

LILLOA

VOLUMEN 62, SUPLEMENTO 2

Interacciones biológicas
en un mundo cambiante



Fundación Miguel Lillo
TUCUMÁN - ARGENTINA
— 2025 —



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Interacciones biológicas en un mundo cambiante

Biological Interactions in a Changing World

Catania, Myriam del Valle^{1,2*}; Marcelo D. Arana^{3,4,5}
Gerardo L. Robledo^{5,6,7,8}

¹ Instituto Criptogámico, Sección Micología, Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, San Miguel de Tucumán T4000JFE, Argentina.

² Directora de Lilloa. Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, San Miguel de Tucumán T4000JFE, Argentina.

³ Instituto Criptogámico, Sección Pteridología, Fundación Miguel Lillo. San Miguel de Tucumán, Argentina.

⁴ Grupo GIVE, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Instituto ICBA (UNRC-CONICET), Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

⁵ Editor Asociado de Lilloa. Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, San Miguel de Tucumán T4000JFE, Argentina.

⁶ Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, CeTBIO-Centro de Transferencia de Bioinsumos, Ing. Agr. Félix Aldo Marrone 746, CP 5000 Córdoba, Argentina.

⁷ CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina.

⁸ Fundación FungiCosmos, Córdoba, Argentina.

* Autor correspondiente: <mcatania@lilloa.org.ar>

Resumen

Las interacciones entre organismos son fundamentales para entender el funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas. Estas relaciones influyen en la productividad, la dinámica poblacional y la resiliencia ante perturbaciones. La biodiversidad no solo abarca la diversidad de especies, sino también sus interacciones, aún poco exploradas pero esenciales en tiempos de crisis ambiental. Ante este desafío, la revista Lilloa presenta el número especial Interacciones biológicas en un mundo cambiante, con estudios sobre relaciones entre plantas, hongos y algas en diversos contextos ecológicos y evolutivos. Se abordan simbiosis micorrízicas, interacciones planta-hongo, epibiosis, micofagia y redes tróficas en humedales urbanos, además de aportes taxonómicos y morfológicos sobre hongos poco conocidos. Este volumen enfatiza

► Ref. bibliográfica: Catania, M. del V.; Arana, M. D.; Robledo, G. L. 2025. Interacciones biológicas en un mundo cambiante. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 3-8. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2230>

► Recibido: 15 de junio 2025 – Aceptado: 25 de junio 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lilloa.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



la necesidad de integrar enfoques ecológicos, evolutivos, funcionales y aplicados para avanzar en el conocimiento de la intrincada red de interacciones biológicas. Las investigaciones reunidas reflejan el compromiso científico por comprender y conservar la complejidad biológica del planeta, promoviendo nuevas líneas de estudio frente a las crecientes amenazas ambientales.

Palabras clave: Biodiversidad; ecosistemas naturales e intervenidos; epibiosis, hongos liquenícolas, interacciones plantas hongo; micofagia; micorrizas; simbiosis.

Abstract

Interactions between organisms are fundamental to understanding the functioning and stability of ecosystems. These relationships influence productivity, population dynamics, and resilience to disturbances. Biodiversity encompasses not only the variety of species but also their interactions, which remain underexplored yet are essential in times of environmental crisis. In response to this challenge, the journal *Lilloa* presents the special issue *Biological Interactions in a Changing World*, featuring studies on relationships among plants, fungi, and algae across diverse ecological and evolutionary contexts. The issue explores mycorrhizal symbiosis, plant-fungus interactions, epibiosis, mycophagy, and trophic networks in urban wetlands, as well as taxonomic and morphological contributions on lesser-known fungi. This volume highlights the need to integrate ecological, evolutionary, functional, and applied approaches to advance our understanding of the intricate web of biological interactions. The collected research reflects the scientific community's commitment to comprehending and preserving the planet's biological complexity, while promoting new lines of study in the face of growing environmental threats.

Keywords: Biodiversity; epibiosis; fungal-plant interactions; lichenicolous fungi; mycophagy; mycorrhizas; natural and disturbed ecosystems; symbiosis.

Las comunidades biológicas comprenden complejas redes de organismos que interactúan entre sí y con su entorno, y forman parte intrínseca de todos los sistemas naturales. La biodiversidad global se conforma a partir de la combinación de cinco tipos clave de diversidad: taxonómica, funcional, filogenética, metabolómica (entendida como la variedad de procesos químicos en los que intervienen metabolitos dentro de los organismos biológicos) y la diversidad de las interacciones (Pugh y Field, 2022). Esta última fue definida inicialmente por Janzen (1974) y posteriormente ampliada por Thompson (1996) como el número de interacciones que conectan a las especies dentro de comunidades bióticas dinámicas (Dyer *et al.*, 2010).

Sin embargo, las especies de la biosfera terrestre, sus atributos, posiciones en el árbol de la vida e interrelaciones constituyen aún algunas de las grandes fronteras inexploradas de la ciencia. Pese a los avances en taxonomía, ecología y evolución, una parte sustancial de la biodiversidad mundial permanece desconocida, y, con ello, también la vasta red de interacciones bióticas que constituye la base del funcionamiento de los ecosistemas. Estas interacciones entre especies son importantes debido a que afectan a todos los atributos del ecosistema, desde la productividad primaria hasta la dinámica de poblaciones y la supervivencia y reproducción de los individuos (Dyer *et al.*, 2010). Sin embargo, existen pocos estudios centrados en cuantificar la diversidad de interacciones del mismo modo que se ha catalogado, cartografiado, destacado, y utilizado la diversidad de especies como variable de predicción o respuesta en los estudios ecológicos (Ollerton y Cranmer, 2002). Este desconocimiento se torna aún más crítico en un contexto de rápida y creciente pérdida de biodiversidad. Las tasas actuales de extinción son considerablemente más altas que los niveles estimados históricamente, y es esperable que esta tendencia continúe a medida que los ecosistemas sufren alteraciones crecientes producto de la deforestación, la contaminación y la introducción e invasión de especies exóticas. Se ha demostrado, además, que el cambio climático y la variabilidad climática influyen en la diversidad y las interacciones tróficas (Åkesson *et al.*, 2021). La ampliación de los estudios de estos fenómenos más allá de la diversidad y abundancia de especies mediante el examen de la diversidad de interacciones puede proporcionar una considerable comprensión, tanto de las consecuencias comunitarias del cambio climático, como de los mecanismos implicados (Spiller y Schoener, 2008; Fontúrbel *et al.*, 2021).

En este contexto, el estudio de las interacciones biológicas cobra una importancia fundamental para la comunidad científica, ya que estas relaciones conectan a los distintos componentes de los ecosistemas y determinan su equilibrio, su funcionamiento y su capacidad de recuperarse frente a cambios o perturbaciones. El conocimiento sobre interacciones biológicas es importante no solo para describir la biodiversidad, sino también para entender su dinámica y funcionamiento, tanto en ambientes naturales como modificados. Más aún, permite plantear posibles predicciones respecto a cómo responderán las comunidades biológicas a los cambios ambientales, lo cual es esencial para diseñar estrategias de conservación, restauración y manejo sostenible.

Frente a este escenario desde *Lilloa* hemos impulsado la convocatoria a un número especial titulado *Interacciones biológicas en un mundo cambiante*, con el objetivo de reunir trabajos que exploren las múltiples formas en que plantas, hongos y algas interactúan en diversos contextos ecológicos y evolutivos, tanto en ecosistemas naturales como en ambientes manejados por el ser humano.

Uno de los ejes centrales del presente volumen es el estudio de las **interacciones micorrízicas**, una forma de simbiosis ampliamente distribuida y fundamental para el crecimiento y la supervivencia de muchas especies de plantas. Este tipo de asociación representa un modelo paradigmático de interacción entre plantas y hongos, que ha sido determinante para la colonización terrestre y el éxito evolutivo de las plantas vasculares. Dentro de este eje, se incluyen estudios sobre comunidades **ectomicorrízicas** asociadas a especies forestales, tanto nativas como *Nothofagus* spp. y exóticas como *Pinus* spp., que aportan datos relevantes sobre la estructura, composición y respuesta frente a disturbios. Particularmente el fuego, que es un factor de perturbación creciente en los ecosistemas forestales del sur de Sudamérica, y cómo estas interacciones pueden favorecer el éxito de las especies nativas en la competencia por el establecimiento en ambientes alterados. Estas investigaciones revelan cómo las comunidades simbiotes responden a condiciones cambiantes, proporcionando indicios de su resiliencia y valor ecológico en contextos de restauración. Asimismo, se presentan trabajos sobre **micorrizas arbusculares**, otro tipo de simbiosis extendida en plantas herbáceas, arbustivas y leñosas, con especial atención a su diversidad funcional y ecológica en distintos sistemas, incluidos cultivos, bosques tropicales, subtropicales y suelos perturbados. Estas investigaciones documentan una notable variación en la composición y funcionalidad de las comunidades micorrízicas de acuerdo al hábitat de las plantas, lo que tiene implicancias directas en los procesos de restauración y su uso en prácticas agroecológicas. En este sentido, se presentan estudios aplicados que evalúan el uso de **hongos micorrízicos como biofertilizantes**, analizando sus ventajas y limitaciones en contextos agrícolas. Estos trabajos aportan una visión crítica y necesaria sobre la transferencia de conocimientos ecológicos al campo productivo, y resaltan la importancia de una aproximación integradora entre ciencia básica y tecnología agraria.

Otros artículos se enfocan en **interacciones planta-hongo** desde una perspectiva morfológica, funcional y simbiótica. Se analizan, por ejemplo, las interacciones de raíces de especies leñosas con hongos del género *Tuber* P. Micheli ex F.H. Wigg., aportando información detallada sobre los patrones de colonización, morfología de la simbiosis y los factores que determinan la especificidad en la asociación. También se exploran relaciones menos convencionales, como la que ocurre entre *Cladorrhinum samala* (Subram. & Lodha) W. Gams & Mouch., un hongo con potencial bioestimulante, y *Solanum lycopersicum* L. (tomate), una planta de importancia económica y nutricional. A su vez, se analiza la interacción entre levaduras y hongos micorrízicos en el contexto de cultivos de la mencionada especie de planta, destacando el posible rol en la promoción del crecimiento vegetal y la salud del suelo.

En una línea diferente, pero complementaria, algunos trabajos exploran **formas menos conocidas tradicionalmente de interacción biológica**, muchas veces insuficientemente tratadas o abordadas, como la **epibiosis**. Tal es el caso del estudio de comunidades de diatomeas epizoicas que colonizan la superficie de moluscos quitones y crustáceos decápodos, aportando evidencia sobre patrones de afinidad ecológica, colonización y posibles co-adaptaciones. Asimismo, se documenta el comportamiento micófago de animales, particularmente centrados en el consumo de macrohongos, tanto por parte de pequeños mamíferos en bosques ribereños como de tortugas terrestres, ambos en ambientes tropicales, una forma de interacción poco explorada pero potencialmente significativa en la dispersión de esporas y el mantenimiento de la diversidad fúngica.

También se presenta una contribución que examina **interacciones multitróficas en humedales artificiales urbanos**, en particular entre macrofitas del género *Chara* L., y comunidades de moluscos gasterópodos nativos y exóticos. Este tipo de estudio resulta valioso para comprender cómo las redes tróficas se reorganizan en ecosistemas intervenidos, y cómo ciertas asociaciones puede favorecer la estabilidad o, por el contrario, promover invasiones biológicas. Otra contribución destacada de este número especial es el **aporte taxonómico y morfológico** que realizan algunos trabajos centrados en hongos poco conocidos o de identificación compleja. Se destacan, en este sentido, las descripciones morfológicas y observaciones sobre *Neottiella ricciae* (P. Crouan & H. Crouan) Korf & W.Y. Zhuang, un hongo que crece sobre hepáticas, el conocimiento del género *Buelliella* Fink, que incluye la posición filogenética de algunas especies y la descripción de estados asexuales previamente no documentados, y el estudio sobre el mildiu polvoriento que afecta a especies de robles. Estos estudios contribuyen de manera directa al avance de la sistemática fúngica y refuerzan la base sobre la que se construyen futuros trabajos ecológicos de interacción y evolutivos.

Las contribuciones reunidas en este número de *Lilloa* documentan una amplia y variada gama de interacciones biológicas, tanto en ambientes prístinos como modificados, que reflejan el esfuerzo e interés de la comunidad científica por comprender la diversidad, complejidad y vulnerabilidad de nuestro mundo en constante transformación. Al integrar enfoques ecológicos, taxonómicos, morfológicos y aplicados, este volumen busca fomentar una colaboración interdisciplinaria y promover nuevas líneas de investigación que profundicen en el conocimiento de las redes biológicas que sustentan el funcionamiento de los ecosistemas. Avanzar en el estudio de las interacciones biológicas es una tarea impostergable en tiempos de crisis ecológicas y evolutivas. Esperamos que los artículos aquí presentados sirvan no solo como una muestra del estado actual del conocimiento en este campo, sino también como un estímulo para futuras investigaciones que, desde diversos enfoques, contribuyan a una comprensión más amplia, integrada y profunda de la vida en interacción.

BIBLIOGRAFÍA

- Åkesson, A., Curtsdotter, A., Eklöf, A., Ebenman, B., Norberg, J. y Barabás, G. (2021). The importance of species interactions in eco-evolutionary community dynamics under climate change. *Nature Communications* 12: 4759. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24977-x>
- Dyer, L. A., Walla, T. R., Greeney, H. F., Stireman III, J. O. y Hazen, R. F. (2010). Diversity of interactions: a metric for studies of biodiversity. *Biotropica* 42: 281-289. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2009.00624.x>
- Fontúrbel, F. E., Nespolo, R. F., Amico G. C. y Watson D. M. (2021). Climate change can disrupt ecological interactions in mysterious ways: Using ecological generalists to forecast community-wide effects. *Climate Change Ecology* 2: 100044. <https://doi.org/10.1016/j.ecochg.2021.100044>
- Janzen, D. H. (1974). The deflowering of central America. *Natural History* 83: 48-53.
- Ollerton, J. y Cranmer, L. (2002). Latitudinal trends in plant-pollinator interactions: Are tropical plants more specialized? *Oikos* 98: 340-350.
- Pugh, B. y Field, R. (2022). Biodiversity: The role of interaction diversity. *Current Biology* 32: R414-R432. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03>
- Spiller, D. A. y Schoener, T. W. (2008). Climatic control of trophic interaction strength: The effect of lizards on spiders. *Oecologia* 154: 763-771.
- Thompson, J. N. (1996). Evolutionary ecology and the conservation of biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 300-303.



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Notes on *Buelliella* (Dothideomycetes, Ascomycota): phylogenetic position of *B. lecanorae* and description of the asexual stage of *B. physciicola*

Notas sobre *Buelliella* (Dothideomycetes, Ascomycota): posición filogenética de *B. lecanorae* y descripción del estado asexual de *B. physciicola*

Suija, Ave^{1*}; Michael Haldeman²

¹ Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Juhan Liivi street 2, 50409 Tartu, Estonia.

² 1402, 23rd Street, Bellingham, Washington, U.S.A.

* Corresponding author: <ave.suija@ut.ee>

Abstract

The polyphyletic genus *Buelliella* includes lichen-inhabiting species that belong either to *Asterotexiales* or *Asterinales* in Dothideomycetes. In this paper, we provide phylogenetic information for one additional *Buelliella* species—*B. lecanorae*. In addition, we present a first description of an asexual stage in *Buelliella*—for *B. physciicola*—based on the matching of molecular data and host choice.

Keywords: Anamorph-teleomorph connection; *Epithamnolia*; fungal systematics; *Lecanora*; lichenicolous fungi; *Phaeophyscia*; *Physciaceae*.

Resumen

El género polifilético *Buelliella* incluye especies que habitan en líquenes y que pertenecen a *Asterotexiales* o *Asterinales* en Dothideomycetes. En este trabajo, proporcionamos información filogenética para una especie adicional de *Buelliella*: *B. lecanorae*. Se describe por primera vez el esta-

► Ref. bibliográfica: Suija, A.; Haldeman, M. 2025. Notes on *Buelliella* (Dothideomycetes, Ascomycota): phylogenetic position of *B. lecanorae* and description of the asexual stage of *B. physciicola*. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 9-20. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2047>

► Recibido: 31 de octubre 2024 – Aceptado: 10 de febrero 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



OPEN ACCESS

do asexual en *Buelliella*, para *B. physciicola*, basada en la concordancia de los datos moleculares y la elección del hospedador.

Palabras clave: Conexión anamorfo-teleomorfo; *Epithamnolia*; sistemática fúngica; *Lecanora*; hongos liquenícolas; *Phaeophyscia*; *Physciaceae*.

INTRODUCTION

Lichenicolous fungi represent a specialized group of parasitic, parasymbiotic and saprotrophic fungi that grow on the thalli or reproductive bodies of lichens (Diederich *et al.*, 2018). The genus *Buelliella* Fink ex Hafellner includes lichen-inhabiting fungi characterized by apothecioid ascomata that are initially closed, but opening irregularly in the centre when mature. They have bitunicate, 8-spored asci that are I– and K/I– and have a distinct ocular chamber. The ascospores are 1-septate, smooth, brown and slightly constricted near the septum (Hafellner, 1979; Ertz & Diederich, 2015). The genus includes 14 species (Index Fungorum: <https://www.indexfungorum.org>) accepted by Hafellner (1979) or described at a later date. Sequence data are available for three of them—*Buelliella physciicola* Poelt & Hafellner, *B. poetschii* Hafellner (Ertz & Diederich, 2015), and the type species *B. minimula* (Tuck.) Fink (Ertz *et al.*, 2016; Jüriado *et al.*, 2022). All molecular phylogenies that include sequences of *Buelliella* (Ertz & Diederich, 2015; Ertz *et al.*, 2016; Hongsanan *et al.*, 2020) show polyphyly of the genus within Dothideomycetes. Two species—*B. minimula* and *B. physciicola*—have been shown to belong to different clades within *Asterotexiales*, but *B. poetschii* belongs to *Asterinales*. Because of this distant phylogenetic position, Hongsanan *et al.* (2020) described the monotypic genus *Neobuelliella* Hongsanan & K.D. Hyde and family *Neobuelliellaceae* for the latter.

In this paper we have two goals. First, we provide phylogenetic information for an additional *Buelliella* species—*B. lecanorae* Suija & Alstrup—based on recently generated sequences. Second, we describe the asexual stage for *B. physciicola* based on observational and molecular data.

MATERIAL AND METHODS

Materials and microscopy

The study is based on fresh specimens of *Buelliella physciicola* and *B. lecanorae* collected by the authors and deposited in TUF (Table 1). For microscopic examination, freehand ascomata sections were mounted in tap water, in potassium hydroxide (KOH; K) c. 10% solution and in Congo red pre- and post-processed with K. All microscopic measurements were made in tap water and given as (minimum–) average $\pm$ standard deviation (–maximum)

Table 1. Sequenced specimens (lab ID, voucher ID, collector name and collector ID) and NCBI ID-s for sequenced DNA regions. – = no sequence generated.

Tabla 1. Especímenes secuenciados (ID de laboratorio, ID de voucher, nombre del recolector e ID del recolector) e ID-s del NCBI para las regiones de ADN secuenciadas. – = ninguna secuencia generada.

Taxon name	Lab ID	Voucher	Collector / Country	nuLSU	nuITS	mtSSU
[<i>Buelliella</i>] <i>lecanorae</i>	AS952	TUF091928	Suija / Estonia	PQ847482	PQ847876	PQ847484
[<i>Buelliella</i>] <i>physciicola</i>	AS804	TUF091855	Haldeman 3752 / U.S.A.	–	PQ847874	–
[<i>Buelliella</i>] <i>physciicola</i>	HA512	TUF095350	Haldeman 3735 / U.S.A.	PQ847481	PQ847873	–
[<i>Buelliella</i>] <i>physciicola</i>	AS093	TUF095223	Haldeman 5246 / U.S.A.	PQ847483	PQ847875	–

and followed by the number of measurements (n). Microscopy was done using a Leica M205 A stereomicroscope and a Nikon 80i light microscope. Microscopic structures were measured and photographed using NIS-Elements ver. 5.20.00 imaging software.

DNA extraction, PCR amplification, DNA sequencing and analyses of sequences

DNA extraction and amplification were carried out at Tartu University (TU). For DNA extraction, we removed ascomata or conidiomata from the lichen thallus and placed them into a 1.5 mL test tube. DNA extraction was carried out using High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science®) and following the protocol provided by the manufacturer.

We amplified two nuclear (internal transcribed spacer [nuITS] and large subunit [nuLSU]) ribosomal DNA regions, and for *Buelliella lecanorae* also mitochondrial small subunit (mtSSU) ribosomal DNA region. To amplify these loci, we used the primer pairs: ITS0F / LA-W (Tederloo *et al.*, 2008), LR0R / LR7 (Vilgalys & Hester, 1990), and mrSSU1 / mrSSU3r (Zoller *et al.*, 1999), respectively. The details of PCR amplification, DNA purification and sequencing are given e.g. in Suija *et al.* (2018). Both DNA strands were Sanger sequenced in Macrogen Inc. (Amsterdam, the Netherlands). The extracted DNA samples are kept in the DNA and Environmental Sample Collection of the Natural History Museum in Tartu University (TUE).

CodonCode Aligner ver. 8.0.2 (CodonCode Corporation®, Centerville, MA, U.S.A.) was used to check, assemble, and manually adjust the resulting sequence fragments. To avoid misidentifications, we compared consensus sequences with those available in the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using mainly the ‘megablast’ algorithm (Altschul *et al.*, 1990). After checking, the new sequences were submitted to NCBI (Table 1) and UNITE (Abarenkov *et al.*, 2023) data repositories.

We compiled and analysed both nuLSU and mtSSU datasets, but the phylogeny presented is based only on the nuLSU marker because of the larger taxon selection. The taxon compilation is based mainly on that of Ertz *et al.* (2016) including lichenicolous genera *Hemigrapha*, *Karschia*, *Labrocarpon*, *Neobuelliella* and *Taeniolella*, all belonging to *Asterinales* and *Asterotexiales*. *Capnodium coffeae* (*Capnodiales*), *Dothidea insculpta* (*Dothideales*) and *Preussia terricola* (*Pleosporales*) were incorporated to root the tree. The final nuLSU dataset contained 66 taxa, and was aligned using the online version of MAFFT ver. 7 (Katoh *et al.*, 2019; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) applying L-INS-i (Katoh *et al.*, 2005) as an iterative refinement method. The online version of Gblocks ver. 0.91b (Talavera & Castresana, 2007) run at http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html was used to eliminate poorly aligned positions and divergent regions of the alignment but allowing gap positions within the final blocks. The original alignment contained 1915 nucleotide positions, but after applying Gblocks, the resulting alignment contained 786 sites, of them 412 constant (= 52.4% of all sites) and 273 parsimony informative sites (PIC; = 34.7%).

We used the online version of IQTree ver. 1.6.12. (Nguyen *et al.*, 2015) for reconstruction of the phylogeny. The best-fit nucleotide substitution model selected according to AIC criterion was TIM2+F+I+G4. To estimate branch support, we used ultrafast bootstrapping (Hoang *et al.*, 2018) with 1000 iterations. The log-likelihood of the consensus tree was: -7950.529669. In parallel, we calculated Bayesian based phylogeny implemented in MrBayes ver. 3.2.7. (Ronquist *et al.*, 2012). TIM + I + G was selected as the nucleotide substitution model according to the lowest AIC value. The settings of the Bayesian were as follows: two parallel, simultaneous runs with four incrementally heated chains starting with a random tree; ngen = 700,000 generations, samplefreq and printfreq = 500, diagnfreq = 2000. The mcmc analysis was run until the average standard deviation of split frequencies (SDSF) was 0.01, and the potential scale reduction factor (PSRF) was close to 1 indicating convergence of the chains. The first 25% was discarded as 'burn-in' and a consensus tree and posterior probabilities (PP) were calculated from the remaining tree distribution. The phylogenetic tree was visualised and edited using FigTree ver. 1.4.4 (Rambaut, 2018) and post-processed with Adobe Illustrator CS3® ver. 13.0.0.

RESULTS

Eight sequences (3 nuLSU, 4 nuITS and 1 mtSSU) were generated for this study (Table 1), but only nuLSU sequences were used to generate the phylogeny because here the number of reference sequences was the largest. The phylogeny agrees with that of Ertz and Diederich (2015) and Ertz *et al.* (2016) showing polyphyly of *Buelliella* and other lichenicolous genera

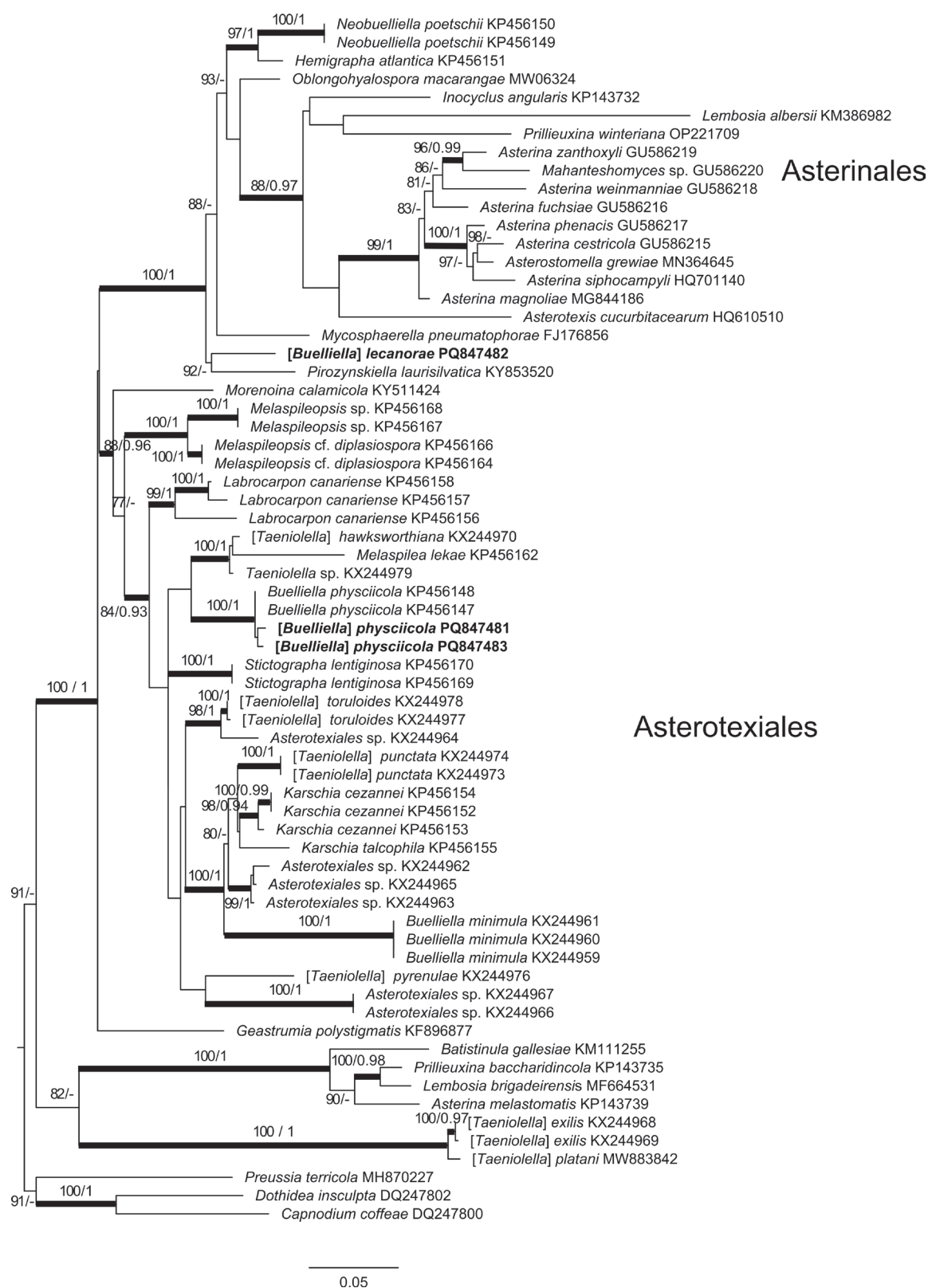


Fig. 1. The nuLSU based ML phylogeny showing position of lichenicolous *Asterinales* and *Asterotexiales* (Dothideomycetes), including newly sequenced *Buelliella lecanorae* and *B. physciicola* (both asexual and sexual stage). New sequences are marked in bold. The clades with bootstrap support (BS) higher than 75 and Bayesian posterior probabilities

► (PP) higher than 0.93, indicated above the branch and separated by slash, are considered as supported. Thicker lines show support based on both analyses. NCBI accession codes are at the tips of the tree. The scale bar is proportional to the substitution rate.

