bergeron J-M, Menard H (1990) Preference of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) for conifer seedlings: chemical components and nutritional quality of bark of damaged and undamaged trees. *J Chem Ecol* 16:2569–2579. <https://doi.org/10.1007/bf01017479>
- Caley P, Groves RH, Barker R (2008) Estimating the invasion success of introduced plants. *Divers Distrib* 14:196–203. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00440.x>
- Chave J, Coomes D, Jansen S, Lewis SL, Swenson NG, Zanne AE (2009) Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecol Lett* 12:351–366. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01285.x>
- CIEFAP (2017) Inventario nacional de plantaciones forestales: Región Patagónica. Ministerio de Agroindustria, Argentina
- Connolly B, Pearson D, Mack R (2014) Granivory of invasive, naturalized, and native plants in communities differentially susceptible to invasion. *Ecology* 95:1759–1769
- Crawley MJ (1997) Plant–herbivore dynamics. In: Crawley MJ (ed) *Plant ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 401–474
- Crawley MJ (2000) Seed predators and plant population dynamics. In: Gallagher RS (ed) *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. CABI International, Wallingford, pp 167–182
- Di Piero E et al (2011) The effects of seed availability on habitat use by a specialist seed predator. *Eur J Wildl Res* 57:585–595. <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0469-7>
- Dutta SK, Nema VK, Bhardwaj RK (1988) Physical properties of gram. *J Agric Eng Res* 39:259–268. [https://doi.org/10.1016/0021-8634\(88\)90147-3](https://doi.org/10.1016/0021-8634(88)90147-3)
- Emerson SE, Brown JS, Whelan CJ, Schmidt KA (2012) Scale-dependent neighborhood effects: shared doom and associational refuge. *Oecologia* 168:659–670. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2144-4>
- Essl F, Moser D, Dullinger S, Mang T, Hulme P (2010) Selection for commercial forestry determines global patterns of alien conifer invasions. *Biodivers Res* 16:911–921. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2010.00705.x>
- Essl F, Mang T, Dullinger S, Moser D, Hulme PE (2011) Macroecological drivers of alien conifer naturalizations worldwide. *Ecography* 34:1076–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2011.06943.x>
- Franzese J, Raffaele E (2017) Fire as a driver of pine invasions in the Southern Hemisphere: a review. *Biol Invasions* 19:2237–2246. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1435-z>
- Fricke EC, Wright SJ (2016) The mechanical defence advantage of small seeds. *Ecol Lett* 19:987–991. <https://doi.org/10.1111/ele.12637>
- Garren JM, Strauss SY (2009) Population-level compensation by an invasive thistle thwarts biological control from seed predators. *Ecol Appl* 19:709–721
- Gómez JM (2004) Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. *Evolution* 58:71–80. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01574.x>
- Grodzinski W, Sawicka-Kapusta K (1970) Energy values of tree-seeds eaten by small mammals. *Oikos* 21:52–58. <https://doi.org/10.2307/3543838>
- Grotkopp E, Rejmánek M, Rost TL (2002) Toward a causal explanation of plant invasiveness: seedling growth and life-history strategies of 29 Pine (*Pinus*) species. *Am Nat* 159:396–419. <https://doi.org/10.1086/338995>
- Grotkopp E, Rejmánek M, Sanderson MJ, Rost TL (2004) Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses. *Evolution* 58(8):1705–1729. <https://doi.org/10.1554/03-545>
- Hamilton MA et al (2005) Life-history correlates of plant invasiveness at regional and continental scales. *Ecol Lett* 8:1066–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00809.x>
- Hay ME (1986) Associational plant defenses and the maintenance of species diversity: turning competitors into accomplices. *Am Nat* 128:617–641
- Hjalten J, Danell K, Lundberg P (1993) Herbivore avoidance by association: vole and hare utilization of woody plants. *Oikos* 68:125–131. <https://doi.org/10.2307/3545317>
- Hoffmann LA, Redente EF, McEwen LC (1995) Effects of selective seed predation by rodents on shortgrass establishment. *Ecol Appl* 5:200–208. <https://doi.org/10.2307/1942063>
- Holt RD (1977) Predation, apparent competition, and the structure of prey communities. *Theor Popul Biol* 12:197–229. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(77\)90042-9](https://doi.org/10.1016/0040-5809(77)90042-9)
- Holt RD, Kotler BP (1987) Short-term apparent competition. *Am Nat* 130:412–430
- Hulme PE (1994) Post-dispersal seed predation in grassland: its magnitude and sources of variation. *J Ecol* 82:645–652. <https://doi.org/10.2307/2261271>

- Hulme PE (1998) Post-dispersal seed predation: consequences for plant demography and evolution. *Perspect Plant Ecol Evolut Syst* 1:32–46. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00050>
- Hulme PE, Borelli T (1999) Variability in post-dispersal seed predation in deciduous woodland: relative importance of location, seed species, burial and density. *Plant Ecol* 145:149–156. <https://doi.org/10.1023/a:1009821919855>
- Ibrahim MA, Kainulainen P, Aflatuni A, Tiilikkala K, Holopainen JK (2011) Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability from control of insect pests. *J Agric Food* 10:243–259
- James S (2016) James S (2016) An introduction to data analysis using aggregation functions in R. Springer, Cham
- Jansen P, et al. (2002) The role of seed size in dispersal by a scatter-hoarding rodent. In: Levey et al. (ed) Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation. CABI International, Brazil, pp 209–225
- Janzen DH (1969) Seed-eaters versus seed size, number, toxicity and dispersal. *Evolution* 23:1–27. <https://doi.org/10.2307/2406478>
- Krugman SL, Jenkinson JL (2008) Pinaceae—Pine family. In: Bonner FT, Karraft RP (eds) The woody plant seed manual. Agriculture handbook 727. USDA Forest Service, Washington DC, pp 809–847
- Larios L, Pearson DE, Maron JL (2017) Incorporating the effects of generalist seed predators into plant community theory. *Funct Ecol* 31:1856–1867. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12905>
- Leopold AC (1983) Volumetric Components of Seed Imbibition. *Plant Physiol* 73:677–680. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.677>
- Lobo N, Duong M, Millar JS (2009) Conifer-seed preferences of small mammals. *Can J Zool* 87:773–780. <https://doi.org/10.1139/Z09-070>
- Long FL (1934) Application of calorimetric methods to ecological research. *Plant Physiol* 9:323–337
- Louda SM (1983) Seed predation and seedling mortality in the recruitment of a shrub, *Haplopappus venetus* (Asteraceae), along a climatic gradient. *Ecology* 64:511–521
- MacArthur RH, Pianka ER (1966) On optimal use of a patchy environment. *Am Nat* 100:603–609. <https://doi.org/10.1086/282454>
- Martell AM (1979) Selection of conifer seeds by deer mice and red-backed voles. *Can J For Res* 9:201–204. <https://doi.org/10.1139/x79-035>
- McGregor KF, Watt MS, Hulme PE, Duncan RP (2012) What determines pine naturalization: species traits, climate suitability or forestry use? *Divers Distrib* 18:1013–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00942.x>
- Moles AT, Warton DI, Westoby M (2003) Do small-seeded species have higher survival through seed predation than large-seeded species? *Ecology* 84:3148–3161. <https://doi.org/10.1890/02-0662>
- Moodley D, Geerts S, Richardson DM, Wilson JR (2013) Different traits determine introduction, naturalization and invasion success in woody plants: proteaceae as a test case. *PLoS One* 8:e75078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075078>
- Muschetto E, Mazia N, Cueto GR, Busch M (2015) Are rodents a source of biotic resistance to tree invasion in Pampean grasslands? Tree seed consumption under different conditions. *Austral Ecol* 40:255–266. <https://doi.org/10.1111/aec.12208>
- Nagelkerke NJ (1991) A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* 78:691–692. <https://doi.org/10.1093/biomet/78.3.691>
- Niinemets Ü (2010) A review of light interception in plant stands from leaf to canopy in different plant functional types and in species with varying shade tolerance. *Ecol Res* 25:693–714. <https://doi.org/10.1007/s11284-010-0712-4>
- Núñez MA, Simberloff D, Relva MA (2008) Seed predation as a barrier to alien conifer invasions. *Biol Invasions* 10:1389–1398
- Oje K, Ugbor EC (1991) Some physical properties of oil bean seed. *J Agric Eng Res* 50:305–313. [https://doi.org/10.1016/S0021-8634\(05\)80022-8](https://doi.org/10.1016/S0021-8634(05)80022-8)
- Orrock JL et al (2015) A continent-wide study reveals clear relationships between regional abiotic conditions and post-dispersal seed predation. *J Biogeogr* 42:662–670. <https://doi.org/10.1111/jbi.12451>
- Ortega YK, Pearson DE, Waller LP, Sturdevant NJ, Maron JL (2012) Population-level compensation impedes biological control of an invasive forb and indirect release of a native grass. *Ecology* 93:783–792
- Ostojica SM, Schupp E, Klinger R (2013) Seed harvesting by a generalist consumer is context-dependent: Interactive effects across multiple spatial scales. *Oikos* 122:563–574. <https://doi.org/10.1111/11600-0706.2012.19969.x>
- Ostojica SM, Schupp EW, Durham S, Klinger R (2013) Seed harvesting is influenced by associational effects in mixed seed neighbourhoods, not just by seed density. *Funct Ecol* 27:775–785. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12091>
- Pardiñas UFJ, Teta P (2013) Holocene stability and recent dramatic changes in micromammalian communities of northwestern Patagonia. *Quatern Int* 305:127–140. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2012.08.001>
- Pearson OP (1983) Characteristics of a mammalian fauna from forests in Patagonia, Southern Argentina. *J Mammal* 64(3):476–492
- Pearson OP (1995) Annotated keys for identifying small mammals living in or near Nahuel Huapi National Park or Lanin National Park, Southern Argentina. *Mastozool Neotrop* 2:99–148
- Pearson DE, Callaway RM, Maron JL (2011) Biotic resistance via granivory: establishment by invasive, naturalized, and native asters reflects generalist preference. *Ecology* 92:1748–1757
- Pfister CA, Hay ME (1988) Associational plant refuges: convergent patterns in marine and terrestrial communities result from differing mechanisms. *Oecologia* 77:118–129. <https://doi.org/10.1007/BF00380934>
- Pirk GI, Lopez de Casenave J (2017) Ant interactions with native and exotic seeds in the Patagonian steppe: Influence of seed traits, disturbance levels and ant assemblage. *Plant Ecol* 218:1255–1268. <https://doi.org/10.1007/s11258-017-0764-4>
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Raffaele E, Núñez MA, Eneström J, Blackhall M (2016) Fire as mediator of pine invasion: evidence from Patagonia, Argentina. *Biol Invasions* 18:597–601. <https://doi.org/10.1007/s1053-0-015-1038-5>
- Rejmánek M (1996) A theory of seed plant invasiveness: The first sketch. *Biol Cons* 78:171–181. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(96\)00026-2](https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00026-2)
- Rejmánek M, Richardson DM (1996) What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* 77:1655–1661. <https://doi.org/10.2307/2265768>
- Rejmánek M, Richardson DM (2013) Trees and shrubs as invasive alien species—2013 update of the global database. *Divers Distrib* 19:1093–1094. <https://doi.org/10.1111/ddi.12075>
- Rejmánek, (2000) Invasive plants: approaches and predictions. *Austral Ecol* 25:497–506. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9993.2000.01080.x>
- Rey PJ, Gutiérrez JE, Alcántara J, Valera F (1997) Fruit size in wild olives: implications for avian seed dispersal. *Funct Ecol* 11:611–618. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1997.00132.x>
- Richardson DM (2006) Pinus: a model group for unlocking the secrets of alien plant invasions? *Preslia* 78:375–388
- Richardson DM, Rejmánek M (2004) Conifers as invasive aliens: a global survey and predictive framework. *Divers Distrib* 10:321–331. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2004.00096.x>

- Richardson DM, Rejmánek M (2011) Trees and shrubs as invasive alien species—a global review. *Divers Distrib* 17:788–809. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00782.x>
- Richardson DM, Cowling RM, Le Maitre DC (1990) Assessing the risk of invasive success in *Pinus* and *Banksia* in South African mountain fynbos. *J Veg Sci* 1:629–642. <https://doi.org/10.2307/3235569>
- Richardson DM, Williams PA, Hobbs RJ (1994) Pine invasions in the southern hemisphere: determinants of spread and invadability. *J Biogeogr* 21:511–527. <https://doi.org/10.2307/2845655>
- Rubino FM et al (2012) Food choice of Eurasian red squirrels and concentrations of anti-predatory secondary compounds. *Mamm Biol* 77:332–338. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2012.01.003>
- Rueda M, Godoy O, Hawkins BA (2017) Spatial and evolutionary parallelism between shade and drought tolerance explains the distributions of conifers in the conterminous United States. *Glob Ecol Biogeogr* 26:31–42. <https://doi.org/10.1111/geb.12511>
- Sarasola M, Rusch V, Schlichter T, Ghersa C (2006) Tree conifers invasion in steppe areas and *Austrocedrus chilensis* forests in NW Patagonia. *Ecologia Austral* 16:143–156
- Schlichter T, Laclau P (1998) Ecotono estepa-bosque y plantaciones forestales en la Patagonia norte. *Ecologia Austral* 8:285–296
- Simberloff D (2013) *Invasive Species: What Everyone Needs to Know*. Oxford University Press, New York
- Simberloff D, Relva MA, Nuñez M (2002) Gringos En El Bosque: introduced tree invasion in a native *Nothofagus/Austrocedrus* Forest. *Biol Invasions* 4:35–53. <https://doi.org/10.1023/a:1020576408884>
- Simberloff D et al (2010) Spread and impact of introduced conifers in South America: lessons from other southern hemisphere regions. *Austral Ecol* 35:489–504. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2009.02058.x>
- Swope SM, Parker IM (2010) Widespread seed limitation affects plant density but not population trajectory in the invasive plant *Centaurea solstitialis*. *Oecologia* 164:117–128. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1641-1>
- Tahvanainen JO, Root RB (1972) The influence of vegetational diversity on the population ecology of a specialized herbivore, *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia* 10:321–346. <https://doi.org/10.1007/bf00345736>
- van Kleunen M, Weber E, Fischer M (2010) A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. *Ecol Lett* 13:235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01418.x>
- van Kleunen M, Dawson W, Maurel N (2015) Characteristics of successful alien plants. *Mol Ecol* 24:1954–1968. <https://doi.org/10.1111/mec.13013>
- Wang B, Ives AR (2017) Tree-to-tree variation in seed size and its consequences for seed dispersal versus predation by rodents. *Oecologia* 183:751–762. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3793-0>
- Wang Z, Cao L, Zhang Z (2014) Seed traits and taxonomic relationships determine the occurrence of mutualisms versus seed predation in a tropical forest rodent and seed dispersal system. *Integr Zool* 9:309–319. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12086>
- Wheelwright NT (1985) Fruit-size, gape width, and the diets of fruit-eating birds. *Ecology* 66:808–818. <https://doi.org/10.2307/1940542>
- Wheelwright NT (1993) Fruit size in a tropical tree species: variation, preference by birds, and heritability. *Vegetatio* 107:163–174. <https://doi.org/10.1007/bf00052219>
- Williamson M, Fitter A (1996) The varying success of invaders. *Ecology* 77:1661–1666. <https://doi.org/10.2307/2265769>
- Wood DM, Andersen MC (1990) The effect of predispersal seed predators on colonization of *Aster ledophyllus* on Mount St. Helens Washington. *Am Midl Nat* 123:193–201. <https://doi.org/10.2307/2425773>
- Zhang H, Zhang Z (2008) Endocarp thickness affects seed removal speed by small rodents in a warm-temperate broad-leaved deciduous forest, China. *Acta Oecologica* 34:285–293. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2008.06.001>

The interplay between propagule pressure, seed predation and ectomycorrhizal fungi in plant invasion

Jaime Moyano¹, Mariana C. Chiuffo¹, Nahuel Policelli¹,
Martin A. Nuñez¹, Mariano A. Rodriguez-Cabal¹

¹ Grupo de Ecología de Invasiones, INIBIOMA, Universidad Nacional del Comahue, CONICET, Avenida de los Pioneros 2350, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina

Corresponding author: *Jaime Moyano* (mjaimo@agro.uba.ar)

Academic editor: *D. Richardson* | Received 1 November 2018 | Accepted 3 January 2019 | Published 18 February 2019

Citation: Moyano J, Chiuffo MC, Policelli N, Nuñez MA, Rodriguez-Cabal MA (2019) The interplay between propagule pressure, seed predation and ectomycorrhizal fungi in plant invasion. *NeoBiota* 42: 45–58. <https://doi.org/10.3897/neobiota.42.30978>

Abstract

There are many hypotheses aiming to explain invasion success, but evaluating individual hypotheses in isolation may hinder our ability to understand why some species invade and others fail. Here we evaluate the interaction between propagule pressure, seed predation and missed mutualism in the invasion success of the pine, *Pinus ponderosa*. We evaluated the independent and interactive effects of propagule pressure and seed predation at increasing distances from a pine plantation. Additionally, because pines are obligate mutualists with ectomycorrhizal fungi (EMF) and pine invasions fail in the absence of their EMF symbionts, we evaluated EMF availability through a growth chamber bioassay. In this bioassay we measured root colonization by EMF with soil samples collected from the different distances from the plantation. We found that propagule pressure overwhelms seed predation only at the edge of the pine plantation, while seed predation overcomes propagule pressure at 25 m and further distances from the plantation. We also found that EMF root colonization decreases with distance from the plantation. However, pine roots were colonized up to 200 m from the plantation, suggesting that EMF may not be hindering invasion, at least not on the scale of this experiment. Taken together our results demonstrate that seed predation may be limiting the invasion of *P. ponderosa* in the study region as propagule pressure only overcomes seed predation at the plantation edge. Here we provide evidence of how strong biotic resistance can suppress an invasion, regardless of the variation in propagule pressure and the availability of mutualists.

Keywords

Biotic resistance, granivory, invasion mechanism, mutualism, *Pinus*, seed dispersal

Introduction

For decades, ecologists have tried to explain why some populations of introduced species become invasive while others fail to invade (Elton 1958, Lockwood et al. 2013). Numerous hypotheses seek to explain the mechanisms behind biological invasions (Catford et al. 2009). The propagule pressure hypothesis posits that increasing the number of individuals released in a region where they are not native increases the probability of invasion success (Lockwood et al. 2005). This hypothesis seems to be more supported by empirical evidence than most other hypotheses proposed in invasion biology (Simberloff 2009, Lamarque et al. 2011, Blackburn et al. 2015) and, therefore, may be the hypothesis carrying the greater consensus (Jeschke 2014). Another major hypothesis in biological invasions is the biotic resistance hypothesis (Elton 1958), which states that competitors, predators, herbivores and pathogens in the resident community reduce invasion success (Levine et al. 2004). Seed predation is one of the major filters for plant establishment (Janzen 1969, Hulme 1994, Larios et al. 2017) and, consequently, a major barrier to plant invasions (Nuñez et al. 2008, Pearson et al. 2011, Connolly et al. 2014). Studies on the interplay between propagule pressure and biotic resistance found that the influence of propagule pressure on invasion success is more important for high levels of biotic resistance (von Holle and Simberloff 2005, Jones et al. 2017).

Together with strong biotic resistance and low propagule pressure, the absence of mutualistic biotic interactions (missed mutualism) is one of the most important limitations for the invasion of non-native plants (Traveset and Richardson 2014, Dickie et al. 2017). More than one third of the most widespread invasive woody species form mutualistic interactions with mycorrhizal symbionts, more than two thirds form interactions with seed dispersers and the vast majority of invasive woody plants are animal pollinated (Traveset and Richardson 2014). If a non-native plant needs an obligate mutualist its absence in the invaded range will act as a strong filter to its invasion success (Traveset and Richardson 2014, Dickie et al. 2017). Even though the importance of different mechanisms is recognized in invasion processes, most studies on biological invasions focus on a single hypothesis without considering the possible interaction between different mechanisms. As a consequence, we lack an understanding of how different processes interplay to determine invasion success or failure (Pearson et al. 2018).