Fig. 1. La filogenia ML basada en nuLSU muestra la posición de los líquenícolas *Asterinales* y *Asterotexiales* (Dothideomycetes), incluyendo las nuevas secuencias de *Buelliella lecanorae* y *B. physciicola* (tanto en estado asexual como sexual). Las nuevas secuencias están marcadas en negrita. Los clados con un soporte bootstrap (BS) superior a 75 y probabilidades posteriores bayesianas (PP) superiores a 0,93, indicados sobre el clado y separados por una barra oblicua, se consideran soportados. Las líneas más gruesas muestran el soporte basado en ambos análisis. Los códigos de acceso NCBI están en los extremos del árbol. La barra de escala es proporcional a la tasa de sustitución.

in *Asterinales* and *Asterotexiales* (Dothideomycetes) (Fig. 1). According to the phylogeny, *Buelliella physciicola* and *B. minimula* belong to *Asterotexiales* while *B. lecanorae* comes under *Asterinales* and is sister to the saprophytic hyphomycete *Pirozynskiella laurisilvatica* Hern.-Restr., R.F. Castañeda & Gené (BP = 92; PP = 0.78). *Neobuelliella poetschii* and other lichenicolous species in *Asterinales* are only distantly related to it.

The North American and European specimens of *B. physciicola* form a well-supported clade (BP = 100, PP = 1), that is sister to a clade consisting of two *Taeniolella* species and *Melaspilea lekae* Brackel & Kalb (Fig. 1). The nuLSU sequences of *B. physciicola* specimens from different regions are not one-by-one identical, but there are five parsimony informative sites (0.5 % of 1293 sites; Table 2). There are no nuITS sequences available for European specimens to evaluate the variation in a less-conservative gene locus. Two of the North American specimens (TUF091855 / Haldeman 3752 and TUF095223 / Haldeman 5246) have ascomata, while the third specimen (TUF095350 / Haldeman 3735) has sporodochia superficially resembling *Epithamnolia* (Suija *et al.*, 2018). The comparison of DNA sequences (nuLSU and nuITS) leaves, however, no doubt that this fungus is the asexual stage of *B. physciicola*. The number of variable sites in the alignment of three nuITS sequences is 11 (1.3% of 823 bp). Herewith, we amend the description of *B. physciicola*.

Table 2. Distribution of polymorphisms in nuLSU sequences in European and North American specimens of *Buelliella physciicola*.

Tabla 2. Distribución de polimorfismos en las secuencias nuLSU de especímenes europeos y norteamericanos de *Buelliella physciicola*.

Sequence	Country	Position in the nuLSU alignment				
		59	926	927	946	1006
KP456148	Belgium	C	T	C	G	C
KP456147	Belgium	C	T	C	G	C
PQ847483	U.S.A.	T	C	T	A	T
PQ847481	U.S.A.	T	C	T	A	T

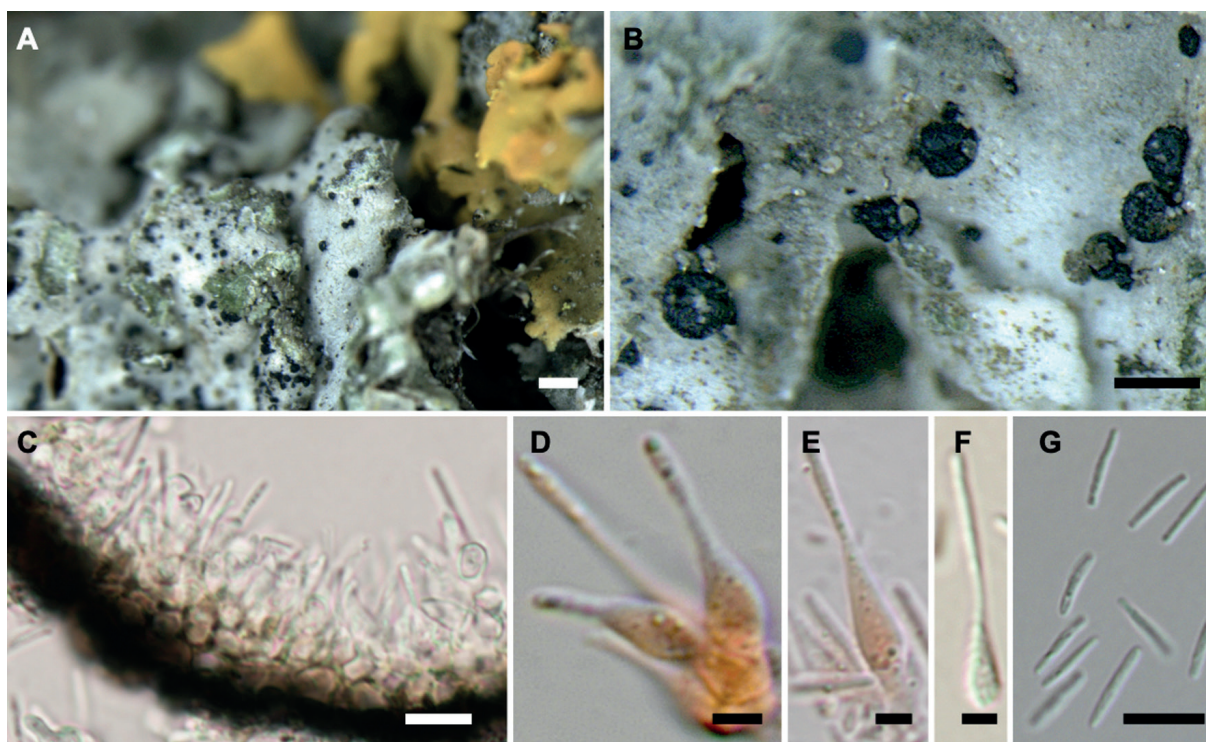


Fig. 2. Asexual stage of *Buelliella physciicola* (Haldeman 3735; TUF095350). A-B) Sporodochia on the thallus of *Phaeophyscia orbicularis*. C) Detail of the conidioma (cross section), conidiogenous cells lining the wall. D-F) Conidiogenous cells with conidia. G) Conidia. Scales: A = 0.5 mm, B = 0.1 mm, C = 5 μm , D, E, F = 2 μm ; G = 10 μm . C, F and G in water, D and E in Congo red pre- and post-treated with KOH, respectively.

Fig. 2. Estado asexual de *Buelliella physciicola* (Haldeman 3735; TUF095350). A-B) Esporodocios en el talo de *Phaeophyscia orbicularis*. C) Detalle del conidioma (corte transversal), células conidiógenas recubriendo la pared. D-F) Células conidiógenas con conidios. G) Conidios. Escalas: A = 0,5 mm, B = 0,1 mm, C = 5 μm , D, E, F = 2 μm ; G = 10 μm . C, F y G en agua, D y E en rojo Congo pre y postratados con KOH, respectivamente.

***Buelliella physciicola* Poelt & Hafellner,**
Beih. Nova Hedwigia 62: 155 (1979). (Fig. 2)

Mycelium indistinct. Conidiomata sporodochial, sessile, (40–)49.6–115.6(–135) μm in diameter ($n = 20$), black, glossy, cupulate (with central depression) when mature, without depression when young, dispersed or loosely aggregated over the lichen thallus. Wall of the conidiomata dark brown, of *textura angularis* type, c. 10 μm in cross section, K–; individual cells (3.0–)3.4–4.9(–5.5) $\times$ (2.4–)2.7–3.6(–4.0) μm , l/w = 1.2–2.0 ($n = 20$). Conidiophores not observed. Conidiogenous cells lining the wall of conidiomata, hyaline, flask-shaped, (6.0–)6.3–8.2(–12) $\times$ (1.5–)2.0–3.0 μm , l/w = 2.2–4.5 ($n = 11$), phialidic, acropetal, determinate. Conidia one-celled, hyaline, smooth-walled, bacilliform to filiform, with one end rounded and the other abruptly truncate, a few also narrowing at one end, straight to slightly curved, (7.5–)8.1–9.9(–11.0) $\times$ (0.7–)0.9–1.3(–1.5) μm , l/w = 5.9–13.3 ($n=28$).

Specimens examined in this study: *Buelliella physciicola*: UNITED STATES, Washington, Asotin County, Hells Canyon area, Grande Ronde River mouth, 46.06209°N 117.0012°W, 327 m asl, outcrop cliff bands on steep grassy slope above river, on *Phaeophyscia orbicularis* and *Physconia enteroxantha* on the base of a small deciduous shrub, 22-I-2021, leg. & det. M. Haldeman 3735 (TUF095350); Whatcom County, Chuckanut Bay Pocket Estuary, 48.7025°N 122.4992°W, 5 m asl, *Pseudotsuga* and *Alnus rubra* woods on protected estuarine shore, on *P. orbicularis* on sandstone outcrop, 3 m above the barnacles, 28-II-2021, leg. & det. M. Haldeman 3752c (TUF091855); Larrabee State Park, between Clayton Beach and Wildcat Cove, 48.6462°N 122.4895°W, 10 m asl, on *P. orbicularis* on exposed sandstone above bay, 25-I-2024, leg. & det. M. Haldeman 5246 (TUF095223).

Buelliella lecanorae: ESTONIA, Pärnu County, Lääneranna, comm., Kitselaid islet, Varbla Islets Nature Reserve, 58.45437°N 23.6766°E, on *Lecanora saligna* growing on *Juniperus communis*, 23-IX-2022, leg. & det. A. Suija (TUF091928.a); Viljandi county, Põhja-Sakala comm, Suure-Jaani churchyard, 58.53345°N 25.46664°E, on *L. chlarotera* on *Acer platanoides*, 20-VII-1996, leg. I. Jüriado 421 (TUF008283.a, holotype).

DISCUSSION

In this paper, we do not make any nomenclatural rearrangements although newly sequenced *Buelliella lecanorae* belongs to the order *Asterinales* whereas the type of *Buelliella*, *B. minimula*, belongs to the order *Asterotexiales*. However, at this point, we chose not to introduce nomenclatural changes until more species and specimens are sequenced along with detailed morphological studies.

The asexual stages of *Asterinales* and *Asterotexiales* are structurally variable, being either coelomycetous or hyphomycetous, and the process of conidiogenesis varies between taxa (e.g., Hongsanan *et al.*, 2020; Ertz *et al.*, 2016). However, many of the asexual species are included in these orders based on observational data without confirmation with sequence data. *Taeniolella* is an asexual fungus in the *Asterotexiales* with many lichenicolous species. It is characterized by a lack of conidiomata, forming dark brown hyphal colonies on the host (Heuchert *et al.*, 2018). This is much different than the asexual stage we describe for *Buelliella physciicola*, which superficially resembles *Epithamnolia* (Zhurbenko, 2012; Suija *et al.*, 2018; Suija *et al.*, 2024). However, the conidiogenous cells in *Buelliella physciicola* are more flask-shaped (Fig. 2), whereas those in *Epithamnolia*, a member of the *Leotiales*, are narrowly lageniform to fusiform (Suija *et al.*, 2024).

We also found, that the nuLSU sequences from North American and European *Buelliella physciicola* specimens differ from each other by a few nucleotide positions hinting at a potential speciation event. *Buelliella physciicola* is a globally distributed species reported from Asia (Japan), Canary Islands, Europe (many countries), North America (Canada, Mexico, U.S.A.) and South America (Ecuador, Peru) (Hafellner, 1979; Santesson, 1988, 1998; Hafellner, 2004; Hafellner *et al.*, 2008; Brackel, 2014; Ertz & Diederich, 2015; Etayo, 2017). Therefore, more DNA barcoding markers (nuITS) should be generated, and more detailed microscopic studies should be carried out on a wider global scale to clarify if *B. physciicola* is a single species or belongs to a group of closely related species.

The type specimen of *B. physciicola* was from *Phaeophyscia sciastra* (Hafellner, 1979). That description included other hosts like “*Phaeophyscia orbicularis* and *Physcia* cf. *hirtuosa* (*Phaeophyscia hirtuosa* in Esslinger, 1978: 304). Our sequenced specimens from northwestern U.S.A. (Washington) and Europe (both from Belgium) were also on *Phaeophyscia orbicularis* (Ertz & Diederich, 2015). Hafellner (2004), only listed *Phaeophyscia* spp. as hosts in his account of *B. physciicola*. Almost all published records of *B. physciicola* are from *Phaeophyscia* spp. (see above sources). However, there is one record from Ecuador on *Physcia* sp. (Etayo, 2017). Therefore, in addition to exploring genetic variation geographically, variation on other host species should be explored. Our record Haldeman 3735 was mainly growing on *Phaeophyscia orbicularis*, but was also growing on an intertwined thallus of *Physconia enteroxantha*. We did not sequence the conidiomata from the *Physconia*, but it was morphologically consistent with the conidiomata on *Phaeophyscia*. This may support the idea that *B. physciicola* can inhabit a broader host range within the *Physciaceae*. but *Phaeophyscia* seems to be the preferred host genus.

There are scattered reports of *Buelliella lecanorae*. All previous reports have been from Europe (Estonia, Germany, Switzerland and Ukraine), Asia (Joshi *et al.*, 2020) and South America (Flakus & Kukwa, 2012), on corticolous members of the *Lecanora subfusca* group—*L. argentata*, *L. chlarotera* and *L. pulicaris*—(Suija & Alstrup, 2004; Brackel, 2014; Kapetz *et al.*, 2015; Zimmermann, 2022). However, the sequenced specimen reported here was from a member of the *Lecanora varia* group, *L. saligna*. Our phylogeny includes only one European specimen, therefore, similarly to *B. physciicola*, there may be some polymorphisms in DNA sequences when sampled from wider geographic regions.

To conclude, our study is one step forward for understanding phylogeny and heterogeneity of the morphology-based genus *Buelliella*. Increasing sampling and sequencing is necessary to solve phylogenetic placement of several taxa lacking recent collections and to finally make inevitable nomenclatural rearrangements.

ACKNOWLEDGEMENTS

Rasmus Puusepp (Tartu University, Estonia) is thanked for lab work. The reviewers are cordially thanked for their helpful and constructive reviews. The financial support for AS was provided by an Estonian Research Council grant (PRG1170).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., ..., Kõljalg, U. (2023). The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: sequences, taxa and classifications reconsidered. *Nucleic Acids Research* 52: D791-D797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1039>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Brackel, W. v. (2014). Kommentierter Katalog der flechtenbewohnenden Pilze Bayerns. *Bibliotheca Lichenologica* 109: 1-476.
- Diederich, P., Lawrey, J. D. & Ertz, D. (2018). The 2018 classification and checklist of lichenicolous fungi, with 2000 non-lichenized, obligately lichenicolous taxa. *Bryologist* 121 (3): 340-425. <https://doi.org/10.1639/0007-2745-121.3.340>
- Ertz, D. & Diederich, P. (2015). Dismantling *Melaspileaceae*: a first phylogenetic study of *Buelliella*, *Hemigrapha*, *Karschia*, *Labrocarpon* and *Melaspilea*. *Fungal Diversity* 71: 141-164. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0321-1>
- Ertz, D., Heuchert, B., Braun, U., Freebury, C. E., Common, R. S. & Diederich, P. (2016). Contribution to the phylogeny and taxonomy of the genus *Taeniolella*, with a focus on lichenicolous taxa. *Fungal Biology* 120 (11): 1416-1447. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.05.008>
- Esslinger, T. L. (1978). Studies in the lichen family *Physciaceae*. II The genus *Phaeophyscia* in North America. *Mycotaxon* 7 (2): 283-320.
- Etayo, J. (2017). Hongos liquenícola de Ecuador. *Opera Lilloana* 50: 1-535.
- Flakus, A. & Kukwa, M. (2012). New records of lichenicolous fungi from Bolivia. *Opuscula Philolichenum* 11: 36-48.
- Hafellner, J. (1979). *Karschia*. Revision einer Sammelgattung an der Grenze von lichenisierten und nicht-lichenisierten Ascomyceten. *Beiheft zur Nova Hedwigia* 62: 1-248.

- Hafellner, J. (2004). *Buelliella*, pp. 633-635. In Nash III, T. H., Ryan, B. D., Diederich, P., Gries, C. & Bungartz, F. (Eds.), *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region, Vol. 2.* (pp. 633–635). Tempe, Arizona: Lichens Unlimited, Arizona State University.
- Hafellner, J., Herzog, G. & Mayrhofer, H. (2008). Zur Diversität von lichenisierten und lichenicolen Pilzen in den Ennstaler Alpen (Österreich: Steiermark, Oberösterreich). *Mitteilungen der Naturwissenschaftlichen Vereines für Steiermark* 137: 131-204.
- Heuchert, B., Braun, U., Diederich, P. & Ertz, D. (2018). Taxonomic monograph of the genus *Taeniolella* s. lat. (Ascomycota). *Fungal Systematics and Evolution* 2 (1): 69-261. <https://doi.org/10.3114/fuse.2018.02.06>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35 (2): 518-522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Hongsanan, S., Hyde, K. D., Phookamsak, R., & Xie, N. (2020). Refined families of Dothideomycetes: Dothideomycetidae and Pleosporomycetidae. *Mycosphere* 11 (1): 1553-2107. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/13>
- Joshi, Y., Kumar, P., Yadav, A. L. & Suda, N. (2020). Diversity and distribution of lichenicolous fungi and lichenicolous lichens in Uttarakhand: first comprehensive checklist. *Journal of Indian Botanical Society*. 100 (A): 318-343.
- Jüriado, I., Marmor-Ohtla, L., Martin, L., Randlane, T. & Suija, A. (2022). Updates to the list of Estonian lichenized, lichenicolous and allied fungi. *Folia Cryptogamica Estonica* 59: 83-89. <https://doi.org/10.12697/fce.2022.59.12>
- Kapetz, N. V., Pleskach L. Yu., Popova, L. P., Fedorenko, N. M., Litovynska A. V., Shershova N. V. & Kondratyuk S. Ya. (2015). New to Ukraine and rare species of lichen-forming and lichenicolous fungi. *Ukrainian Botanical Journal* 72 (2): 156-163. (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/ukrbotj72.02.156>
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. & Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33 (2): 511-518. <https://doi.org/10.1093/nar/gki198>
- Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20 (4): 1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32 (1): 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Rambaut, A. (2018) FigTree v. 1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Santesson, R. (1988). Fungi lichenicoli exsiccati: Fasc. 5–6 (Nos 101–150). *Thunbergia* 6: 1-18.
- Santesson, R. (1998). Fungi lichenicoli exsiccati: Fasc. 11 & 12 (Nos 251–300). *Thunbergia* 28: 1-19.
- Suija, A. & Alstrup, V. (2004). *Buelliella lecanorae*, a new lichenicolous fungus. *Lichenologist* 36 (3-4): 203-206. <https://doi.org/10.1017/S0024282904014239>
- Suija, A., Diederich, P., Darmostuk, V., Etayo, J., Flakus, A. & Zimmermann, E. (2024). *Epithamnolia*. In Diederich, P., Ertz, D., & Braun, U. (Eds.). *Flora of Lichenicolous Fungi 2. Hyphomycetes*. (pp. 178–188). Luxembourg: National Museum of Natural History, Luxembourg.
- Suija, A., van den Boom, P., Zimmermann, E., Zhurbenko, M. P. & Diederich, P. (2018). Lichenicolous species of *Hainesia* belong to *Phacidiales* (Leotiomycetes) and are included in an extended concept of *Epithamnolia*. *Mycologia* 109: 882-899. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1413891>
- Talavera, G. & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56 (4): 564-577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B. M., Abarenkov, K., Suvi, T., Saar, I., & Kõljalg, U. (2008). Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytologist* 180 (2): 479-490. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02561.x>
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- Zhurbenko, M. P. (2012). Lichenicolous fungi growing on *Thamnolia*, mainly from the Holarctic, with a worldwide key to the known species. *Lichenologist* 44: 147-177. <https://doi.org/10.1017/S0024282911000739>
- Zimmermann, E. (2022). Lichenicole Pilze der Schweiz VI: Seltene und erwähnenswerte lichenicole Pilze. *Meylania* 69: 27-39.
- Zoller, S., Scheidegger, C. & Sperisen, C. (1999). PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist* 31 (5): 511-516. <https://doi.org/10.1006/lich.1999.0220>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Competencia entre *Nothofagus obliqua* y *Pinus ponderosa*: efectos sobre su crecimiento y comunidades ectomicorrícicas asociadas

Competition between *Nothofagus obliqua* and *Pinus ponderosa*: effects on their growth and associated ectomycorrhizal communities

Fioroni, Facundo^{1,2*} ; Ayelén I. Carrón³ ; Franco Caldironi⁴ ; Natalia V. Fernández^{5,6} 

¹ Universidad Nacional de Río Negro. Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales, Agroecología y Desarrollo Rural. Río Negro, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). IRNAD. Río Negro, Argentina.

³ Universidad Nacional de Río Negro.

⁴ Universidad Nacional del Comahue.

⁵ Grupo de Microbiología Aplicada y Biotecnología Vegetal y del Suelo. Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional del Comahue (CONICET-UNComahue).

⁶ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

* Autor correspondiente: <ffioroni@unrn.edu.ar>

Resumen

La competencia entre especies vegetales puede influir significativamente en el crecimiento y las asociaciones simbióticas de las plantas, lo cual es particularmente importante tanto en procesos de restauración ecológica como de invasión. En este estudio se evaluó el efecto la competencia entre *Nothofagus obliqua* y *Pinus ponderosa* sobre el crecimiento de las plantas, su colonización por hongos ectomicorrícicos y la diversidad taxonómica y funcional de estos simbioses, creciendo tanto en suelo de bosque nativo como en suelo de plantación de pino. Los resultados

► Ref. bibliográfica: Fioroni, F.; Carrón, A. I.; Caldironi, F.; Fernández, N. V. 2025. Competencia entre *Nothofagus obliqua* y *Pinus ponderosa*: efectos sobre su crecimiento y comunidades ectomicorrícicas asociadas. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 21-44. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2093>

► Recibido: 13 de diciembre 2024 – Aceptado: 12 de febrero 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



OPEN ACCESS

mostraron que el crecimiento de ambas especies fue mayor en suelos de bosque nativo, probablemente debido a su mayor contenido nutricional. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, los efectos de la competencia fueron nulos o incluso positivos, especialmente para *N. obliqua*. Estos hallazgos sugieren una coexistencia facilitada por diferencias en las estrategias de uso de recursos. En cuanto a las micorrizas, cada especie presentó mayores niveles de colonización en suelos previamente dominados por su misma especie. A pesar de esto, ambos suelos mostraron una composición taxonómica y funcional distintiva, destacando una mayor diversidad en general en suelos de plantación. Sin embargo, los hongos con alto contenido de melanina, cruciales para enfrentar estrés hídrico, estuvieron ausentes en este suelo. Nuestros resultados resaltan el potencial invasor de *P. ponderosa* y el potencial de *N. obliqua* para restaurar ambientes convertidos en plantaciones de pino. Además, estos resultados destacan la importancia de considerar las comunidades de hongos simbióticos en estos esfuerzos, y que la introducción de inóculos micorrícicos podría ser clave para maximizar el éxito de las restauraciones en suelos degradados.

Palabras clave: Competencia; diversidad; invasiones; micorrizas; restauración.

Abstract

Plant competition can significantly influence plant growth and their symbiotic associations, which is particularly important in both ecological restoration and invasion processes. This study evaluated the effect of competition between *Nothofagus obliqua* and *Pinus ponderosa* on plant growth, colonization by ectomycorrhizal fungi, and the taxonomic and functional diversity of these symbionts growing in soils of native forest and pine plantation. The results showed that the growth of both species was greater in native forest soils, likely due to their higher nutrient content. However, contrary to expectations, the effect of competition was neutral or even positive, particularly for *N. obliqua*. These findings suggest a coexistence facilitated by differences in resource use strategies. Regarding mycorrhizas, each species exhibited higher colonization levels in soils previously dominated by its own species. Despite this, both soils showed distinctive taxonomic and functional compositions, with plantation soils exhibiting overall higher diversity. However, melanized fungi, crucial for coping with water stress, were absent in this soil. Our results highlight the invasive potential of *P. ponderosa* and the suitability of *N. obliqua* for restoring environments converted into pine plantations. Furthermore, these findings emphasize the importance of considering symbiotic fungal communities in such efforts, suggesting that mycorrhizal inoculum could be key to maximizing restoration success in degraded soils.

Keywords: Competition; diversity; invasion; mycorrhizas; restoration.

INTRODUCCIÓN

El establecimiento y éxito de una planta en un nuevo entorno depende en gran medida de su capacidad para competir eficazmente con especies propias del nuevo entorno y de encontrar simbioses con los cuales asociarse (Orrock *et al.*, 2008; Menzel *et al.*, 2017; Gioria *et al.*, 2018; Koziol *et al.*, 2018). La competencia entre diferentes especies, especialmente a través de sus raíces, ha demostrado ser un fuerte determinante del crecimiento de las plantas, siendo que una determinada especie es capaz de reducir el crecimiento de plantas vecinas (Kjær *et al.*, 2013; Ni *et al.*, 2018). Esto es particularmente importante en escenarios de restauración ecológica o durante procesos de invasiones biológicas, situaciones que presentan desafíos similares a pesar del gran contraste entre ambas. En el caso de la restauración, estas situaciones de competencia interespecífica pueden observarse al reintroducir especies nativas en ambientes degradados, ya sea por disturbios naturales como los incendios (Martin, 2017; Souza-Alonso *et al.*, 2022) o por acción directa de las actividades antrópicas, como las extensas plantaciones de pino establecidas en Patagonia (Zamorano-Elgueta *et al.*, 2015; Martínez-Ramos *et al.*, 2016; Pauchard *et al.*, 2016). En este último caso, las plantas nativas generalmente deben competir con plantas exóticas previamente establecidas o germinadas a partir del banco de semillas (Jonášová *et al.*, 2006). Además, se verían forzadas a adaptarse a ambientes que, al haber sido dominados por especies foráneas, suelen presentar severas alteraciones en las comunidades de organismos simbióticos necesarios para su supervivencia y desarrollo (Gazol *et al.*, 2016; Suz *et al.*, 2017; Sapsford *et al.*, 2022). De manera similar, en escenarios de invasión la especie exótica necesita superar numerosas barreras al introducirse en un nuevo sitio, entre ellas la competencia con las especies vegetales nativas (Theoharides y Dukes, 2007; Iannone *et al.*, 2016) y el establecimiento de relaciones simbióticas con microorganismos benéficos en un suelo cuyas comunidades se encuentran modeladas por las especies autóctonas (Dickie *et al.*, 2010; Jo *et al.*, 2018).

El rol de las interacciones mutualistas, como aquellas establecidas con hongos micorrícicos, es clave en la dinámica de establecimiento de la gran mayoría de las especies vegetales. Estos hongos forman una relación simbiótica con las raíces (u otro órgano en contacto con el sustrato) de las plantas, en la cual la planta le brinda fotosintatos al hongo y éste le aporta beneficios críticos como una mayor capacidad de absorción de nutrientes, protección contra patógenos y resistencia a factores de estrés abiótico y biótico (Smith y Read, 2008; Dickie *et al.*, 2010). Las ectomicorrizas (EcM), son un tipo particular de estas asociaciones y se encuentran principalmente asociadas a especies arbóreas, incluidas aquellas de las familias Nothofagaceae y Pinaceae (Tedersoo *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2015; Barroetaveña *et al.*, 2019). Las EcM se caracterizan por modificar la morfología radical, formando en los ápices radicales una estructura conocida como ectomorfotipo,

que consiste en una red compacta de hifas que recubre los ápices (manto) y otra que se desarrolla dentro de la raíz (red de Hartig). Además, desde el manto se extienden en el suelo circundante hifas de diferente longitud y complejidad que constituyen el denominado micelio extrarradical. Éste actúa como una extensión del sistema radical de la planta, permitiéndole explorar el suelo en busca de recursos, algo especialmente valioso en entornos con limitaciones nutricionales o en los que las plantas enfrentan fuerte competencia (Agerer, 1987; Smith y Read, 2008).

En las EcM, la asociación específica entre determinados hongos y especies vegetales da lugar a diferentes morfologías de ectomorfotipos, los cuales representan diferentes tipos exploratorios. Estos últimos reflejan distintas estrategias para captar nutrientes del suelo, y se clasifican según la presencia y tipo de micelio extraradical en: 1) tipo exploratorio de “contacto”, que se caracteriza por carecer o presentar muy escasas hifas emanantes cortas y compactas que exploran el suelo inmediato a las raíces; 2) de “corta distancia”, que desarrollan hifas abundantes y de mayor longitud para explorar un volumen mayor de suelo; y 3) de “mediana” y “larga distancia” que presentan cordones de hifas (rizomorfos) de gran longitud (superior a 40 cm), permitiendo un mucho mayor rango de exploración y maximizando la absorción de nutrientes en suelos pobres (Agerer, 2001; Smith y Read, 2008; Janowski y Leski, 2023; Izumi, 2024). Otra característica morfológica que tiene implicancia funcional es el contenido de melanina de los hongos simbios. Las melaninas son pigmentos poliméricos de color marrón oscuro que desempeñan funciones diversas en distintos grupos de organismos. En los hongos, la melanina se acumula típicamente en la pared celular y cumple funciones tales como protección a la radiación y al daño mecánico, tolerancia a agentes químicos, propiedades antioxidantes, y protección contra la desecación, entre otras. La melanina es una molécula compleja y costosa en términos energéticos, pero puede conferir ventajas tanto al hongo como a la planta hospedadora bajo condiciones adversas (Fernandez y Koide, 2013; Netherway y Bahram, 2024; Pellitier *et al.*, 2024). Por lo tanto, conocer la diversidad morfológica y funcional de los hongos EcM es clave para entender cómo se optimiza la adquisición de recursos y se incrementa la resistencia de las plantas a distintos factores de estrés en contextos de restauración e invasión, donde diferentes hongos pueden brindar distintos beneficios a la planta hospedadora.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar cómo la competencia entre una especie forestal nativa (*Nothofagus obliqua*) y otra exótica (*Pinus ponderosa*) afecta el crecimiento y las comunidades micorrícicas (abundancia, diversidad taxonómica y funcional) durante las etapas iniciales de su desarrollo. Además, se estudió cómo varían estas dinámicas según las plantas se desarrollen en suelos de ecosistemas dominados por vegetación nativa (suelo de bosque de *Nothofagus*) y por especies exóticas (suelo de plantación de *Pinus*). Hipotetizamos que (1) la coexistencia de ambas especies tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas debido a la competencia

entre ellas, y (2) *N. obliqua* y *P. ponderosa* presentan mayor colonización por EcM y mayor diversidad taxonómica y funcional de hongos EcM al desarrollarse en suelos provenientes de sus propios ecosistemas dado que contienen inóculo específico adaptado a las condiciones en las que se desarrollan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies de estudio

Para llevar a cabo este trabajo se seleccionaron dos especies arbóreas, una nativa (*N. obliqua*, Nothofagaceae) y otra exótica (*P. ponderosa*, Pinaceae). *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Orest. (roble pellín) es una especie caducifolia nativa de la zona cordillerana de Neuquén y Río Negro. En Argentina, esta especie puede formar rodales puros (~13250 ha) o mixtos (~161000 ha) (Donoso Zegers, 2006; Azpilicueta *et al.*, 2010; Sabatier *et al.*, 2011).

Por otro lado, *P. ponderosa* (Douglas ex Lawson et. C Lawson) (pino ponderosa) es una especie nativa de Norteamérica que se ha aclimatado perfectamente a la zona cordillerana de Neuquén, Río Negro y Chubut. Actualmente, en la región andino-patagónica existen ~109000 ha ocupadas por plantaciones forestales, de las cuales el 96 % corresponde a especies de pino, principalmente de *P. ponderosa* (81% del total; Galarco y Ramilo, 2020).

Ensayo a vivero

Se llevó a cabo un ensayo en el vivero forestal del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Bariloche (INTA EEA Bariloche). El ensayo se basó en el cultivo de las especies forestales seleccionadas en macetas de 3 L. Para analizar el efecto de la interacción entre ambas especies sobre el desarrollo de las plantas y sus comunidades micorrícicas se cultivaron dos plántulas por maceta conteniendo diferentes tipos de suelo. Por lo tanto, los dos factores de estudio fueron: Factor 1 = “Competencia interespecífica” con dos niveles (Sin -es decir que las dos plantas en la maceta correspondían a la misma especie-: *N. obliqua* + *N. obliqua* y *P. ponderosa* + *P. ponderosa* / Con: *N. obliqua* + *P. ponderosa*); y Factor 2 = “Tipo de suelo” también con dos niveles (bosque nativo de *Nothofagus* / plantación comercial de *P. ponderosa*). Se realizó un diseño completamente aleatorizado combinando los niveles de todos los factores (4 tratamientos, 20 macetas por tratamiento, 80 macetas en total y 160 plantas).

Para el cultivo de ambas especies se germinaron semillas otorgadas por el INTA EEA Bariloche. Luego de que las plantas desarrollaron el primer par de hojas verdadero se trasplantaron a las macetas según los tratamientos indicados anteriormente. Los suelos se colectaron el día previo al trasplante en dos sitios. Uno de ellos corresponde a la Región de Yuco (40° 9' 11" S,

Tabla 1. Resultados de los análisis químicos de los suelos provenientes del bosque nativo (Yuco) y de la plantación de *Pinus ponderosa* (Meliquina). P_E = Fósforo extraíble, N_T = Nitrógeno total, C_T = Carbono total.

Table 1. Results of the chemical analyses of soils from the native forest (Yuco) and the *Pinus ponderosa* plantation (Meliquina). P_E = Extractable phosphorus, N_T = Total nitrogen, C_T = Total carbon.

Suelo	P _E (ug/g)	N _T (%)	C _T (%)	Conductividad	pH
Bosque	22,3	0,5	7,2	147,8	6,1
Plantación	4,7	0,1	1,9	48,2	5,7

71° 30' 39" O, 841 m snm), comprendida dentro de la cuenca del Lago Lácar del Parque Nacional Lanín. Este sitio se encuentra dentro del área natural de distribución de *N. obliqua*, y se caracteriza por un bosque mixto de *N. obliqua*, *N. alpina* y *N. dombeyi*. El otro sitio se ubica en la Estancia Santa Lucía (40° 23' 18" S, 71° 15' 43" O, 982 m snm), y corresponde a una plantación comercial de *P. ponderosa* en las cercanías de Meliquina. Este sitio se encuentra aproximadamente a 30 km del primero. Luego de caracterizarse los suelos de cada sitio, se observó que el suelo del bosque nativo presentó mayor contenido de carbono total, nitrógeno total, y fósforo extraíble en comparación con el suelo de plantación (Tabla 1). Además, el suelo de bosque mostró valores más altos de conductividad y pH en relación con el suelo de plantación (Tabla 1).

Variables evaluadas

Una vez finalizado el primer período de crecimiento activo de las plantas (cinco meses desde el establecimiento del ensayo) se seleccionaron al azar diez de las veinte macetas por tratamiento. En el caso de los tratamientos sin competencia (*N. obliqua* + *N. obliqua* y *P. ponderosa* + *P. ponderosa*) se seleccionó una planta al azar para realizar los análisis, mientras que los tratamientos con competencia (*N. obliqua* + *P. ponderosa*) se analizaron ambas plantas. De cada ejemplar se registró la longitud del tallo (relacionado con su capacidad fotosintética y ventaja competitiva) y el diámetro del cuello (excelente predictor de crecimiento y sobrevivencia) (Haase, 2008). Se calculó también la relación longitud del tallo / diámetro del cuello, también considerada un indicador de la capacidad de supervivencia de la plántula (Haase, 2008).

En las mismas diez plantas se cuantificó el porcentaje de colonización de EcM siguiendo el método de conteo de puntas colonizadas descripto por Grand y Harvey (1982). Utilizando microscopio estereoscópico y óptico se observaron las características morfológicas propias de esta simbiosis (tamaño, forma, color y ramificación; disposición de hifas del manto; presencia y tipo de micelio extrarradical; Agerer, 1987), y en base a ellas se construyeron grupos de similitud morfológica (ectomorfotipos). Con el fin de analizar la abundancia relativa de cada ectomorfotipo, se cuantificó

en cada individuo el número de ápices radicales correspondientes a cada uno de éstos, se dividió esta cantidad por el total de ápices colonizados y se expresó este valor en porcentaje.

Para determinar cómo lo ocurrido durante el primer período de crecimiento (Tiempo 1 = T1) impactaba el desarrollo de las plantas al corto plazo, se realizó una evaluación no destructiva de las mismas luego de dos ciclos de crecimiento adicionales (Tiempo 2 = T2). Así, se repitieron las medidas morfológicas detalladas (longitud del tallo, diámetro del cuello y relación longitud del tallo / diámetro del cuello) en todos los ejemplares que no fueron utilizados en la primera etapa y que al momento de esta evaluación tenían 28 meses de edad.

Diversidad de hongos ectomicorrícicos

En este trabajo se analizó tanto la diversidad taxonómica como funcional de los hongos EcM. Para conocer su identidad taxonómica, los mismos fueron amplificados utilizando el kit Phire Plant Direct PCR (Thermo Fisher Scientific, Alemania), de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. El mismo se basa en la realización de PCRs anidadas (Fernández *et al.*, 2015). Para la primera PCR se utilizaron los *primers* universales NSII (5'-GATTGAATGGCTTAGTGAGG-3') y NLB4 (5'-GGATTCTCACCTCTATGAC-3') (Martin y Rygiewicz, 2005) y una pequeña fracción del ectomorfotipo (~1 mm²) como fuente de ADN. Esta reacción de PCR fue realizada en 20 µL según el siguiente protocolo: 7,6 µL de agua mili-Q, 10 µL de 2X buffer de reacción, 1 µL de cada primer (5 mM) y 0,4 µL de la polimerasa Phire Hot Start II DNA (Phire Plant Direct PCR Kit, Thermo Fisher Scientific, Alemania). Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo de desnaturalización de 98 °C por 5 min, 30 ciclos de 5 s a 98 °C, 5 s a 54 °C y 20 s a 72 °C, y una extensión final de 1 min a 72 °C. Para la segunda PCR los *primers* utilizados fueron específicos para hongos: ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Martin & Rygiewicz, 2005). Esta segunda reacción fue realizada en 20 µL según el siguiente protocolo: 6,6 µL de agua mili-Q, 10 µL de 2X buffer de reacción, 1 µL de cada primer (5 mM), 0,4 µL de la polimerasa Phire Hot Start II DNA, y 1 µL de ADN (proveniente del producto de la primera PCR diluido a 2/100, 5/100 o 10/100 dependiendo del ectomorfotipo). Las condiciones de PCR en este caso fueron: un ciclo de desnaturalización de 98 °C por 5 min, 28 ciclos de 5 s a 98 °C, 5 s a 52 °C y 20 s a 72 °C, y una extensión final de 1 min a 72 °C. Aquellos productos de PCR que presentaron una única banda fueron enviados a secuenciar a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas (PQ002578-PQ002599) se compararon con la base de datos pública GenBank de NCBI, utilizando el algoritmo de BLASTn para identificar el taxón a la que correspondía cada una.

Para asignar los diferentes hongos EcM a grupos funcionales se analizaron dos principales características: tipo exploratorio y contenido de melanina (Agerer, 2001; Fernandez y Koide, 2013; López-García *et al.*, 2018; Floriani *et al.*, 2024). Los tipos exploratorios se clasificaron en ‘contacto’ (EC, ectomorfortipos lisos prácticamente sin hifas emanantes), de ‘corta distancia’ (ECD, con hifas emanantes) y de ‘media/larga distancia’ (EMLD, con presencia de rizomorfos). El contenido de melanina se determinó por métodos visuales según el color de los ectomorfortipos y según tres categorías: ‘melanina baja’ (MB, morfotipos más claros que la raíz -blancos, ambar, beige-), ‘melanina intermedia’ (MI, morfotipos de un color similar a la raíz -marrón claros, canela-) y ‘melanina alta’ (MA, morfotipos más oscuros que la raíz -marrón oscuros, negros-). En la Fig. 1 se muestran representantes de los grupos funcionales encontrados en este trabajo.

Para evaluar la diversidad tanto taxonómica como funcional de los hongos EcM en plántulas de *N. obliqua* y *P. ponderosa* se emplearon los números de Hill (Hill, 1973). Estos números ofrecen una perspectiva integral al ponderar la abundancia de especies o grupos funcionales de diferentes maneras: q_0 representa la riqueza de especies o grupos funcionales sin ponderación por abundancia; q_1 pondera de manera exponencial las especies de acuerdo con su abundancia (equivalente al índice de diversidad de Shannon); y q_2 da mayor peso a las especies más abundantes (similar índice de diversidad de Simpson).

Análisis estadísticos

Para evaluar el efecto de la competencia y el tipo del suelo sobre el crecimiento y micorrización de las plantas se construyeron modelos lineales para la mayor parte de las variables consideradas. Se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) para la relación longitud del tallo / diámetro del cuello de roble para el Tiempo 1, al igual que para el q_2 de la diversidad funcional de hongos EcM para ambas especies vegetales; y modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) para la colonización EcM. En los modelos se incluyeron la competencia, el tipo de suelo y su interacción como variables explicativas. Para evaluar colonización por EcM se utilizó la función *cbind* (de la siguiente manera: *cbind*(número de puntas colonizadas, número total de puntas - número de puntas colonizadas), para asegurar que el modelo representara adecuadamente la naturaleza de los datos. Además, para esta variable se consideró el ID de la planta como efecto aleatorio en la colonización ectomicorrícica para tener en cuenta que las puntas contadas dentro de la misma planta no son independientes entre sí, como lo son con respecto a los de otra planta. Todos los GLM se ajustaron utilizando una distribución Gamma, y una distribución Binomial para los GLMM. Realizamos comparaciones por pares post hoc de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software R versión 4.2.2

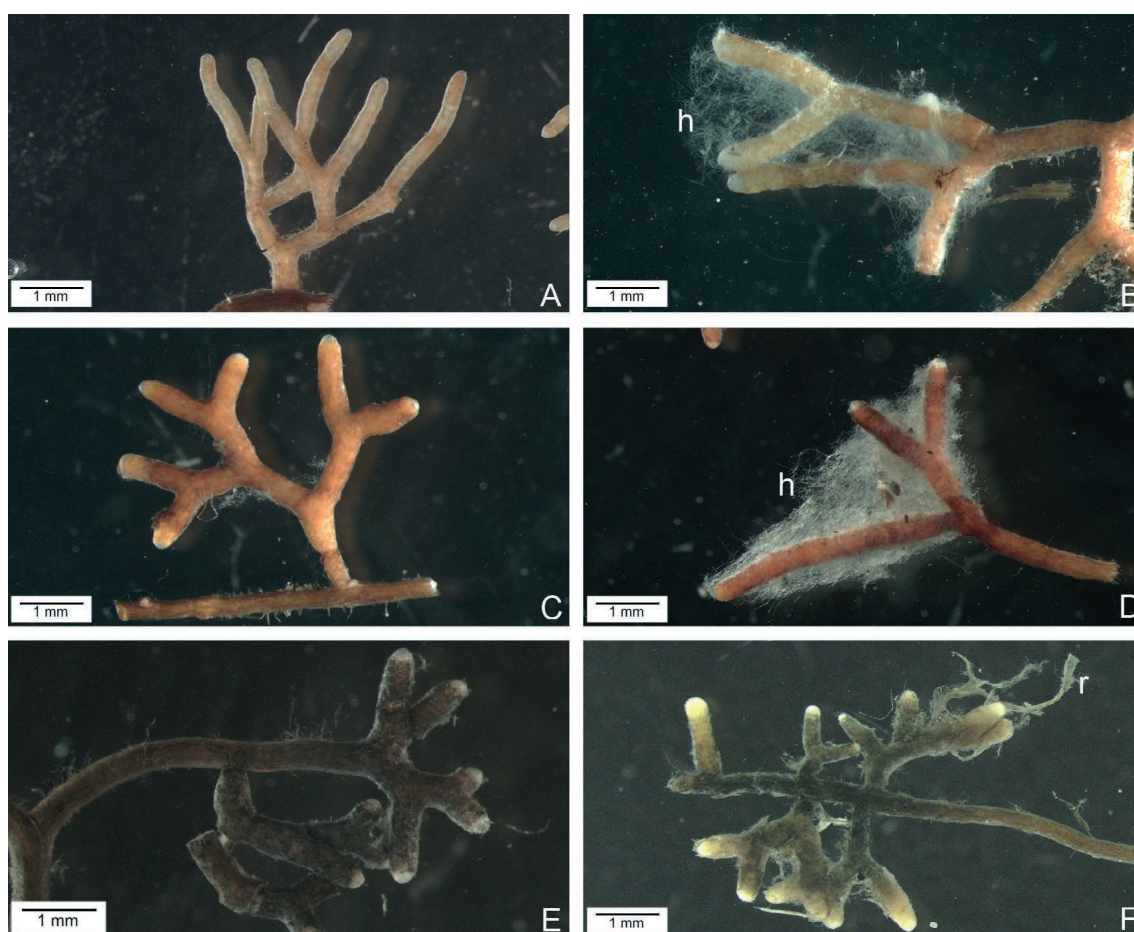


Fig. 1. Grupos funcionales de los ectomorfotipos encontrados en las raíces de *Nothofagus obliqua* y *Pinus ponderosa*. A y B presentan bajo contenido de melanina, C y D un contenido intermedio, y E y F un contenido alto. Por otro lado, A, C y D tienen un tipo exploratorio de contacto, B y D de corta distancia, y F de media/larga distancia. Las hifas emanantes se encuentran indicadas con “h” y los rizomorfos con “r”.

Fig. 1. Functional groups of the ectomorphotypes found in *Nothofagus obliqua* and *Pinus ponderosa* plants. A and B have low melanin content, C and D intermediate content, and E and F a high content. Additionally, A, C, and D correspond to the contact exploration type, B and D to the short-distance type, and F to the medium/long-distance type. Em-anating hyphae are indicated with “h” and rhizomorphs with “r.”

(R Core Team, 2022). Utilizamos el paquete *lme4* versión 1.1-31 (Bates *et al.*, 2015) para estimar los parámetros del modelo, el paquete *DHARMA* versión 0.4.6 (Hartig, 2020) para verificar los supuestos de los modelos, el paquete *emmeans* versión 1.8.4-1 para las comparaciones post hoc (Lenth *et al.*, 2018), y los paquetes *vegan* y *hillR* para calcular los números de Hill (Li, 2018; Oksanen *et al.*, 2024).

RESULTADOS

Crecimiento de las plantas

Luego de la primera temporada de crecimiento (T1), el desarrollo de las plántulas de *N. obliqua*, representado por la longitud del tallo y el diámetro del cuello, solo se vio afectado por el tipo de suelo, creciendo más en el suelo de bosque, mientras que no hubo efecto de la competencia (Tabla 2, Fig. 2A, 2B). En la tercera temporada de crecimiento se mantuvo el efecto del tipo de suelo, pero también se halló efecto de la competencia. El crecimiento de las plantas de *N. obliqua* fue generalmente superior al crecer conjuntamente con *P. ponderosa*, aunque la diferencia fue significativa sólo para aquellas plantas creciendo en suelo de bosque (Tabla 2, Fig. 2A, 2B). Finalmente, en términos de la relación longitud del tallo / diámetro del cuello de *N. obliqua*, luego de la primera temporada solo se observó efecto del tipo de suelo, siendo los valores mayores en suelo de bosque en comparación con el de plantación. En la tercera temporada se encontró una interacción entre los dos factores de estudio y la diferencia en los valores de la relación no fue tan marcada siendo, de hecho, mayores en las plantas cultivadas en suelo de plantación sin competencia. En suelo de plantación, se observó además que las plantas de *N. obliqua* cultivadas junto a *P. ponderosa* tuvieron una relación longitud del tallo / diámetro del cuello significativamente menor que aquellas cultivadas a la par de otra planta de su misma especie (Tabla 2, Fig. 2C).

En el caso de las plantas de *P. ponderosa*, tanto para la primera como para la tercera temporada se encontró que la longitud del tallo y el diámetro del cuello dependieron mayormente del suelo en el que fueron cultivadas, creciendo más en el de bosque nativo con respecto al de la plantación (Tabla 2, Fig. 2D, 2E). En general, en esta especie no se notó un efecto significativo de la competencia sobre el crecimiento vegetal (Tabla 2, Fig. 2D, 2E), salvo en el diámetro del cuello de las plantas de la primera temporada de crecimiento cultivadas en suelo de bosque, cuyo diámetro fue mayor al cultivarse a la par de una planta de *N. obliqua* en comparación con aquellas acompañadas por una planta de su misma especie. Con respecto a la relación entre la longitud del tallo y el diámetro del cuello, no se observaron en general diferencias significativas, a excepción de las plántulas de *P. ponderosa* del primer período de crecimiento cultivadas en suelo de bosque nativo y en competencia con *N. obliqua*, cuyos valores de la relación longitud de tallo / Diámetro de cuello fueron los más bajos registrados (Tabla 2, Fig. 2F).

Asociación entre las plantas y los hongos micorrícicos

Los porcentajes de colonización por EcM de ambas especies dependieron mayormente del suelo en el que fueron cultivadas, siendo mayores en suelo

Tabla 2. Análisis de varianza para evaluar el efecto del suelo (bosque nativo o plantación) y competencia (con o sin) para variables morfológicas de plantas jóvenes de *Nothofagus obliqua* y *Pinus ponderosa* para el primer (T1) y tercer (T2) período de crecimiento, al igual que el porcentaje de ectomicorrización y números de Hill como medidas de diversidad taxonómica y funcional de las ectomicorrizas encontradas. Los valores indican el estadístico F (a excepción de Longitud/Diámetro de *N. obliqua* en T1, ectomicorrización, y q2 funcional, donde el estadístico es X2). Aquellos valores destacados en negrita corresponden a efectos significativos. Los asteriscos indican el p-valor de la siguiente forma: '****' = <0,001; '***' = <0,01; '**' = <0,05, '*' = <0,1.

Table 2. Analysis of variance to evaluate the effect of soil type (native forest or plantation) and competition (with or without) on morphological variables in young plants of *Nothofagus obliqua* and *Pinus ponderosa* during the first (T1) and third (T2) growth periods, as well as on the percentage of ectomycorrhization and Hill numbers as measures of taxonomic and functional ectomycorrhizal diversity. Values indicate the F statistic (except for Length/Diameter of *N. obliqua* in T1, ectomycorrhization, and functional q2, where the statistic is X2). Values in bold indicate significant effects. Asterisks represent the p-value as follows: '****' = <0,001; '***' = <0,01; '**' = <0,05, '*' = <0,1.