Pines are an ideal system to study the role of propagule pressure, seed predation and missed mutualism on invasion success. The role of propagule pressure can be easily studied because non-native pines produce a large number of seeds which are wind dispersed over large areas but with the highest proportion falling near the seed source, creating a gradient of propagule pressure (Nathan et al. 2011). The role of biotic resistance, through seed predation, can be assessed because seeds of non-native pines are highly consumed by native generalist seed predators (Nuñez et al. 2008, Chiuffo et al. 2018). Additionally, pines are obligate mutualists with ectomycorrhizal fungi (EMF) and pine invasion fails in the absence of their EMF symbionts (Nuñez et al. 2009), thus the effect of missing mutualism can be straightforwardly evaluated using pines. Furthermore, EMF are dispersed from the invasion source, creating a gradient of de-

creasing abundance of fungal symbionts (Collier and Bidartondo 2009, Hayward et al. 2015, Horton 2017).

The aim of this study was to test the importance of three mechanisms (propagule pressure, seed predation and missed mutualism) in the invasion of *Pinus ponderosa* in north Argentinean Patagonia. Here, we evaluated seed predation with different seed availability to resemble the natural seed rain pattern at different distances from a plantation of *P. ponderosa*. Additionally, to test if the absence of highly co-evolved soil mutualists could account for pine invasion failure we performed a growth chamber bioassay with soil inoculum from increasing distances from the pine plantation. Specifically, we asked the following question: what is more important determining *P. ponderosa* invasion success, propagule pressure, seed predation, the availability of EMF symbionts or the interplay between these mechanisms? Evaluating the relative importance of different invasion mechanisms is key to identify the causes of plant invasions. Also, assessing the interaction between different mechanisms helps to understand how different processes interplay to determine invasion success or failure (Pearson et al. 2018).

Methods

Study area

We conducted this experiment on a steppe ecosystem in North Patagonia (40°59'53"S, 71°05'13"W) because this type of ecosystem is among the most frequently invaded by non-native pines (Richardson et al. 1994). In Patagonia, large areas of steppe have been replaced by pine plantations during the past few decades (CIEFAP 2017), which are now seed source for invasions. *Pinus ponderosa* is the most widely planted species in the region, covering over 90% of the forestry area (CIEFAP 2017). However, *P. ponderosa* is only rarely invasive in this region (Sarasola et al. 2006). Post dispersal seed predation for pines in this system is largely carried by the native rodents *Oligoryzomys longicaudatus* and *Eligmodontia morgani* (Chiuffo et al. 2018). There is no evidence of secondary seed dispersal of *P. ponderosa* by animals in the study region (Nuñez et al. 2008, Chiuffo et al. 2018). On the study site, mean annual rainfall is 580 mm, concentrated during fall and winter (March-September), and mean annual temperature is 8.6 °C (San Ramon ranch meteorological station). Vegetation cover is ca. 60% being *Pappostipa speciosa* and *Festuca pallescens* the dominant plant species (Anchorena and Cingolani 2002).

Propagule pressure vs. seed predation

To evaluate the effects of propagule pressure and seed predation on seed survival, we conducted a seed predation experiment. We placed 18 transects every 50 meters perpendicular to a *P. ponderosa* plantation. In each transect, we installed plots at 0, 25, 50, 75, 100, 150 and 200 m from the plantation. To disentangle the effects of distance

from plantation and seed availability, we used two different experimental designs with different seed densities (variable and fixed). In the "Variable density" experiment we simulated natural seed dispersal on nine transects. The purpose of the "Variable density" experiment is to evaluate the proportion of seed rain that is consumed by seed predators at different distances from the pine plantation. Since data on seed production and dispersion is not available in our study site, we obtained data from the literature (Barrett et al. 1979, Krannitz and Duralia 2004). Specifically, we used data on the percentage of seeds that reach different distances from the edge of a *P. ponderosa* plantation and built a regression model that best described the variation in seed dispersal with distance from plantation. To fit this dispersion kernel we used a negative exponential model because it is appropriate for describing seed dispersal by wind (Clark et al. 2005, Lustenhouwer et al. 2017). Based on the dispersion kernel of this species we placed 100, 50, 30, 16, 10, 6 and 2 seeds per m² at 0, 25, 50, 75, 100, 150 and 200 m from the plantation respectively (Fig. 1). In the "Fixed density" experiment we put 20 seeds per m² at 0, 25, 50, 75, 100, 150 and 200 m from the plantation at each of the nine transects. We chose to put 20 seeds per m² because it represents an intermediate value between the mean (ca. 30 seeds/m²) and the median (16 seeds/m²) of the seed rain across all the distance levels. The purpose of the "Fixed density" experiment is to evaluate the effect of the distance from the pine plantation on seed predation. We glued the seeds to popsicle sticks with a non-toxic odor-free adhesive and we fastened sticks to the ground with stakes to prevent the removal of the sticks by seed predators. We used latex disposable gloves to handle the seeds to avoid imparting human odor to the seeds. We considered seed removal as evidence of seed predation (Nuñez et al. 2008, Chiuffo et al. 2018). In total, we placed 2013 seeds and 1473 sticks. We carried out this study during autumn because it is the period when pine seeds are naturally available (Krugman and Jenkinson 2008) and when rodent abundance tends to peak (Guthmann et al. 1997). We evaluated seed removal 30 days after installing the experiment.

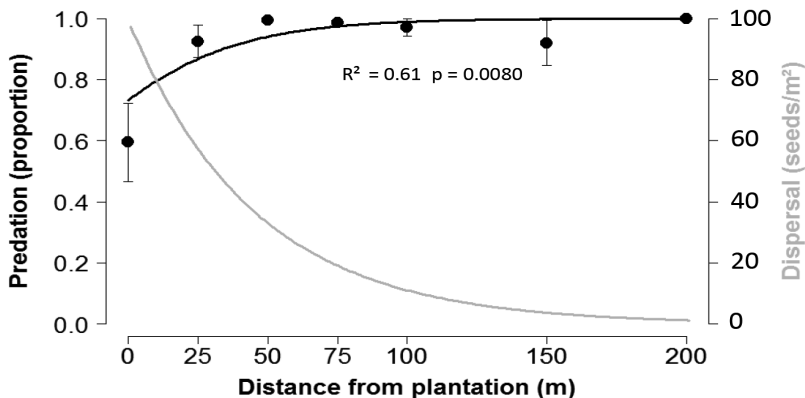


Figure 1. Seed dispersal (grey solid line) and seed predation (black dots and black solid line) of *P. ponderosa* at increasing distance from plantation. Dots show mean (+ SE) values of seed predation for each distance.

Missed mutualism

To test if lack of ectomycorrhizal fungi is limiting *P. ponderosa* invasion, we conducted a growth chamber bioassay. We collected ~100 cm³ of soil from each of the seven distances (0, 25, 50, 75, 100, 150, and 200 m) from the plantation on each of the nine "Variable density" transects used for the field experiment. Soils were collected during late fall 2017, just after the peak of mushroom fruiting season. Soil samples were dug from each site using an ethanol-sterilized spoon, placed in coin envelopes, each of which was then placed into gallon bags and then stored at 4 °C to be used the next day after collection. We removed small rocks and coarse roots and we used these soils to inoculate a mix of sterilized 50:50 soil and sand that had been autoclaved twice (Wolf and Skipper 1994). We randomly distributed soils from different distances into pots of 12 cm depth in ethanol sterilized plastic trays. To detect inadvertent EMF inoculation in the growth chamber, we randomly located 12 pots filled only with sterile soil. We used a total of 75 pots (nine for each from seven distances and 12 sterile) randomly distributed in five planting trays that were rotated once a week inside the growth chamber to avoid location effects. In each pot we planted four *P. ponderosa* seeds. We bought *P. ponderosa* seeds in the National Institute of Agricultural Technology (INTA – Bolson Experimental Station). We performed a pre-germination treatment in cold water for 48 hours. Floating seeds (vain seeds) were discarded and the rest were stored at 2–5 °C for three weeks. Prior to being sown, we surface-sterilized seeds in a 1% sodium hypochlorite solution. During the experiment water was added *ad libitum*, and there were no nutrients added to the pots. Light and temperature were kept constant. We used a cycle of 12 hours of light and 12 hours dark. Temperature was 25 °C during light periods and 10 °C during dark periods. Only the first plant to emerge was left in the pot, the rest were cut at the soil level avoiding soil disturbance. During the growing period we recorded survival (number of seedlings alive/total seedlings) for each distance and for sterile controls. After six months of initial planting we harvested the plants. We measured shoot height. We carefully rinsed clean seedling of adhering soil, separated them at the soil line into a root and shoot compartment, and placed them into an envelope to be dried in an oven at 65 °C for 2 days. We measured the biomass of dried root and shoot fractions separately using an electronic balance with accuracy to 0.0001 g. Prior to drying, we carefully examined the root system of each *P. ponderosa* seedling under a dissection microscope to address the extent of ectomycorrhizal colonization (based on morphological characteristics). Roots were placed on a petri dish, and the number of fine root tips colonized and not colonized by ectomycorrhizal fungi recorded.

Statistical analysis

To evaluate the effect of different predictive variables on seed predation we used logistic regressions. We calculated seed predation, the response variable, as the proportion of seeds that had been consumed (Orrock et al. 2015). To determine if distance from plantation and transect type had a significant effect on seed predation we considered them

as fixed factors. Because our experimental design included experimental units nested in transects we used transect number as a random factor (Bolker et al. 2009). To evaluate if the relationship between seed predation and distance from plantation differed between fixed and variable density transects we included the interaction between variables "distance" and "transect type" in our models. To compare seed predation between different distance levels we built logistic models with seed predation as response variable and distance level as a fixed categorical variable. Then we compared seed predation of each distance level with all the rest distance levels. To compare propagule pressure with seed predation at each distance level we also built logistic models with distance level as a fixed categorical variable. In this case we included a "dummy" distance level with 100% seed predation (proportion equal to 1) to represent propagule pressure. Then we compared seed predation of this "dummy" distance level with seed predation at distance levels 0, 25, 50, 75, 100, 150 and 200 m from the pine plantation. Significant differences would indicate that propagule pressure is higher than seed predation, while no significant differences would indicate that seed predation was as high as propagule pressure. For all our models we assumed a binomial distribution, using Generalized Linear Mixed Models (GLMM) based on Laplace approximation and a logit link function (lme4 package, glmer function) (Bates et al. 2015). We used analysis of deviance to evaluate the amount of total variation explained by each of the fixed factors (pseudo R^2).

To evaluate the effect of mycorrhizal inocula at increasing distances from plantation, we analyzed each response variable (survival, shoot height, biomass, and root colonization) separately. For response variables with binomial distribution (survival, and root colonization) we used GLMM fit by maximum likelihood and a logit link function (lme4 package, glmer function) (Bates et al. 2015). For those variables with a binomial distribution that presented overdispersion, we included an observation-level random effect for modeling the overdispersion (Harrison 2014). For response variables with normal distribution (shoot height and biomass) we used linear mixed-effects model fit by residual maximum likelihood (REML) (nlme package, lme function) (Pinheiro et al. 2017). In all cases we included "distance" as a fixed factor and "transect" as a random factor in the model. To address the effect of root colonization in plant growth we compared aboveground biomass (shoot dry biomass) of colonized vs. uncolonized seedlings with ANOVA (at $\alpha = 0.05$). All analyses were performed with R 3.4.0 statistical software (R Core Team 2018).

Results

Propagule pressure vs. seed predation

We found that seed predation increased with distance from plantation ($p = 0.0080$, Fig. 1, Table 1, 2). Propagule pressure was higher than seed predation only at the plantation edge (0 m) and seed predation surpassed propagule pressure at distances of 25 m and further from the plantation (Table 3). Seed predation was between 30 and 40% lower at the plantation edge than at distances of 25 m and further from the plantation (Fig. 1).

Table 1. Parameters of the logistic regression for seed predation of *P. ponderosa* at increasing distance from the pine plantation.

Fixed effects of distance from plantation, transect type and the interaction between distance and transect type.				
Significant effects ($p < 0.05$) are shown in bold letters				
Fixed effects	Estimate	Standard error	z	p
Distance	0.036	0.0134	2.656	0.0080
Transect type	-0.849	0.7791	1.090	0.2756
Distance * Transect type	-0.015	0.0203	0.731	0.4648
Random effects of the transect (n = 9). Intercepts are averaged				
Random effect	Mean intercept		Standard deviation	
Transect	1.475		0.000	

Table 2. Pairwise comparisons of seed predation levels between different distances from the pine plantation. Significant differences ($p < 0.05$) are shown in bold letters.

Pairwise comparison [m]	p value
0 vs 25	0.0396
0 vs 50	0.0397
0 vs 75	0.0312
0 vs 100	0.0291
0 vs 150	0.0441
0 vs 200	0.0438
25 vs 50	0.4273
25 vs 75	0.5187
25 vs 100	0.6585
25 vs 150	0.9311
25 vs 200	0.4090
50 vs 75	0.8348
50 vs 100	0.6705
50 vs 150	0.3914
50 vs 200	0.9541
75 vs 100	0.8175
75 vs 150	0.4724
75 vs 200	0.7925
100 vs 150	0.6011
100 vs 200	0.6359
150 vs 200	0.3758

Table 3. Pairwise comparisons between propagule pressure and seed predation for each distance level from the pine plantation. Significant differences ($p < 0.05$) are shown in bold letters.

Pairwise comparison	Distance [m]	p value
Propagule pressure vs seed predation	0	0.0438
	25	0.4090
	50	0.9541
	75	0.7925
	100	0.6359
	150	0.3758
	200	1.0000

Moreover, we found no effect of transect type (variable vs. fixed) on seed predation ($p = 0.2756$). The relationship between seed predation and distance from plantation was the same for both transect types as evidenced by the absence of interaction between distance from the plantation and transect type ($p = 0.4648$). With the fixed density transects we

offered 25%, 100%, 230% and 900% more seeds than would naturally be available at 75, 100, 150 and 200 m from the plantation, respectively, but still seed predators consumed 97%, 98%, 88% and 100% of the seeds dispersed, respectively.

Missed mutualism

EMF root colonization decreased with distance from plantation ($p = 0.0139$, Fig. 2, Table 4). Mean EMF root colonization at the pine plantation edge was ca. 90% while it decreased to ca. 40% at the furthest distance from the plantation evaluated here (200 m). However, we found no differences in seedling growth (shoot height and biomass) or survival with distance from plantation ($p_{\text{height}} = 0.6387$; $p_{\text{biomass}} = 0.9911$; $p_{\text{survival}} = 0.4830$). When we pooled all distance levels together and compared seedlings colonized by EMF (ranging from 10% to 100% EMF root colonization) with seedlings un-colonized (0% EMF root colonization) we found differences in seedling biomass favoring colonized seedlings ($p = 0.0400$, Suppl. material 1: Fig. S1). Finally, the roots of the seedlings growing in sterile soils were not colonized by EMF, showing there was no inadvertent EMF inoculation in the growth chamber.

Table 4. Parameters of the logistic regression for EMF root colonization at increasing distance from the pine plantation.

Fixed effects of distance from plantation. Significant effects ($p < 0.05$) are shown in bold letters				
Fixed effects	Estimate	Standard error	z	P
Distance	-0.012	0.0050	-2.460	0.0139
Random effects of the transect (n = 9), and the observation included due to overdispersion. Intercepts are averaged				
Random effect	Mean intercept		Standard deviation	
Transect	2.064		0.396	
Observation	2.027		1.554	

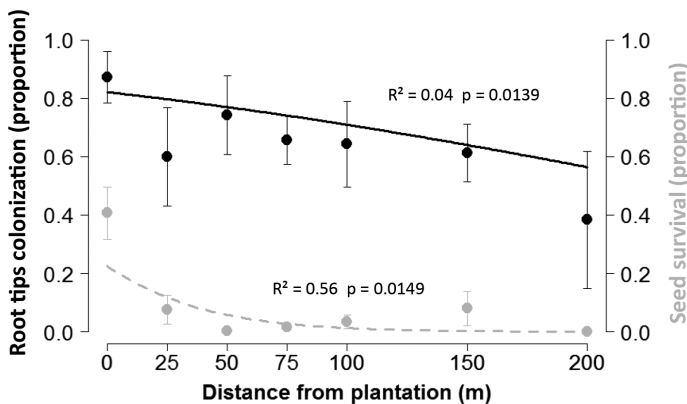


Figure 2. EMF root tips colonization on growth chamber bioassay (in black) and seed survival from predation for *P. ponderosa* on field experiment (in grey) at increasing distance from plantation. Dots show mean (+ SE) values for each distance.

Discussion

Our results provide strong empirical evidence that seed predation may be the most important biotic mechanism limiting *P. ponderosa* invasions in this system. Seed predators consumed ca. 95% of the seeds dispersed outside the pine plantation, thereby limiting seed availability. Propagule pressure varied in a wide range, from 100 seeds/m² at the plantation edge to 2 seeds/m² at a distance of 200 m from the plantation, however, only at the plantation edge does propagule pressure overwhelm seed predation. At distances of 25 m and further from the pine plantation, seed predation overcame the influence of propagule pressure. This is particularly clear when we consider seed predation in the fixed density transects: at distances from plantation higher than 75 m seed predation was between 25% and 900% higher than propagule pressure. This survival pattern of not predated seeds suggests that *P. ponderosa* seedling annual recruitment is limited to the first 25 m from the seed source. Altogether, these results provide evidence of how biotic resistance from generalist natural enemies can hinder an invasion.

In this study, we found that pine seed predation probability increases with increasing distance from plantation (Fig. 1). This fits with the seedling recruitment pattern described by McCanny (1985). Such inverse density-dependence seed mortality can be explained by predator satiation (Janzen 1971), when predators are satiated by the higher seed densities near adult plants (Augspurger and Kitajima 1992). Predator satiation near the pine plantation makes sense when we consider the gradient of decreasing seed availability with increasing distance from the plantation (Fig. 1). An alternative explanation is that native predators' activity is lower near pine plantations because it is a type of habitat very different from the steppe. The low cover of understory vegetation in pine plantations (Paritsis and Aizen 2008) means that small mammals (main pine seed predators in this region) (Nuñez et al. 2008, Chiuffo et al. 2018) have few sheltered habitats to take refuge from predators. Thus, small mammals would reduce risk by spending less time searching for food in the understory of pine plantations than in the adjacent low stature vegetation. The observed seed predation pattern may not reflect *P. ponderosa*'s probability of establishment and invasion because many other factors and processes are involved between seed survival and invasion success (Richardson et al. 2000, Carrillo-Gavilan et al. 2010, Blackburn et al. 2011). However, if seed predators are able to consume most of the seed production of a plant population then its probability of becoming invasive would be highly reduced (Pearson et al. 2012), especially considering further filters before invasion success (Richardson et al. 2000, Blackburn et al. 2011, Carrillo-Gavilan et al. 2012).