Variable	Suelo	Cultivo	Suelo x Cultivo
<i>Nothofagus obliqua</i>			
Diámetro cuello (T1)	77,62****	0,07	0
Diámetro cuello (T2)	51,88****	6,08*	0,38
Longitud tallo (T1)	152,03****	1,09	3,39°
Longitud tallo (T2)	24,25****	3,42°	6,17*
Longitud / Diámetro (T1)	26,12****	0,08	2,38
Longitud / Diámetro (T2)	1,83	1,32	12,37*
Ectomicorrización	17,89****	1,12	0
q0 (Taxonómico)	22,07****	0,04	0,04
q1 (Taxonómico)	8,98**	1,57	1,72
q2 (Taxonómico)	6,69*	0,48	0,39
q0 (Funcional)	7,22*	0,51	0,06
q1 (Funcional)	1,01	2,24	0,72
q2 (Funcional)	0,41	2,36	0,28
<i>Pinus ponderosa</i>			
Diámetro cuello (T1)	9,94**	0,43	7,74**
Diámetro cuello (T2)	23,06****	0,71	2,51
Longitud tallo (T1)	7,95**	3,53°	1,32
Longitud tallo (T2)	22,31****	0,09	0,63
Longitud / Diámetro (T1)	0,08	3,47*	1,76
Longitud / Diámetro (T2)	0	0,28	1,10
Ectomicorrización	14,8****	3,57°	3,68°
q0 (Taxonómico)	57,62****	0,03	4,41°
q1 (Taxonómico)	45,43****	0,07	0,55
q2 (Taxonómico)	28,31****	0,18	0,07
q0 (Funcional)	13,25****	2,49	1,51
q1 (Funcional)	5,48*	0,11	0,18
q2 (Funcional)	0,76	0,29	0,39

de bosque para *N. obliqua* y en suelo de plantación para *P. ponderosa* (Tabla 2, Fig. 3A, 3B). Aunque no se encontró un efecto significativo para la competencia sobre los porcentajes de colonización, en el suelo de bosque *P. ponderosa* tendió a presentar mayores valores al crecer junto a *N. obliqua*.

Las comunidades de hongos EcM fueron diferentes entre las especies estudiadas, y el principal factor que influyó en su composición fue el tipo de suelo. La diversidad taxonómica (tanto q0 como q1 y q2) fue siempre mayor en las plantas cultivadas en el suelo de plantación (Tabla 2, Tabla 3). Las plantas de *N. obliqua* se colonizaron principalmente por *Ruhlandiella patagonica* y *Sordariomycetes* sp. en suelo de bosque (ambos ascomicetes),

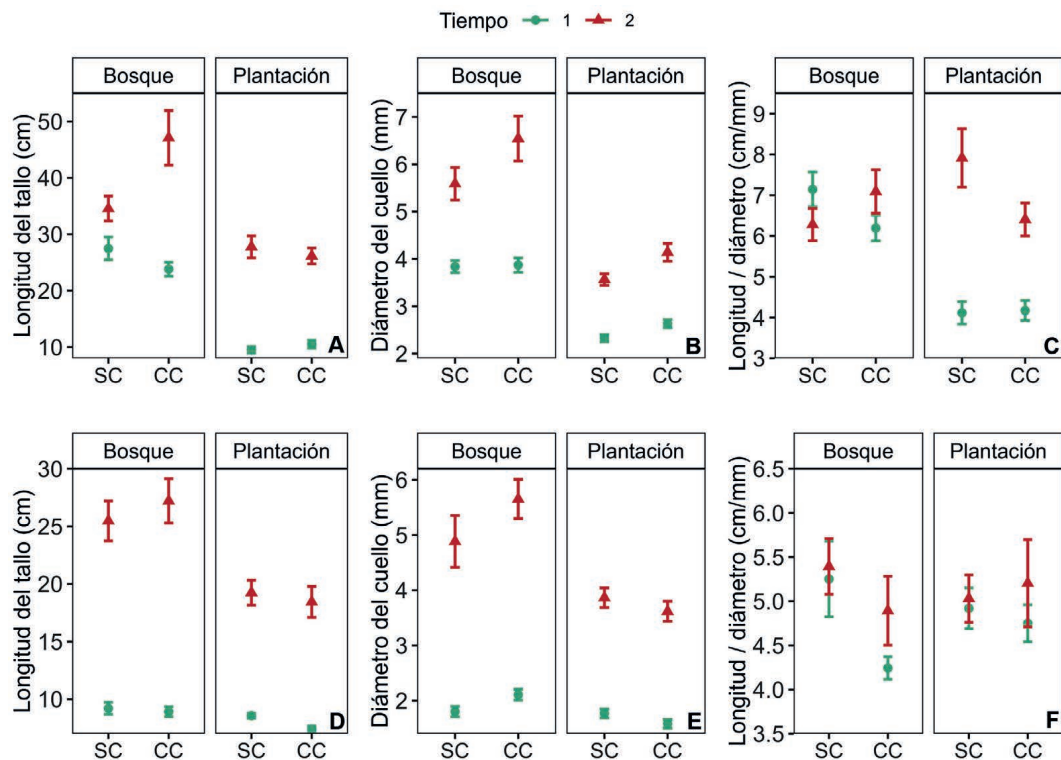


Fig. 2. Medidas morfológicas de las plantas de *Nothofagus obliqua* (A-C) y *Pinus ponderosa* (D-F) durante el primer (T1) y tercer (T2) período de crecimiento, cultivadas en suelo de bosque nativo o en suelo de plantación, junto a otro ejemplar de la misma especie (sin competencia interespecífica, SC) o de la especie contraria (con competencia interespecífica, CC). A y D: Longitud del tallo; B y E: Diámetro del cuello; C y F: relación Longitud del tallo / diámetro del cuello. Los puntos redondos indican la media para el Tiempo 1, y los triangulares para el Tiempo 2. Las barras indican el error estándar.

Fig. 2. Morphological measurements in *Nothofagus obliqua* (A-C) and *Pinus ponderosa* (D-F) plants during the first (T1) and third (T2) growth periods, cultivated in either native forest soil or plantation soil, along with another plant of the same species (without interspecific competition, SC) or from the other species (with interspecific competition, CC). A and D: Stem length; B and E: Collar diameter; C and F: Stem length / collar diameter ratio. Round points indicate the mean for Time 1 and triangular points for Time 2. Bars represent the standard error.

mientras que en suelo de plantación dominaron *Hebeloma mesophaeum*, *Tomentella ellisii* (basidiomicetes) y *Tuber borchii* (ascomicete). En *P. ponderosa* se encontró una mayor diversidad de hongos EcM asociados, dominando *Suillus luteus* (basidiomicete), *Wilcoxina mikolae*, y *Meliniomyces* sp. (ascomicetes) en suelo de bosque, mientras que en suelo de plantación los porcentajes relativos de colonización se dividieron más homogéneamente entre *W. mikolae*, *Tu. borchii*, Pyronemataceae sp. (ascomicetes), *To. ellisii*, y *Amphinema* sp. (basidiomicetes) (Fig. 3C, 3D). Por otro lado, la competencia también tuvo un efecto en las comunidades de hongos EcM asociados a estas especies, aunque menor que el suelo. Para *N. obliqua*, en suelo de bosque, aumentó la colonización relativa por Sordariomycetes sp. y se redujo en consecuencia la de *R. patagónica* (Fig. 3C). Para *P. ponderosa*, en este mismo

Tabla 3. Números de Hill (q0, q1 y q2) correspondientes a la diversidad taxonómica (especies de hongos micorrícicos, T) y funcional (F) de las ectomicorrizas encontradas en las raíces de plantas jóvenes de *Nothofagus obliqua* y *Pinus ponderosa* cultivadas en suelo de bosque nativo o en suelo de plantación junto a otro ejemplar de la misma especie (sin competencia interespecífica, SC) o de la especie contraria (con competencia interespecífica, CC). Los datos se presentan como “media (error estándar)”.

Table 3. Hill numbers (q0, q1, and q2) corresponding to the taxonomic diversity (ectomycorrhizal fungal species, T) and functional diversity (F) of ectomycorrhizas found in the roots of young *Nothofagus obliqua* and *Pinus ponderosa* plants grown in either native forest soil or plantation soil, along with another plant of the same species (without interspecific competition, SC) or from the other species (with interspecific competition, CC). Data are presented as “mean (standard error)”.

Número de Hill	Bosque		Plantación	
	SC	CC	SC	CC
<i>Nothofagus obliqua</i>				
q0 T	1,70 (0,15)	1,70 (0,15)	2,70 (0,15)	2,40 (0,22)
q1 T	1,38 (0,13)	1,39 (0,11)	2,10 (0,19)	1,67 (0,20)
q2 T	1,31 (0,12)	1,29 (0,09)	1,92 (0,20)	1,50 (0,18)
q0 F	1,80 (0,20)	1,70 (0,15)	2,20 (0,13)	2,00 (0,00)
q1 F	1,48 (0,19)	1,39 (0,11)	1,74 (0,13)	1,41 (0,09)
q2 F	1,42 (0,18)	1,30 (0,09)	1,59 (0,14)	1,30 (0,10)
<i>Pinus ponderosa</i>				
q0 T	1,40 (0,22)	0,80 (0,25)	3,10 (0,39)	3,80 (0,36)
q1 T	1,33 (0,18)	1,11 (0,08)	2,60 (0,29)	2,70 (0,23)
q2 T	1,28 (0,15)	1,12 (0,06)	2,36 (0,26)	2,32 (0,21)
q0 F	2,00 (0,21)	1,20 (0,39)	2,80 (0,25)	2,70 (0,26)
q1 F	1,59 (0,17)	1,46 (0,23)	1,94 (0,15)	1,96 (0,15)
q2 F	1,48 (0,14)	1,69 (0,24)	1,72 (0,16)	1,73 (0,13)

suelo, aumentó la colonización relativa por *W. mikolae* al cultivarse junto a *N. obliqua* (Fig. 3D). En suelo de plantación, sin embargo, no se notaron cambios considerables por la competencia en las comunidades de hongos EcM asociados a cada especie.

En relación a los grupos funcionales, en las plantas de *N. obliqua* el único tipo exploratorio que se encontró fue el de contacto. En *P. ponderosa* también dominó el tipo de contacto, aunque se registraron en menor proporción tipos exploratorios de corta y media/larga distancia. Para ambas especies se encontró que el factor que más influyó en la diversidad funcional fue el tipo de suelo, observándose mayor colonización relativa de hongos EcM con alto contenido de melanina en suelo de bosque en comparación con suelo de plantación, donde se perdieron casi por completo (Fig. 3E, 3F). Estos efectos solo se vieron en términos de q0 para *N. obliqua* y q0 y q1 para *P. ponderosa* (Tabla 2, 3). Para la diversidad funcional no se notaron, sin embargo, cambios considerables a causa de la competencia entre especies.

DISCUSIÓN

Crecimiento de las plantas

El principal factor que afectó el crecimiento (longitud de tallo y diámetro del cuello) fue el suelo utilizado para cultivar las plantas, creciendo más

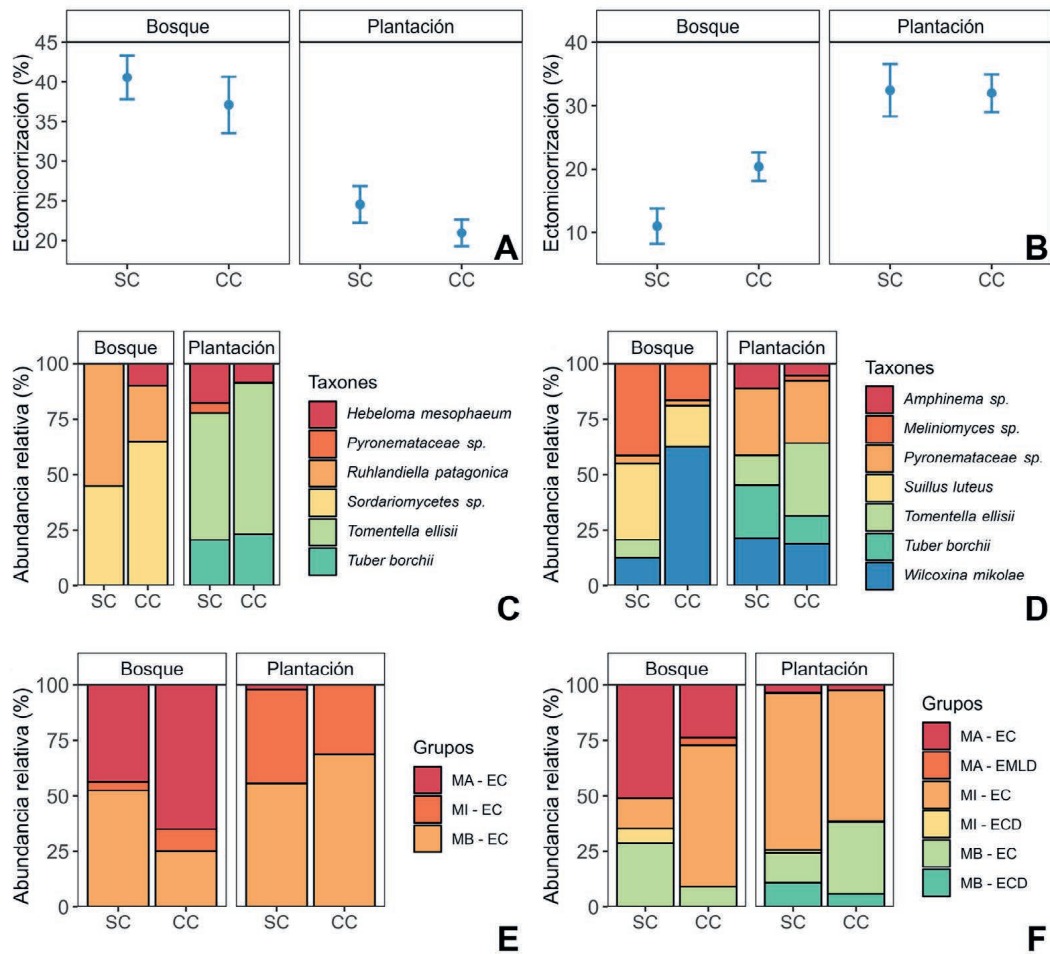


Fig. 3. Porcentaje de colonización ectomicorrízica, abundancia relativa de hongos ectomicorrízicos, y abundancia relativa de grupos funcionales de ectomicorizas en *Nothofagus obliqua* (A, C y E, respectivamente) y *Pinus ponderosa* (B, D y F, respectivamente), plantadas en suelo de bosque nativo o en suelo de plantación, en conjunto con otra planta de su misma especie (SC) o de la especie restante (CC). En A y B, los puntos indican la media y las barras el error estándar.

Fig. 3. Percentage of ectomycorrhizal colonization, relative abundance of ectomycorrhizal fungi, and relative abundance of ectomycorrhizal functional groups in *Nothofagus obliqua* (A, C, and E, respectively) and *Pinus ponderosa* (B, D, and F, respectively), planted in native forest soil or plantation soil, along with another plant of the same species (SC) or the other species (CC). In A and B, points indicate the mean and bars the standard error.

en suelo de bosque que en suelo de plantación. Estos resultados pueden atribuirse a las diferencias en el contenido de nutrientes encontradas entre ambos tipos de suelo (Huat *et al.*, 2002; Xia y Wan, 2008), los cuales fueron mucho mayores en suelo de bosque. Los resultados obtenidos contradicen la hipótesis propuesta con respecto al efecto de la competencia en el crecimiento de las especies: en lugar de que la competencia disminuyera el desarrollo, se encontró un efecto nulo o incluso positivo en algunos casos, particularmente en *N. obliqua*. Es posible que estos beneficios para *N. obliqua* se deban a que consume más recursos que la exótica (en todos los casos presentó mayor altura y diámetro de cuello que *P. ponderosa*; Craine

y Dybziński, 2013), por lo que la competencia interespecífica pudo haberle resultado más favorable que la intraespecífica (Mangla *et al.*, 2011). Una explicación alternativa, o complementaria, podría estar relacionada con que diferentes especies vegetales explotan los recursos nutricionales del suelo de maneras distintas y utilizando diferentes estrategias, reduciendo así la competencia directa entre dos especies diferentes y favoreciendo la coexistencia (Fichtner *et al.*, 2017; Adler *et al.*, 2018). Esto se ve sustentado por el hecho de que la diversidad funcional de los tipos exploratorios hallados en *P. ponderosa* haya sido mayor que en *N. obliqua*.

El hecho de que las plantas de *N. obliqua* se hayan desarrollado de manera óptima durante un período de tiempo prolongado (tres años) a la par de *P. ponderosa*, en suelos previamente dominados por plantaciones de pino, destaca la capacidad de esta especie nativa de competir y coexistir con la exótica de manera exitosa. Mejorar la fertilidad del suelo podría potenciar esta capacidad ya que, en suelo de bosque nativo donde el contenido nutricional es mayor, *N. obliqua* mostró un crecimiento superior y no se detectaron efectos negativos al coexistir con *P. ponderosa*. Estas observaciones indican que, con un manejo adecuado del suelo, una práctica común en la restauración ecológica, *N. obliqua* podría desempeñar un papel clave en la restauración de áreas modificadas por plantaciones de especies forestales exóticas (Hagen y Evju, 2013; Li *et al.*, 2013). Incluso, estos resultados destacan la potencialidad de utilizar ambas especies forestales para establecer plantaciones mixtas, las cuales tienen numerosos beneficios en relación a las monoespecíficas, como por ejemplo potenciar la productividad de la plantación hasta un 30%, junto con promover una mayor biodiversidad (Bielak *et al.*, 2015; Felton *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).

Por otro lado, las plantas de *P. ponderosa* se desarrollaron muy bien en suelo de bosque, y la competencia con *N. obliqua* no fue particularmente perjudicial para su crecimiento aún luego de tres años. Esto sugiere que esta especie de pino podría establecerse en bosques nativos sin mayores impedimentos, lo que constituye un gran riesgo desde el punto de vista de las invasiones biológicas (Liebhold *et al.*, 2017; Calviño-Cancela y van Etten, 2018). Sin embargo, es importante destacar que, bajo condiciones naturales, las plántulas de *P. ponderosa* crecerían bajo el dosel del bosque nativo y en competencia con el denso sotobosque, lo que podría impactar negativamente su éxito de establecimiento (Averett *et al.*, 2016; Gómez *et al.*, 2019). Este factor no fue considerado en el presente estudio, sin embargo, futuras investigaciones podrían abordar estas limitaciones mediante experimentos de campo en los que se evalúe el crecimiento y la supervivencia de *P. ponderosa* en condiciones más similares a las naturales, considerando la presencia de un sotobosque diverso y la sombra que generaría el dosel de un bosque de *Nothofagus*. Además, aunque este trabajo solo consideró los primeros ciclos de crecimiento de las plantas, estudios a largo plazo podrían examinar cómo perturbaciones como incendios o tala podrían afectar el establecimiento y la competencia de *P. ponderosa* con especies nativas, lo

que proporcionaría una comprensión más completa de su potencial invasivo en bosques nativos, y las limitaciones que enfrentaría en un escenario de invasión.

Asociación entre las plantas y los hongos micorrícicos

En términos de colonización micorrícica, es de destacar que ambas especies forestales encontraron hongos simbioses compatibles en los dos tipos de suelos en los que fueron cultivadas. No obstante, cada especie mostró mayores porcentajes de colonización por EcM en los suelos donde típicamente se desarrollan: suelo de bosque nativo para *N. obliqua* y suelo de plantación para *P. ponderosa*. Este patrón respalda parcialmente la hipótesis de que las plantas se asocian con mayor éxito a hongos EcM presentes en suelos dominados por especies afines. Sin embargo, e independientemente de la competencia, ambas especies se asociaron con una mayor diversidad de hongos EcM al desarrollarse en suelo de plantación. Esto se contrapone a lo esperado inicialmente, es decir, que cada especie estaría colonizada por mayor diversidad de EcM al crecer en su suelo de origen. Es posible que este resultado sea consecuencia de una mayor disponibilidad de nutrientes en suelo de bosque, especialmente nitrógeno. Una alta disponibilidad de nitrógeno, como se observó en el suelo de bosque nativo, normalmente se encuentra asociado con una riqueza y diversidad reducida de hongos EcM (Parrent et al., 2006; Avis et al., 2008).

En términos de diversidad taxonómica, a pesar de que se observaron algunas especies de hongos EcM en común entre *N. obliqua* y *P. ponderosa*, cada especie se caracterizó por un ensamble característico de simbioses, lo que era de esperarse dado que estos hongos suelen tener una alta especificidad (Bruns et al., 2002; Lofgren et al., 2018). Es importante destacar, sin embargo, que se hallaron especies de EcM en común entre ambas plantas, lo cual brinda apoyo a la hipótesis de que la especificidad de hongos EcM es más flexible de lo que se considera en la actualidad (Pérez-Pazos et al., 2021). Por otro lado, cada especie se asoció a comunidades fúngicas compuestas por diferentes hongos EcM al ser cultivadas en los diferentes suelos evaluados. Ello se debe, por un lado, a que la comunidad de plantas que domina un determinado sitio modela las comunidades de hongos micorrícicos presentes (Tedersoo et al., 2012; van der Linde et al., 2018; Eagar et al., 2022). Por el otro, debe tenerse en cuenta que las condiciones nutricionales de cada suelo eran muy diferentes, por lo que es de esperar que las comunidades de microorganismos que se desarrollen en ellos también varíen considerablemente. Esto es así dado que deben adaptarse a diferentes condiciones ambientales y estrategias de adquisición de recursos (van der Linde et al., 2018). Además, es posible que haya una menor diversidad taxonómica de hongos EcM colonizando las raíces de ambas especies en

suelo de bosque nativo debido a su alto contenido de nutrientes, lo cual ha demostrado disminuir la riqueza y diversidad de estos hongos (Parrent *et al.*, 2006; Avis *et al.*, 2008).

La diversidad funcional también mostró patrones particulares. En términos generales, en las plantas cultivadas en suelos de plantación se halló mayor diversidad de grupos funcionales de EcM, aunque este efecto no fue uniforme en todas las métricas de diversidad funcional, sino que solo se notó en aquellas que otorgan más peso a los grupos menos abundantes. También es de destacar el cambio en los grupos funcionales según el tipo de suelo. Específicamente, las plantas, tanto de *N. obliqua* como de *P. ponderosa*, cultivadas en suelo de plantación casi no presentaron colonización por hongos EcM con alto contenido de melanina. Una de las posibles razones para este fenómeno es que, si bien estos hongos EcM son importantes en suelos con limitaciones de nutrientes o agua, como el de la plantación, también es cierto que su formación requiere mayor costo energético, porque lo que puede que las plantas no posean los recursos necesarios para sostener estas simbiosis de alto costo (Netherway y Bahram, 2024). Dado que estos hongos simbioses en particular son fundamentales para enfrentar condiciones de estrés hídrico, su ausencia en suelos de plantación podría representar un desafío para restauraciones futuras con *N. obliqua* (Fernandez y Koide, 2013; Netherway y Bahram, 2024). Por lo tanto, para optimizar los esfuerzos de restauración en zonas previamente dominadas por plantaciones de pino o bien para establecer plantaciones mixtas, podría ser necesario introducir un inóculo ectomicorrícico que incluya hongos funcionalmente adaptados a estas condiciones, especialmente aquellos que proporcionen tolerancia al estrés hídrico (Asmelash *et al.*, 2016; Neuenkamp *et al.*, 2019). De este modo, se podrían incrementar las probabilidades de éxito en la reintroducción de *N. obliqua* y otras especies nativas en suelos alterados.

CONCLUSIONES

En este estudio se evaluó cómo el origen del suelo y la competencia entre especies afectan el crecimiento de *Nothofagus obliqua* y *Pinus ponderosa*, así como sus asociaciones ectomicorrícicas y la diversidad fúngica en sus raíces. Encontramos que el origen del suelo desempeñó un papel central en el desarrollo de ambas especies, con un mejor crecimiento en suelo de bosque nativo que en suelo de plantación. Aunque esperábamos que la competencia redujera el crecimiento, los efectos observados fueron nulos o incluso positivos. Se observó que *N. obliqua* mostró una mayor capacidad de adaptación a condiciones de competencia directa, beneficiándose de la misma, mientras que *P. ponderosa* creció sin impedimentos ni beneficios al cultivarse junto a *N. obliqua*. A nivel de simbioses, observamos un claro impacto de las plantas dominantes en la composición de las comunidades de hongos EcM, aunque ambas especies mostraron la capacidad de encontrar

simbiontes compatibles en ambos tipos de suelo, e incluso compartieron algunos de ellos. La falta de hongos EcM melanizados en suelos de plantación es notoria y sería importante avanzar en el estudio de este fenómeno, particularmente porque podría afectar negativamente el establecimiento de especies forestales de interés, ya sea desde una perspectiva económica (plantaciones) o ecológica (restauración). Nuestros resultados resaltan el potencial de *N. obliqua* como una especie clave para la restauración de bosques modificados por plantaciones de pino, mientras que también sugieren que *P. ponderosa* podría invadir bosques nativos al encontrar los simbiontes necesarios para su desarrollo, en ninguno de los casos viéndose limitadas por la competencia entre ellas.

AGRADECIMIENTOS

Al INTA EEA Bariloche por su apoyo en el desarrollo de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, P. B., Smull, D., Beard, K. H., Choi, R. T., Furniss, T., Kulmatiski, A., Meiners, J. M., Tredennick, A. T. y Veblen, K. E. (2018). Competition and coexistence in plant communities: Intraspecific competition is stronger than interspecific competition. *Ecology Letters* 21 (9): 1319-1329. <https://doi.org/10.1111/ele.13098>
- Agerer, R. (Ed.). (1987). Colour atlas of ectomycorrhizae: With glossary. Delivery 2 (1th-5th del eds.). Einhorn-Verl. Dietscher.
- Agerer, R. (2001). Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11 (2): 107-114. <https://doi.org/10.1007/s005720100108>
- Asmelash, F., Bekele, T. y Birhane, E. (2016). The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in the restoration of degraded lands. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01095>
- Averett, J. P., McCune, B., Parks, C. G., Naylor, B. J., DelCurto, T. y Mata-González, R. (2016). Non-native plant invasion along elevation and canopy closure gradients in a middle rocky mountain ecosystem. *PLOS ONE* 11 (1): e0147826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147826>
- Avis, P. G., Mueller, G. M. y Lussenhop, J. (2008). Ectomycorrhizal fungal communities in two North American oak forests respond to nitrogen addition. *New Phytologist* 179 (2): Article 2. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02491.x>

- Azpilicueta, M. M., Gallo, L. A., Martinez, A., Varela, S. y others. (2010). Manual de viverización, cultivo y plantación de roble pellín en el norte de la región andino patagónica. 1a. edición. Buenos Aires: INTA.
- Barroetaveña, C., Salomón, M. E. S. y Bassani, V. (2019). Rescuing the ectomycorrhizal biodiversity associated with South American Nothofagaceae forest, from the 19th century naturalists up to molecular biogeography. *Forestry: An International Journal of Forest Research* 92 (5): Article 5. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpz047>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67 (1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bielak, K., Dudzinska, M. y Pretzsch, H. (2015). Volume growth of mixed-species versus pure stands: Results from selected long-term experimental plots in Central Europe. *Sylvan* 159: 22-35.
- Bruns, T. D., Bidartondo, M. I. y Taylor, D. L. (2002). Host specificity in ectomycorrhizal communities: What do the exceptions tell us?1. *Integrative and Comparative Biology* 42 (2): 352-359. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.352>
- Calviño-Cancela, M. y van Etten, E. J. B. (2018). Invasive potential of *Eucalyptus globulus* and *Pinus radiata* into native eucalypt forests in Western Australia. *Forest Ecology and Management* 424: 246-258. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.05.001>
- Craine, J. M. y Dybzinski, R. (2013). Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Functional Ecology* 27 (4): 833-840. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12081>
- Dickie, I. A., Bolstridge, N., Cooper, J. A. y Peltzer, D. A. (2010). Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187 (2): 475-484. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03277.x>
- Donoso Zegers, C. (2006). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: Autoecología (1a ed.). Marisa Cuneo Ediciones.
- Eagar, A. C., Mushinski, R. M., Horning, A. L., Smemo, K. A., Phillips, R. P. y Blackwood, C. B. (2022). Arbuscular mycorrhizal tree communities have greater soil fungal diversity and relative abundances of saprotrophs and pathogens than ectomycorrhizal tree communities. *Applied and Environmental Microbiology* 88 (1): e01782-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01782-21>
- Felton, A., Nilsson, U., Sonesson, J., Felton, A. M., Roberge, J.-M., Ranius, T., Ahlström, M., Bergh, J., Björkman, C., Boberg, J., Drössler, L., Fahlvik, N., Gong, P., Holmström, E., Keskitalo, E. C. H., Klapwijk, M. J., Laudon, H., Lundmark, T., Niklasson, M., ... Wallertz, K. (2016). Replacing monocultures with mixed-species stands: Ecosystem service implications of two production forest alternatives in Sweden. *Ambio* 45 (2): 124-139. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0749-2>

- Fernandez, C. W. y Koide, R. T. (2013). The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology* 6 (6): 479-486. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.08.004>
- Fernández, N. V., Marchelli, P., Gherghel, F., Kost, G. y Fontenla, S. B. (2015). Ectomycorrhizal fungal communities in *Nothofagus nervosa* (Raulí): A comparison between domesticated and naturally established specimens in a native forest of Patagonia, Argentina. *Fungal Ecology* 18: 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.05.011>
- Fichtner, A., Härdtle, W., Li, Y., Bruehlheide, H., Kunz, M. y von Oheimb, G. (2017). From competition to facilitation: How tree species respond to neighbourhood diversity. *Ecology Letters* 20 (7): 892-900. <https://doi.org/10.1111/ele.12786>
- Floriani, F. D., El Mujtar, V., Mateo, C., Sola, G., Peñalba, M. G., Sbrancia, R., Marchelli, P. y Fernández, N. V. (2024). Site conditions shaped the effect of silvicultural management on the biodiversity of ectomycorrhizal fungi in mixed *Nothofagus* forests. *Forest Ecology and Management* 563: 121981. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.121981>
- Galarco, S. P. y Ramilo, D. I. (2020). Plantaciones forestales en Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/101543>
- Gazol, A., Zobel, M., Cantero, J. J., Davison, J., Esler, K. J., Jairus, T., Öpik, M., Vasar, M. y Moora, M. (2016). Impact of alien pines on local arbuscular mycorrhizal fungal communities—Evidence from two continents. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (6): fiw073. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw073>
- Gioria, M., Pyšek, P. y Osborne, B. A. (2018). Timing is everything: Does early and late germination favor invasions by herbaceous alien plants?. *Journal of Plant Ecology* 11 (1): 4-16. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtw105>
- Gómez, P., Murúa, M., Martín, J. S., Goncalves, E. y Bustamante, R. O. (2019). Maintaining close canopy cover prevents the invasion of *Pinus radiata*: Basic ecology to manage native forest invasibility. *PLOS ONE* 14 (5): e0210849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210849>
- Grand, L. F. y Harvey A. E. (1982). Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots. En: Schenk, N. C. (ed.), *Method and principles of mycorrhizal research*. APS Press. St. Paul, Minnesota, pp: 157-164.
- Haase, D. L. (2008). Understanding forest seedling quality: Measurements and interpretation. *Tree Planters' Notes* 52 (2): Article 2.
- Hagen, D. y Evju, M. (2013). Using Short-Term Monitoring Data to Achieve Goals in a Large-Scale Restoration. *Ecology and Society* 18 (3). <https://www.jstor.org/stable/26269355>
- Hartig, F. (2020). DHARMA: Residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. R package version 0.3, 3.
- Hill, M. O. (1973). Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 54 (2): 427-432. <https://doi.org/10.2307/1934352>

- Huat, O. K., Awang, K., Hashim, A. y Majid, N. M. (2002). Effects of fertilizers and vesicular–arbuscular mycorrhizas on the growth and photosynthesis of *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs seedlings. *Forest Ecology and Management* 158 (1-3): Article 1-3. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00668-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00668-X)
- Iannone, B. V., Potter, K. M., Hamil, K.-A. D., Huang, W., Zhang, H., Guo, Q., Oswalt, C. M. y Woodall, C. W. Fei, S. (2016). Evidence of biotic resistance to invasions in forests of the Eastern USA. *Landscape Ecology* 31 (1): 85-99. <https://doi.org/10.1007/s10980-015-0280-7>
- Izumi, H. (2024). Abundances of ectomycorrhizal exploration types show the type-dependent temporal dynamics over the seasons—A controlled growth container experiment. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00573-z>
- Janowski, D. y Leski, T. (2023). Methods for identifying and measuring the diversity of ectomycorrhizal fungi. *Forestry: An International Journal of Forest Research* 96 (5): 639-652. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpad017>
- Jo, I., Potter, K. M., Domke, G. M. y Fei, S. (2018). Dominant forest tree mycorrhizal type mediates understory plant invasions. *Ecology Letters* 21 (2): 217-224. <https://doi.org/10.1111/ele.12884>
- Jonášová, M., van Hees, A. y Prach, K. (2006). Rehabilitation of monotonous exotic coniferous plantations: A case study of spontaneous establishment of different tree species. *Ecological Engineering* 28 (2): 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.05.008>
- Kiær, L. P., Weisbach, A. N. y Weiner, J. (2013). Root and shoot competition: A meta-analysis. *Journal of Ecology* 101 (5): 1298-1312. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12129>
- Kozioł, L., Schultz, P. A., House, G. L., Bauer, J. T., Middleton, E. L. y Bever, J. D. (2018). The Plant Microbiome and Native Plant Restoration: The Example of Native Mycorrhizal Fungi. *BioScience* 68 (12): 996-1006. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy125>
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P. y Herve, M. (2018). emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means (R package, Version 1.4)[Computer software].
- Li, D. (2018). hillR: Taxonomic, functional, and phylogenetic diversity and similarity through Hill Numbers. *Journal of Open Source Software* 3 (31): 1041. <https://doi.org/10.21105/joss.01041>
- Li, S., Di, X., Wu, D. y Zhang, J. (2013). Effects of sewage sludge and nitrogen fertilizer on herbage growth and soil fertility improvement in restoration of the abandoned opencast mining areas in Shanxi, China. *Environmental Earth Sciences* 70 (7): 3323-3333. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2397-9>
- Liebold, A. M., Brockerhoff, E. G., Kalisz, S., Nuñez, M. A., Wardle, D. A. y Wingfield, M. J. (2017). Biological invasions in forest ecosystems. *Biological Invasions* 19 (11): 3437-3458. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1458-5>

- Lofgren, L., Nguyen, N. H. y Kennedy, P. G. (2018). Ectomycorrhizal host specificity in a changing world: Can legacy effects explain anomalous current associations?. *New Phytologist* 220 (4): 1273-1284. <https://doi.org/10.1111/nph.15008>
- López-García, Á., Gil-Martínez, M., Navarro-Fernández, C. M., Kjølner, R., Azcón-Aguilar, C., Domínguez, M. T. y Marañón, T. (2018). Functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities is reduced by trace element contamination. *Soil Biology and Biochemistry* 121: 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.03.021>
- Mangla, S., Sheley, R. L., James, J. J. y Radosovich, S. R. (2011). Intra and interspecific competition among invasive and native species during early stages of plant growth. *Plant Ecology* 212 (4): 531-542. <https://doi.org/10.1007/s11258-011-9909-z>
- Martin, D. M. (2017). Ecological restoration should be redefined for the twenty-first century. *Restoration Ecology* 25 (5): 668-673. <https://doi.org/10.1111/rec.12554>
- Martin, K. J. y Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5 (1): Article 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Martínez-Ramos, M., Pingarrón, A., Rodríguez-Velázquez, J., Toledo-Chelala, L., Zermeno-Hernández, I. y Bongers, F. (2016). Natural forest regeneration and ecological restoration in human-modified tropical landscapes. *Biotropica* 48 (6): 745-757. <https://doi.org/10.1111/btp.12382>
- Menzel, A., Hempel, S., Klotz, S., Moora, M., Pyšek, P., Rillig, M. C., Zobel, M. y Kühn, I. (2017). Mycorrhizal status helps explain invasion success of alien plant species. *Ecology* 98 (1): 92-102. <https://doi.org/10.1002/ecy.1621>
- Netherway, T. y Bahram, M. (2024). Melanized root-associated fungi: Key players in plant–soil systems. *Trends in Microbiology* 32 (12): 1190-1199. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.06.006>
- Neuenkamp, L., Prober, S. M., Price, J. N., Zobel, M. y Standish, R. J. (2019). Benefits of mycorrhizal inoculation to ecological restoration depend on plant functional type, restoration context and time. *Fungal Ecology* 40: 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.05.004>
- Ni, M., Liu, Y., Chu, C., Xu, H. y Fang, S. (2018). Fast seedling root growth leads to competitive superiority of invasive plants. *Biological Invasions* 20 (7): 1821-1832. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1664-9>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Cáceres, M. D., Durand, S., ... Weedon, J. (2024). *vegan: Community Ecology Package (Versión 2.6-8)* [Software]. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

- Orrock, J. L., Witter, M. S. y Reichman, O. J. (2008). Apparent Competition with an Exotic Plant Reduces Native Plant Establishment. *Ecology* 89 (4): 1168-1174. <https://doi.org/10.1890/07-0223.1>
- Parrent, J. L., Morris, W. F. y Vilgalys, R. (2006). CO₂-enrichment and nutrient availability alter ectomycorrhizal fungal communities. *Ecology* 87 (9): Article 9. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2278:CANAAE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2278:CANAAE]2.0.CO;2)
- Pauchard, A., García, R., Zalba, S., Sarasola, M., Zenni, R., Ziller, S. y Nuñez, M. A. (2016). 14. Pine Invasions in South America: Reducing Their Ecological Impacts Through Active Management. En J. Canning-Clode (Ed.), *Biological Invasions in Changing Ecosystems: Vectors, Ecological Impacts, Management and Predictions* (pp. 318–342). De Gruyter Open Poland. <https://doi.org/10.1515/9783110438666-020>
- Pellitier, P. T., Van Nuland, M., Salamov, A., Grigoriev, I. V. y Peay, K. G. (2024). Potential for functional divergence in ectomycorrhizal fungal communities across a precipitation gradient. *ISME Communications* 4 (1): ycae031. <https://doi.org/10.1093/ismeco/ycae031>
- Pérez-Pazos, E., Certano, A., Gagne, J., Lebeuf, R., Siegel, N., Nguyen, N. y Kennedy, P. G. (2021). The slippery nature of ectomycorrhizal host specificity: *Suillus* fungi associated with novel pinoid (*Picea*) and abietoid (*Abies*) hosts. *Mycologia* 113: 891-901. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1921525>
- R Core Team. (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Sabatier, Y., Azpilicueta, M. M., Marchelli, P., González-Peñalba, M., Lozano, L., García, L., Martínez, A., Gallo, L. A., Umaña, F., Bran, D. y Pastorino, M. J. (2011). Distribución natural de *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua* (Nothofagaceae) en Argentina, dos especies de primera importancia forestal de los bosques templados norpatagónicos. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46 (1-2): 131-138.
- Sapsford, S. J., Wakelin, A., Peltzer, D. A. y Dickie, I. A. (2022). Pine invasion drives loss of soil fungal diversity. *Biological Invasions* 24 (2): 401-414. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02649-7>
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Souza-Alonso, P., Saiz, G., García, R. A., Pauchard, A., Ferreira, A. y Merino, A. (2022). Post-fire ecological restoration in Latin American forest ecosystems: Insights and lessons from the last two decades. *Forest Ecology and Management* 509: 120083. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120083>
- Suz, L. M., Kallow, S., Reed, K., Bidartondo, M. I. y Barsoum, N. (2017). Pine mycorrhizal communities in pure and mixed pine-oak forests: Abiotic environment trumps neighboring oak host effects. *Forest Ecology and Management* 406: 370-380. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.09.030>

- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., Smith, M. E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., ... Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346 (6213): Article 6213. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diédhiou, A. G., Henkel, T. W., Kjøller, R., Morris, M. H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K. G., Põlme, S., Ryberg, M., Smith, M. E. y Kõljalg, U. (2012). Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi: Global metastudy of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21 (17): Article 17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05602.x>
- Theoharides, K. A. y Dukes, J. S. (2007). Plant invasion across space and time: Factors affecting nonindigenous species success during four stages of invasion. *New Phytologist* 176 (2): 256-273. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02207.x>
- van der Linde, S., Suz, L. M., Orme, C. D. L., Cox, F., Andreae, H., Asi, E., Atkinson, B., Benham, S., Carroll, C., Cools, N., De Vos, B., Dietrich, H.-P., Eichhorn, J., Gehrmann, J., Grebenc, T., Gweon, H. S., Hansen, K., Jacob, F., Kristöfel, F., ... Bidartondo, M. I. (2018). Environment and host as large-scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature* 558 (7709): Article 7709. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0189-9>
- Wu, D., Zhang, M., Peng, M., Sui, X., Li, W. y Sun, G. (2019). Variations in Soil Functional Fungal Community Structure Associated With Pure and Mixed Plantations in Typical Temperate Forests of China. *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01636>
- Xia, J. y Wan, S. (2008). Global response patterns of terrestrial plant species to nitrogen addition. *New Phytologist* 179 (2): Article 2. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02488.x>
- Zamorano-Elgueta, C., Rey Benayas, J. M., Cayuela, L., Hantson, S. y Armenteras, D. (2015). Native forest replacement by exotic plantations in southern Chile (1985–2011) and partial compensation by natural regeneration. *Forest Ecology and Management* 345: 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.02.025>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

NOTE

Powdery mildew of oak (*Quercus robur*) caused by *Erysiphe alphitoides* in the Northwest of Argentina

Oídio del roble (*Quercus robur*) causado por *Erysiphe alphitoides* en el Noroeste de Argentina

Ibiris, Martín A.¹; Castillo, Lucas A.¹; Suárez, Guillermo M.^{1,2*}

¹ Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (T4000JFE) San Miguel de Tucumán, Argentina.

² Unidad Ejecutora Lillo (CONICET – Fundación Miguel Lillo). Miguel Lillo 251, (T4000JFE) San Miguel de Tucumán, Argentina.

* Corresponding author: <suarezgm@csnat.unt.edu.ar>

Abstract

The common oak, although infrequently, can be found as urban trees in the cities of northwestern Argentina. Between late 2023 and early 2024, leaves of *Quercus robur* exhibiting typical symptoms of powdery mildew were collected from three provinces in this region. Based on its morphological characteristics, host specificity, and the available descriptions, the fungus was identified as *Erysiphe alphitoides* in the asexual phase. This represents the first report of this fungus in northwestern Argentina. The symptoms of the disease, as well as the morphological characteristics of the anamorph are described and illustrated.

Keywords: Anamorph; biological control; Erysiphaceae; *Erysiphe*; hyperparasite; *Quercus*.

Resumen

El roble común está presente, aunque de forma infrecuente, en el arbolado urbano de las ciudades del noroeste argentino. Entre finales del 2023 y principios del 2024 se colectaron hojas de *Quercus robur* que presentaban los síntomas típicos de un oídio en tres provincias de esta

➤ Ref. bibliográfica: Ibiris, M. A.; Castillo, L. A.; Suárez, G. M. 2025. Powdery mildew of oak (*Quercus robur*) caused by *Erysiphe alphitoides* in the Northwest of Argentina. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 45-52. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2023>

➤ Recibido: 30 de enero 2025 – Aceptado: 3 de abril 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.



OPEN ACCESS

➤ URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

➤ Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

región. El hongo se identificó en función de sus características morfológicas, su hospedador y consultando descripciones disponibles como la fase asexual de *Erysiphe alphitoides*. Este es el primer reporte de este hongo para el noroeste argentino. Se describen e ilustran los síntomas de la enfermedad y las características morfológicas del anamorfo.

Palabras clave: Anamorfo; control biológico; Erysiphaceae; *Erysiphe*; Roble.

INTRODUCTION

Quercus robur L. (Fagaceae), known as the “common oak” or “European oak”, is a tree native to the northern hemisphere, specifically Europe and Western Asia. It has been introduced to various regions around the world, including Argentina, where is occasionally found in urban areas as an ornamental species. In late 2023, typical symptoms of powdery mildew were observed on the foliage of *Q. robur* specimens in different locations within the province of Tucumán, Argentina. In these infected specimens, whitish, powdery spots were noted on both the abaxial and adaxial surfaces. Following this discovery, similar symptoms were also observed in oak specimens from the neighboring provinces of Catamarca and Santiago del Estero.

Based on the observed morphological characteristics and the host plant, the infection was identified as being caused by the anamorph of *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam. This powdery mildew species is known to cause significant foliar diseases in oaks, including *Q. robur* (Takamatsu *et al.*, 2007). Originally described in France under the name *Microsphaera alphitoides* (Griffon & Maublanc, 1912), it is well-documented and widely spread across Europe (Bradshaw *et al.*, 2022; Takamatsu *et al.*, 2007). In Argentina, however, it was only recorded in Buenos Aires (Marchionatto, 1944; Braun *et al.*, 2000) and Río Negro (Havrylenko, 1995; Takamatsu *et al.*, 2007).

This is the first report of *E. alphitoides* causing powdery mildew on oak trees in northwestern Argentina (Tucumán, Catamarca, and Santiago del Estero). The symptoms of the disease and the morphological characteristics of the anamorph are described and illustrated herein.

MATERIALS AND METHODS

Over 250 leaves from adult *Quercus robur* individuals were collected from various public spaces across Tucumán Province. Additionally, samples were gathered from infected plant communities in Catamarca and Santiago del Estero.

The collected leaves were first examined with a magnifying glass to identify symptoms of powdery mildew. Subsequently, fungal samples were extracted from the infected leaves and placed in water for further examination under the optical microscope. At least 30 measurements of conidiophores, pycnidia, and conidia were recorded. Reference specimens are housed in the fungal collection at Fundación Miguel Lillo (LIL).

RESULTS

Erysiphe alphitoides (Griff. & Maubl.) U. Braun & S. Takam.,
Schlechtendalia 4: 5, 2000.
≡ *Microsphaera alphitoides* Griff. & Maubl.,
Bull. Soc. Mycol. France 28: 103, 1912. (Fig. 1, 2)

Symptoms.— Colonies of powdery mildew were observed on both the abaxial and adaxial surfaces of leaves, with predominance on the upper surface. The infection appeared in either an effuse or patchy manner. The frequency and severity of infection by *E. alphitoides* varied with the age of the leaf. Infections were more pronounced on shoots, branches, and new leaves. Younger leaves exhibited symptoms such as malformations and curling of leaf edges. However, infected trees did not show signs of defoliation. Older, fully developed leaves displayed only minimal symptoms of powdery mildew (Fig. 1).

Microscopic Characteristics.— Mycelium amphigenous, mainly epiphyllous, in white patches or effuse, persistent on the upper leaf surface. Hyphae branched, septate, hyaline, thin-walled, smooth or almost so. Appressoria lobed, solitary or in opposite pairs. Anamorph abundant. Conidiophores arising terminally from the mother cell, mostly central, erect, straight, rarely curved or flexuous, $31.25\text{--}50(-75) \mu\text{m}$, on the lower leaf surface often longer, foot-cells cylindrical, $18.75\text{--}31.25 \mu\text{m}$, followed by 1–3 shorter cells. Conidia solitary, primary conidia obovoid-ellipsoid, apex rounded, base subtruncate $28.75\text{--}37.5(-40) \times 12.5\text{--}13.75 \mu\text{m}$, secondary conidia doliiform when mature $31.25\text{--}37.5(-40) \times 16.25\text{--}18.75 \mu\text{m}$, ends truncate or subtruncate, immature ones sometimes ellipsoid-cylindrical, germ tubes terminal to subterminal, short to moderately long, usually terminating with a lobed appressorium (Fig. 2).

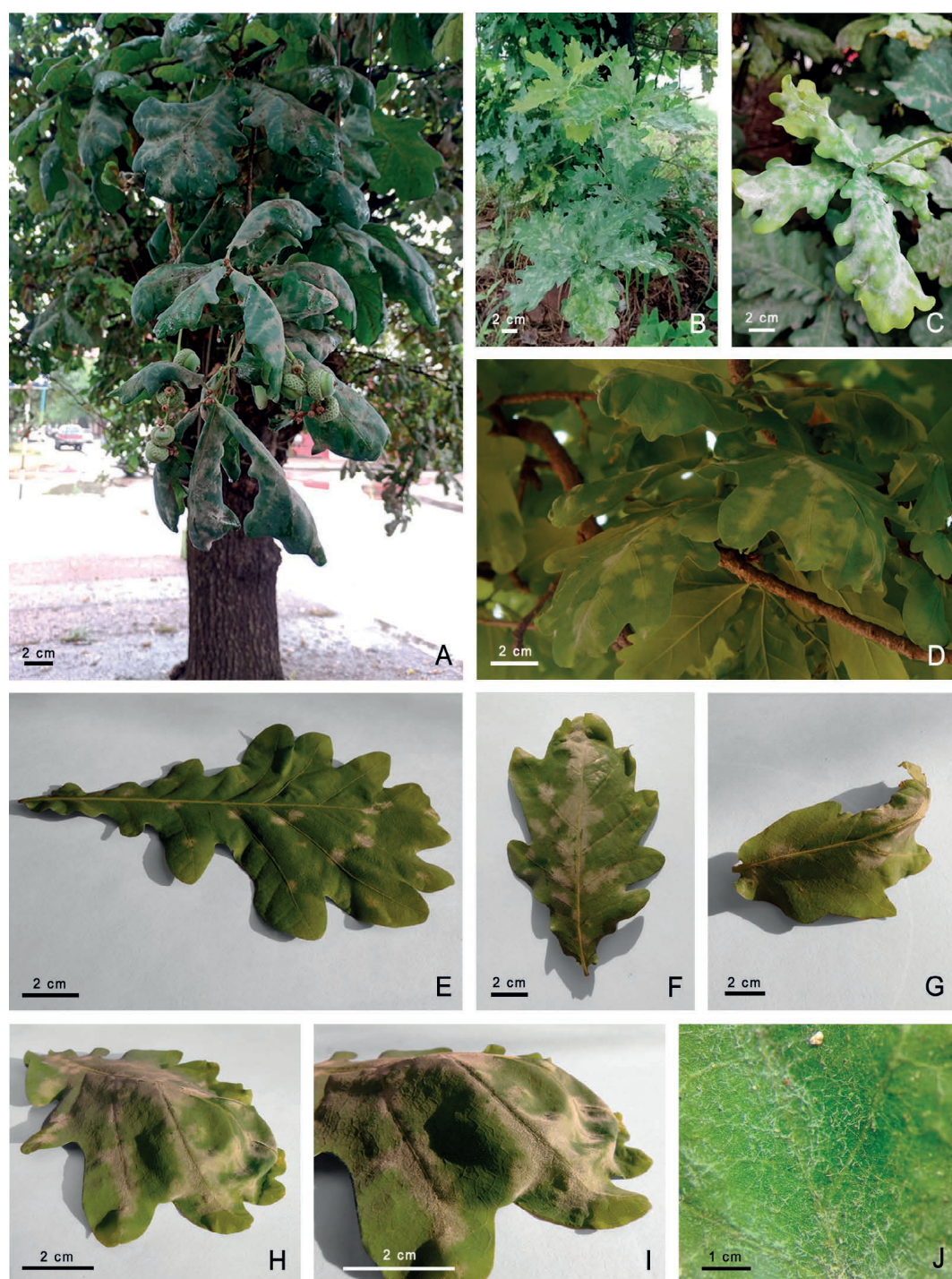


Fig. 1. *Quercus robur* parasited by *Erysiphe alphitoides* (samples from Tucumán). A-D) Symptomatic leaves on trees. E-J) Symptomatic leaves.

Fig. 1. *Quercus robur* parasited by *Erysiphe alphitoides* (muestras de Tucumán). A-D) Hojas sintomáticas sobre los árboles. E-J) Hojas sintomáticas.