Our results also show that the abundance of EMF may not be limiting pine seedling survival and growth at the distance range evaluated. We found a gradient of decreasing root colonization with increasing distance from plantation (Fig. 2). However, this root colonization gradient did not affect seedling survival or growth. Other studies have found important effects of EMF abundance and composition on pine seedling establishment (Nuñez et al. 2009, Hayward et al. 2015, Urcelay et al. 2017) but working with wider distance ranges. For example, Nuñez et al. (2009) found effects of EMF on *P. ponderosa*

seedling establishment working with a distance of 1000 m from plantation. Lower levels of EMF root colonization at further distances from the pine plantation may have a significant effect on seedling growth. In this vein, we found that only when seedlings were not colonized (0% EMF root colonization) their growth was negatively affected (Suppl. material 1: Fig. S1). However, if seed survival to predation is limiting at a distance of 25 m from plantation (Fig. 2) the importance of limitations at further distances may not be fundamental to explain invasion in the first hundreds meters from plantations, but may be extremely important for rare but potentially key events of long distance dispersal. Another possibility is that the duration of the bioassay was not long enough to show the effect of root colonization on seedling growth. For example, Nuñez et al. (2009) found effects of *P. ponderosa* root colonization by EMF on seedling growth on a greenhouse experiment that lasted 9 months. However, on a growth chamber the effect of EMF on pine seedling growth should be clear after 6 months, as shown in other studies (Alberton and Kuyper 2009, Hazard et al. 2017). Therefore, our results suggest that EMF availability is not limiting *P. ponderosa* invasion in our study system but that the community of seed predators is behind the observed pattern of low invasion levels for *P. ponderosa*.

Our study shows that biotic resistance can be extremely important in plant invasions, even more important than the propagule pressure and the missed mutualism hypothesis. By contrast, a review of the empirical evidence for general hypothesis in invasion ecology found more support for the propagule pressure hypothesis than for the biotic resistance hypothesis in experiments with terrestrial plants (Jeschke 2014). This highlights the idiosyncratic nature of the importance of these hypotheses. In our study system, only the highest level of propagule pressure overwhelms biotic resistance, highly limiting the invasion of *P. ponderosa*. Therefore, our study highlights the role of biotic resistance in plant invasions.

Acknowledgements

This research was supported by Rufford Foundation grant number 23089-1 and the National Agency of Scientific and Technologic Promotion (AGENCIA) grant "PICT 2014 N° 0662 PRESTAMO BID". We thank San Ramon ranch for giving us permission to carry out our study on their property. We also thank Ariel Mayoral and Agustin Vitali for their valuable help on the field. We appreciate the help with the statistical analyses provided by Teresa Moran-Lopez and Florencia Tiribelli. We greatly appreciate the helpful comments from Dean Pearson on an earlier version of this manuscript.

References

- Alberton O, Kuyper TW (2009) Ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus sylvestris* seedlings respond differently to increased carbon and nitrogen availability: implications for ecosystem responses to global change. *Global Change Biology* 15: 166–175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01714.x>

- Anchorena J, Cingolani A (2002) Identifying habitat types in a disturbed area of the forest-steppe ecotone of Patagonia. *Plant Ecology* 158: 97–112. <https://doi.org/10.1023/A:1014768822737>
- Augsburger CK, Kitajima K (1992) Experimental studies of seedling recruitment from contrasting seed distributions. *Ecology* 73: 1270–1284. <https://doi.org/10.2307/1940675>
- Barrett JW, Forest PN, Station RE, Service USF (1979) *Silviculture of ponderosa pine in the Pacific Northwest: the state of our knowledge*. Dept. of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station: 1–106.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. 2015 67: 48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Blackburn TM, Lockwood JL, Cassey P (2015) The influence of numbers on invasion success. *Molecular Ecology* 24: 1942–1953. <https://doi.org/10.1111/mec.13075>
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White J-SS (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.008>
- Carrillo-Gavilán A, Espelta JM, Vilà M (2012) Establishment constraints of an alien and a native conifer in different habitats. *Biological Invasions* 14: 1279–1289. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-0155-z>
- Carrillo-Gavilán MA, Lagüë H, Vilà M (2010) Comparing seed removal of 16 pine species differing in invasiveness. *Biological Invasions* 12: 2233–2242. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9633-y>
- Catford JA, Jansson R, Nilsson C (2009) Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. *Diversity and Distributions* 15: 22–40. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00521.x>
- CIEFAP (2017) *Inventario nacional de plantaciones forestales: Región Patagónica*. Ministerio de Agroindustria. Argentina.
- Chiuffo MC, Moyano J, Rodríguez-Cabal MA, Nuñez MA (2018) Seed predation of non-native species along a precipitation gradient. *Plant Ecology* 219: 1307–1314. <https://doi.org/10.1007/s11258-018-0880-9>
- Clark CJ, Poulsen JR, Bolker BM, Connor EF, Parker VT (2005) Comparative seed shadows of bird-, monkey-, and wind-dispersed trees. *Ecology* 86: 2684–2694. <https://doi.org/10.1890/04-1325>
- Collier FA, Bidartondo MI (2009) Waiting for fungi: the ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal of Ecology* 97: 950–963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01544.x>
- Connolly B, Pearson D, Mack R (2014) Granivory of invasive, naturalized, and native plants in communities differentially susceptible to invasion. *Ecology* 95: 1759–1769. <https://doi.org/10.1890/13-1774.1>
- Dickie IA, Bufford JL, Cobb RC, Desprez-Loustau M-L, Grelet G, Hulme PE, Klironomos J, Makiola A, Nuñez MA, Pringle A, Thrall PH, Tourtellot SG, Waller L, Williams NM (2017) The emerging science of linked plant–fungal invasions. *New Phytologist* 215: 1314–1332. <https://doi.org/10.1111/nph.14657>
- Elton CS (1958) *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Methuen, London, 181 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7214-9>

- Guthmann N, Lozada M, Monjeau JA, Heinemann K (1997) Population dynamics of five sigmodontine rodents of northwestern Patagonia. *Acta Theriologica* 42: 143–152. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.97-17>
- Harrison XA (2014) Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ* 2: e616. <https://doi.org/10.7717/peerj.616>
- Hayward J, Horton TR, Nuñez MA (2015) Ectomycorrhizal fungal communities coinvasing with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytologist* 208: 497–506. <https://doi.org/10.1111/nph.13453>
- Hazard C, Kruitbos L, Davidson H, Taylor AF, Johnson D (2017) Contrasting effects of intra- and interspecific identity and richness of ectomycorrhizal fungi on host plants, nutrient retention and multifunctionality. *New Phytologist* 213: 852–863. <https://doi.org/10.1111/nph.14184>
- Horton TR (2017) Spore dispersal in ectomycorrhizal fungi at fine and regional scales. In: Tedersoo L (Ed.) *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Springer International Publishing, 61–78. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_3
- Hulme PE (1994) Post-dispersal seed predation in grassland: its magnitude and sources of variation. *Journal of Ecology* 82: 645–652. <https://doi.org/10.2307/2261271>
- Janzen DH (1969) Seed-Eaters Versus Seed Size, Number, Toxicity and Dispersal. *Evolution* 23: 1–27. <https://doi.org/10.2307/2406478>
- Janzen DH (1971) Seed predation by animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2: 465–492. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.02.110171.002341>
- Jeschke JM (2014) General hypotheses in invasion ecology. *Diversity and Distributions* 20: 1229–1234. <https://doi.org/10.1111/ddi.12258>
- Jones ML, Ramoneda J, Rivett DW, Bell T (2017) Biotic resistance shapes the influence of propagule pressure on invasion success in bacterial communities. *Ecology* 98: 1743–1749. <https://doi.org/10.1002/ecy.1852>
- Krannitz PG, Duralia TE (2004) Cone and seed production in *Pinus ponderosa*: a review. *Western North American Naturalist* 64: 208–218.
- Krugman SL, Jenkinson JL (2008) Pinaceae - Pine family. In: Bonner FT, Karraft RP (Eds) *The woody plant seed manual*. Agriculture handbook 727. USDA Forest Service, Washington, 809–847.
- Lamarque LJ, Delzon S, Lortie CJ (2011) Tree invasions: a comparative test of the dominant hypotheses and functional traits. *Biological Invasions* 13: 1969–1989. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-0015-x>
- Larios L, Pearson DE, Maron JL (2017) Incorporating the effects of generalist seed predators into plant community theory. *Functional Ecology* 31: 1856–1867. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12905>
- Levine JM, Adler PB, Yelenik SG (2004) A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions. *Ecology Letters* 7: 975–989. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00657.x>
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.004>
- Lockwood JL, Hoopes MF, Marchetti MP (2013) *Invasion Ecology*. Wiley, 466 pp.

- Lustenhouwer N, Moran EV, Levine JM (2017) Trait correlations equalize spread velocity across plant life histories. *Global Ecology and Biogeography* 26: 1398–1407. <https://doi.org/10.1111/geb.12662>
- McCanny SJ (1985) Alternatives in parent-offspring relationships in plants. *Oikos* 45: 148–149. <https://doi.org/10.2307/3565232>
- Nathan R, Horvitz N, He Y, Kuparinen A, Schurr FM, Katul GG (2011) Spread of North American wind-dispersed trees in future environments. *Ecology Letters* 14: 211–219. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01573.x>
- Núñez MA, Horton TR, Simberloff D (2009) Lack of belowground mutualisms hinders Pinaceae invasions. *Ecology* 90: 2352–2359. <https://doi.org/10.1890/08-2139.1>
- Núñez MA, Simberloff D, Relva MA (2008) Seed predation as a barrier to alien conifer invasions. *Biological Invasions* 10: 1389–1398. <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9214-x>
- Orrock JL, Borer ET, Brudvig LA, Firn J, MacDougall AS, Melbourne BA, Yang LH, Baker DV, Bar-Massada A, Crawley MJ, Damschen EI, Davies KF, Gruner DS, Kay AD, Lind E, McCulley RL, Seabloom EW (2015) A continent-wide study reveals clear relationships between regional abiotic conditions and post-dispersal seed predation. *Journal of Biogeography* 42: 662–670. <https://doi.org/10.1111/jbi.12451>
- Paritsis J, Aizen MA (2008) Effects of exotic conifer plantations on the biodiversity of understory plants, epigeal beetles and birds in *Nothofagus dombeyi* forests. *Forest Ecology and Management* 255: 1575–1583. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.11.015>
- Pearson DE, Callaway RM, Maron JL (2011) Biotic resistance via granivory: establishment by invasive, naturalized, and native asters reflects generalist preference. *Ecology* 92: 1748–1757. <https://doi.org/10.1890/11-0164.1>
- Pearson DE, Ortega YK, Eren Ö, Hierro JL (2018) Community assembly theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 33: 313–325. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.03.002>
- Pearson DE, Potter T, Maron JL (2012) Biotic resistance: exclusion of native rodent consumers releases populations of a weak invader. *Journal of Ecology* 100: 1383–1390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2012.02025.x>
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Heisterkamp S, van Willigen B, Maintainer R (2017) Package 'nlme'. Linear and nonlinear mixed effects models.
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. <http://www.Rproject.org/>
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 6: 93–107. doi:10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x
- Richardson DM, Williams PA, Hobbs R (1994) Pine Invasions in the Southern Hemisphere: Determinants of Spread and Invasibility. *Journal of Biogeography* 21: 511–527. <https://doi.org/10.2307/2845655>
- Sarasola M, Rusch V, Schlichter T, Ghersa C (2006) Tree conifers invasion in steppe areas and *Austrocedrus chilensis* forests in NW Patagonia. *Ecologia Austral* 16: 143–156.
- Simberloff D (2009) The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 81–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120304>

- Traveset A, Richardson DM (2014) Mutualistic interactions and biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45: 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091857>
- Urcelay C, Longo S, Geml J, Tecco PA, Nouhra E (2017) Co-invasive exotic pines and their ectomycorrhizal symbionts show capabilities for wide distance and altitudinal range expansion. *Fungal Ecology* 25: 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.11.002>
- von Holle B, Simberloff D (2005) Ecological resistance to biological invasions overwhelmed by propagule pressure. *Ecology* 86: 3212–3218. <https://doi.org/10.1890/05-0427>
- Wolf DC, Skipper HD (1994) Soil sterilization. *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*: 41–51.

Supplementary material I

Figure S1.

Authors: Jaime Moyano, Mariana C. Chiuffo, Nahuel Policelli, Martin A. Nuñez, Mariano A. Rodriguez-Cabal

Data type: multimedia

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/neobiota.42.30978.suppl1>

Highly invasive tree species are more dependent on mutualisms

JAIME MOYANO ¹, MARIANO A. RODRIGUEZ-CABAL ^{1,2}, AND MARTIN A. NUÑEZ ^{1,3}

¹Grupo de Ecología de Invasiones, INIBIOMA, CONICET, Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, San Carlos de Bariloche CP 8400 Argentina

²Rubenstein School of Environment and Natural Resources, University of Vermont, Burlington, Vermont 05405 USA

Citation: Moyano, J., M. A. Rodriguez-Cabal, and M. A. Nuñez. 2020. Highly invasive tree species are more dependent on mutualisms. Ecology 101(5):e02997. 10.1002/ecy.2997

Abstract. Why some species become invasive while others do not remains an elusive question. It has been proposed that invasive species should depend less on mutualisms, because their spread would then be less constrained by the availability of mutualistic partners. We tested this idea with the genus *Pinus*, whose degree of invasiveness is known at the species level (being highly and negatively correlated with seed size), and which forms obligate mutualistic associations with ectomycorrhizal fungi (EMF). Mycorrhizal dependence is defined as the degree to which a plant needs the mycorrhizal fungi to show the maximum growth. In this regard, we use plant growth response to mycorrhizal fungi as a proxy for mycorrhizal dependence. We assessed the responsiveness of *Pinus* species to EMF using 1,206 contrasts published on 34 species, and matched these data with data on *Pinus* species invasiveness. Surprisingly, we found that species that are more invasive depend more on mutualisms (EMF). Seedling growth of species with smaller seeds benefited more from mutualisms, indicating a higher dependence. A higher reliance on EMF could be part of a strategy in which small-seeded species produce more seeds that can disperse further, and these species are likely to establish only if facilitated by mycorrhizal fungi. On the contrary, big-seeded species showed a lower dependence on EMF, which may be explained by their tolerance to stressful conditions during establishment. However, the limited dispersal of larger seeds may limit the spread of these species. We present strong evidence against a venerable belief in ecology that species that rely more on mutualisms are less prone to invade, and suggest that in certain circumstances greater reliance on mutualists can increase spread capacity.

Key words: facilitation; mutualists; mycorrhiza; *Pinus*; plant invasions; seed size; seedling growth.

INTRODUCTION

Predicting what species are more likely to invade when introduced to a new region represents a major challenge in modern ecology. However, understanding why some plant species become invasive while others do not remains elusive (van Kleunen et al. 2015, Seebens et al. 2016). The “ideal weed” hypothesis posits that invasive plant species should depend less on mutualistic interactions (Baker 1965). Several studies have suggested that plant species that rely more on mutualisms are less prone to invade (Richardson et al. 2000). Therefore, plant species that rely more on pollinators (Burns et al. 2011, Pyšek et al. 2011, Rodger et al. 2013, Razanajatovo et al. 2016), on seed dispersers (Richardson et al. 2000), and on mycorrhizal associations (Vogelsang et al. 2004, Vogelsang and Bever 2009) are proposed to be less invasive.

Dependence on mutualists may affect the success of plant invasions in different ways. There may be no dependence between plants and mutualists, in which case those plants should be more likely to be invasive because their spread is not limited by the presence of mutualists (Baker 1965, Rodger et al. 2013). For example, the highly invasive *Atriplex* spp. and *Hakea* spp. in South Africa (Henderson 2007) and *Brassica* spp. in North America (Oduor et al. 2015) are nonmycorrhizal plants (Traveset and Richardson 2014). Also many successful invasive plants, including *Alliaria petiolata*, *Bromus tectorum*, *Carpobrotus edulis*, *Hypericum perforatum*, and *Mesembryanthemum crystallinum* are self-pollinated (Richardson et al. 2000). Some plants may depend facultatively on mutualisms, so they can still establish and invade in the absence of their mutualistic partners (Traveset and Richardson 2014). For example, 90% of woody invasive plants do not depend exclusively on animal dispersers (Traveset and Richardson 2014). Finally, some plants are highly dependent on mutualisms and will invade only in the presence of their mutualists (Richardson et al. 2000). For example, out of 60 *Ficus* species introduced to Florida, only 3 have become invasive, and

Manuscript received 10 October 2019; revised 17 December 2019; accepted 3 January 2020. Corresponding Editor: Jason Hoeksema.

³E-mail: nunezm@gmail.com

only after the introduction of their highly specific pollinator wasps (Ramírez 1988, McKey and Kaufmann 1991, Nadel et al. 1992). Although many studies have supported this general pattern of higher likelihood of becoming invasive for plant species with lower dependence on mutualisms using isolated examples, no study has quantified the dependence on mutualisms along a gradient of plant invasiveness.

The genus *Pinus* is an ideal study system to evaluate the dependence of invasive plants on mutualisms. Many species of this genus have been widely planted around the world, some of which have become invasive, whereas others have not (Simberloff et al. 2010, Richardson and Rejmánek 2011, Nuñez et al. 2017). Also, invasions by *Pinus* have been intensively studied (Richardson 2006), and a score was developed to quantify invasiveness among different pine species (*Z* score; Rejmánek et al. 2005; see also Rejmánek and Richardson 1996). Further, *Pinus* species form obligate and highly specific mutualistic interactions with ectomycorrhizal fungi (EMF; Mikola 1970, Koele et al. 2012), which is the mycorrhizal association of 60% of the trees on the world (Steidinger et al. 2019). The degree to which *Pinus* species need ectomycorrhizal fungi to produce the maximum growth is defined as mycorrhizal dependence (Gerdemann 1975, Janos 2007). In this regard, *Pinus* growth response to ectomycorrhizal fungi can be used as a proxy for mycorrhizal dependence (Menge et al. 1978, Plenchette et al. 1983, Tawaraya 2003, Moora 2014). Additionally, working with species within the same genus minimizes confounding effects arising from phylogenetic relatedness. Here we focus on the seedling stage because: (1) *Pinus* species vary greatly in their growth response to EMF at the seedling stage (Karst et al. 2018), (2) it is the most vulnerable stage in the life cycle of a plant (Harper 1977, Baskin and Baskin 1998, Fenner and Thompson 2005), and (3) patterns of growth at the seedling stage are very good predictors of patterns of growth at maturity for woody species (Cornelissen et al. 1998).

Here, we test the hypothesis that *Pinus* species with higher invasiveness depend less on the mutualisms with EMF. We define invasiveness here as the potential of a species to increase in abundance and/or distribution when introduced to a new region (Pyšek and Richardson 2007). To test this hypothesis we compiled a database of 1,206 contrasts on 34 *Pinus* species that evaluated the growth of seedlings, with or without EMF inoculation (i.e., mycorrhizal responsiveness). Using linear models we evaluated the relationship between *Pinus* species invasiveness as scored by Rejmánek et al. (2005) and the response of seedling growth to EMF inoculation. Seed mass is among the plant traits with more evidence showing a correlation with plant invasiveness (Rejmánek 2000, Hamilton et al. 2005, Moravcová et al. 2010, Pyšek et al. 2015, Novoa et al. 2016). To understand the relationship between invasiveness and mutualist dependence further, we evaluated the relationship between seed mass and the effect of EMF on seedling growth.

METHODS

We quantified *Pinus* species responsiveness to mycorrhizas (Janos 2007, Smith et al. 2009) following the method in Veresoglou et al. (2018): comparing the growth of *Pinus* seedlings with and without EMF. Although species response to mycorrhizas is evaluated under highly controlled conditions, this response could be used as a proxy for plant mycorrhizal dependence (Gerdemann 1975, Menge et al. 1978, Plenchette et al. 1983, Tawaraya 2003, Moora 2014). For this purpose, we used data from published studies to perform a meta-analysis conforming to PRISMA guidelines (Moher et al. 2009).