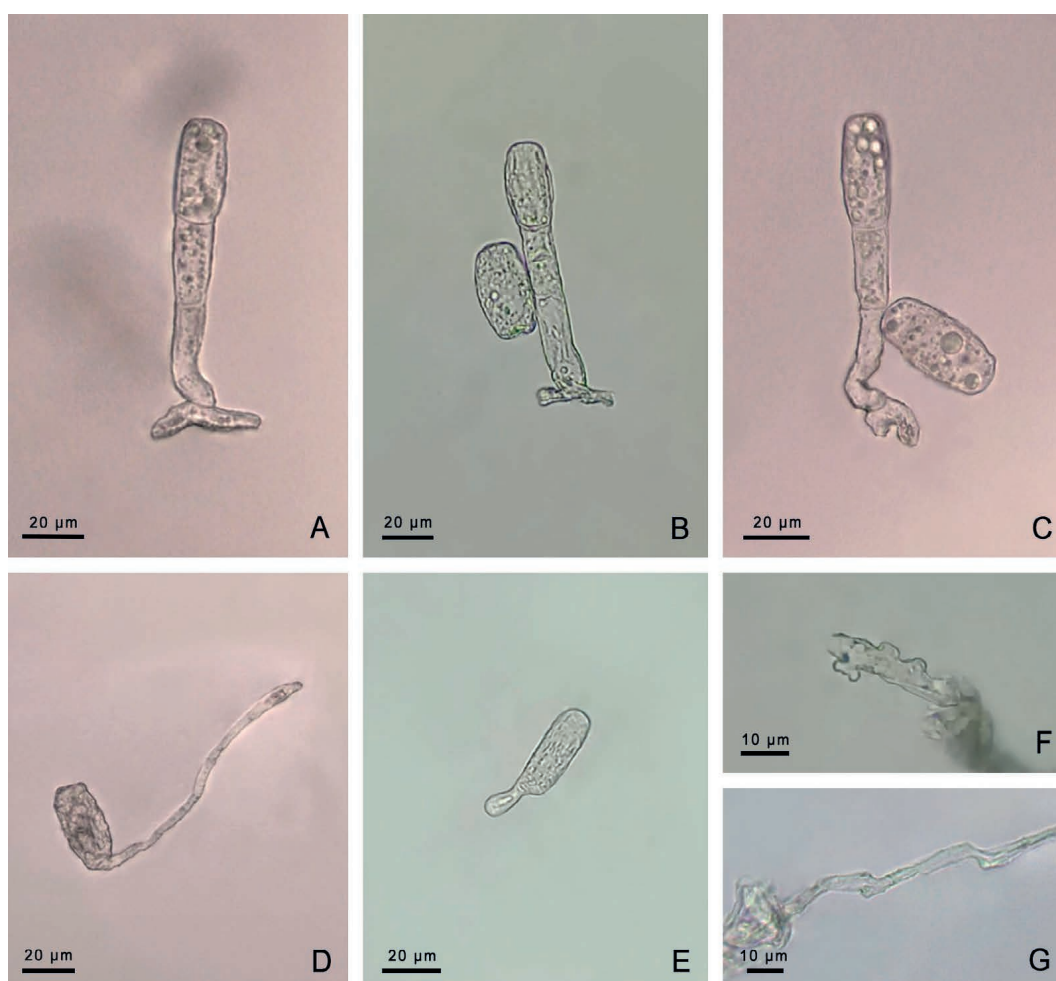


Fig. 2. *Erysiphe alphitoides*. A) Conidiophore with primary conidia. B, C) Conidiophores with primary conidia and secondary conidia free. D, E) Conidia with germ tubes. F, G) Appressoria.

Fig. 2. *Erysiphe alphitoides*. A) Conidióforo con conidio primario. B, C) Conidióforos con conidio primario y conidio secundario libre. D, E) Conidios con tubo de germinación. F, G) Apresorios.

Comments.— Under the optical microscope, *Ampelomyces* sp. (Phaeosphaeriaceae) was observed in close association with the mycelium of *Erysiphe alphitoides* (Fig. 3). *Ampelomyces* is a common intracellular mycoparasite of powdery mildew, and it was found affecting the hyphae, conidiophores, and conidia of *E. alphitoides*. This hyperparasite is of both ecological and economic significance. It has recently been reported in the province, where it was observed parasitizing specimens of *Erysiphe platani* (Castillo & Suárez, 2023).

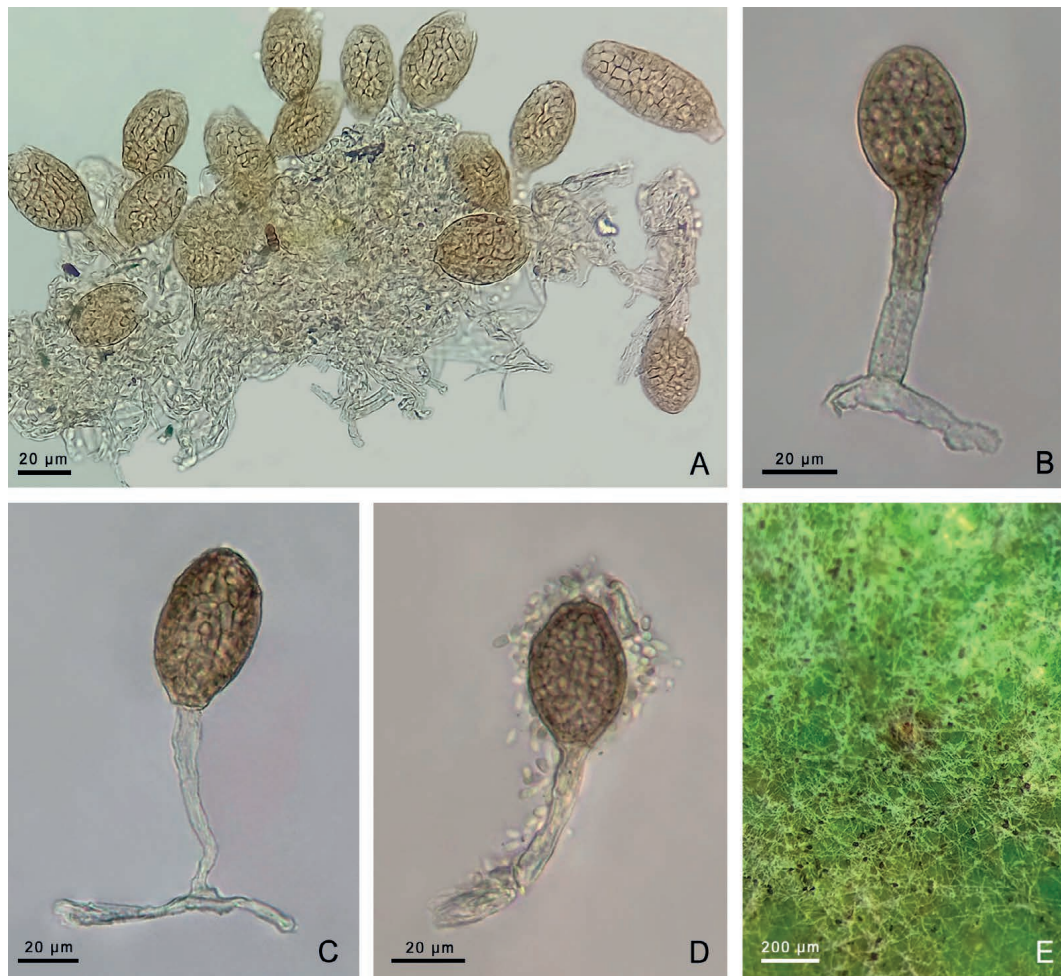


Fig. 3. Pycnidia of *Ampelomyces* sp. A) General view of numerous pycnidia. B, C) pycnidia. D) Pycnidium globose liberating conidia. E) General view of numerous pycnidia hyperparasitizing *Quercus robur*.

Fig. 3. Pycnidios de *Ampelomyces* sp. A) Vista general de numerosos picnidios. B, C) Picnidios. D) Picnidio globoso liberando conidios. E) Vista general de numerosos picnidios hiperparasitando *Quercus robur*.

In *Erysiphe alphetoides* the infection by *Ampelomyces* sp. occurred on colonies of the powdery mildew that developed on leaves of *Quercus robur*. The detected hyperparasite was observed inside the powdery mildew hyphae causing alterations and deformation. Pycnidia were dark brown to light brown colored, showed diverse morphology (globose, elongated or fusiform) with variable size, according to each shape. When spherical they measured $31.25\text{--}43.75\text{ }(-56.25) \times (-15)\text{ }18.75\text{--}27.5\text{ }(-31.25)\text{ }\mu\text{m}$, and the elongated to fusiform $(-60)\text{ }65\text{--}100 \times 22.5\text{--}27.5\text{ }(-31.25)\text{ }\mu\text{m}$. The pycnidia produced abundant ellipsoid to oblong hyaline conidia $6.25\text{ }(-7.50) \times 2.50\text{ }(-3.75)\text{ }\mu\text{m}$.

Selected Specimens examined (all on *Quercus robur* infected with *Erysiphe alphetoides*).— ARGENTINA. Catamarca, Dpto. San Fernando del Valle de Catamarca (av. Belgrano 462), $28^{\circ}27'37.8''\text{S } 65^{\circ}46'51.9''\text{W}$, 527 m snm, 20-IX-2023, L. Castillo & M. Ibris 2009 (LIL 161000); Dpto. El Alto, Guayamba (frente a la capilla), $28^{\circ}20'39.7''\text{S } 65^{\circ}23'53.3''\text{W}$, 1,066 m snm, 12-III-2024, F. Moreno s/n (LIL 161002); (calle a Las Ollas), $28^{\circ}20'39''\text{S } 65^{\circ}23'49''\text{W}$, 1,066 m snm, 12-III-2024, F. Moreno s/n (LIL 161001); $28^{\circ}20'42''\text{S } 65^{\circ}23'48''\text{W}$, 1,064 m snm, 12-III-2024, F. Moreno s/n (LIL 161003). Santiago del Estero, Dpto. Capital, Ciudad de Santiago del Estero, Barrio Juramento (calle Vinará y Av. Moreno), $27^{\circ}48'56.1''\text{S } 64^{\circ}14'59.6''\text{W}$, 184 m snm, 21-III-2024, Roger s/n (LIL 161004). Tucumán, Dpto. San Miguel de Tucumán (calle Carlos Pellegrini 70), $26^{\circ}49'38.5''\text{S } 65^{\circ}13'35.4''\text{W}$, 446 m snm, 23-X-2024, G. Suárez & M. Ibris 2010 (LIL 161005); (calle Estados Unidos 110), $26^{\circ}49'22.2''\text{S } 65^{\circ}11'35.1''\text{W}$, 434 m snm, 23-VIII-2023, L. Castillo 2012 (LIL 161006); (Plaza San Martín), $26^{\circ}50'19''\text{S } 65^{\circ}12'39.8''\text{W}$, 430 m snm, 26-VIII-2023, L. Castillo 2011 (LIL 161007); (calle Juan Crisóstomo Álvarez), $26^{\circ}49'46''\text{S } 65^{\circ}13'06''\text{W}$, 438 m snm, 26-X-2023, M. Ibris 2047 (LIL 161008); Dpto. Tafí del Valle, Tafí del Valle (av. Presidente Juan D. Perón), $26^{\circ}51'12''\text{S } 65^{\circ}42'31.5''\text{W}$, 1,992 m snm, 09-XII-2023, M. Ibris 2008 (LIL 161009); Dpto. Trancas, San Pedro de Colalao (calle Salta), $26^{\circ}14'09''\text{S } 65^{\circ}29'53''\text{W}$, 1,075 m snm, 26-IV-2024, G. Suárez 2045 (LIL 161010); Dpto. Yerba Buena, Villa Carmela (calle Leopoldo Lugones y Calle Los Pinos), $26^{\circ}46'11.7''\text{S } 65^{\circ}16'28.3''\text{W}$, 562 m snm, 28-II-2024, M. Ibris 2004, 2005, 2006 (LIL 161011, LIL 161021, LIL 161012); (Barrio 240 viviendas), $26^{\circ}46'18.5''\text{S } 65^{\circ}16'58.5''\text{W}$, 571 m snm, 28-II-2024, M. Ibris 2007 (LIL 161013); (calle Saavedra Lamas), $26^{\circ}48'03''\text{S } 65^{\circ}18'28.8''\text{W}$, 542 m snm, 01-III-2024, M. Ibris 2015, 2016, 2017, 2018 (LIL 161014, LIL 161015, LIL 161016, LIL 161017).

CONCLUSIONS

In Northwestern Argentina, examined *Quercus robur* trees with symptoms of powdery mildew showed severe infections caused by *E. alphitoides*. Younger leaves displayed more pronounced disease symptoms compared to older leaves, including curling and malformations, which adversely affected their ornamental quality. While infections by this powdery mildew have been previously documented in trees from various locations in Buenos Aires and Rio Negro (Takamatsu *et al.*, 2007), this study represents the first record of *E. alphitoides* in the region (Tucumán, Catamarca, and Santiago del Estero). Additionally, *E. alphitoides* was found to be intensely parasitized by *Ampelomyces* sp.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Michael Bradshaw for confirming the species identity. This study was supported by CONICET (PIP 0177) and Universidad Nacional de Tucumán (PIUNT G744).

BIBLIOGRAPHY

- Bradshaw, M., Braun, U. & Pfister, D. H. (2022). Powdery mildews on *Quercus*: A worldwide distribution and rediscovered holotype provide insights into the spread of these ecologically important pathogens. *Forest Pathology* 52: e12742.
- Braun, U., Kiehr, M. & Delhey, R. (2000). Some new records of powdery mildew fungi from Argentina. *Sydowia* 53 (1): 34-43.
- Castillo, L. A. & Suárez, G. M. (2023). Natural occurrence of the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* (Ascomycota, Phaeosphaeriaceae) in urban environments from Tucumán (Argentina). *Lilloa* 60 (2): 349-356.
- Griffon, É. & Maublanc, A. (1912). Les Microsphaera des Chênes. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France* 28 (1): 88-104.
- Havrylenko, M. (1995). Erysiphaceous species from Nahuel Huapi National Park, Argentina. Part 1. *New Zealand Journal of Botany* 33: 389-400.
- Marchionatto, J. B. (1944). Manual de las enfermedades de las plantas. Edit. Sudamericana, Buenos Aires.
- Takamatsu, S., Braun, U., Limkaisang, S., Kom-un, S., Sato, Y. & Cunnington, J. H. (2007). Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. *Mycological Research* 111 (7): 809-826. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.05.013>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Neottiella ricciae (Pyronemataceae, Ascomycota): a hepaticolous fungus in South America

Neottiella ricciae (Pyronemataceae, Ascomycota):
un hongo hepatófito en Sudamérica

Guillermo M. Suárez^{1,2*} ; Denise J. Alvarez^{1,2} 

¹ Unidad Ejecutora Lillo (CONICET – Fundación Miguel Lillo), Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

² Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L., Universidad Nacional de Tucumán, Miguel Lillo 205, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

* Corresponding author: <suarezgm@csnat.unt.edu.ar>

Abstract

Neottiella ricciae is characterized by asci containing eight smooth, ellipsoid to ovoid ascospores, typically with one rounded side and the other somewhat fusiform. This species is reported for the first time in South America, where it was found colonizing a new host, *Riccia cavernosa*. The present work provides a detailed description of this fungus with photographs of its macroscopic and microscopic features.

Keywords: Argentina; Bryophilous; Entre Rios; Marchantiophyta; Pezizales; *Riccia cavernosa*.

Resumen

Neottiella ricciae se caracteriza por presentar ascas formadas por ocho ascosporas lisas, elipsoides a ovoides, en su mayoría con un lado redondeado y el otro algo fusiforme. La especie se reporta por primera vez para Sudamérica, donde se encontró creciendo en un nuevo hospedador, *Riccia cavernosa*. Se provee una descripción del hongo, además de fotografías de sus características macroscópicas y microscópicas.

Palabras clave: Argentina; briófilos; Entre Ríos; Marchantiophyta; Pezizales; *Riccia cavernosa*.

► Ref. bibliográfica: Suárez, G. M.; Alvarez, D. J. 2025. *Neottiella ricciae* (Pyronemataceae, Ascomycota): a hepaticolous fungus in South America. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 53-60. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2077>

► Recibido: 19 de diciembre 2024 – Aceptado: 14 de abril 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

INTRODUCTION

Bryophilous fungi primarily inhabit mosses (Phylum Bryophyta), but over 20% of known species growing on liverworts (Phylum Marchantiophyta). Among the octosporaceous bryophilous fungi, small, orange to yellow (occasionally red) ascomata are characteristic of the genera *Filicupula* Y.J. Yao & Spooner, *Lamprospora* De Not., *Octospora* Hedw., *Octosporella* Döbbeler, *Octosporopsis* U. Lindemann & M. Vega, and *Neottiella* (Cooke) Sacc. (Eckstein, 2024).

The genus *Filicupula* includes species with clavate apothecia that develop into obovoid or turbinate forms, flattening at the top (Yao & Spooner, 1996). Examples include *F. suboperculata* (Döbbeler & P. James) Y.J. Yao & Spooner from Europe and *F. cyanopoda* Döbbeler & P.G. Davison from North America, both biotrophic on *Frullania* Raddi (Döbbeler & Davison, 2021).

Conversely, the genus *Lamprospora* comprises approximately 50 species, primarily associated with acrocarpic mosses found mainly in the subclass Dicranidae Doweld (orders Dicranales M. Fleisch. and Pottiales M. Fleisch.). However, a few species reside in the subclass Bryidae Engl. (orders Bryales Limpr. and Bartramiales M. Menzel), with only *L. aneurae* Benkert and *L. maireana* Seaver forming associations with liverworts, specifically on *Aneura pinguis* (L.) Dumort. and *Fossombronina* Raddi species.

Octospora stands out as the largest genus among bryophilous fungi, thriving on both acrocarpous and pleurocarpous mosses (Suárez *et al.*, 2023, 2025), as well as liverworts. Although it encompasses numerous species, the high degree of specific variability suggests that it likely represents more than one distinct genus (Németh *et al.*, 2017).

Exclusively associated with the Phylum Marchantiophyta, the genus *Octosporella* is typically found on leafy liverworts, while *Octosporopsis* grows on thalloid liverworts. *Octosporella* can be distinguished from other bryophilous octosporaceous fungi by its functionally perithecioid ascomata (Döbbeler, 2011), highlighting the diversity within this ecological niche.

Finally, *Neottiella* represents one of the smallest genera in the Pyrenomataceae family, with only six known species. Recently, sampling of bryophytes in Entre Rios (Argentina) yielded small orange apothecia growing on *Riccia cavernosa* Hoffm. These were identified as *Neottiella ricciae*, marking its first record in South America and contributing to our understanding of the region's fungal biodiversity.

MATERIALS AND METHODS

The material was collected in winter on arable land in northeastern Argentina. The preparations were mounted in tap water and examined under a microscope. The description and photographs were based on fresh material, whereas 10–30 values of spore size and at least 10 values of other structures were measured in each collection. *Neottiella ricciae* was identified according to Németh *et al.* (2017) and Eckstein (2016). The spores studied with scanning electron microscopy (ZEISS-EVO 15 operating at 15 KV) were previously rehydrated in a solution of distilled water (20 ml) with TritonX detergent (3 drops) for 24 hours, then they were fixed in Formalin-Aceto-Alcohol (FAA), critical-point dried and then mounted on aluminum discs on double-sided tape, to later be coated with gold-palladium for two minutes (Salgado Laurenti & Galíndez, 2023). The *Riccia* specimens were analyzed according to Bischler-Causse *et al.* (2005). All considered fungal material has been preserved and stored as exsiccate in the herbarium of the Foundation Miguel Lillo (LIL) in San Miguel de Tucumán, Argentina.

RESULTS

Neottiella ricciae (P.Crouan & H.Crouan)

Korf & W.Y. Zhuang, Mycotaxon 40: 96 (1991).

Basionym: *Peziza ricciae* P. Crouan & H. Crouan 1867.

A complete list of synonyms can be found in Németh *et al.* (2017).

Host. *Riccia cavernosa* Hoffm. Deutschl. Fl. 2: 95. 1795 [1796].

Macroscopic features (Fig. 1).— Apothecia 0.2–0.8 mm in diameter, orange, initially spherical, later barrel-shaped to discoid, sessile, margin rimmed with hyalin, stiff acute hairs. Hairs 120–220 μm long, thick walled, 1–2 septate, 6–11 μm broad at base and gradually tapering. Hymenium orange.

Microscopic features (Fig. 2).— Asci 125–190 μm , 8-spored, cylindrical, operculate, spores uniseriate. Paraphyses straight, filiform, septate, 3–6 μm wide, apically slightly inflated, contain orange granulates. Ascospores hyaline, smooth, ellipsoid to ovoid, $17\text{--}23 \times 10\text{--}16 \mu\text{m}$, mostly markedly egg-shaped with one rounded side and the other tapering (Fig. 3), with one large lipid drop. Medullary excipulum textura globulosa, ectal excipulum textura intricata.

Material examined.— ARGENTINA. Prov. Entre Ríos, Dpto. Nogoyá, Laurencena, 32°16'52.4"S 59°40'17.6"W, 16-VI-2024, D. J. Alvarez 542 (LIL).



Fig. 1. *Neottiella ricciae*. A-D) Apothecia growing on *Riccia cavernosa*.

Fig. 1. *Neottiella ricciae*. A-D) Apotecios creciendo sobre *Riccia cavernosa*.

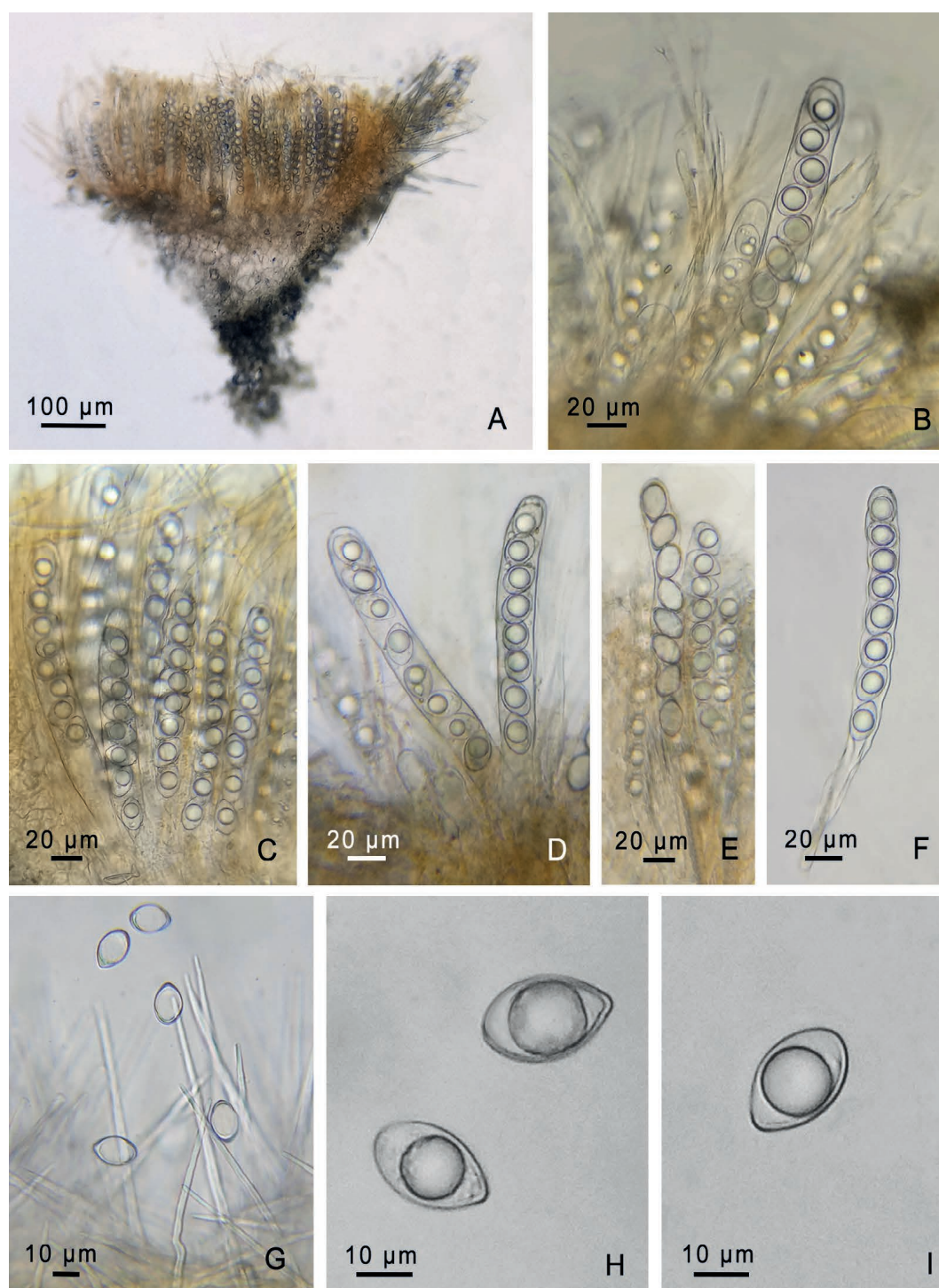


Fig. 2. *Neottiella ricciae*. A) Longitudinal section of an apothecium with stiff hyaline hairs on the margin. B-F) Asci with ascospores and paraphyses. G-I) Ascospores.

Fig. 2. *Neottiella ricciae*. A) Sección longitudinal de un apotecio con pelos hialinos rígidos. B-F) Ascas con ascosporas y parafisis. G-I) Ascosporas.

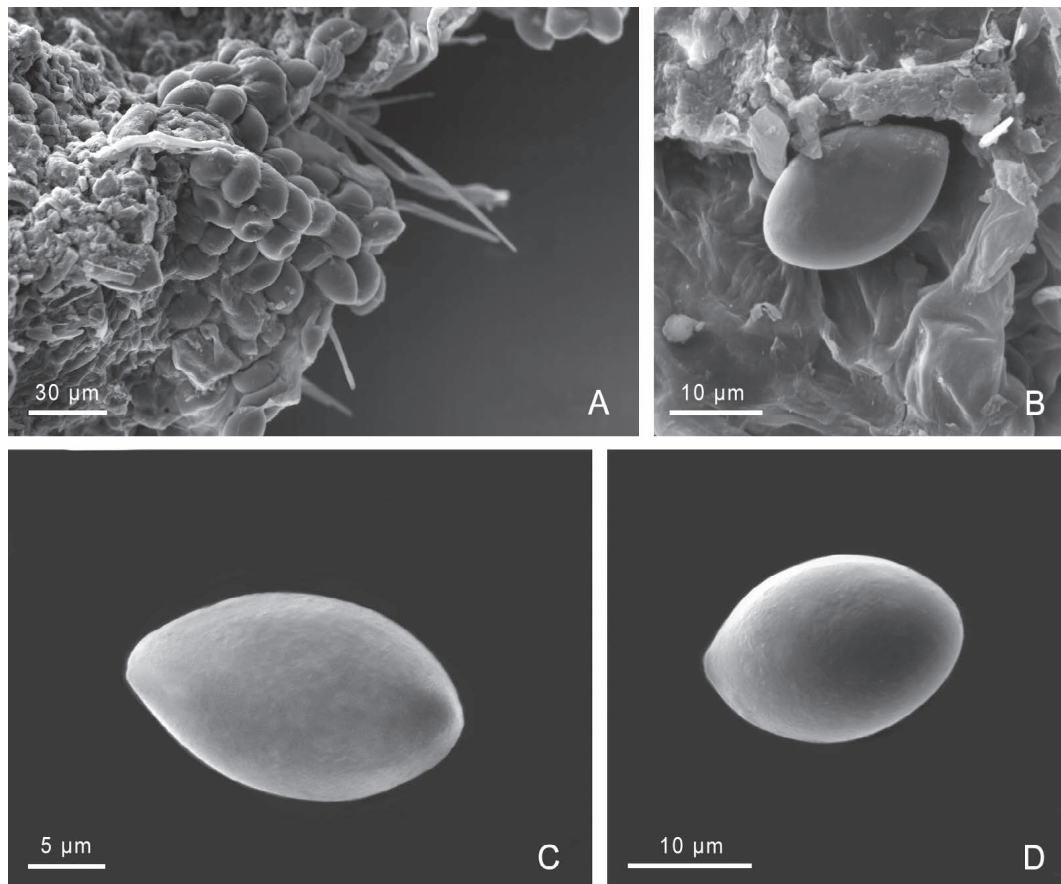


Fig. 3. *Neottiella ricciae*. A-D) Spores (examined using scanning electron microscopy).

Fig. 3. *Neottiella ricciae*. A-D) Esporas (estudiadas con microscopio electrónico de barrido).

DISCUSSION

The description of *N. ricciae* from Argentina generally confirms the observations presented in Németh *et al.* (2017) about finds from Europe. The species was found growing on the thallus of *R. cavernosa*, a species with a wide distribution. While many species have restricted host ranges, typically associated with only one species or genus of bryophytes, others exhibit a broader host spectrum (Quintero *et al.*, 2020). *Neottiella ricciae* is recognized as ricciophilous, previously documented on *Riccia sorocarpa* Bisch., *R. glauca* L., *R. beyrichiana* Hampe ex Lehm., and *R. nigrella* DC. (Németh *et al.*, 2017). Notably, it is the only *Neottiella* reported to grow on a liverwort, raising questions about its true taxonomic position within the genus. Most other species in the genus are associated with the Polytrichaceae family, including *Neottiella albocincta* (Berk. & M.A. Curtis) Sacc. on *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. (Benkert, 1987) and *Neottiella gigaspora* M. Zeng, Q. Zhao & K.D. Hyde on *Atrichum* sp. (according to image 46a in Yuan *et al.*, 2020), as well as *Neottiella aphanodictyon* (Kobayasi) Dissing, Korf & Sivertsen, *Neottiella rutilans* (Fr.) Dennis, and *Neottiella vivida* (Nyl.) Dennis found on *Polytrichum* Hedw., *Polytrichastrum* G.L. Sm., or *Oligotrichum* DC.

(Benkert, 1994). Németh *et al.* (2017) suggest the placement of *N. ricciae* in *Octospora* but refrain from the new combination until more molecular data of the heterogeneous genus *Octospora* is available.

In Argentina, *N. ricciae* has somewhat smaller spores than those observed in Europe. Additionally, *R. cavernosa* belongs to the subgenus *Ricciella* in contrast to the other known hosts, which all belong to the subgenus *Riccia*. These differences indicate at least a small deviation, which could merit taxonomic recognition in the future when more data is available.

This finding marks the first record of *Neottiella ricciae* in South America, specifically in Argentina, expanding our understanding of its geographic distribution from previously recorded locations in Europe, Africa (Canary Islands), North America and India (Németh *et al.*, 2017; Döbbeler *et al.*, 2023). The new record in Argentina adds the fifth continent in the distribution of *N. ricciae*, making it a cosmopolitan species. The Argentinian record includes *R. cavernosa* as a previously undocumented host.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Jan Eckstein for valuable comments on the manuscript. This research was supported by the National Scientific and Technological Research Council (CONICET, PIP 0177), and the Research Project of the National University of Tucumán (PIUNT G744).

BIBLIOGRAPHY

- Benkert, D. (1987). *Neottiella atrichi* (= *N. catharinaea*) in Europa. *Beiträge zur Kenntnis der Pilze Mitteleuropas* 3: 407-411.
- Benkert, D. (1994). Beiträge zur Kenntnis bryophiler Pezizales-Arten. 2. Die Identität von *Peziza albo-cincta* Berk. & Curt. *Beiträge zur Kenntnis der Pilze Mitteleuropas* 9: 131-138.
- Bischler-Causse, H., Gradstein, S. R., Jovet-Ast, S., Long, D. G. & Salazar Allen, N. (2005). Marchantiidae. *Flora Neotropica*, Vol. 97. New York Botanical Garden Press.
- Döbbeler, P. (2011). Two new hepaticolous species of the genus *Octosporella* (Pezizales). *Herzogia* 24 (2): 357-365. <http://dx.doi.org/10.13158/heia.24.2.2011.357>
- Döbbeler, P. & Davison, P. G. (2021). Non-hypocrealean ascomycetes on *Frullania* mainly from Southeastern North America. *Nova Hedwigia* 113: 361-401. http://dx.doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2021/0663

- Döbbeler, P., Davison, P. G. & Buck, W. R. (2023). Bryophilous ascomycetes of North America – an overview of the recorded species. *Herzogia* 36: 305-370. <http://dx.doi.org/10.13158/heia.36.2.2023.305>
- Eckstein, J. (2016). Key to main groups of bryoparasitic Pezizales. – <http://www.octospora.de/identification.htm> (accessed: 28.09.2024)
- Eckstein, J. (2024). Bryoparasitic Pezizales. – <http://www.octospora.de> (accessed: 28.09.2024).
- Németh, C., Eckstein, J. & Stöckli, E. (2017). New European occurrences of *Neottiella ricciae*, a bryophilous ascomycete. *Herzogia* 30 (2): 353-361. <http://dx.doi.org/10.13158/heia.30.2.2017.353>
- Quintero, M., Quijada, L., Negrín, R. & Losada-Lima, A. (2020). Pezizales asociados a briófitos en las islas Canarias: estado actual y contribución a su estudio en la isla de Tenerife. *Ascomycete.org* 12 (1): 19-28. <https://doi.org/10.25664/art-0292>
- Salgado Laurenti, C. R. & Galíndez, M. C. (2023). Fast and simple biological simple preparation and observation procedure for scanning electron microscopy. *Acta Microscopia* 32: 13-26.
- Suárez, G. M., Domínguez, F. G., Pajot, H. P., Flores, J. R. & Catania, M. V. (2023). *Octospora tucumanensis* (Pezizales), a new bryophilous ascomycete on *Dimerodontium balansae* (Bryophyta) from Argentina. *Springer Heidelberg, Mycological Progress* 22 (54). <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-023-01909-1>
- Suárez, G. M., L. A. Castillo & M. A. Ibris. (2025). Discovery of *Octospora excipulata* (Pezizales) in South America. *Bonplandia* 34 (1): 1-8. <http://dx.doi.org/10.30972/bon.3417990>
- Yao, Y.-J. & Spooner, B. M. (1996). Notes on British *Octospora* with a new genus *Filicupula* (Pezizales). *Kew Bulletin* 51 (1): 193-196. <http://dx.doi.org/10.2307/4118759>
- Yuan, H. S., Lu, X., Dai, Y. C., Hyde, K. V. D., Kan, Y. H., Kušan, I., He, S. H., Liu, N. G., Sarma, V. V., Zhao, C. L., Cui, B. K., Yousaf, N., Sun, G. Y., Liu, S. Y., Wu, F., Lin, C. G., Dayarathne, M. C., Gibertoni, T. B., Conceição, L. B., ... Zhou, L. W. (2020). Fungal diversity notes 1277-1386: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity* 104: 1-266. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-020-00461-7>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Yeast-mycorrhizae interaction as a strategy to improve tomato production

La interacción levadura-micorriza como estrategia para la producción de tomate

Mestre María C.^{1,2*} ; Micaela Boenel^{1,2} ; Nicolás Robredo³ ; Sonia Fontenla² 

¹ Instituto Andino Patagónico de tecnologías biológicas y geoambientales (IPATEC, Universidad Nacional del Comahue-CONICET), Av De Los Pioneros 2350, CP 8400, Bariloche, Río Negro, Argentina.

² Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología, Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB), Universidad Nacional del Comahue (UNCO), Quintral 1250, CP8400, Bariloche, Río Negro, Argentina.

³ Instituto de investigaciones en biodiversidad y mediambiente (INIBIOMA, Universidad Nacional del Comahue-CONICET), Pasaje Gutiérrez 1415, CP 8400, Bariloche, Río Negro, Argentina.

* Corresponding autor: <mestremc@comahue-conicet.gob.ar>

Abstract

Inoculation with plant growth-promoting microorganisms such as bacteria, mycorrhizal fungi, and soil yeasts may play a promising role in sustainable plant production. This study evaluated the potential of Patagonian yeasts and mycorrhizal fungi to enhance the growth and productivity of tomato plants (*Lycopersicum esculentum* var. *platense*) during the production season in Patagonia. A greenhouse experiment was conducted, where plants were inoculated with the mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* and the yeasts *Candida saitoana*, *Saccharomyces eubayanus*, or *Tausonia pullulans*. None of the 45-day-old seedlings exhibited mycorrhizal colonization, although *F. mosseae* inoculation significantly influenced seedling growth. By the end of the production season (135-day-old plants), all plants showed mycorrhizal colonization, and those inoculated with *F. mosseae* demonstrated increased plant growth and yield. Inoculation with *S. eubayanus* enhanced both plant yield and mycorrhizal colonization. Conversely, co-inoculation with *T. pullulans* and *F. mosseae* was detrimental to mycorrhizal colonization.

➤ Ref. bibliográfica: Mestre, M. C.; Boenel, M.; Robredo, N.; Fontenla, S. 2025. Yeast-mycorrhizae interaction as a strategy to improve tomato production. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 61-76. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2089>

➤ Recibido: 12 de diciembre 2024 – Aceptado: 3 de abril 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

➤ URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

➤ Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

Nevertheless, *Tausonia pullulans* independently improved plant growth and yield, suggesting that this yeast may benefit tomato production without relying on mycorrhizal associations. These findings highlight the complex interactions between mycorrhizal fungi and soil yeasts in agronomic systems.

Keywords: *Funneliformis mosseae*; *Candida saitoana*; *Saccharomyces eubayanus*; *Tausonia pullulans*; sustainable agriculture.

Resumen

La inoculación con microorganismos promotores del crecimiento vegetal, como bacterias, hongos micorrícicos y levaduras del suelo, puede tener un rol prometedor en la producción agrícola sostenible. Este estudio evaluó el potencial de hongos micorrícicos y levaduras patagónicas para mejorar el crecimiento y la productividad de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* var. *platense*) durante la temporada de producción en Patagonia. Se llevó a cabo un experimento en invernadero, en el cual las plantas fueron inoculadas con el hongo micorrícico *Funneliformis mosseae* y las levaduras *Candida saitoana*, *Saccharomyces eubayanus* o *Tausonia pullulans*. Ninguna de las plántulas de 45 días presentaban colonización micorrícica, aunque la inoculación con *F. mosseae* influyó significativamente en el crecimiento de las plántulas. Al final de la temporada de producción (plantas de 135 días de edad), todas las plantas presentaron colonización micorrícica, y aquellas inoculadas con *F. mosseae* mostraron un aumento en el crecimiento y el rendimiento. La inoculación con *S. eubayanus* mejoró tanto el rendimiento de las plantas como la colonización micorrícica. En contraste, la co-inoculación con *T. pullulans* y *F. mosseae* resultó perjudicial para la colonización micorrícica. Sin embargo, *T. pullulans* mejoró de forma independiente el crecimiento y el rendimiento de las plantas, lo que sugiere que esta levadura puede beneficiar la producción de tomate sin depender de las asociaciones micorrícicas. Estos resultados destacan las complejas interacciones entre hongos micorrícicos y levaduras del suelo en sistemas agronómicos.

Palabras clave: *Funneliformis mosseae*; *Candida saitoana*; *Saccharomyces eubayanus*; *Tausonia pullulans*; agricultura sustentable.

INTRODUCTION

Addressing the global challenge of food security is imperative, and the increase in food production must go hand in hand with the implementation of safe practices for people and the environment (Wezel, 2014). Therefore, when considering sustainable practices in agricultural production, plant growth promoting microorganisms (PGPM) arise as a biotechnological tool to reduce the use of chemical fertilizers and enhance food production.

Several reports support a promising role of yeasts as PGPM due to the production of plant's growth regulators and, indirectly, as result of the interaction with symbiotic microorganisms (Carvajal *et al.*, 2024; Mohamed, 2015; Nimsi *et al.*, 2023; Radić *et al.*, 2022; Vargas *et al.*, 2024). The symbiotic association between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants is the most widespread symbiosis in the plant kingdom (Smith and Read, 2008) and it is relevant for plant development and production (Van Der Heijden and Horton, 2009). Inoculation with AMF is been explored as an environmentally friendly practice in agriculture (Aguilera *et al.*, 2021; Dejana *et al.*, 2022), while the co-inoculation of AMF and other PGPM is not so widespread. The effect of yeasts on mycorrhizal colonization is not well understood yet; several publications reported enhanced (Fracchia *et al.*, 2003; Sampedro *et al.*, 2004; Sarabia *et al.*, 2018), neutral (Sarabia *et al.*, 2018) or decreased (Gollner *et al.*, 2006) mycorrhizal colonization of roots. It is of particular interest to further investigate the yeast-AMF-plant interaction, as yeasts could provide new strategies for sustainable agriculture.

A large number of yeasts were isolated from cold-temperate *Nothofagus* native forests in Patagonia (Mestre *et al.*, 2011, 2014; Fernández *et al.*, 2012). These indigenous soil yeasts are considered psychrotolerant, as they are periodically exposed to low temperatures: mean annual temperature of 10 °C, winter temperatures are often below 0 °C with precipitation in the form of snow (Mestre *et al.*, 2016). Several of the isolated yeasts presented PGPM features such as phytohormone's production, phosphate solubilization and plant-pathogen inhibition (Mestre *et al.*, 2016). In Western-Patagonia, agriculture practices are closely related to native forest due to the closeness of production sites to the forest and the use of the surrounded forest soil and litter in several steps of production. Here, the agriculture is lead by seasonal dynamics due to cold and short light-period during winter. Some times in economically important crops, such as tomato and pepper, tunnel greenhouse without temperature control are used to complete fruit maturity (Venegas Jaque *et al.*, 2021). The use of native cold adapted yeasts with PGPM features could be an attractive strategy to promote sustainable agriculture in Patagonia and other cold-temperate regions.

Tomato is an economically important horticultural crop worldwide and in Patagonia; and it also has been used as model plant in several PG-PM-plant studies. In the present study, we aim to evaluate the potential use of Patagonian yeasts and mycorrhizal fungus to enhance growth and productivity of tomato (*Lycopersicum esculentum* var. *platense*) plant during the production season in Patagonia. The guiding hypothesis of the study was that yeast inoculation would improve tomato growth and yield, as well as enhance mycorrhizal colonization, with a synergistic effect expected from the combined yeast and mycorrhizal inoculation.

MATERIAL AND METHODS

Mycorrhizal and yeast inoculum preparation

The arbuscular mycorrhizal fungus used as inoculum was *Funneliformis mosseae* (ex *Glomus mosseae*) gently supplied by Dr. J. A. Ocampo. Mycorrhizal fungus was contained in a soil inoculum, produced under greenhouse conditions from trap plants at Estación Experimental del Zaidín, CSIC (Spain), and included colonized root fragments, fungal mycelia and spores (with approximately 110 sporocarps per 10 g inoculum). The mycorrhizal inoculum was added to one-half of seedling production substrate in a 2 % W/V ratio, before planting the germinated seed.

The yeast used as inoculum were *Tausonia pullulans* CRUB1772, *Candida saitoana* CRUB1770 and *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; they have already been proposed as plant growth promoters (Mestre et al., 2016; Mestre et al., 2021). The three yeast strains are deposited in the Yeast Collection of the Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Argentina. Each yeast strains was cultivated on solid MYP medium (Malt extract 7 g L⁻¹, Yeast extract 0.5 g L⁻¹, Soy peptone 2.3 g L⁻¹, Agar 15 g L⁻¹) at 20 °C for 72 h. Biomass from cultures was harvested and then suspended in peptone water (Soy peptone 1% W/V) up to a turbidity of 0.3 at 600 nm (equivalent to 10⁶ cells mL⁻¹). Nine mL of cell suspension from each yeast or peptone water without yeast were used to inoculate early stages of tomato seedlings production.

Plant production experiment

Lycopersicum esculentum var. *platense* plants, a commercially important variety of tomato in Argentina, were produced following an experimental design with two factors: mycorrhizal inoculation (with or without mycorrhizal inoculum) and yeast inoculation (with one of the three yeast species or without yeasts). We combined control conditions for seedling production -sterile substrate-, with conditions that mimics common production technique -use of natural non-sterile soil and water. By completing tomato production season we were able to evaluate plant growth as well as plant yield.

Seedling production

Tomato seeds were surface disinfected by immersion in 20% sodium hypochlorite for 2 min, followed by triple washing with sterile water. Disinfected seeds were germinated in a sterilized moistened filter paper under controlled conditions (16 hours light at 25°C, 8 hours darkness at 22°C) for 4 days. Germinated seeds were individually planted in alveolar trays with tyndallized commercial organic amendment (Lombriquen®), with or without mycorrhizal inoculum. We produced 192 tomato seedling, by using 12 replicates in each of the 8 treatments in the experiment. All seedlings were incubated under controlled conditions (10 hours darkness at 20°C, 14 hours light at 28°C) and periodically watered with sterile tap water.

When the first true leaves appeared in tomato seedlings (20 days after germination), the yeasts were inoculated at the base of the shoot of seedling growing in substrate with *F. mosseae* (co-inoculation treatments) and without the mycorrhizal fungus inoculum (single inoculation treatments). Seedling were transplanted 45 days after germination.

Seedling recorded variables: Half of the seedling (96) were harvested to evaluated seedling quality using destructive determinations. We recorded shoot length, root and aerial biomass (material was harvested separately and dried at 90 °C to constant weight in an oven) and stem diameter. Slenderness index (SI) was calculated as the rate between shoot length and stem diameter, cm.mm^{-1} (Gallegos-Cedillo *et al.*, 2021). A fraction of the seedling roots were collected and preserved in 70% alcohol for fungal colonization determination.

Tomato plant growth and yield evaluation

The 45 day-old seedlings (96) were placed manually into 7-litre pots (one seedling per pot) containing a non-sterile mixture of perlite, peat and soil in a 1:1:2 ratio. The soil was sourced from the vicinity of the greenhouse, and it was used as a source of nutrients and natural microorganisms (including native mycorrhizae). The pots were transferred to the greenhouse and randomly distributed on greenhouse benches. The greenhouse was equipped with air conditioning to prevent room-temperature from dropping below 10°C during early stages of cultivation, as nighttime temperatures during late spring and early summer, could approach 0°C. In summer, during flowering and fruiting, temperature was regulated using a combination of fogging and ventilation systems to keep the maximum temperature under 40°C. Plant were watering using a drip irrigation system, and water regime was adjusted based on plant requirement throughout the production season. Weed control was carried out every 15 days and axillary buds were eliminated to simulate productive conditions. The plants grew in the greenhouse until harvest (3 month after transplant) to complete the production season in Patagonia.

Adult plant recorded variables: We harvested complete adult plants (135 day-old) to record aerial and root biomass (as describe above); we also recorded the number and weight of fruits per plant. We calculated the probability of fruit production per treatment by comparing plant with fruit (1) vs. plant without fruit (0) within each treatment. We measured chlorophyll concentration in plant leaves by optical density difference at 660 nm vs. 940 nm, usually known as SPAD (Soil Plant Analysis Developmental), using Clorofilio® (Cavadevices). For each plant, an average chlorophyll value was calculated from three leaves (one apical, one intermediate, and one basal). SPAD readings are positively correlated with chlorophyll concentration in tomato leaves (Jiang *et al.*, 2017). A portion of roots was collected and preserved in 70% alcohol for fungal colonization determination.

Fungal colonization determination

We determined fungal colonization in seedling and adult plant roots using the non-vital Trypan Blue histochemical staining procedure (Phillips and Hayman, 1970). Stained roots were observed under optical microscope (Olympus BX40) and the presence of arbuscules was used as diagnostic for arbuscular mycorrhizal colonization (AM). For quantification of fungal colonization, stained root fragments of 1 cm length were placed on a slide and observed with 200x magnification, resulting in the observation of at least 300 fields per plant. Percentage of mycorrhizal colonization (AM%) was estimated using the intersect method described by McGonigle *et al.* (1990).

Statistical Analysis

Data from seedlings (45 day-old) and adult plants (135 day-old) were separately analysed. We used two-way ANOVA for seedling's slenderness index, seedlings dry biomass, and for adult plants dry biomass and chlorophyll concentration. The variable AM% was transformed with arcsin's square-root prior to statistical analysis using two-way ANOVA. Tukey's post-hoc tests were used to form homogenous groups when necessary. We used a generalized linear model with binomial distribution to analyse the probability of fruit production per treatment. All statistical analyses were performed with *agricolae* (de Mendiburu, 2020), *car* (Fox and Weisberg, 2019) and *DHARMa* 0.4.6 (Hartig, 2020) packages on R software version 4.4.0 (2024-04-24 ucrt); differences at $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Quality of the 45 day-old seedlings was assessed using total dry biomass and slenderness index (SI). None of these variables showed significant interactive effects between the inoculation with yeast and the inoculation with *Funneliformis mosseae* ($F_{\text{Biomass}}=2.28$, $p_{\text{Biomass}}=0.08$; $F_{\text{SI}}=2.25$, $p_{\text{SI}}=0.08$). Total plant biomass showed significant differences for mycorrhizal inoculation as main effect ($F=37.9$, $p=2\cdot10^{-8}$; Fig. 1): plant with *F. mosseae* inoculum were smaller (about 40% less biomass) than plant without the mycorrhizal inoculum. Total plant biomass showed no significant differences for yeast inoculation ($F=0.62$, $p=0.6$; Fig.1). Slenderness index showed significant differences for each factor as main effect (Fig. 1). Seedlings without *F. mosseae* inoculum showed lower SI than those with the mycorrhizal inoculum ($F=5.57$, $p=0.02$; Fig 1). Seedlings inoculated with *T. pullulans* or *C. saitoana* showed lower SI than those inoculated with *S. eubayanus* ($F=3.9$, $p=0.01$; Fig 1). The 45 days-old seedlings did not show any fungal colonization in their roots.

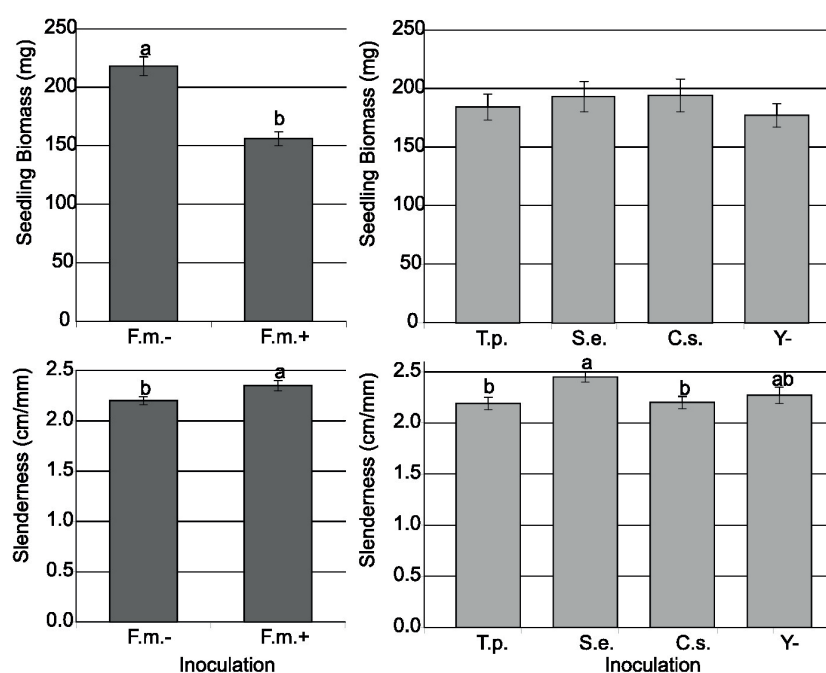


Fig. 1. Quality indicators for tomato seedling (45-days-old). Statistical significance was determined with $\alpha=0.05$ using two-way ANOVA. Treatments with the same letter are not significantly different. F.m.+ : with *Funneliformis mosseae* inoculum; F.m.-: without *Funneliformis mosseae* inoculum; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; Y-: without yeast inoculum.

Fig. 1. Indicadores de calidad de las plántulas de tomate (45 días). La significancia estadística se determinó con un $\alpha=0,05$ usando un ANOVA de dos factores. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes. F.m.+ : inoculado con *Funneliformis mosseae*; F.m.-: sin inóculo de *Funneliformis mosseae*; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; Y-: sin inóculo de levaduras.

At final harvest (135 day-old plants), plant dry biomass did not show significant interactive effects between the inoculation with yeasts and the inoculation with *F. mosseae* ($F=0.25$, $p=0.85$), nor significant effects of yeast inoculation ($F=1.59$, $p=0.19$). The plants which received *F. mosseae* inoculum (with and without yeast) have significantly ($F=24.08$, $p=4 \cdot 10^{-6}$) higher biomass (42%) than those without the inoculum (with and without yeast; Fig. 2). The plants singly inoculated with *F. mosseae* (F.m.) showed 64% increase in biomass respect the plants without any inoculation (Fig. 2). We observed significant interactive effects ($F=5.07$, $p=0.002$) of yeasts and mycorrhizal inoculation for chlorophyll concentration in leaves (Fig. 2).

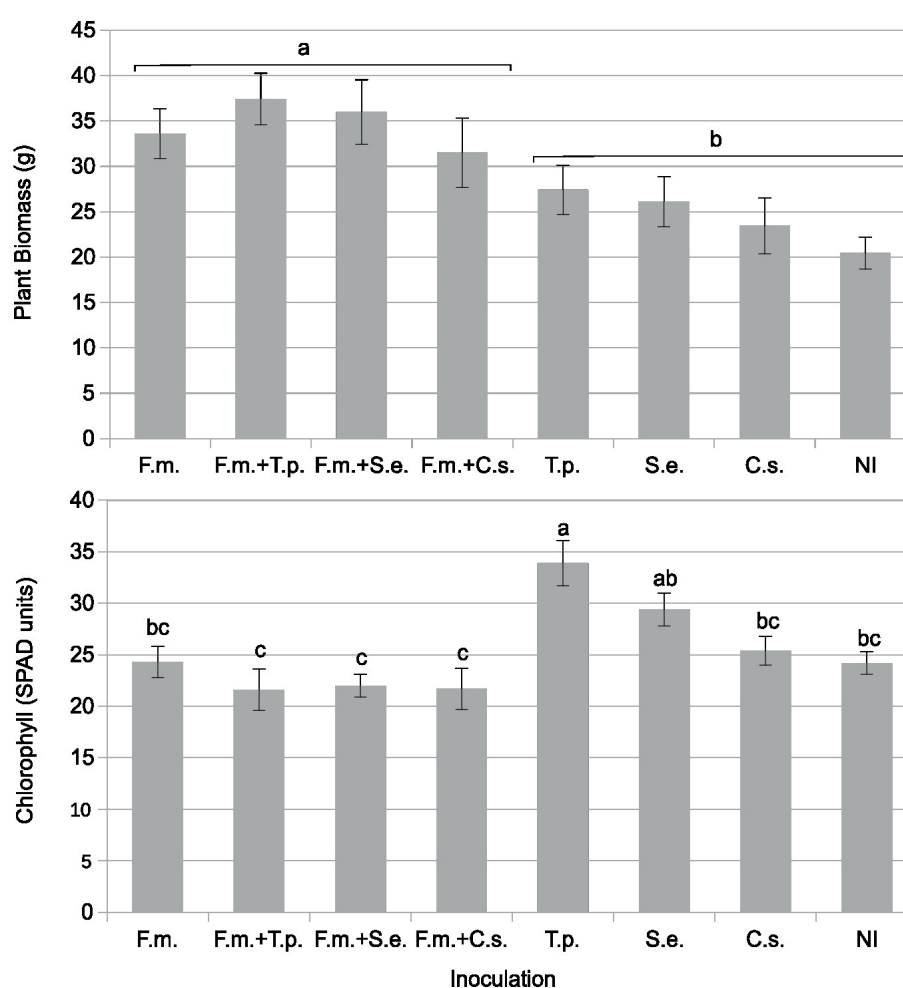


Fig. 2. Biomass and chlorophyll concentration in tomato plants at final harvest (135 days). Statistical significance was determined with $\alpha=0.05$ using two-way ANOVA. Treatments with the same letter are not significantly different. F.m.: *Funneliformis mosseae* inoculation; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; NI: without inoculation.