We built our database of published studies starting with a global database of plant response to mycorrhizal fungi (MycnoDB), which contains studies where plants were grown either with mycorrhizal fungi or without them, and the resulting plant growth was measured (Chaudhary et al. 2016). MynoDB contains 444 contrasts from 58 papers focused on *Pinus* species (Appendix S1: Fig. S1). On March 2019 we conducted a literature search of the Scopus database using the keywords “pinus” OR “pine*” AND “inocul*” AND “mycorrhiz*” OR “ecotmyc*”. We evaluated the results obtained with this search and the references therein to identify 112 papers which met the following requirements: (1) comparison of *Pinus* seedling biomass measured after growing with or without inoculation of EMF and, (2) the study was not included in MynoDB. Those articles that did not include control treatments (without EMF inoculation) were not included, because comparisons were not possible. For each study, we obtained information on seedling biomass with and without inoculation of EMF. When they were available, we extracted data from whole plant biomass (shoot + root), and if such data were unavailable we tallied only shoot biomass. If an experiment contained the manipulation of a factor apart from fungal inoculation (e.g., substrate fertilization, age of seedlings at moment inoculation), the results were included in our database as separate contrasts within the same experiment, following the same criteria as the authors of MynoDB (Chaudhary et al. 2016).

We also extracted, from each experiment, data on covariables that we expected to influence *Pinus* seedlings response to EMF: (1) whether the experiment was performed in the field or under controlled conditions (greenhouse or growth chamber), (2) the duration of the experiment, (3) whether the substrate was fertilized or not, (4) whether *Pinus* seedlings were inoculated with a single fungal species or with multiple fungal species, (5) the age of the *Pinus* seedlings when inoculated, and (6) whether the experiment took place in the native or in the introduced range of the *Pinus* species. We digitized data available in graphs using Web Plot Digitizer 4.1 (Rohatgi 2018). In combination with previous contrasts from MynoDB, the final database we obtained consists of

1,206 contrasts from 170 papers. Of these, 346 contrasts were carried out in the field and 860 took place under controlled conditions (either in a greenhouse or a growth chamber).

We calculated an effect size (ES) for each study using log response ratio as

$$ES = \ln(EMF_P/EMF_A) \quad (1)$$

where EMF_P is the biomass of seedlings in the presence of EMF and EMF_A is the biomass of seedlings in the absence of EMF. We calculated a mean effect size for each *Pinus* species using an unweighted average of all the contrasts for each species, following Karst et al. (2018). A positive effect size indicates that *Pinus* seedlings benefit from the presence of EMF, whereas if the effect size is negative seedlings are negatively affected by EMF. Also, the absolute value of the effect size is an indicator of the magnitude of the response of the seedlings to the presence of EMF, whether positive or negative. Therefore, some *Pinus* seedlings may have a strong response, whereas others may have a weak response even when in both cases seedlings benefit from EMF inoculation (i.e., both responses are positive).

For each *Pinus* species included in the database (Appendix S1: Table S1) we obtained information on life-history traits from different sources (Committee-for-Compilation-of-Chinese-Tree-Species-Manuals 1978, Grotkopp et al. 2004, Krugman and Jenkinson 2008, Zhao et al. 2011, McGregor et al. 2012, Yang et al. 2018). We were interested in the different traits that were found to predict invasiveness (seed mass, juvenile period, and interval between large seed crops) and were therefore used to calculate an invasion index (i.e., the Z score; Rejmánek et al. 2005; see also Rejmánek and Richardson 1996). The Z score is calculated for each *Pinus* species as follows:

$$Zscore = 23.39 - 0.63 * \sqrt{SM} - 3.88\sqrt{JP} - 1.09 * SC \quad (2)$$

where SM is seed mass, JP is juvenile period, and SC is the interval between large seed crops for each *Pinus* species. A species with negative Z score would be considered noninvasive, whereas a species with positive Z score would be considered invasive. For example, according to a global database of invasive trees and shrubs, 90% of *Pinus* species that have become invasive around the world have a positive Z score (Rejmánek and Richardson 2013). Also, the higher the value of positive Z scores, the more invasive a species would be (Rejmánek et al. 2005). In this regard, based on a recently compiled database of worldwide occurrences of naturalized *Pinus* species (Perret et al. 2019) the Z score is positively and highly correlated with the number of naturalized occurrences for the 34 species included in our database ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.38$). On the other hand, lower

values of seed mass correspond to a higher invasive capacity for *Pinus* species (Richardson et al. 1990, 1994, Rejmánek 1996, Rejmánek and Richardson 1996, Grotkopp et al. 2002, Grotkopp et al. 2004, Rejmánek et al. 2005). We also extracted data on seed wing length from (McGregor et al. 2012) to obtain the ratio between seed mass and seed wing length, defined as seed loading index (Richardson et al. 1990). This trait is a good indicator of how effectively the seed can be dispersed by wind and, therefore, it may help understand why some *Pinus* species spread more rapidly (Richardson et al. 1990, Rejmánek 1996).

To quantify the importance of *Pinus* species invasiveness (using either Z score or seed mass as a proxy) and other covariables as the potential drivers of the effect of EMF on seedling growth, we used linear regression models (lm function; Wilkinson and Rogers 1973, Chambers et al. 1990). Further, to evaluate the relationship between *Pinus* species dispersal ability and seedling responsiveness to EMF, we used seed loading index as a predictor variable (an alternative to species invasiveness), together with other co-variables. We tested the independence of all predictor variables through multicollinearity, using the variance inflation factor (VIF; VIF function; Fox and Weisberg 2010). None of the variables showed multicollinearity (all VIF values were below 2), so we incorporated all of them in our models. However, it is important to make clear that we never included Z score, seed mass, or seed loading index on the same model, because Z scores and seed loading indexes are calculated based on seed mass. We tested our models for normality by visually analyzing the distribution of each model's residuals (Appendix S2: Figs. S1a and S2a). We evaluated the homogeneity of variance checking the absence of patterns between model residuals and fitted values (Quinn and Keough 2002; Appendix S2: Figs. S1b and S2b). Further, none of the data points in our data set showed a Cook's distance over 1, indicating the absence of influential cases (Cook and Weisberg 1982; Appendix S2: Figs. S1c and S2c).

To test if there is a phylogenetic signal in our response variable we used the phylogenetic tree constructed by McGregor (2012) and estimated Abouheif's C_{mean} (Abouheif 1999, Pavoine et al. 2008; abouheif.moran function from package adephylo; Jombart and Dray 2008). To evaluate if there is a publication bias in our database, we used a nonparametric rank correlation test, Spearman's rho, a powerful test for analyses including more than 75 contrasts (Begg and Mazumdar 1994). According to this test a significant correlation between effect size and sample size would indicate bias in publication. We also built a funnel plot to observe how the distribution of effect sizes changes with the sample size. Finally, we included sample size (i.e., number of replicates) of each contrast as a predictive variable in the multiple regression models to account for a possible publication bias. We performed all statistical analyses

using R software v.3.5.1 (R Development Core Team 2019).

RESULTS

The effect of EMF inoculation on *Pinus* seedling growth increased with increasing *Pinus* invasiveness ($R^2 = 0.37$; $P = 0.0001$; Fig. 1a) and decreased with increasing seed mass ($R^2 = 0.24$; $P = 0.0030$; Fig. 1b). Even without considering the four species with clearly negative Z scores, species with higher invasiveness showed higher growth response to EMF ($R^2 = 0.16$; $P = 0.0288$; Appendix S2: Fig. S3). This growth response ranged from nearly 0% for big-seeded species with low invasiveness to nearly 100% biomass increase for small-seeded species with high invasiveness. Seedling growth response to EMF decreased with seed wing

loading ($R^2 = 0.20$; $P = 0.0072$; Appendix S2: Fig. S4). Even when removing data from the *Pinus* species with extreme values of this trait, species dependence to EMF still decreased with higher seed wing loading ($R^2 = 0.16$; $P = 0.0244$; Appendix S2: Fig. S5).

When accounting for experiment conditions (field experiment or under controlled conditions, experiment duration, fertilization, single fungal species, or multiple fungal species inoculation, the age of seedlings when inoculated and the location of the experiment in the native or introduced range of the *Pinus* species) we found a significant effect of many co-variables. Seedling response to EMF increased with the duration of the experiment (Appendix S2: Fig. S6) and with inoculation of multiple fungal species (Appendix S2: Fig. S8). On the other hand, species mycorrhizal responsiveness decreased with soil fertilization (Appendix S2: Fig. S7) and seedling age at the moment of inoculation (Appendix S2: Fig. S9). However, seedling growth response was not affected by whether the experiment was carried out under controlled conditions or in the field (Appendix S3: Table S1). Finally, the effect of the location of the experiment in the native or the introduced range of *Pinus* species on seedling growth response to EMF showed inconclusive results (Appendix S3: Table S1). When using the Z score as proxy for *Pinus* species invasiveness we found that seedling response to EMF increased in the native range (Appendix S3: Table S1a). However, when using either seed mass or seed wing loading index as proxy for *Pinus* species invasiveness we found no significant effect of experiment location (Appendix S3: Table S1b and S1c).

After accounting for experimental conditions the effect of EMF on *Pinus* seedling growth still increased with *Pinus* invasiveness ($P < 0.0001$; Appendix S3: Table S1a), and decreased with *Pinus* seed mass ($P = 0.0021$; Appendix S3: Table S1b) and *Pinus* seed wing loading ($P = 0.0068$, Appendix S3: Table S1c). Therefore, across many different scenarios and context conditions the traits that favor *Pinus* invasiveness and seed dispersal remained strong drivers of their response to EMF: *Pinus* species that can disperse further and are more invasive have higher responsiveness to EMF. We found no evidence that the effect of EMF on seedling growth is affected by species relatedness (Abouheif's $C_{\text{mean}} = 0.116$, $P = 0.159$; Münkemüller et al. 2012). On the other hand, we found evidence for publication bias in our database (Spearman's $\rho = -0.13$; $P < 0.0001$), given by an overrepresentation of positive effect sizes at low sample sizes (Appendix S4: Fig. S1). However, when including the sample size as a predictive variable in our models, to account for this publication bias, our results were unchanged (Appendix S5: Table S1).

DISCUSSION

Contrary to theoretical predictions, our results show that *Pinus* species that are more invasive depend more

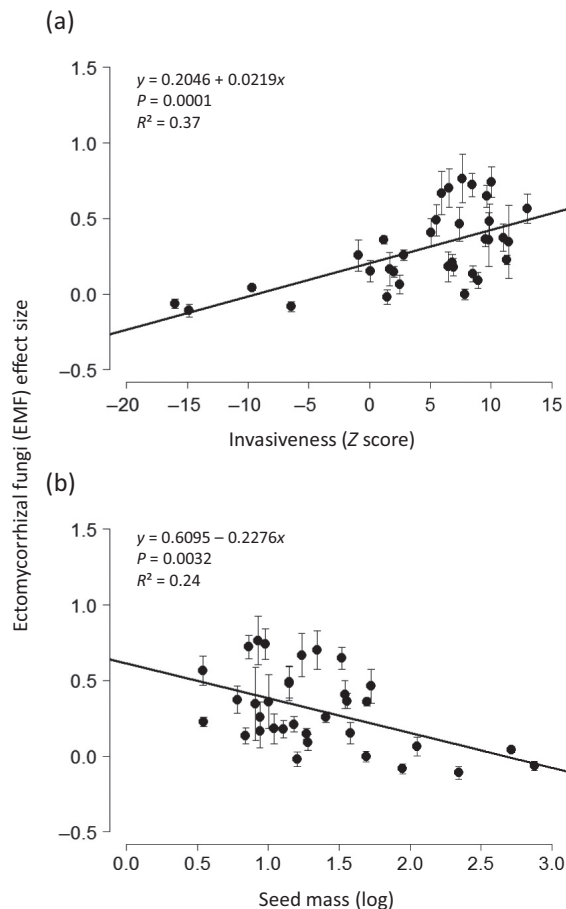


FIG. 1. (a) Linear regression among mean effect size (\pm SE) of ectomycorrhizal fungi (EMF) inoculation on seedling growth and species invasiveness (Z score) for 34 *Pinus* species. The higher the Z score, the more invasive a species is. Species with Z scores below zero are expected to be noninvasive. (b) Linear regression among mean effect size (\pm SE) of ectomycorrhizal fungi (EMF) inoculation on seedling growth and seed mass for 34 *Pinus* species. The lower the seed mass, the more invasive a species is. Each dot represents a different *Pinus* species.

on mutualistic partners. Ectomycorrhizal fungi (EMF) generated a bigger increase of seedling growth for *Pinus* species that are more invasive (higher *Z* score and lower seed mass). The interaction between plants and mycorrhizal fungi benefits the plants, in terms of increased water and nutrient absorption, but also has its costs, in terms of a proportion of carbon assimilation destined to the fungi and not to plant growth (Johnson et al. 1997, Johnson and Graham 2013). One possibility is that the balance between the benefits and costs of this mutualism differs between *Pinus* species differing in seed mass. Larger seeds tend to have higher levels of reserves and to produce larger seedlings, which usually have deeper roots, increasing water and nutrient absorption without the need of symbionts (Harper et al. 1970, Baker 1972, Buckley 1982, Gross 1984, Stock et al. 1990, Jakobsson and Eriksson 2000). As a consequence, these seedlings may be less limited by root absorption and less benefited by EMF. *Pinus* species are obligate mycorrhizal plants (Koole et al. 2012), and as such require associations with appropriate fungi to survive (Smith and Read 2008, Brundrett and Tedersoo 2018). However, our results suggest that big-seeded species may persist for long periods of time in areas with low mycorrhizal inoculum, because their seedlings may survive longer awaiting mycorrhizal fungi.

Relying more on EMF could be a mechanism that helps explain why small-seeded *Pinus* species are more invasive. Seed size is probably the trait with more evidence showing a correlation with plant invasiveness: smaller-seeded species are more invasive (Rejmánek 2000, Hamilton et al. 2005, Moravcová et al. 2010, Pyšek et al. 2015). According to the seed size–seed number trade-off, species may produce either many small seeds or a few large seeds (Jakobsson and Eriksson 2000, Henry and Westoby 2001, Moles and Westoby 2006). Species with small seeds tend to have higher fecundity (seeds produced per adult per year), part of a strategy aimed to produce enough propagules to ensure that at least some seeds will find suitable microsites for seedling growth (Jakobsson and Eriksson 2000). Smaller seeds tend to produce smaller seedlings, which are more susceptible to stressful conditions, such as low water availability and low nutrient levels (Baker 1972, Buckley 1982, Leishman and Westoby 1994, Moles and Westoby 2004). However, facilitated by the mutualism with EMF, these seedlings may be more capable to survive and grow under these stressful conditions (Rapparini and Peñuelas 2014). Thus, the strategy of producing more seeds and associating with EMF would promote the establishment of a higher number of seedlings than that of species that produce larger (and fewer) seeds.

The dispersal ability of a plant may also be related to its dependence on the mutualism with mycorrhizas. A recent meta-analysis showed that adaptations for long-distance dispersal are more frequent in mycorrhizal plants than in nonmycorrhizal plants (Correia et al. 2018). In our study, the dependence of *Pinus* species on

EMF showed a gradient, from highly dependent on EMF (small-seeded species with low seed wing loading) to low dependence (large-seeded species with high seed wing loading). This gradient may be associated with the dispersal ability of *Pinus* species differing in seed wing loading, where small-seeded species with relatively big seed wings disperse further, by means of wind, than large-seeded species with relatively small seed wings (Greene and Johnson 1993, Groom 2010, Zhu et al. 2015). The dispersal ability of different *Pinus* species may have an influence on their invasiveness, limiting the spread of large-seeded species with relatively small seed wings (Rejmánek 1996). For example, *Pinus pinea*, one of the species with the largest seed wing loading in the genus, was introduced in ~1,750 in South Africa but never became invasive (van Wilgen and Richardson 2012), possibly because seed dispersal was highly limited and seedlings were only found in the understory of plantations (van Wilgen and Siegfried 1986). Our study shows that species that spread further depend more on EMF. This is contrary to what we expected, because the availability of suitable mycorrhizal partners decreases with distance from the parent tree (Collier and Bidartondo 2009, Nuñez et al. 2009, Hayward et al. 2015, Horton 2017). However, where appropriate biotic vectors increase mycorrhizal dispersal, availability of EMF inoculum may not limit the distance for *Pinus* establishment (Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015). In this context, the positive association between seed dispersal and dependence on EMF may be advantageous for expanding the range of the plant population (Correia et al. 2018). Also, the ability to disperse further may reduce competition between seedlings and with the mother plant, increasing the probability of survival for each individual seedling, and therefore contributing to population growth (Law et al. 2003) and rapid expansion (Clark et al. 2001).

In accordance with previous studies, our results show that *Pinus* seedling growth response to EMF increased with experiment duration (Lekberg and Helgason 2018) and inoculation of multiple fungal species (Perry et al. 1989, Dalong et al. 2011). On the other hand, species mycorrhizal responsiveness decreased with soil fertilization (Browning and Whitney 1992, Diaz et al. 2010) and age of the seedlings when inoculated. We found no conclusive results regarding species responsiveness to EMF inoculation in the native range compared to the introduced range. In this regard, we found no evidence of reduced mycorrhizal dependence in *Pinus* introduced range (Pringle et al. 2009, Seifert et al. 2009).

Proxies for species invasiveness are very useful but none of them are expected to predict all successful and failed invasions. Many factors are involved in biological invasions, which make them extremely difficult to anticipate (van Kleunen et al. 2015, Seebens et al. 2016). In the case of *Pinus* some of the drivers of invasions are not related to species invasiveness, but to biogeographic or

human factors (Essl et al. 2010, McGregor et al. 2012). Nevertheless, invasive traits have shown to be good predictors of invasion success. For example, all *Pinus* species with positive *Z* score (i.e., classified as invasive) that have been introduced to new regions have become invasive outside their native range (Grotkopp et al. 2004). Further, according to a global database of invasive trees and shrubs, 90% of *Pinus* species that have become invasive around the world have been classified as invasive according to the *Z* score (Rejmánek and Richardson 2013). In addition, according to a recently compiled database of *Pinus* species naturalized occurrences, the *Z* score is highly and positively correlated with the number of sites where each species has become naturalized ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.38$) (Perret et al. 2019). However, some of the *Pinus* species regarded as noninvasive have not been widely introduced outside their native range (Essl et al. 2010, McGregor et al. 2012), which results in reduced number of opportunities for invasion (Lockwood et al. 2005). We acknowledge that this proxy of *Pinus* invasiveness is not a perfect predictor of invasion success, but we consider it a useful indicator of how likely it is that a species will become invasive when introduced to a new region.

Our results show that *Pinus* species that are more invasive respond more to the mutualism with EMF, and this pattern may remain consistent across other taxa. For instance, the same pattern of decreasing responsiveness to mycorrhizas with increasing seed mass was found for species belonging to many different plant families in a tropical forest (Janos 1980), for species of the Ericaceae family (Allsopp and Stock 1992), and for species of the Rosidae subclass (Allsopp and Stock 1995). On the other hand, Reinhart et al. (2017) found no evidence that plant invasiveness was associated with mycorrhizal responsiveness for the Poaceae and Asteraceae families. Further, the results we have shown here may have implications not only for the mutualism between plants and mycorrhizal fungi, but also for other types of mutualisms such as pollinators or seed dispersers. However, not all types of mutualisms will have the same impact on plant invasions (Richardson et al. 2000, Traveset and Richardson 2014). For example, many plants may survive and reproduce in the absence of their seed dispersers (although some plant species require that the seed pass through the gut of a seed disperser in order to germinate), whereas for many plants reproduction will be highly affected in the absence of pollinators, and most plants will not even survive without appropriate mycorrhizal fungi (with the exception of nonmycorrhizal and facultative mycorrhizal plants, which only represent ca. 15% of all land plants; Brundrett and Tedersoo 2018). Further research is needed to evaluate the relationship between plant invasiveness and dependence on pollinators and seed dispersers.

In conclusion, we presented clear evidence challenging the hypothesis that species with higher invasiveness depend less on mutualisms. On the contrary, we found

that species that are more invasive depend more on mutualisms. Our work highlights the importance of positive interactions (i.e., mutualisms) in explaining nonnative species success and spread. This result may help explain the high prevalence of mutualists such as mycorrhizal fungi on land plants where ca. 92% of all plants are associated with mycorrhizal fungi (Brundrett and Tedersoo 2018). Relying highly on mutualisms for the colonization of new areas clearly has associated costs, but these costs seem to be overwhelmed by the benefits obtained.

ACKNOWLEDGMENTS

Both MAN and MAR are senior authors on this publication. We thank Marcel Rejmánek, David M. Richardson, Daniel Simberloff, Francois Teste, and Rafael Zenni for their valuable comments on previous versions of this manuscript. We also appreciate the help from Guillermo Amico with statistical analyses. Finally, we are very thankful to the two reviewers whose suggestions have improved this manuscript substantially.

LITERATURE CITED

- Abouheif, E. 1999. A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative data. *Evolutionary Ecology Research* 1:895–909.
- Allsopp, N., and W. D. Stock. 1992. Mycorrhizas, seed size and seedling establishment in a low nutrient environment. Pages 59–64 in D. J. Read, D. H. Lewis, A. H. Fitter and I. J. Alexander, editors. *Mycorrhizas in ecosystem*. CAB, Wallingford, UK.
- Allsopp, N., and W. D. Stock. 1995. Relationships between seed reserves, seedling growth and mycorrhizal responses in 14 related shrubs (Rosidae) from a low-nutrient environment. *Functional Ecology* 9:248–254.
- Baker, H. G. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. Pages 147–172 in H. G. Burns and G. L. Stebbins, editors. *The genetics of colonizing species*. Academic Press, New York, New York, USA.
- Baker, H. G. 1972. Seed weight in relation to environmental conditions in California. *Ecology* 53:997–1010.
- Baskin, C. C., and J. M. Baskin. 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Elsevier, Berkeley, California, USA.
- Begg, C. B., and M. Mazumdar. 1994. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics* 50:1088–1101.
- Browning, M. H. R., and R. D. Whitney. 1992. The influence of phosphorus concentration and frequency of fertilization on ectomycorrhizal development in containerized black spruce and jack pine seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 22:1263–1270.
- Brundrett, M. C., and L. Tedersoo. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220:1108–1115.
- Buckley, R. 1982. Seed size and seedling establishment in tropical arid dunecrest plants. *Biotropica* 14:314–315.
- Burns, J. H., T.-L. Ashman, J. A. Steets, A. Harmon-Threatt, and T. M. Knight. 2011. A phylogenetically controlled analysis of the roles of reproductive traits in plant invasions. *Oecologia* 166:1009–1017.
- Chambers, J., T. Hastie, and D. Pregibon. 1990. Statistical models in S. Pages 317–321 in K. Momirović and V. Mildner, editors. *Compstat: proceedings in computational statistics*, 9th

- symposium held at Dubrovnik, Yugoslavia, 1990. Physica-Verlag HD, Heidelberg, Germany.
- Chaudhary, V. B., et al. 2016. MycoDB, a global database of plant response to mycorrhizal fungi. *Scientific Data* 3:160028.
- Clark, J. S., M. Lewis, and L. Horvath. 2001. Invasion by extremes: population spread with variation in dispersal and reproduction. *American Naturalist* 157:537–554.
- Collier, F. A., and M. I. Bidartondo. 2009. Waiting for fungi: the ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal of Ecology* 97:950–963.
- Committee-for-Compilation-of-Chinese-Tree-Species-Manuals. 1978. China's main tree species for afforestation techniques. China Forestry Publishing House, Beijing, China.
- Cook, R. D., and S. Weisberg. 1982. Residuals and influence in regression. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- Cornelissen, J., P. Castro-Diez, and A. Carnelli. 1998. Variation in relative growth rate among woody species. Pages 363–392 in H. Lambers, H. Poorter, and M. M. I. van Vuuren, editors. Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences. Backhuys, Leiden, Netherlands.
- Correia, M., R. Heleno, P. Vargas, and S. Rodríguez-Echeverría. 2018. Should I stay or should I go? Mycorrhizal plants are more likely to invest in long-distance seed dispersal than non-mycorrhizal plants. *Ecology Letters* 21:683–691.
- Dalong, M., W. Luhe, Y. Guoting, M. Liqiang, and L. Chun. 2011. Growth response of *Pinus densiflora* seedlings inoculated with three indigenous ectomycorrhizal fungi in combination. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:1197–1203.
- Diaz, G., C. Carrillo, and M. Honrubia. 2010. Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. *Annals of Forest Science* 67:405–405.
- Essl, F., D. Moser, S. Dullinger, T. Mang, and P. Hulme. 2010. Selection for commercial forestry determines global patterns of alien conifer invasions. *Diversity and Distributions* 16:911–921.
- Fenner, M., and K. Thompson. 2005. The ecology of seeds. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fox, J., and S. Weisberg. 2010. An R companion to applied regression. Sage Publishing, Thousand Oaks, California, USA.
- Gerdemann, J. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. Pages 575–591 in G. Torrey and D. Clarkson, editors. The development and function of roots. Academic Press, London, UK.
- Greene, D. F., and E. A. Johnson. 1993. Seed mass and dispersal capacity in wind-dispersed diaspores. *Oikos* 67:69–74.
- Groom, P. 2010. Implications of terminal velocity and wing loading on *Hakea* (Proteaceae) seed dispersal. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 93:175.
- Gross, K. L. 1984. Effects of seed size and growth form on seedling establishment of six monocarpic perennial plants. *Journal of Ecology* 72:369–387.
- Grotkopp, E., M. Rejmánek, and T. L. Rost. 2002. Toward a causal explanation of plant invasiveness: seedling growth and life-history strategies of 29 pine (*Pinus*) species. *American Naturalist* 159:396–419.
- Grotkopp, E., M. Rejmánek, M. J. Sanderson, T. L. Rost, and P. Soltis. 2004. Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses. *Evolution* 58:1705–1729.
- Hamilton, M. A., B. R. Murray, M. W. Cadotte, G. C. Hose, A. C. Baker, C. J. Harris, and D. Licari. 2005. Life-history correlates of plant invasiveness at regional and continental scales. *Ecology Letters* 8:1066–1074.
- Harper, J. L. 1977. Population biology of plants. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Harper, J. L., P. H. Lovell, and K. G. Moore. 1970. The shapes and sizes of seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1:327–356.
- Hayward, J., T. R. Horton, and M. A. Nuñez. 2015. Ectomycorrhizal fungal communities coinvasing with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytologist* 208:497–506.
- Henderson, L. 2007. Invasive, naturalized and casual alien plants in southern Africa: a summary based on the Southern African Plant Invaders Atlas (SAPIA). *Bothalia* 37:215–248.
- Henery, M. L., and M. Westoby. 2001. Seed mass and seed nutrient content as predictors of seed output variation between species. *Oikos* 92:479–490.
- Horton, T. R. 2017. Spore dispersal in ectomycorrhizal fungi at fine and regional scales. Pages 61–78 in L. Tedersoo, editor. Biogeography of mycorrhizal symbiosis. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Jakobsson, A., and O. Eriksson. 2000. A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. *Oikos* 88:494–502.
- Janos, D. P. 1980. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology* 61:151–162.
- Janos, D. P. 2007. Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* 17:75–91.
- Johnson, N. C., and J. H. Graham. 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant and Soil* 363:411–419.
- Johnson, N. C., J.-H. Graham, and F. A. Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575–585.
- Jombart, T., and S. Dray. 2008. adephylo: exploratory analyses for the phylogenetic comparative method.
- Karst, J., et al. 2018. Tree species with limited geographical ranges show extreme responses to ectomycorrhizas. *Global Ecology and Biogeography* 27:839–848.
- Koele, N., I. A. Dickie, J. Oleksyn, S. J. Richardson, and P. B. Reich. 2012. No globally consistent effect of ectomycorrhizal status on foliar traits. *New Phytologist* 196:845–852.
- Krugman, S. L., and J. L. Jenkinson. 2008. Pinaceae—Pine family. Pages 809–847 in F. T. Bonner and R. P. Karraft, editors. The woody plant seed manual. Agriculture handbook 727. U.S. Department of Agriculture Forest Service, Washington, D.C., USA.
- Law, R., D. J. Murrell, and U. Dieckmann. 2003. Population growth in space and time: spatial logistic equations. *Ecology* 84:252–262.
- Leishman, M. R., and M. Westoby. 1994. The role of seed size in seedling establishment in dry soil conditions—Experimental evidence from semi-arid species. *Journal of Ecology* 82:249–258.
- Lekberg, Y., and T. Helgason. 2018. In situ mycorrhizal function—knowledge gaps and future directions. *New Phytologist* 220:957–962.
- Lockwood, J. L., P. Cassey, and T. Blackburn. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 20:223–228.
- McGregor, K. F. 2012. Quantifying invasion risk: the genus *Pinus* as a model system. Lincoln University, Lincoln, New Zealand.
- McGregor, K. F., M. S. Watt, P. E. Hulme, and R. P. Duncan. 2012. What determines pine naturalization: species traits, climate suitability or forestry use? *Diversity and Distributions* 18:1013–1023.
- McKey, D., and S. Kaufmann. 1991. Naturalization of exotic *Ficus* species (Moraceae) in south Florida. Pages 221–236 in

- Proceedings of the symposium on exotic pest plants. Technical Report NPS/NREVER/NRTR-91/06. United States Department of Interior, National Park Service, Washington, D.C., USA.
- Menge, J. A., E. L. V. Johnson, and R. G. Platt. 1978. Mycorrhizal dependency of several *Citrus* cultivars under three nutrient regimes. *New Phytologist* 81:553–559.
- Mikola, P. 1970. Mycorrhizal inoculation in afforestation. *International Review of Forestry Research* 3:123–196.
- Moher, D., A. Liberati, J. Tetzlaff, and D. G. Altman. 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of Internal Medicine* 151:264–269.
- Moles, A. T., and M. Westoby. 2004. Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology* 92:372–383.
- Moles, A. T., and M. Westoby. 2006. Seed size and plant strategy across the whole life cycle. *Oikos* 113:91–105.
- Moora, M. 2014. Mycorrhizal traits and plant communities: perspectives for integration. *Journal of Vegetation Science* 25:1126–1132.
- Moravcová, L., P. Pyšek, V. Jarošík, V. Havlíčková, and P. Zákavský. 2010. Reproductive characteristics of neophytes in the Czech Republic: traits of invasive and non-invasive species. *Preslia* 82:365–390.
- Münkemüller, T., S. Lavergne, B. Bzeznik, S. Dray, T. Jombart, K. Schiffrers, and W. Thuiller. 2012. How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution* 3:743–756.
- Nadel, H., J. H. Frank, and R. Knight, Jr. 1992. Escapees and accomplices: the naturalization of exotic *Ficus* and their associated faunas in Florida. *The Florida Entomologist* 75:29–38.
- Novoa, A., J. Rodríguez, A. López-Nogueira, D. M. Richardson, and L. González. 2016. Seed characteristics in Cactaceae: Useful diagnostic features for screening species for invasiveness? *South African Journal of Botany* 105:61–65.
- Núñez, M. A., T. R. Horton, and D. Simberloff. 2009. Lack of belowground mutualisms hinders Pinaceae invasions. *Ecology* 90:2352–2359.
- Núñez, M. A., et al. 2017. Ecology and management of invasive Pinaceae around the world: progress and challenges. *Biological Invasions* 19:3099–3120.
- Núñez, M. A., J. Hayward, T. R. Horton, G. C. Amico, R. D. Dimarco, M. N. Barrios-García, and D. Simberloff. 2013. Exotic mammals disperse exotic fungi that promote invasion by exotic trees. *PLoS ONE* 8:e66832.
- Oduor, A. M. O., J. M. Gómez, M. B. Herrador, and F. Perfecti. 2015. Invasion of *Brassica nigra* in North America: distributions and origins of chloroplast DNA haplotypes suggest multiple introductions. *Biological Invasions* 17:2447–2459.
- Pavoine, S., S. Ollier, D. Pontier, and D. Chessel. 2008. Testing for phylogenetic signal in phenotypic traits: new matrices of phylogenetic proximities. *Theoretical Population Biology* 73:79–91.
- Perret, D. L., A. B. Leslie, and D. F. Sax. 2019. Naturalized distributions show that climatic disequilibrium is structured by niche size in pines (*Pinus* L.). *Global Ecology and Biogeography* 28:429–441.
- Perry, D. A., H. Margolis, C. Choquette, R. Molina, and J. M. Trappe. 1989. Ectomycorrhizal mediation of competition between coniferous tree species. *New Phytologist* 112:501–511.
- Plenchette, C., J. A. Fortin, and V. Furlan. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70:199–209.
- Pringle, A., J. D. Bever, M. Gardes, J. L. Parrent, M. C. Rillig, and J. N. Klironomos. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:699–715.
- Pyšek, P., et al. 2011. Successful invaders co-opt pollinators of native flora and accumulate insect pollinators with increasing residence time. *Ecological Monographs* 81:277–293.
- Pyšek, P., et al. 2015. Naturalization of central European plants in North America: species traits, habitats, propagule pressure, residence time. *Ecology* 96:762–774.
- Pyšek, P., and D. M. Richardson. 2007. Traits associated with invasiveness in alien plants: Where do we stand? Pages 97–125 in W. Nentwig, editor. *Biological invasions*. Springer Berlin, Germany.
- Quinn, G. P., and M. J. Keough. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.r-project.org
- Ramírez, W. 1988. *Ficus microcarpa* L., *F. benjamina* L. and other species introduced in the New World, their pollinators (Agaonidae) and other fig wasps. *Revista de Biología Tropical* 36:441–446.
- Rapparini, F., and J. Peñuelas. 2014. Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. Pages 21–42 in M. Miransari, editor. *Use of microbes for the alleviation of soil stresses*. Volume 1. Springer, New York, New York, USA.
- Razanajatovo, M., N. Maurel, W. Dawson, F. Essl, H. Kreft, J. Pergl, P. Pyšek, P. Weigelt, M. Winter, and M. van Kleunen. 2016. Plants capable of selfing are more likely to become naturalized. *Nature Communications* 7:13313.
- Reinhart, K. O., Y. Lekberg, J. Klironomos, and H. Maherali. 2017. Does responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi depend on plant invasive status? *Ecology and Evolution* 7:6482–6492.
- Rejmánek, M. 1996. A theory of seed plant invasiveness: The first sketch. *Biological Conservation* 78:171–181.
- Rejmánek, M. 2000. Invasive plants: approaches and predictions. *Austral Ecology* 25:497–506.
- Rejmánek, M., and D. M. Richardson. 1996. What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* 77:1655–1661.
- Rejmánek, M., and D. M. Richardson. 2013. Trees and shrubs as invasive alien species—2013 update of the global database. *Diversity and Distributions* 19:1093–1094.
- Rejmánek, M., D. M. Richardson, S. I. Higgins, M. J. Pitcairn, and E. Grotkopp. 2005. Ecology of invasive plants: state of the art. SCOPE—Scientific Committee on Problems of the Environment International Councils of Scientific Unions 63:104.
- Richardson, D. M. 2006. *Pinus*: a model group for unlocking the secrets of alien plant invasions? *Preslia* 78:375–388.
- Richardson, D. M., and M. Rejmánek. 2011. Trees and shrubs as invasive alien species—a global review. *Diversity and Distributions* 17:788–809.
- Richardson, D. M., N. Allsopp, C. M. D'Antonio, S. J. Milton, and M. Rejmanek. 2000. Plant invasions—the role of mutualisms. *Biological Reviews* 75:65–93.
- Richardson, D. M., R. M. Cowling, and D. C. Le Maitre. 1990. Assessing the risk of invasive success in *Pinus* and *Banksia* in South African mountain fynbos. *Journal of Vegetation Science* 1:629–642.
- Richardson, D. M., P. A. Williams, and R. J. Hobbs. 1994. Pine invasions in the southern hemisphere: determinants of spread and invadability. *Journal of Biogeography* 21:511–527.

- Rodger, J. G., M. van Kleunen, and S. D. Johnson. 2013. Pollinators, mates and Allee effects: the importance of self-pollination for fecundity in an invasive lily. *Functional Ecology* 27:1023–1033.
- Rohatgi, A. 2018. WebPlotDigitizer <https://automeris.io/WebPlotDigitizer>
- Seebens, H., N. Schwartz, P. J. Schupp, and B. Blasius. 2016. Predicting the spread of marine species introduced by global shipping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:5646–5651.
- Seifert, E. K., J. D. Bever, and J. L. Maron. 2009. Evidence for the evolution of reduced mycorrhizal dependence during plant invasion. *Ecology* 90:1055–1062.
- Simberloff, D., et al. 2010. Spread and impact of introduced conifers in South America: Lessons from other southern hemisphere regions. *Austral Ecology* 35:489–504.
- Smith, F. A., E. J. Grace, and S. E. Smith. 2009. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 182:347–358.
- Smith, S. E., and D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Third edition. Academic Press, London, UK.
- Steidinger, B. S., et al. 2019. Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature* 569:404–408.
- Stock, W. D., J. S. Pate, and J. Delfs. 1990. Influence of seed size and quality on seedling development under low nutrient conditions in five Australian and South African members of the proteaceae. *Journal of Ecology* 78:1005–1020.
- Tawarayama, K. 2003. Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* 49:655–668.
- Traveset, A., and D. M. Richardson. 2014. Mutualistic interactions and biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45:89–113.
- van Kleunen, M., W. Dawson, and N. Maurel. 2015. Characteristics of successful alien plants. *Molecular Ecology* 24:1954–1968.
- van Wilgen, B. W., and D. M. Richardson. 2012. Three centuries of managing introduced conifers in South Africa: Benefits, impacts, changing perceptions and conflict resolution. *Journal of Environmental Management* 106:56–68.
- van Wilgen, B. W., and W. R. Siegfried. 1986. Seed dispersal properties of three pine species as a determinant of invasive potential. *South African Journal of Botany* 52:546–548.
- Veresoglou, S. D., M. C. Rillig, and D. Johnson. 2018. Responsiveness of plants to mycorrhiza regulates coexistence. *Journal of Ecology* 106:1864–1875.
- Vogelsang, K. M., and J. D. Bever. 2009. Mycorrhizal densities decline in association with nonnative plants and contribute to plant invasion. *Ecology* 90:399–407.
- Vogelsang, K. M., J. D. Bever, M. Griswold, and P. A. Schultz. 2004. The use of mycorrhizal fungi in erosion control applications. Final report for Caltrans Contract 150. California Department of Transportation Contract, Sacramento, California, USA.
- Wilkinson, G. N., and C. E. Rogers. 1973. Symbolic description of factorial models for analysis of variance. *Journal of the Royal Statistical Society C* 22:392–399.
- Wood, J. R., I. A. Dickie, H. V. Moeller, D. A. Peltzer, K. I. Bonner, G. Rattray, and J. M. Wilmshurst. 2015. Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. *Journal of Ecology* 103:121–129.
- Yang, X., S. Li, B. Shen, Y. Wu, S. Sun, R. Liu, R. Zha, and S.-L. Li. 2018. Demographic strategies of a dominant tree species in response to logging in a degraded subtropical forest in Southeast China. *Annals of Forest Science* 75:84.
- Zhao, H., S. Peng, Z. Chen, Z. Wu, G. Zhou, X. Wang, and Z. Qiu. 2011. Abscisic acid in soil facilitates community succession in three forests in China. *Journal of Chemical Ecology* 37:785–793.
- Zhu, J., M. Liu, Z. Xin, Y. Zhao, and Z. Liu. 2015. Which factors have stronger explanatory power for primary wind dispersal distance of winged diaspores: the case of *Zygophyllum xanthoxylon* (Zygophyllaceae)? *Journal of Plant Ecology* 9:346–356.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ecy.2997/supinfo>

ECOGRAPHY

Research

Patterns of plant naturalization show that facultative mycorrhizal plants are more likely to succeed outside their native Eurasian ranges

Jaime Moyano, Ian A. Dickie, Mariano A. Rodriguez-Cabal and Martin A. Nuñez

J. Moyano (<https://orcid.org/0000-0002-7072-0527>) ✉ (mjaimo@agro.uba.ar), M. A. Rodriguez-Cabal (<https://orcid.org/0000-0002-2658-8178>) and M. A. Nuñez (<https://orcid.org/0000-0003-0324-5479>), Grupo de Ecología de Invasiones, INIBIOMA, CONICET, Univ. Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina. – I. A. Dickie (<https://orcid.org/0000-0002-2740-2128>), Bio-Protection Research Centre, School of Biological Sciences, Univ. of Canterbury, Christchurch, New Zealand. MARC also at: Rubenstein School of Environment and Natural Resources, Univ. of Vermont, Burlington, VT, USA.

Ecography

43: 648–659, 2020

doi: 10.1111/ecog.04877

Subject Editor: Bethany Bradley

Editor-in-Chief: Hanna Tuomisto

Accepted 8 January 2020



The naturalization of an introduced species is a key stage during the invasion process. Therefore, identifying the traits that favor the naturalization of non-native species can help understand why some species are more successful when introduced to new regions. The ability and the requirement of a plant species to form a mutualism with mycorrhizal fungi, together with the types of associations formed may play a central role in the naturalization success of different plant species. To test the relationship between plant naturalization success and their mycorrhizal associations we analysed a database composed of mycorrhizal status and type for 1981 species, covering 155 families and 822 genera of plants from Europe and Asia, and matched it with the most comprehensive database of naturalized alien species across the world (GloNAF). In mainland regions, we found that the number of naturalized regions was highest for facultative mycorrhizal, followed by obligate mycorrhizal and lowest for non-mycorrhizal plants, suggesting that the ability of forming mycorrhizas is an advantage for introduced plants. We considered the following mycorrhizal types: arbuscular, ectomycorrhizal, ericoid and orchid mycorrhizal plants. Further, dual mycorrhizal species were those that included observations of arbuscular mycorrhizas as well as observations of ectomycorrhizas. Naturalization success (based on the number of naturalized regions) was highest for arbuscular mycorrhizal and dual mycorrhizal plants, which may be related to the low host specificity of arbuscular mycorrhizal fungi and the consequent high availability of arbuscular mycorrhizal fungal partners. However, these patterns of naturalization success were erased in islands, suggesting that the ability to form mycorrhizas may not be an advantage for establishing self-sustaining populations in isolated regions. Taken together our results show that mycorrhizal status and type play a central role in the naturalization process of introduced plants in many regions, but that their effect is modulated by other factors.

Keywords: fungi, invasive plants, mutualism, mycorrhizal status, mycorrhizal type, plant establishment



www.ecography.org

Introduction

Understanding why some plant species are able to naturalize and become invasive while others fail is a fundamental question in ecology (van Kleunen et al. 2015). Of the total number of plant species introduced to a new region a small fraction becomes naturalized, and of these a small fraction becomes invasive (Williamson and Fitter 1996, Caley et al. 2008). Hence, the naturalization of a non-native species (i.e. when it establishes a self-sustainable population) is the first major filter in the invasion process of a species that has been introduced (Richardson et al. 2000a, b, Blackburn et al. 2011). Identifying the traits that favor naturalization success is key to understand why some plant species become invasive (Richardson and Pyšek 2012). It has been proposed that species that rely on mutualisms, such as on animal pollinators, are less likely to establish in new environments (Baker 1965, Baker 1974, Burns et al. 2011, Rodger et al. 2013, Razanajatovo et al. 2016). Another mutualism that could be vital during the naturalization stage of non-native plants is the mutualistic interaction between plants and mycorrhizal fungi (Smith and Read 2008, Richardson and Pyšek 2012, Dickie et al. 2017, Brundrett and Tedersoo 2018).

Plants vary widely in their associations with mycorrhizal fungi (i.e. the mycorrhizal status of a plant). Non-mycorrhizal plants do not associate with mycorrhizal fungi and, therefore, are completely independent of this mutualism. In contrast, functionally-obligate (hereafter 'obligate') mycorrhizal plants require associations with appropriate fungal partners to survive in natural ecosystems. Finally, facultative mycorrhizal plants form mycorrhizas but may, under some conditions, survive without mycorrhizas (Smith and Read 2008, Brundrett and Tedersoo 2018). Further, there are different types of mycorrhizas (i.e. mycorrhizal types): arbuscular mycorrhizas, ectomycorrhizas, orchid mycorrhizas and ericoid mycorrhizas (Brundrett 2009, Moora et al. 2011, van der Heijden et al. 2015, Brundrett and Tedersoo 2018). In addition, dual mycorrhizal plants are those that include individuals that associate with arbuscular mycorrhizal fungi, individuals that associate with ectomycorrhizal fungi, and individuals that associate with both (Harley and Smith 1983, Chilvers et al. 1987, Adjoud-Sadadou and Halli-Hargas 2017, Teste et al. 2019). When a plant species is introduced to a new region, its mycorrhizal type may affect the probability of finding suitable fungal partners (Nuñez and Dickie 2014).

Plants can naturalize in an introduced region without being limited by a lack of mycorrhizal fungi through different pathways (Nuñez and Dickie 2014). First, a plant may not depend on mycorrhizas by being a non-mycorrhizal or facultative mycorrhizal plant species (15% of all terrestrial plants) (Brundrett and Tedersoo 2018). Not depending on mycorrhizas makes it possible for these species to succeed in environments where they cannot find fungal partners (Nuñez and Dickie 2014). It has been proposed that in most situations mycorrhizal fungi are available and non-mycorrhizal

plants are in disadvantage compared with mycorrhizal species (Richardson et al. 2000a, b). However, in some contexts these mutualistic interactions may be disrupted by the lack of symbionts (Dickie et al. 2017), for example in isolated islands (Carlquist 1974, Trøjelsgaard et al. 2015). Further, non-mycorrhizal plants may have a competitive advantage in highly disturbed locations (Delavaux et al. 2019). On the other hand, facultative mycorrhizal plants can succeed both in the absence of mycorrhizal fungi and also when these symbionts are available (Smith and Read 2008), which may enable facultative mycorrhizal species to take advantage in a broader context. Plants can also form novel associations with mycorrhizal fungi, either native or non-native symbionts (Dickie et al. 2010), although this may be difficult to assess because the native distribution of most fungi is poorly known (Pringle and Vellinga 2006). Novel associations have been found for ectomycorrhizal *Eucalyptus* (Tedersoo et al. 2007), and for ectomycorrhizal Pinaceae (Bahram et al. 2013, Moeller et al. 2015). Forming novel associations may also be possible for arbuscular mycorrhizal plants, as their fungal partners are mainly not host-specific (van der Heijden et al. 2015).

Non-native plants may also form associations with familiar (cosmopolitan) symbionts. For example, more than 40% of arbuscular mycorrhizal fungi have been suggested to have such cross-continental distribution (Moora et al. 2011, Stürmer et al. 2018, but see Bruns and Taylor 2016). In addition, plants can co-invade with the mycorrhizal fungi from its native range (Dickie et al. 2010). Co-invasion seems the most likely for ectomycorrhizal and orchid mycorrhizal plants, whose fungal partners can be host-specific (van der Heijden et al. 2015, Dickie et al. 2017). The dispersal ability of fungi, which is highly variable among fungal species (Peay et al. 2012), is particularly important for the co-invasion pathway because plants will only establish in locations where their fungal partners have dispersed. In this regard, it may be that many ectomycorrhizal fungal species disperse more readily than arbuscular mycorrhizal fungi because they produce fruiting bodies (sporocarps) which enhance fungal spore dispersal (Tedersoo et al. 2010), especially when these sporocarps are eaten by biotic dispersers (Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015). The number of possibilities available to different plant species varies according to their mycorrhizal status and type. In this regard, plants that rely more on mycorrhizas and that form specific mutualistic interactions with their fungal partners may be more limited when introduced to a new region and probably less likely to naturalize (Nuñez and Dickie 2014).

In this study we test the relationship between plant naturalization success and mycorrhizal status and type. Specifically, we build and analyse a database on mycorrhizal status (non-mycorrhizal, obligate mycorrhizal and facultative mycorrhizal) and type (arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal, ericoid mycorrhizal, orchid mycorrhizal and dual mycorrhizal) for 1981 vascular plant species (covering 155 families and 822 genera) and match this record with data

on the most comprehensive database on naturalized alien plants (GloNAF) (van Kleunen et al. 2019). Since facultative mycorrhizal plants can succeed both in the absence of mycorrhizal fungi and also when these are available, we expect them to have higher naturalization success than obligate mycorrhizal and non-mycorrhizal species. Additionally, we ask whether mycorrhizal host specificity favors or hinders plant naturalization success. We predict that arbuscular mycorrhizal species, which are less host-specific (van der Heijden et al. 2015), have naturalized more than the other mycorrhizal types. Further, to assess the influence of land type on patterns of naturalization success we analyse our data for mainland regions and for island regions separately. We expect that on islands mycorrhizal plants will no longer have an advantage over non-mycorrhizal plants, due to the lower abundance of mycorrhizal plants and the lower availability of mycorrhizal fungi. Therefore, we expect that non-mycorrhizal plants will show higher naturalization success on islands.

Material and methods

Database

We compiled information on mycorrhizal status and mycorrhizal type from different sources: a database on mycorrhizal occurrence on vascular plant species across eastern Europe and north Asia (Akhmetzhanova et al. 2012), a database on mycorrhizal associations for plant species in central Europe (Hempel et al. 2013), a database on mycorrhizal associations for plants across Europe (Bueno et al. 2017) and a database on mycorrhizal occurrence on vascular plants from Europe and north Asia (Correia et al. 2018). We checked entries in several databases and their cited references to minimize errors. We included three mycorrhizal statuses: non-mycorrhizal, obligate mycorrhizal and facultative mycorrhizal. We classified each plant species into one mycorrhizal status according to observations of mycorrhizal associations (or the absence of mycorrhizal associations) directly on plant roots, at the individual plant level, following an approach repeatedly used in previous studies (Hempel et al. 2013, Bueno et al. 2017, Menzel et al. 2017, Correia et al. 2018). Non-mycorrhizal species were those that included only observations (on individual plants) of absence of mycorrhizal associations, and obligate mycorrhizal species were those that included only observations of mycorrhizal associations. Facultative species were those that included observations of mycorrhizal associations (either with arbuscular mycorrhizal or ectomycorrhizal fungi) as well as observations of absence of mycorrhizal associations. We considered a minimum of two independent observations for each mycorrhizal status (mycorrhizal associations and absence of mycorrhizal associations) to classify a species as facultative mycorrhizal in order to reduce the influence of observer errors. The number of species with observations of facultative ericoid mycorrhizal associations or facultative orchid mycorrhizal associations

was too low to consider them in our analyses. It is important to note that these three mycorrhizal categories only indicate observed root colonization status and do not include information about functionality, such as mycorrhizal dependence. There were some cases of conflicting databases, which were caused by Correia et al. (2018) not including facultative ectomycorrhizal and dual mycorrhizal categories. In this regard, Correia et al. (2018) considered as obligate ectomycorrhizal plants those with observations of this mycorrhizal type, without any regard on facultative ectomycorrhizal species (ectomycorrhizal–non-mycorrhizal) or dual mycorrhizal species (arbuscular–ectomycorrhizal). Therefore, we checked every plant species classified as obligate ectomycorrhizal according to Correia et al. (2018) in their original data source and in other mycorrhizal databases to evaluate if any plant species was originally classified as facultative ectomycorrhizal or as dual mycorrhizal.

We considered five mycorrhizal types within the obligate mycorrhizal status: arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal, ericoid mycorrhizal, orchid mycorrhizal and dual mycorrhizal (Smith and Read 2008, Moora 2014, Correia et al. 2018). Dual mycorrhizal species were those that included observations of arbuscular mycorrhizas as well as observations of ectomycorrhizas (at least two independent observations of each mycorrhizal type). The number of plant species with observations of dual mycorrhizal associations involving either ericoid or orchid mycorrhizal types was too low to consider them in our analyses. We standardized species names according to The Plant List (<www.theplantlist.org>) using the TPL function from the 'taxonstand' package (Cayuela et al. 2012) (Supplementary material Appendix 1 Table A1).

We use data on naturalization of vascular plant species from the GloNAF database ver. 1.2 (van Kleunen et al. 2019). The GloNAF database is the most comprehensive data source on naturalized vascular alien plant species. This database includes information of 13 939 taxa and 1029 regions, based on 210 data sources (van Kleunen et al. 2019). A region is defined here as the smallest geographic area for which a list of alien plant species is available. From the total number of regions a subset of 648 are considered as mainland regions and a subset of 381 as island regions. Both mainland and island regions vary widely in their surface area. Species names in the GloNAF database are already standardized according to The Plant List. We merged our database on mycorrhizal status and type with the GloNAF database. From the 3719 species in our mycorrhizal database 1981 were recorded as naturalized in at least one region according to the GloNAF database. For these 1981 species we calculated naturalization success as the number of regions where each species is reported to be naturalized. This would be an indicator of the tendency to spread, or invasiveness, of a plant species belonging to a particular group. We also calculated naturalization success as the area where each species is naturalized (adding up the areas of all the regions where the species is reported to be naturalized) to evaluate if we obtained the same patterns of naturalization success.

Statistical analyses

To test the relationship between plant naturalization success, and plant mycorrhizal status and type we used phylogenetic linear models. We fitted phylogenetic linear regressions using the 'phylolm' package (Ho and Ane 2014). Using phylogenetic regressions, we can run analyses accounting for phylogenetic relatedness between species to separate the effect of phylogeny from the effect of other predictive variables. To evaluate if patterns of naturalization success (as the number of naturalized regions) were affected by surface area differences among regions we repeated our analyses using the surface area where the species is naturalized. As predictive variables we used either mycorrhizal status or mycorrhizal type. We also included the number of references for each mycorrhizal status and type as a predictive variable to account for a possible bias in mycorrhizal databases. To evaluate if patterns of naturalization success differed between land types we repeated our analyses only considering mainland regions and only considering island regions. Finally, to test the effect of mycorrhizal status accounting for mycorrhizal type we used three different subsets of data: 1) arbuscular mycorrhizal plants, 2) ectomycorrhizal plants and 3) dual mycorrhizal plants. Within each subset we compared the naturalization success of obligate versus facultative mycorrhizal plants. In other words, we compared naturalization success (as the number of naturalized regions) of: 1) obligate arbuscular mycorrhizal plants versus facultative arbuscular mycorrhizal plants, 2) obligate ectomycorrhizal plants versus facultative ectomycorrhizal plants and 3) obligate dual mycorrhizal plants versus facultative dual mycorrhizal plants.

To fit these phylogenetic regressions we built a phylogenetic tree including the 1981 plant species included in both our mycorrhizal database and GloNAF database using a supertree for vascular plants constructed by Zanne et al. (2014), which was corrected and extended by Qian and Jin (2016). To build the phylogenetic tree we used the function 'S.PhyloMaker' implemented for the 'phytools' package (Revell 2012, Qian and Jin 2016). We tested for model assumptions and these were valid in all cases. We log transformed our response variable (either number of naturalized regions or naturalized area) to achieve normality, as recommended by Mundry (2014). We evaluated the homogeneity of variance for each model, checking that there was no clear pattern between model residuals and fitted values (Quinn and Keough 2002). In addition, none of the plant species in our dataset showed a Cook's distance over 1, which indicates the absence of influential cases (Cook and Weisberg 1982).

Mycorrhizal status datasets include errors at a rate estimated near 10% (Brundrett and Tedersoo 2018), which can have important implications for the results obtained from analyses based on such databases (Dickie et al. 2007). Of particular importance are biased sources of errors because these can have a strong influence on the results. One biased source of errors affecting classification of plant mycorrhizal status is the number of observations per plant species: plant species with more observations are more likely to be classified

as facultative mycorrhizal (Dickie et al. 2017). Facultative mycorrhizal plants can only be identified when the same plant species includes both observations of obligate mycorrhizal status and observations of non-mycorrhizal status (Smith and Read 2008). Therefore, plants with only one observation can only be obligate or non-mycorrhizal. On the other hand, plants with many observations are likely to be considered facultative mycorrhizal due to observation errors (Dickie et al. 2017). For example, an arbuscular mycorrhizal plant may be classified erroneously as non-mycorrhizal by a new observer and the probability of these errors increases with the number of observations.

Previous studies have either not corrected for errors, or have tested for sensitivity to errors by adding random noise to the final status assignment (Bueno et al. 2017). This approach fails to account for biases driven by increasing observation numbers. We suggest that directly including the number of references in statistical models is a robust approach to dealing with two sources of bias. To evaluate the presence of bias due to different number of observations per plant species in our database we fitted logistic regressions. We used the number of references (as proxy for number of observations) for each plant species as a predictive variable and the probability of being classified as facultative mycorrhizal as response variable. If the number of references increased the probability of being facultative we would have a biased source of errors. Moreover, plant species that have spread widely outside their native range would be more likely to be found in surveys and therefore would have more references. As a result, plant species that have spread more widely would be more likely to be classified as facultative mycorrhizal. To evaluate the effect of the number of references in the naturalization success (either the number of naturalized regions or the naturalized area) of plant species we directly included the number of references as a predictive variable in our phylogenetic linear regressions. Therefore, if we found that the number of references was a source of bias and that it affected the naturalization success of plants we could approach this issue by including the number of references as a predictive variable in our models. Then, the number of references for each plant species and the mycorrhizal status and type were the predictive variables, while the naturalization success was the response variable in our models. In this way we could evaluate the effect of mycorrhizal status and type, while accounting for the effect of number of references. We performed all analyses using R software ver. 3.5.1 (R Core Team).

Results

In our database the great majority of plant species formed mycorrhizas (80%), including 631 plant species (17%) classified as facultative mycorrhizal and 2358 plant species (63%) classified as obligate mycorrhizal. We classified 730 plant species (20%) as non-mycorrhizal (Supplementary material Appendix 1 Fig. A1a). The obligate mycorrhizal status included 1926 arbuscular mycorrhizal (82%), 250

ectomycorrhizal (11%), 92 orchid mycorrhizal (3%), 45 ericoid mycorrhizal (2%) and 45 dual mycorrhizal (2%) plant species (Supplementary material Appendix 1 Fig. A1b). The proportion of naturalized species that belong to each mycorrhizal status showed high variability among regions, from cases of 100% facultative mycorrhizal, to 100% obligate mycorrhizal and even a few cases where the only naturalized species were non-mycorrhizal (Fig. 1).

The proportion of plant species that have naturalized outside their native range varied greatly between different mycorrhizal statuses and types (Fig. 2). Regarding mycorrhizal status, 76% of facultative mycorrhizal, 52% of obligate mycorrhizal and 39% of non-mycorrhizal plants have become naturalized in at least one region (Fig. 2a). Regarding mycorrhizal type, 69% of dual mycorrhizal, 54% of arbuscular mycorrhizal, 45% of ectomycorrhizal, 38% of ericoid mycorrhizal and 16% of orchid mycorrhizal plants have become naturalized outside their native range (Fig. 2b). When considering mycorrhizal types within the facultative mycorrhizal status, 81% of facultative dual mycorrhizal species, 76% of facultative arbuscular mycorrhizal species and 64% of facultative ectomycorrhizal species have naturalized outside their native range (Fig. 2c).

According to the phylogenetic linear regressions (including the number of references per species as a predictive variable), the number of naturalized regions was highest for facultative mycorrhizal plants, 41% lower for obligate mycorrhizal plants ($p=0.0001$) and 45% lower for non-mycorrhizal plants ($p<0.0001$; Fig. 3a). When considering only mainland regions this pattern of naturalization success according to mycorrhizal status remained (Fig. 3b). However, when considering only island regions the differences between mycorrhizal statuses were reduced and only non-mycorrhizal plants showed lower naturalization success than facultative mycorrhizal plants (Fig. 3c). Regarding mycorrhizal type, the number of naturalized regions was highest for arbuscular mycorrhizal and dual mycorrhizal, and progressively lower for ectomycorrhizal, orchid mycorrhizal and finally ericoid mycorrhizal, in order (Fig. 4a). When considering only mainland regions this pattern of naturalization success according to mycorrhizal type remained (Fig. 4b). However, when considering only island regions we found no difference in the number of naturalized regions among mycorrhizal types (Fig. 4c). The probability that a plant species was classified as facultative mycorrhizal increased with the number of references per species ($p<0.0001$). Furthermore, a higher number of references per species was correlated with higher number of naturalized regions ($p=0.0024$; Table 1). Therefore, to account for both sources of bias we included the number of references per plant species in our regression models.

When comparing the naturalization success of obligate arbuscular mycorrhizal plants versus facultative arbuscular mycorrhizal plants, obligate ectomycorrhizal plants versus facultative ectomycorrhizal plants, and obligate dual mycorrhizal plants versus facultative dual mycorrhizal plants we found the following results: the number of naturalized

regions was 37% higher for facultative arbuscular mycorrhizal than for obligate arbuscular mycorrhizal plants ($p<0.0001$; Supplementary material Appendix 1 Fig. A2a), 56% higher for facultative ectomycorrhizal than for obligate ectomycorrhizal plants ($p=0.0238$; Supplementary material Appendix 1 Fig. A2b) and we found no difference between facultative dual mycorrhizal and obligate dual mycorrhizal plants ($p=0.6364$; Supplementary material Appendix 1 Fig. A2c). When considering only mainland regions these patterns of naturalization success (as the number of naturalized regions) remained constant. However, when considering only island regions we only found differences between facultative arbuscular mycorrhizal and obligate arbuscular mycorrhizal plants. We performed all the previous analyses using the naturalized area per plant species (calculated as the sum of the areas of the regions where the plant species was reported as naturalized) as response variable in our models and we found the same results as before (Supplementary material Appendix 1 Fig. A6–A8). Therefore, we can assume that the differences in the area of each region in our database is not introducing any bias into our results.

Discussion

Our results on this study show that plant naturalization success was affected by plant mycorrhizal status and type on mainland regions around the globe. Facultative mycorrhizal plants, which can grow without mycorrhizas but can also take advantage of this mutualism when their fungal partners are present (Smith and Read 2008, Moora 2014), were more successful outside their native range than both obligate mycorrhizal and non-mycorrhizal plant species. When compared within mycorrhizal types facultative mycorrhizal plants also showed higher naturalization success than obligate mycorrhizal plants (although not when comparing facultative dual with obligate dual mycorrhizal plants). Non-mycorrhizal plants showed the lowest naturalization success, which suggests that the ability of forming mycorrhizas is an advantage for introduced plants. However, other aspects of non-mycorrhizal plants, such as narrower ecological niches (Correia et al. 2018, Gerz et al. 2018), may be driving these results. Considering mycorrhizal types, naturalization success was highest for arbuscular mycorrhizal and dual mycorrhizal plants, as expected due to the lower host specificity of arbuscular mycorrhizal fungi (Smith and Read 2008, van der Heijden et al. 2015). On the other hand, these patterns of naturalization success were much less clear on island regions. A possible explanation is that isolated oceanic islands may lack mycorrhizal fungi due to dispersal limitations (Peay et al. 2012). Therefore, without their fungal partners, mycorrhizal plants may not have an advantage over non-mycorrhizal plants. Oceanic islands are also sites of high nutrient inputs via sea birds, which may reduce plant reliance on mycorrhizas (Otero et al. 2018).

Facultative mycorrhizal plants, that do not require mycorrhizal fungi, but have the capacity to form mycorrhizas

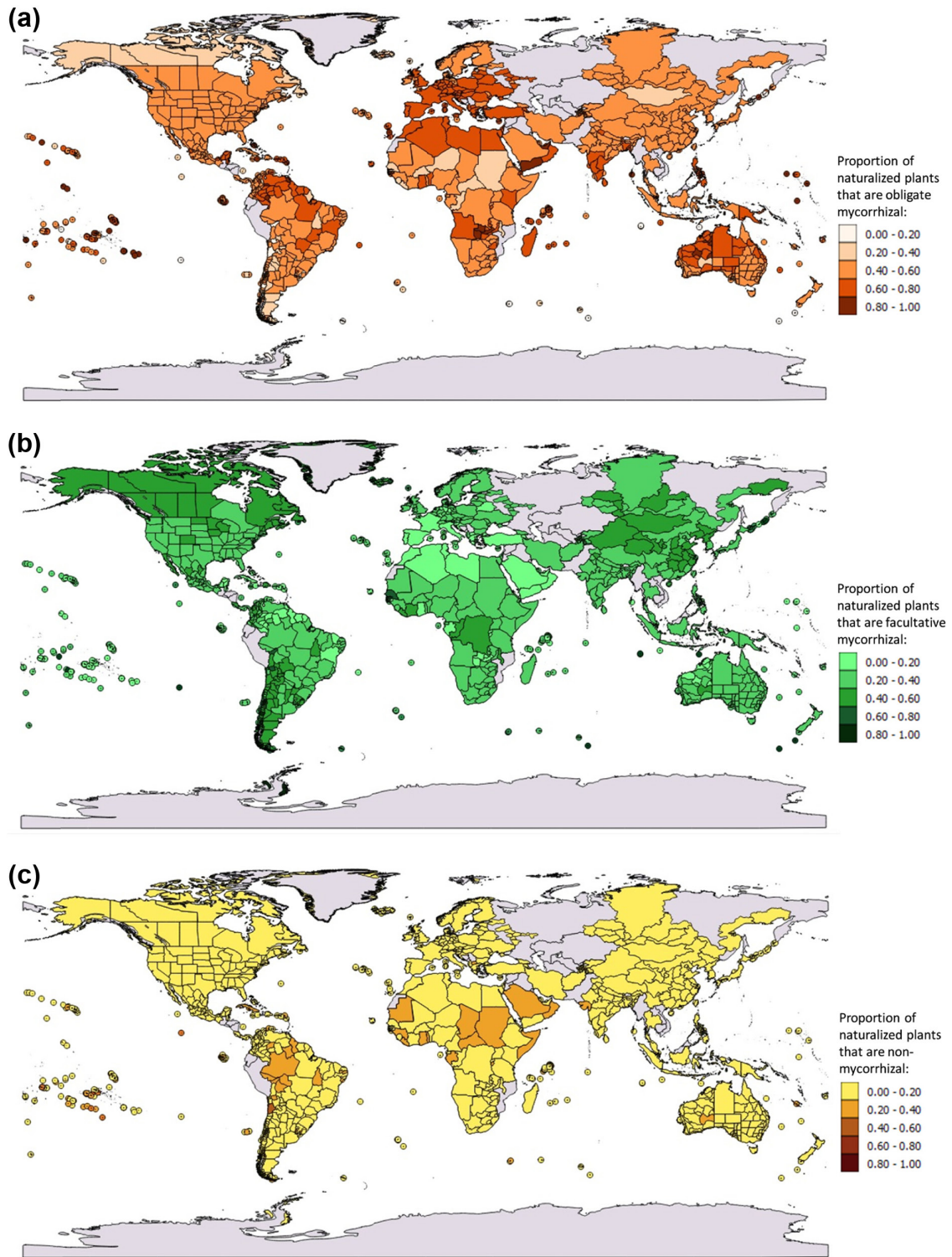


Figure 1. World map showing the proportion of naturalized species that are (a) obligate mycorrhizal, (b) facultative mycorrhizal and (c) non-mycorrhizal for all the regions included in our study. We colored each region according to a graded scale. In the case of small islands we used colored dots. Regions without data are grey.

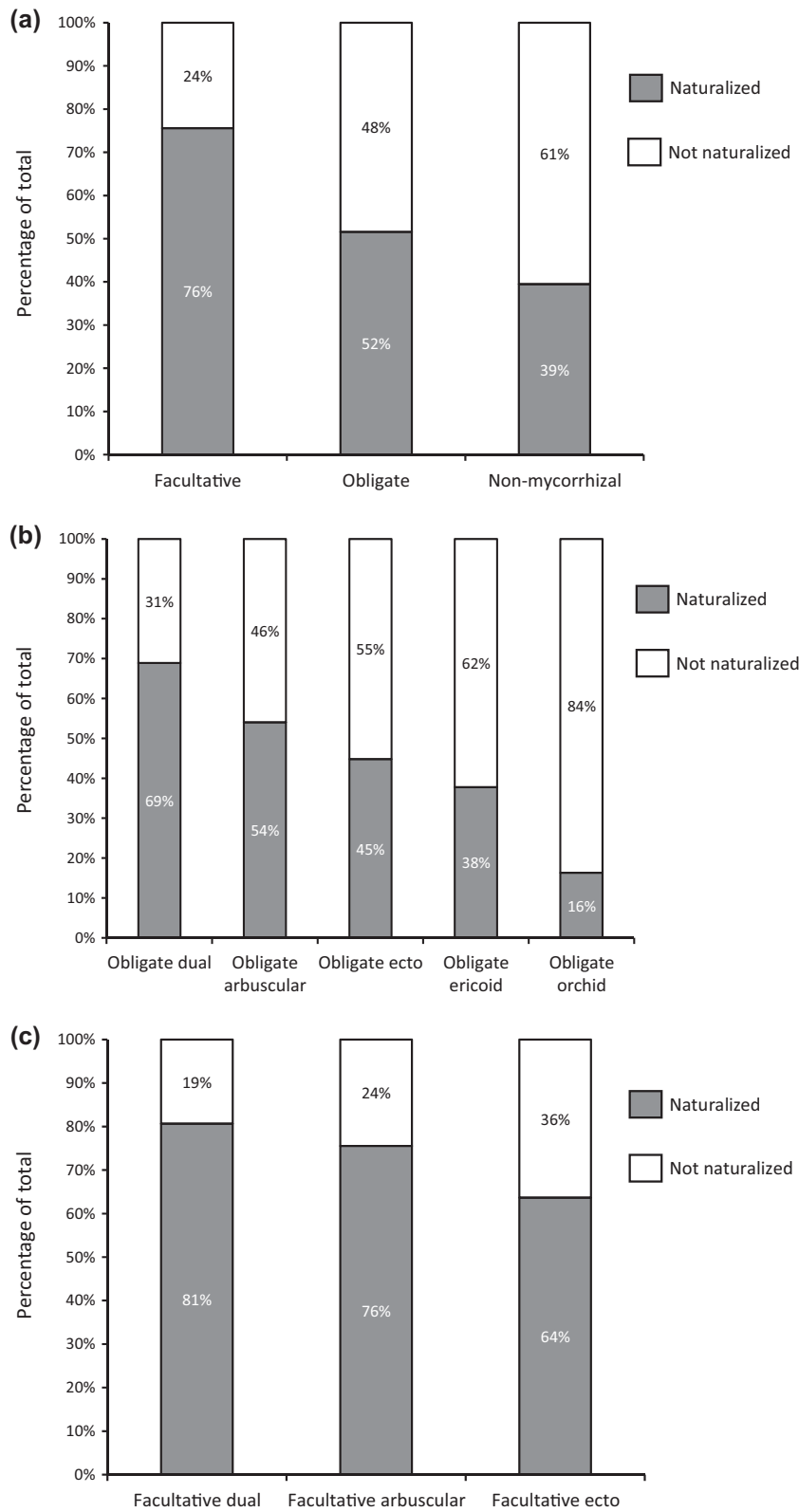


Figure 2. Percentage of species that have naturalized outside their native range and species that have not for each (a) mycorrhizal status: facultative mycorrhizal (n = 631), obligate mycorrhizal (n = 2358) and non-mycorrhizal (n = 730); (b) mycorrhizal types within the obligate mycorrhizal status: dual mycorrhizal (n = 45), arbuscular mycorrhizal (n = 1926), ectomycorrhizal (250), ericoid mycorrhizal (n = 45), orchid mycorrhizal (n = 92); and (c) mycorrhizal types within the facultative mycorrhizal status: dual mycorrhizal (n = 31), arbuscular mycorrhizal (n = 589) and ectomycorrhizal (n = 11).

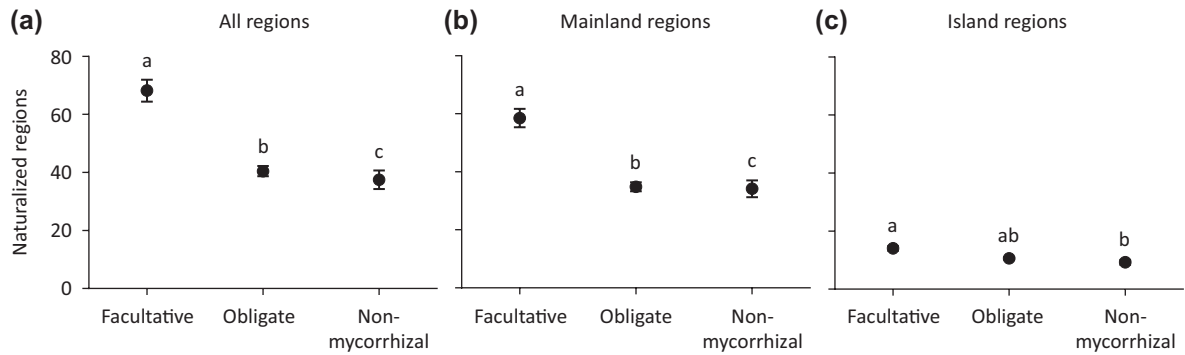


Figure 3. Mean number (\pm SE) of naturalized regions for plant species of different mycorrhizal status: facultative mycorrhizal, obligate mycorrhizal and non-mycorrhizal including (a) all regions, (b) mainland regions and (c) island regions. The letters indicate the results of comparisons using phylogenetic linear regressions. Same letters indicate values that are not significantly different after accounting for phylogenetic relatedness, the number of naturalized regions and the number of references for each species. Regression estimates (\pm 95% CI) from our phylogenetic linear models including mycorrhizal status as predictive variable are given in Supplementary material Appendix 1 Fig. A3.

(Smith and Read 2008, Moora 2014), were the most successful outside their native range for both mainland and island regions. The wide geographic and ecological range of facultative mycorrhizal plants when compared with other mycorrhizal statuses (Hempel et al. 2013, Gerz et al. 2018) might explain why plants belonging to this mycorrhizal status are so successful. Indeed a wide native range size is a plant trait that has been frequently associated with plant naturalization success (Hanspach et al. 2008, Bucharova and van Kleunen 2009, McGregor et al. 2012, Procheş et al. 2012, Moodley et al. 2013, Maurel et al. 2016, Razanajatovo et al. 2016). Our results are in accordance with a recent study that found that facultative mycorrhizal plants are the most successful invaders in Germany, when compared with other mycorrhizal statuses (Menzel et al. 2017). Facultative mycorrhizal plants may have the capacity to establish sustainable

populations (naturalization) in new regions without their fungal partners (Smith and Read 2008). Further research on population dynamics with or without mycorrhizal fungi is needed to evaluate the mechanisms behind the success of facultative mycorrhizal plants outside their native range.

The mycorrhizal status with lowest naturalization success in mainland regions was non-mycorrhizal plants. Prior studies, reviewed by Pringle et al. (2009), have shown that a high proportion of naturalized plants are non-mycorrhizal. However, at a global level mycorrhizal plants represent the majority (60%) of naturalized species in mainland regions (Delavaux et al. 2019). Accordingly, we found that mycorrhizal plants, both facultative and obligate, were more successful than non-mycorrhizal plants on mainland regions. The mutualism with mycorrhizal fungi brings important benefits to the host plants: better access to water (Augé 2001),

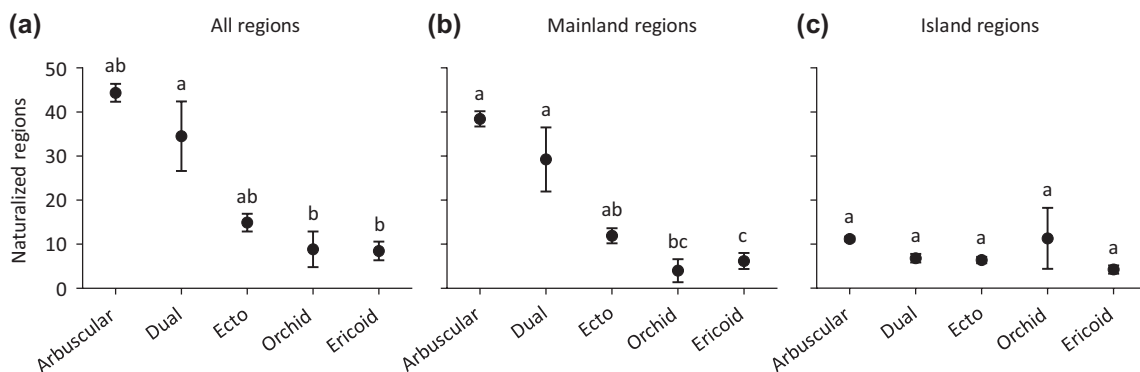


Figure 4. Mean number (\pm SE) of naturalized regions for plant species of different mycorrhizal types: arbuscular mycorrhizal, dual mycorrhizal, ectomycorrhizal, orchid mycorrhizal and ericoid mycorrhizal including (a) all regions, (b) mainland regions and (c) island regions. The letters indicate the results of comparisons using phylogenetic linear regressions. Same letters indicate values that are not significantly different after accounting for phylogenetic relatedness, the number of naturalized regions and the number of references for each species. There are no significant differences between ericoid mycorrhizal plants and the other mycorrhizal types because ericoid mycorrhizal species all belong to the same family. For groups of low genetic variability, such as ericoid mycorrhizal plants, our phylogenetic model is not able to separate the effect of mycorrhizal type from the effect of phylogenetic relatedness. Something similar happens with orchid mycorrhizal plants, which include only two plant families. Regression estimates (\pm 95% CI) from our phylogenetic linear models including mycorrhizal status as predictive variable are given in Supplementary material Appendix 1 Fig. A4.

Table 1. Parameters of the phylogenetic linear regression for number of naturalized regions according to mycorrhizal status (facultative, obligate and non-mycorrhizal), number of references and their interaction. Significant effects ($p < 0.05$) are shown in bold letters. For the predictive variable mycorrhizal status, which has three levels, the reference level is facultative mycorrhizal (and is included in the intercept of the model). The effect of the other two levels (obligate and non-mycorrhizal) are shown on the table.

Predictive variables	Estimate	SE	t	p
References	0.0294	0.0097	3.0366	0.0024
Status_Obligate	-0.4662	0.1213	-3.8438	0.0001
Status_Non-mycorrhizal	-1.1186	0.1881	-5.9463	< 0.0001
References × Status_Obligate	0.0015	0.0116	0.1278	0.8983
References × Status_Non-mycorrhizal	0.2018	0.0798	2.5287	0.0115

nutrients (Smith and Read 2008, Delavaux et al. 2017) and protection from pathogens (Veresoglou and Rillig 2012, Delavaux et al. 2017). In this regard, the ability to form mycorrhizal associations can expand the realized niche of the host plants (Bruno et al. 2003, Rodriguez-Cabal et al. 2012, Hempel et al. 2013, Gerz et al. 2018) which helps mycorrhizal plants to thrive and dominate in many different habitat types around the world (Brundrett and Tedersoo 2018). Accordingly, non-mycorrhizal plants have narrower ecological niches than mycorrhizal plants (Correia et al. 2018, Gerz et al. 2018) and are successful in limited habitat types, particularly aquatic, dry, cold, saline, nutrient poor or disturbed habitats (Peat and Fitter 1993, Miller 2005, Brundrett 2009, Lambers and Teste 2013, Gerz et al. 2016, Swaty et al. 2016, Soudzilovskaia et al. 2017). On the other hand, previous studies have found a lower proportion of native plants that are mycorrhizal in island regions (Koske et al. 1992, Hemmes and Desjardin 2008, Delavaux et al. 2019) suggesting a mycorrhizal filter produced by geographic isolation (Delavaux et al. 2019). However, regarding naturalized plant species on islands at a global scale, more than 65% are mycorrhizal, suggesting that the human induced increase of mycorrhizal fungi dispersal has removed this mycorrhizal filter on islands (Delavaux et al. 2019). In accordance, we found that, on islands, facultative mycorrhizal plants were more successful than non-mycorrhizal plants.

Obligate arbuscular mycorrhizal plants were less successful than facultative arbuscular mycorrhizal plants outside their native range, on both mainland and island regions. The advantage of facultative arbuscular mycorrhizal plants over obligate arbuscular mycorrhizal plants is that the first can succeed in the absence of mycorrhizal fungi (Smith and Read 2008). However, given the low endemism of arbuscular mycorrhizal fungi (Davison et al. 2015, but see Bruns and Taylor 2016) and their low host specificity (van der Heijden et al. 2015) we expected that introduced obligate arbuscular mycorrhizal plants would be as successful as facultative arbuscular mycorrhizal plants. Our results suggest that introduced facultative arbuscular mycorrhizal plants have higher naturalization success (as the number of naturalized regions) than obligate arbuscular mycorrhizal plants. This would contradict the idea that introduced obligate arbuscular mycorrhizal plants are not limited by their fungal partners because most arbuscular mycorrhizal fungi have a cosmopolitan distribution and low host specificity (Richardson et al. 2000a, b, Pringle et al. 2009, Davison et al. 2015). A possible explanation for this

pattern is that although there is no evidence of host specificity for arbuscular mycorrhizal fungi, there are many reports on arbuscular mycorrhizal fungi host preference and host selectivity (Sanders and Fitter 1992, Helgason et al. 1998, van der Heijden et al. 1998, Kiers et al. 2000, Klironomos 2000, Vandenkoornhuysen et al. 2003, Torrecillas et al. 2012) and many arbuscular mycorrhizal fungal species have restricted distributions (Bruns and Taylor 2016, Stürmer et al. 2018). We acknowledge that other traits, not considered in this study, are influencing the naturalization success of facultative and obligate arbuscular mycorrhizal plants (van Kleunen et al. 2007, Pyšek et al. 2015, Razanajatovo et al. 2016). Interestingly, we found no difference in the number of naturalized regions between facultative dual and obligate dual mycorrhizal plants. It may be that the flexibility of association with both arbuscular and ectomycorrhizal fungi gives dual mycorrhizal plants a significant advantage and the additional advantage of being facultative mycorrhizal has lower importance. For example, dual mycorrhizal plants can have higher nutrient uptake, and higher survival and growth when compared with obligate arbuscular or obligate ectomycorrhizal plants (Teste et al. 2019). Further, dual mycorrhizal plants may acquire the benefits from one mycorrhizal type in regions where fungal inoculum of the other mycorrhizal type is missing (Teste et al. 2019).

Dual mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal plants were among the most successful mycorrhizal types in establishing across multiple ranges in mainland regions, but we found no evidence that they were more successful than ectomycorrhizal plants after correcting for phylogenetic independence. We would have expected that the lower host-specificity and wider geographical distribution of arbuscular mycorrhizal fungi (Pringle et al. 2009, Tedersoo et al. 2012, Davison et al. 2015, but see Bruns and Taylor 2016) would favor their naturalization success (as the number of naturalized regions) over that of ectomycorrhizal species. However, the naturalization success of ectomycorrhizal plants was not significantly lower, according to our models. One possibility is that the high dispersal ability of ectomycorrhizal fungi (Peay et al. 2012) compensates for the possible limitations of their higher host specificity (van der Heijden et al. 2015). Another possibility is that the wider ecological niche of ectomycorrhizal species favors their naturalization success (Gerz et al. 2018). Further, it could be that there are differences in naturalization success which are accounted for by plant traits related to phylogeny. For example, the great majority of ectomycorrhizal plants are

woody species. The lack of differences in naturalization success between mycorrhizal types in island regions may reflect that the presence of mycorrhizal fungi is unreliable on isolated regions. Therefore, without their fungal partners, arbuscular and dual mycorrhizal plants may not have an advantage over other mycorrhizal types.

Ericoid and orchid mycorrhizal plants were always in the lowest end of naturalization success outside their native range in mainland regions. One possible explanation is that these mycorrhizal associations are less geographically distributed than ectomycorrhizal associations (Soudzilovskaia et al. 2017). As a consequence, the availability of appropriate fungal partners for ericoid and orchid mycorrhizal associations may be more restricted geographically. Another possibility is that a higher specificity in the associations between orchid mycorrhizal plants and their fungal partners limits their establishment in new environments (Pyšek 1998, Dickie et al. 2017). Further, both ericoid and orchid mycorrhizal plants may have not been introduced to new regions with the same intensity and at such large scales as arbuscular or ectomycorrhizal plants. This lower introduction effort would inevitably reduce their probability of naturalization (Lockwood et al. 2005). Nonetheless, as each of these types is phylogenetically constrained to a single group, we cannot rule out non-mycorrhizal explanations linked to phylogeny.

Our results show that in mainland regions the facultative mycorrhizal status is positively associated with naturalization success. Indeed, facultative mycorrhizal plants, which can live in the absence of their fungal partners but also have the ability to take advantage of these symbionts were the most successful in mainland regions outside their native range. However, on island regions differences in naturalization success of plants with different mycorrhizal status or mycorrhizal type were eroded, possibly because of the unreliable presence of mycorrhizal fungi on isolated islands. The patterns of naturalization success that we show here can help understand why some plant species become naturalized outside their native range while others fail.

Data availability statement

Data available from the Dryad Digital Repository: <<https://doi.org/10.5061/dryad.hdr7sqv>> (Moyano et al. 2020).

Acknowledgements – We thank the authors of the five different databases we used for our analyses, because they made their data publicly available. We also thank two anonymous reviewers for their valuable contributions to our work.

Funding – This research was supported by the National Agency of Scientific and Technologic Promotion (AGENCIA) grant ‘PICT 2014 no. 0662 PRESTAMO BID’.

Author contributions – JM conceived the idea and compiled the data. JM, ID and MN designed the methodology. JM and ID carried out the analyses. All authors participated in the discussion of the results. JM led the writing of the manuscript. ID, MN and MRC revised the manuscript and made comments to improve it.

All authors gave final approval for publication. MRC and MN are both senior authors.

Conflicts of interest – The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adjoud-Sadadou, D. and Halli-Hargas, R. 2017. Dual mycorrhizal symbiosis: an asset for eucalypts out of Australia? – *Can. J. For. Res.* 47: 500–505.
- Akhmetzhanova, A. A. et al. 2012. A rediscovered treasure: mycorrhizal intensity database for 3000 vascular plant species across the former Soviet Union. – *Ecology* 93: 689–690.
- Augé, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis. – *Mycorrhiza* 11: 3–42.
- Bahram, M. et al. 2013. Ectomycorrhizal fungi of exotic pine plantations in relation to native host trees in Iran: evidence of host range expansion by local symbionts to distantly related host taxa. – *Mycorrhiza* 23: 11–19.
- Baker, H. G. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. – Academic Press.
- Baker, H. G. 1974. The evolution of weeds. – *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 5: 1–24.
- Blackburn, T. M. et al. 2011. A proposed unified framework for biological invasions. – *Trends Ecol. Evol.* 26: 333–339.
- Brundrett, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. – *Plant Soil* 320: 37–77.
- Brundrett, M. C. and Tedersoo, L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. – *New Phytol.* 220: 1108–1115.
- Bruno, J. F. et al. 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. – *Trends Ecol. Evol.* 18: 119–125.
- Bruns, T. D. and Taylor, J. W. 2016. Comment on ‘Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism’. – *Science* 351: 826–826.
- Bucharova, A. and van Kleunen, M. 2009. Introduction history and species characteristics partly explain naturalization success of North American woody species in Europe. – *J. Ecol.* 97: 230–238.
- Bueno, C. G. et al. 2017. Plant mycorrhizal status, but not type, shifts with latitude and elevation in Europe. – *Global Ecol. Biogeogr.* 26: 690–699.
- Burns, J. H. et al. 2011. A phylogenetically controlled analysis of the roles of reproductive traits in plant invasions. – *Oecologia* 166: 1009–1017.
- Caley, P. et al. 2008. Estimating the invasion success of introduced plants. – *Divers. Distrib.* 14: 196–203.
- Carlquist, S. J. 1974. *Island biology*. – Columbia Univ. Press.
- Cayuela, L. et al. 2012. taxonstand: an R package for species names standardisation in vegetation databases. – *Methods Ecol. Evol.* 3: 1078–1083.
- Chilvers, G. A. et al. 1987. Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. – *New Phytol.* 107: 441–448.
- Cook, R. D. and Weisberg, S. 1982. Residuals and influence in regression. – Chapman and Hall.
- Correia, M. et al. 2018. Should I stay or should I go? Mycorrhizal plants are more likely to invest in long-distance seed dispersal than non-mycorrhizal plants. – *Ecol. Lett.* 21: 683–691.

- Davison, J. et al. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. – *Science* 349: 970–973.
- Delavaux, C. S. et al. 2017. Beyond nutrients: a meta-analysis of the diverse effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plants and soils. – *Ecology* 98: 2111–2119.
- Delavaux, C. S. et al. 2019. Mycorrhizal fungi influence global plant biogeography. – *Nat. Ecol. Evol.* 3: 424–429.
- Dickie, I. A. et al. 2007. On the perils of mycorrhizal status lists: the case of *Buddleja davidii*. – *Mycorrhiza* 17: 687–688.
- Dickie, I. A. et al. 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. – *New Phytol.* 187: 475–484.
- Dickie, I. A. et al. 2017. The emerging science of linked plant–fungal invasions. – *New Phytol.* 215: 1314–1332.
- Gerz, M. et al. 2016. Plant community mycorrhization in temperate forests and grasslands: relations with edaphic properties and plant diversity. – *J. Veg. Sci.* 27: 89–99.
- Gerz, M. et al. 2018. Niche differentiation and expansion of plant species are associated with mycorrhizal symbiosis. – *J. Ecol.* 106: 254–264.
- Hanspach, J. et al. 2008. Correlates of naturalization and occupancy of introduced ornamentals in Germany. – *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 10: 241–250.
- Harley, J. L. and Smith, S. E. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. – Academic Press.
- Helgason, T. et al. 1998. Ploughing up the wood-wide web? – *Nature* 394: 431.
- Hemmes, D. E. and Desjardin, D. E. 2008. Annotated list of Boletes and Amanita in the Hawaiian Islands. – *North Am. Fungi* 3: 167–176.
- Hempel, S. et al. 2013. Mycorrhizas in the central European flora: relationships with plant life history traits and ecology. – *Ecology* 94: 1389–1399.
- Ho, L. S. T. and Ane, C. 2014. A linear-time algorithm for Gaussian and non-Gaussian trait evolution models. – *Syst. Biol.* 63: 397–408.
- Kiers, E. T. et al. 2000. Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. – *Ecol. Lett.* 3: 106–113.
- Klironomos, J. 2000. Host-specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. – In: Bell, C. R. et al. (eds), *Proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology*, Atlantic Canada Society from Microbial Ecology, Halifax, pp. 845–851.
- Koske, R. E. et al. 1992. Mycorrhizae in Hawaiian angiosperms: a survey with implications for the origin of the native flora. – *Am. J. Bot.* 79: 853–862.
- Lambers, H. and Teste, F. P. 2013. Interactions between arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal plants: do non-mycorrhizal species at both extremes of nutrient availability play the same game? – *Plant Cell Environ.* 36: 1911–1915.
- Lockwood, J. L. et al. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. – *Trends Ecol. Evol.* 20: 223–228.
- Maurel, N. et al. 2016. Introduction bias affects relationships between the characteristics of ornamental alien plants and their naturalization success. – *Global Ecol. Biogeogr.* 25: 1500–1509.
- McGregor, K. F. et al. 2012. What determines pine naturalization: species traits, climate suitability or forestry use? – *Divers. Distrib.* 18: 1013–1023.
- Menzel, A. et al. 2017. Mycorrhizal status helps explain invasion success of alien plant species. – *Ecology* 98: 92–102.
- Miller, R. M. 2005. The nonmycorrhizal root: a strategy for survival in nutrient-impooverished soils. – *New Phytol.* 165: 655–658.
- Moeller, H. V. et al. 2015. Mycorrhizal co-invasion and novel interactions depend on neighborhood context. – *Ecology* 96: 2336–2347.
- Moodley, D. et al. 2013. Different traits determine introduction, naturalization and invasion success in woody plants: proteaceae as a test case. – *PLoS One* 8: e75078.
- Moorá, M. 2014. Mycorrhizal traits and plant communities: perspectives for integration. – *J. Veg. Sci.* 25: 1126–1132.
- Moorá, M. et al. 2011. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing. – *J. Biogeogr.* 38: 1305–1317.
- Moyano, J. et al. 2020. Data from: Patterns of plant naturalization show that facultative mycorrhizal plants are more likely to succeed outside their native Eurasian ranges. – Dryad Digital Repository, <<https://doi.org/10.5061/dryad.hdr7sqvvg>>.
- Mundry, R. 2014. Statistical issues and assumptions of phylogenetic generalized least squares. – In: Garamszegi, L. Z. (ed.), *Modern phylogenetic comparative methods and their application in evolutionary biology: concepts and practice*. Springer, pp. 131–153.
- Núñez, M. A. and Dickie, I. A. 2014. Invasive belowground mutualists of woody plants. – *Biol. Invas.* 16: 645–661.
- Núñez, M. A. et al. 2013. Exotic mammals disperse exotic fungi that promote invasion by exotic trees. – *PLoS One* 8: e66832.
- Otero, X. L. et al. 2018. Seabird colonies as important global drivers in the nitrogen and phosphorus cycles. – *Nat. Commun.* 9: 246.
- Peat, H. J. and Fitter, A. H. 1993. The distribution of arbuscular mycorrhizas in the British flora. – *New Phytol.* 125: 845–854.
- Peay, K. G. et al. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. – *Mol. Ecol.* 21: 4122–4136.
- Pringle, A. and Vellinga, E. C. 2006. Last chance to know? Using literature to explore the biogeography and invasion biology of the death cap mushroom *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.:Fr.) Link. – *Biol. Invas.* 8: 1131–1144.
- Pringle, A. et al. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. – *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 699–715.
- Procheş, Ş. et al. 2012. Native and naturalized range size in *Pinus*: relative importance of biogeography, introduction effort and species traits. – *Global Ecol. Biogeogr.* 21: 513–523.
- Pyšek, P. 1998. Is there a taxonomic pattern to plant invasions? – *Oikos* 82: 282–294.
- Pyšek, P. et al. 2015. Naturalization of central European plants in North America: species traits, habitats, propagule pressure, residence time. – *Ecology* 96: 762–774.
- Qian, H. and Jin, Y. 2016. An updated megaphylogeny of plants, a tool for generating plant phylogenies and an analysis of phylogenetic community structure. – *J. Plant Ecol.* 9: 233–239.
- Quinn, G. P. and Keough, M. J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. – Cambridge Univ. Press.
- Razanajatovo, M. et al. 2016. Plants capable of selfing are more likely to become naturalized. – *Nat. Commun.* 7: 13313.
- Revell, L. J. 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). – *Methods Ecol. Evol.* 3: 217–223.
- Richardson, D. M. and Pyšek, P. 2012. Naturalization of introduced plants: ecological drivers of biogeographical patterns. – *New Phytol.* 196: 383–396.
- Richardson, D. M. et al. 2000a. Plant invasions – the role of mutualisms. – *Biol. Rev.* 75: 65–93.

- Richardson, D. M. et al. 2000b. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. – *Divers. Distrib.* 6: 93–107.
- Rodger, J. G. et al. 2013. Pollinators, mates and Allee effects: the importance of self-pollination for fecundity in an invasive lily. – *Funct. Ecol.* 27: 1023–1033.
- Rodriguez-Cabal, M. A. et al. 2012. Positive interactions in ecology: filling the fundamental niche. – *Ecol. Evol. Biol.* 5: 37–41.
- Sanders, I. R. and Fitter, A. H. 1992. Evidence for differential responses between host–fungus combinations of vesicular–arbuscular mycorrhizas from a grassland. – *Mycol. Res.* 96: 415–419.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. – Academic Press.
- Soudzilovskaia, N. A. et al. 2017. Global patterns of mycorrhizal distribution and their environmental drivers. – In: Tedersoo, L. (ed.), *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Springer International Publishing, pp. 223–235.
- Stürmer, S. L. et al. 2018. Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): a phylogenetic perspective on species distribution patterns. – *Mycorrhiza* 28: 587–603.
- Swaty, R. et al. 2016. Mapping the potential mycorrhizal associations of the conterminous United States of America. – *Fungal Ecol.* 24: 139–147.
- Tedersoo, L. et al. 2007. Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from the native *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). – *New Phytol.* 175: 321–333.
- Tedersoo, L. et al. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution and evolution of phylogenetic lineages. – *Mycorrhiza* 20: 217–263.
- Tedersoo, L. et al. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. – *Mol. Ecol.* 21: 4160–4170.
- Teste, F. P. et al. 2019. Dual-mycorrhizal plants: their ecology and relevance. – *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.16190
- Torrecillas, E. et al. 2012. Host preferences of AM fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. – *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6180–6186.
- Trøjelsgaard, K. et al. 2015. Geographical variation in mutualistic networks: similarity, turnover and partner fidelity. – *Proc. R. Soc. B* 282: 20142925.
- van der Heijden, M. G. A. et al. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. – *Ecology* 79: 2082–2091.
- van der Heijden, M. G. A. et al. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present and the future. – *New Phytol.* 205: 1406–1423.
- van Kleunen, M. et al. 2007. Predicting naturalization of southern African Iridaceae in other regions. – *J. Appl. Ecol.* 44: 594–603.
- van Kleunen, M. et al. 2015. Characteristics of successful alien plants. – *Mol. Ecol.* 24: 1954–1968.
- van Kleunen, M. et al. 2019. The global naturalized alien flora (GloNAF) database. – *Ecology* 100: e02542.
- Vandenkoornhuyse, P. et al. 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. – *Mol. Ecol.* 12: 3085–3095.
- Veresoglou, S. D. and Rillig, M. C. 2012. Suppression of fungal and nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi. – *Biol. Lett.* 8: 214–217.
- Williamson, M. and Fitter, A. 1996. The varying success of invaders. – *Ecology* 77: 1661–1666.
- Wood, J. R. et al. 2015. Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. – *J. Ecol.* 103: 121–129.
- Zanne, A. E. et al. 2014. Three keys to the radiation of angiosperms into freezing environments. – *Nature* 506: 89–92.

Supplementary material (available online as Appendix ecog-04877 at <www.ecography.org/appendix/ecog-04877>). Appendix 1.