Fig. 2. Biomasa y concentración de clorofila en las plantas de tomate en la cosecha final (135 días). La significancia estadística se determinó con un $\alpha=0,05$ usando un ANOVA de dos factores. Los tratameintos con la misma letra no son significativamente diferentes. F.m.: *Funneliformis mosseae*; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; NI: sin inoculación.

Plants singly inoculated with *T. pullulans* (T.p.) showed the highest chlorophyll concentration, 40% higher than plants without any inoculation (Fig. 2). The plants co-inoculated with yeast and *F. mosseae* showed similar chlorophyll concentration (independently of yeast inoculum), and it was lower than for plant singly inoculated with *T. pullulans* or *S. eubayanus*. Plants inoculated with *F. mosseae* showed similar chlorophyll concentration than plants without any inoculation (Fig. 2b).

The adult plant yield was evaluated using the total weight of fruits per plant, the percentage of plant with fruits within each treatment and the probability of fruits occurrence in each treatment (Fig. 3). Co-inoculation of *F. mosseae* and *S. eubayanus* resulted in a higher yield (with at least 2 fruit per plants when fruiting) than most treatments. Plants with *F. mosseae* inoculum showed significantly higher probability of fruit occurrence than plants without *F. mosseae* inoculum. Co-inoculation of *F. mosseae* and *T. pullulans* treatment (Fig. 3) presented the highest percentage of plants with fruits (83%), and the lowest percentage (25%) was observed for the treatment without any inoculation (Fig. 3). Plants singly inoculated with *S. eubayanus* (S.e.; Fig. 3) showed the highest percentage (67%) of plants with fruit among plants which didn't received *F. mosseae* inoculum.

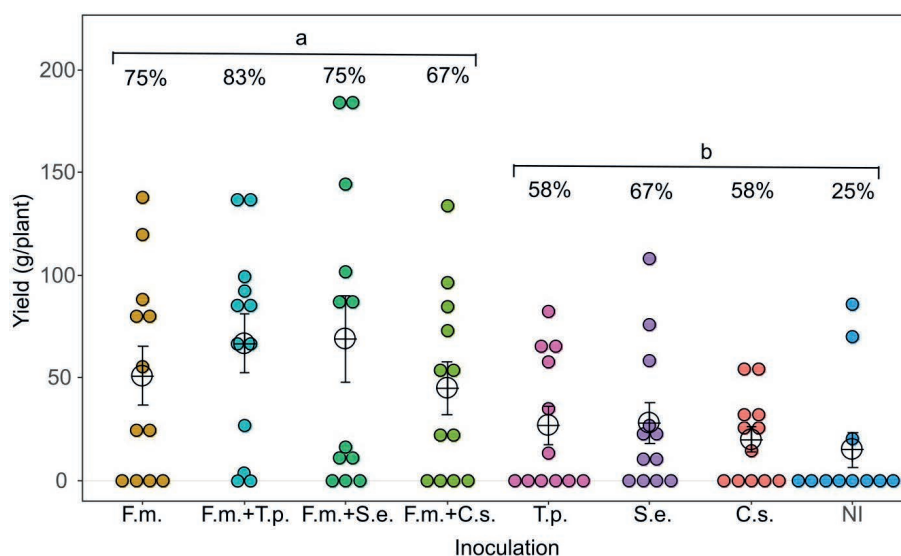


Fig. 3. Tomato yield per adult plant (dots), percentage of plants with fruit (upper numbers) and the probability of fruit production, at final harvest (135 days). Statistical significance was determined with $\alpha=0.05$ using a generalized linear model with binomial distribution. Treatments with the same letter are not significantly different. F.m.: *Funneliformis mosseae*; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; NI: without inoculation.

Fig. 3. Rendimiento por planta adulta (puntos), porcentaje de plantas con frutos (número superior) y probabilidad de producción de frutos, en la cosecha final (135 días). La significancia estadística de la probabilidad de producción de frutos se determinó con un $\alpha=0,05$ usando un modelo lineal generalizado con una distribución binomial. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes. F.m.: *Funneliformis mosseae*; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; NI: sin inoculación.

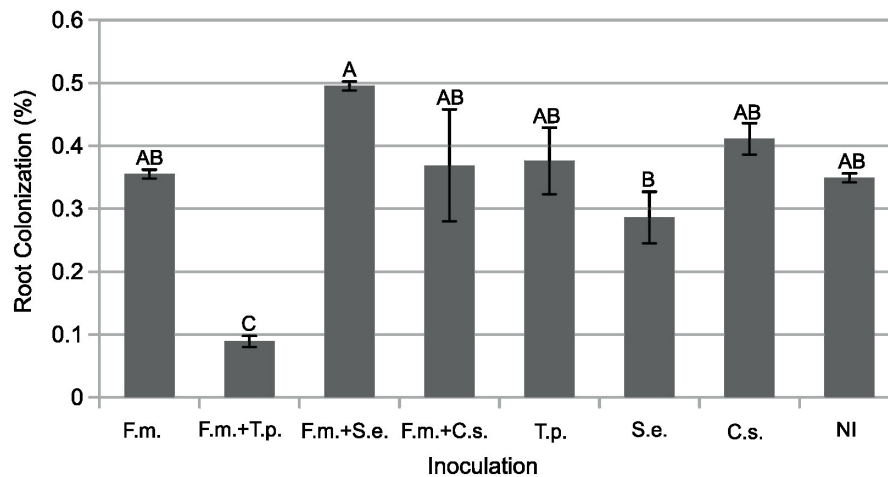


Fig. 4. Mycorrhizal (AM) colonization of adult tomato plants at final harvest (135 days). Statistical significance was determined with $\alpha=0.05$, using a two-way ANOVA. Treatments with the same letter are not significantly different. F.m.: *Funneliformis mosseae*; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; NI: without inoculation.

Fig. 4. Colonización por micorrizas (AM) de las plantas adultas de tomate en la cosecha final (135 días). La significancia estadística se determinó con un $\alpha=0,05$ usando un ANOVA de dos factores. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes. F.m.: *Funneliformis mosseae*; C.s.: *Candida saitoana* CRUB1770; S.e.: *Saccharomyces eubayanus* CRUB2014; T.p.: *Tausonia pullulans* CRUB1772; NI: sin inoculación.

All adult plants showed typical mycorrhizal colonization, within their roots. The interaction between the inoculation with yeasts and the inoculation with *F. mosseae* showed significant effects ($F=15.204$, $p=6.05 \cdot 10^{-5}$; Fig. 4). Plants without *F. mosseae* inoculation showed colonization percentage ranging from 28 to 40 %. The highest mycorrhizal colonization (50%) was observed in plants co-inoculated with *F. mosseae* and *S. eubayanus*; the lowest percentage (under 10%) was observed in plants co-inoculated with *F. mosseae* and *T. pullulans* (Fig.4).

DISCUSSION

We studied the interaction between yeasts, arbuscular mycorrhizal fungi and tomato plants, in a greenhouse trial. Most studies published on the potential of yeast and AMF to enhanced plant production involve in-vitro tests or short-term in-vivo evaluations conducted under axenic conditions (Carvajal et al., 2024; Radić et al., 2022; Vargas et al., 2024), while studies dealing with conditions close to field production are scarce (Biel et al., 2021). One of the main cause for this bias, is the complexity of the production systems, where inoculated microorganisms compete with and are challenged by native microbiota in agronomical soils, alongside the long duration required for experiments.

Our experiment combined control conditions –surface-disinfected seeds and production in pots– with typical agronomic practices, which included the production of plants during the natural growing season and the use of natural soil and water. Therefore the yeast and mycorrhizal inocula were tested against the native microbiota in a soil from native forest which is typically used for horticultural and forest production in the region. We included the mycorrhizal inoculum during seedling substrate preparation, as it would be an easy adoptable step for seedling producers. Yeast inoculum as a cell suspension could be included in irrigation systems and its addition to the plant, when first true leaves appeared, coincide with the first fertigation for seedling, which means that yeast inoculation would not be a disrupting or time adding step for agricultures. Although conducted under experimental conditions, our experimental design mimics common production technique in Patagonia which enables us to establish connections between the recorded results and real-world agronomic scenarios.

The seedlings produced were primarily exposed to the inoculated microorganisms, either yeasts or mycorrhizae (up to 45 days of growth), as we used sterile substrate and water while growing. Gallegos-Cedillo *et al.* (2021) reported that slenderness index (SI) could be used to estimate the potential success and survival after seedling transplanting and good quality seedling has SI under 6 cm mm⁻¹ (low value for SI correspond to shorter and thicker plants). All treatments in our trial produced seedlings of good quality (SI under 6). The seedlings inoculated with *T. pullulans* CRUB1772 or *C. saitonae* CRUB1770 would have better potential survival (lower SI) than seedlings inoculated with *S. eubayanus* CRUB2014. Although mycorrhizal colonization was not detected in any of the seedlings, those without *F. mosseae* inoculation appear to be of better quality, exhibiting higher biomass and a lower slenderness index, compared to seedlings that received the mycorrhizal inoculum. Lack of mycorrhizal colonization in plant with *F. mosseae* inoculum was an unexpected result. One possible explanation could be the lack of infectivity of mycorrhizal inoculum. Another explanation could be a delay in colonization due to the fulfilled nutritional requirement of the seedling by the seedling substrate (Dejana *et al.*, 2022). Mycorrhizal colonization is a fine-tuned process which involve changes in fungal and plant chemistry, and depends on plant age (Lidoy *et al.*, 2023). Seedlings that received the mycorrhizal inoculum exhibited significant differences compared to those that did not. While this complicates the interpretation of the results, it also opens the door to explore previously unexamined phenomena. The synthesis of plant chemical products by plant to attract mycorrhizal forming fungi (Bonfante and Requena, 2011) before fungal colonization suppose an energy cost. Therefore, the decreased biomass observed in seedling inoculated with *F. mosseae* but lacking mycorrhizal colonization, could be explained by the resource invested in setting future mycorrhizal colonization.

Adult plants were produced in pots containing no-sterilised substrate, using forest soil and water from natural mountain spring, therefore the plants were exposed to natural microbiota as well as to the previous inoculated microorganisms. At final harvest (135 days) plant biomass and yield was higher for plants inoculated with *F. mosseae*, which is opposite to the result obtained for seedling biomass. The growth variables measured in seedling failed to predict the level of growth or production in adult plants. The reduced chlorophyll concentration in plants inoculated with *F. mosseae*, compared to those without the inoculum, may be linked to higher fruit production, as a decrease in chlorophyll during flowering and fruit setting has been previously reported in tomato (Soval-Vila, 2002).

In our study, adult plants were exposed to two sources of mycorrhizae: *F. mosseae* inoculated during seedling production and the native mycorrhizal fungi from soil (and possibly water) used in the pot's substrate. We observed mycorrhizal colonization in plants without *F. mosseae* inoculation, which showed that native mycorrhizae were able to colonize tomato roots. Therefore, colonization values observed should be interpreted as a mix effect of the *F. mosseae* inoculum and the AMF from native soil. Harnessing native AMF for agricultural production could be an economically and friendly practice (Aguilera et al., 2021). Microorganisms inoculated in plant production systems, interact with the target plant and also with the indigenous soil microbiota; such interaction must be evaluated and could reveal novel strategies to enhance plant growth. Plant singly inoculated with *T. pullulans* (exposed to native mycorrhizae) showed similar colonization percentage than plants singly inoculated with *F. mosseae* (exposed to the two source of mycorrhizae) or plants without yeast nor *F. mosseae* inoculum (exposed to native mycorrhizae); but the co-inoculation of *T. pullulans* and *F. mosseae* (exposed to the two source of mycorrhizae) resulted in the lowest percentage of mycorrhizal colonization. In another study, we observed a negative effect of *S. eubayanus* on *Rhizophagus irregularis* colonization of tomato roots (Mestre et al., 2022), which was linked to the activation of the plant Induced Systemic Resistance. In the present study, a similar phenomenon may result in response to pressure by the inoculated microorganisms added to the indigenous microorganism from the soil used in the pot's substrate. Although the low mycorrhizal colonization, the *T. pullulans*-*F. mosseae* co-inoculation treatment rendered high average plant biomass, high percentage of plants with fruits and high yield per plant. For most variables, this treatment was not different than co-inoculation of *S. eubayanus* and *F. mosseae* which showed the highest colonization percentage. Therefore, the inhibitory effect on colonization is not affecting the general growth and production of the plants which received *F. mosseae* and *T. pullulans* inocula.

CONCLUSION

Some of the unexpected and challenging-to-interpret results obtained in our study underscore the complexity of agronomic research, where fungal and plant species, plant age, microbial interactions, and environmental conditions play critical roles. The experimental design employed allowed us to partially simulate conditions closer to those encountered by plant producers. The growth variables measured in seedlings failed to predict growth or production levels in mature plants, highlighting the importance of conducting *in-vivo* trials encompassing the plant's productive age. The application of *Funneliformis mosseae* inoculum demonstrated a significant increase in plant yield, despite the possibility that the inoculum was not fully infective. Inoculation with *S. eubayanus* CRUB2014 showed good result for plant yield and mycorrhizal colonization. *Tausonia pullulans* CRUB1772 exhibited the ability to enhance plant growth and yield independently of its effects on mycorrhizal colonization, suggesting that this yeast may independently benefit tomato production. Although, we failed to observed synergist effect of yeast and mycorrhizal inoculation, we identified the yeast strains *S. eubayanus* CRUB2014 and *Tausonia pullulans* CRUB1772 as promising candidates to explore sustainable crop production practices.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Prof. J. Puga for his helpful assistance with technical and greenhouse work. Dra. Boenel M was supported by a doctoral fellowship from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). This work was supported by the “Universidad Nacional del Comahue-Centro Regional Universitario Bariloche” under Grant 04-B200; “Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT)” under Grant PICT 2018-3441.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aguilera, P., Becerra, N., Alvear, M., Ortiz, N., Turrini, A., Azcón-Aguilar, C., ... & Borie, F. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi from acidic soils favors production of tomatoes and lycopene concentration. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 102 (6): 2352-2358. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11573>

- Biel, C., Camprubí, A., Lovato, P. E. & Calvet, C. (2021). On-farm reduced irrigation and fertilizer doses, and arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improve water productivity in tomato production. *Scientia Horticulturae* 288: 110337. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110337>
- Bonfante, P. & Requena, N. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology* 14 (4): 451-457. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.014>
- Carvajal, M., Godoy, L., Gebauer, M., Catrileo, D. & Alborno, F. (2024). Screening for indole-3-acetic acid synthesis and 1-aminocyclopropane-carboxylate deaminase activity in soil yeasts from Chile uncovers *Solicoccozyma aeria* as an effective plant growth promoter. *Plant and Soil* 496 (1): 83-93. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05906-x>
- De Mendiburu, F. (2020). *Agricolae tutorial (Version 1.3-2)—Statistical procedures for agricultural research*.
- Dejana L., Ramírez-Serrano, B., Rivero, J., Gamir, J., López-Ráez, J. A. & Pozo, M. J. (2022) Phosphorus availability drives mycorrhiza induced resistance in tomato. *Frontiers in Plant Science* 13: 1060926. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1060926>
- Fernandez, N. V., Mestre, M. C., Marchelli, P. & Fontenla, S. B. (2012). Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. *FEMS microbiology ecology* 80 (1): 179-192. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01287.x>. PMID:22224476
- Fox, J. & Weisberg, S. (2018). *An R companion to applied regression*. Sage publications.
- Fracchia, S., Godeas, A., Scervino, J. M., Sampedro, I., Ocampo, J. A. & Garcia-Romera, I. (2003). Interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Soil Biology and Biochemistry* 35 (5): 701-707. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00086-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00086-5)
- Gallegos-Cedillo, V. M., Diáñez, F., Nájera, C. & Santos, M. (2021). Plant agronomic features can predict quality and field performance: a bibliometric analysis. *Agronomy* 11 (11): 2305. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112305>
- Gollner, M. J., Püschel, D., Rydlová, J. & Vosátka, M. (2006). Effect of inoculation with soil yeasts on mycorrhizal symbiosis of maize. *Pedobiologia* 50 (4): 341-345. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.06.002>
- Hartig, F. (2020). DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. *R Packag version 020*.
- Jiang, C., Johkan, M., Hohjo, M., Tsukagoshi, S. & Maruo, T. (2017). A correlation analysis on chlorophyll content and SPAD value in tomato leaves. *HortResearch* 71 (71): 37-42. <http://doi.org/10.20776/S18808824-71-P37>
- Lidoy, J., López-García, Á., Amate, C., García, J. M., Flors, V., García-Garrido, J. M.,... & Pozo, M. J. (2023). Regulation of mycorrhizal coloniza-

- tion under stress in tomato depends on symbiotic efficiency. *Environmental and Experimental Botany* 215: 105479. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105479>
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist* 115 (3): 495-501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>
- Mestre, M. C., Fontenla, S. & Rosa, C. A. (2014). Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Canadian journal of microbiology* 60 (6): 371-382. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0897>
- Mestre, M. C., Fontenla, S., Bruzone, M. C., Fernández, N. V. & Dames, J. (2016). Detection of plant growth enhancing features in psychrotolerant yeasts from Patagonia (Argentina). *Journal of basic microbiology* 56 (10): 1-9. <https://doi.org/1098-1106.10.1002/jobm.201500728>
- Mestre, M. C., Severino, M. E. & Fontenla, S. (2021). Evaluation and selection of culture media for the detection of auxin-like compounds and phosphate solubilization on soil yeasts. *Revista argentina de microbiología* 53 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.12.004>
- Mestre, M. C., Tamayo Navarrete, M. I. & García Garrido, J. M. (2022). Exploring the yeast-mycorrhiza-plant interaction: *Saccharomyces eu-bayanus* negative effects on arbuscular mycorrhizal formation in tomato plants. *Plant and Soil* 479 (1): 529-542. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05538-7>
- Mestre, M. C., Rosa, C. A., Safar, S. V., Libkind, D. & Fontenla, S. B. (2011). Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS microbiology ecology* 78 (3): 531-541. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01183.x>
- Mohamed, H. M. (2015). Effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) and soil yeasts interaction on root nodulation, N-fixation and growth of faba bean (*Vicia faba*). *Malaysian Journal of Soil Science* 19: 157-168.
- Nimsi, K. A., Manjusha, K., Kathiresan, K. & Arya, H. (2023). Plant growth-promoting yeasts (PGPY), the latest entrant for use in sustainable agriculture: a review. *Journal of Applied Microbiology* 134 (2): 1-11. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac088>
- Phillips, J. M. & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society* 55 (1): 158-IN18.
- Radić, D., Karličić, V., Đorđević, J., Jovičić-Petrović, J., Kljujev, I., Lalević, B. & Raičević, V. (2022). Soil yeasts promoting plant growth: benefits for the development of common wheat and white mustard. *Zemdirbyste-Agriculture* 109 (1): 27-34. <https://doi.org/10.13080/z-a.2022.109.004>

- Sampedro, I., Aranda, E., Scervino, J. M., Fracchia, S., García-Romera, I., Ocampo, J. A. & Godeas, A. (2004). Improvement by soil yeasts of arbuscular mycorrhizal symbiosis of soybean (*Glycine max*) colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 14: 229-234. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0285-y>
- Sarabia, M., Jakobsen, I., Grønlund, M., Carreon-Abud, Y. & Larsen, J. (2018). Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. *Applied Soil Ecology* 125: 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.012>
- Smith, S. E. & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Soval-Villa, M., Wood, C. W. & Guertal, E. A. (2002). Tomato leaf chlorophyll meter readings as affected by variety, nitrogen form, and night-time nutrient solution strength. *Journal of plant nutrition* 25 (10): 2129-2142. <https://doi.org/10.1081/PLN-120014065>
- Van Der Heijden, M. G. & Horton, T. R. (2009). Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of ecology* 97 (6): 1139-1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01570.x>
- Vargas, M. F., Mestre, M. V., Vergara, C., Maturano, P., Petrignani, D., Pesce, V. & Vazquez, F. (2024). Residual brewer's *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as biofertilizers in horticultural seedlings: towards a sustainable industry and agriculture. *Frontiers in Industrial Microbiology* 2: 1360263. <https://doi.org/10.3389/finmi.2024.1360263>
- Venegas Jaque, P., Cardozo, A., Sisón Cáceres, L. A. & Gasparetti, A. F. (2021). Elaboración de Biopreparados a partir de microorganismos del bosque para la producción frutihortícola de la Comarca Andina del paralelo 42°. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/9881>
- Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J. F., Ferrer, A. & Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development* 34 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0180-7>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Diversidad de hongos formadores de micorriza arbuscular en plantas cultivadas de *Swietenia macrophylla* en la Amazonía peruana

Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated plants of *Swietenia macrophylla* in the Peruvian Amazon

Herrera, Isabel¹; Krystel C. Rojas^{1*}; Merlin H. Gárate²; Héctor Guerra¹; Jorge M. Revilla¹; Ymber Flores³; Ewald Sieverding⁴

¹ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Programa de Investigación en Manejo Integral del Bosque y Servicios Ecosistémicos. Carretera Federico Basadre Km 12.400, Pucallpa, Coronel Portillo, Perú.

² Colegio de Ingenieros del Perú (CIP). Jr. Tacna 551. Pucallpa, Coronel Portillo, Perú.

³ Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Avenida Centenario Km 4.00, Pucallpa, Coronel Portillo, Perú.

⁴ Universidad de Hohenheim, Instituto de Ciencias Agrícolas en los Trópicos (Instituto de Hans-Ruthenberg), Garbenstr. 13, 70599 Stuttgart Hohenheim, Alemania.

* Autor correspondiente: <krojas@iiap.gob.pe>

Resumen

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) constituyen un potencial microbiano, para su uso sostenible en la agroforestería y restauración ecológica. Actualmente en Perú la contribución de diversidad HMA es limitada y no existen reportes de la diversidad nativa de HMA asociados a plantas cultivadas de caoba (*Swietenia macrophylla* G. King), una especie forestal vulnerable, de interés en programas de reforestación y restauración ecológica. El objetivo de este estudio fue identificar la diversidad de morfoespecies de HMA en plantas cultivadas de *S. macrophylla* G. King, así como el número de esporas y porcentaje de colonización de HMA en cinco zonas de muestreo ubicadas en los departamentos de Ucayali, San Martín y Huánuco. Se emplearon quince individuos de *S. macrophylla* G. King por cada zona de muestreo. Se identificaron 35 morfoespecies de HMA en el área de estudio, encontrando mayor riqueza de morfoespecies en los distritos de Chazuta y Von Humboldt

➤ Ref. bibliográfica: Herrera, I.; Rojas, K. C.; Gárate, M. H.; Guerra, H.; Revilla, J. M.; Flores, Y.; Sieverding, E. 2025. Diversidad de hongos formadores de micorriza arbuscular en plantas cultivadas de *Swietenia macrophylla* en la Amazonía peruana. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 77-95. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2095>

➤ Recibido: 14 de diciembre 2024 – Aceptado: 25 de abril 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.



OPEN ACCESS

➤ URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

➤ Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

departamento de San Martín y Ucayali respectivamente. Las especies de HMA predominantes fueron las de las familias Acaulosporaceae y Glomeraceae con 13 en cada familia. *Ambispora reticulata* se encontró en común para cuatro zonas de muestreo; mientras que 19 morfoespecies se encontraron exclusivas de una zona de muestreo. El estudio reveló mayor número de esporas en las zonas de muestreo con plantas de menos de un año de establecimiento. El porcentaje de colonización no varió significativamente entre los sitios, donde se encontraron en promedio 42% de colonización por HMA en raíces en todas las zonas de muestreo.

Palabras clave: Acaulosporaceae; agroforestal; caoba; diversidad; HMA; morfoespecies.

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) constitute a microbial resource with potential for sustainable application in agroforestry and ecological restoration. Currently in Peru, the documented diversity of AMF diversity is limited, and no prior reports exist on the native AMF diversity associated with cultivated plants of mahogany (*Swietenia macrophylla* G. King), a vulnerable forest species of interest in reforestation and ecological restoration programs. This study aimed to identify the diversity of AMF morphospecies in cultivated *S. macrophylla* plants, as well as the number of spores and the percentage of AMF root colonization across five sampling areas located in the departments of Ucayali, San Martín and Huánuco. Fifteen individuals of *S. macrophylla* G. King were sampled in each sampling area. Thirty-five AMF morphospecies were identified in the study areas, with the highest richness found in the districts of Chazuta and Von Humbolt, within the departments of San Martín and Ucayali, respectively. The most predominant AMF species belonged to the Acaulosporaceae and Glomeraceae families, with 13 species per family. *Ambispora reticulata* was found in common for four sampling areas; while 19 morphospecies were exclusive to a single sampling area. The study revealed a higher number of spores in the sampling areas with plants less than one year of age. The average percentage of root colonization by AMF was 42% and did not vary significantly among the sampling locations.

Keywords: Acaulosporaceae; agroforestry; AMF morphospecies; diversity; mahogany.

INTRODUCCIÓN

Los Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se asocian con el 72% de las plantas vasculares (Brundrett y Tedersoo, 2018). Estos microorganismos están presentes en la mayoría de los ambientes terrestres y en ciertos ecosistemas acuáticos a nivel global; desempeñan un papel esencial tanto en la salud de las plantas individuales como en el equilibrio de los ecosistemas (Öpik y Davison, 2016). Este grupo de organismos del suelo en simbiosis obligada es un componente ubicuo y funcionalmente crítico de los ecosistemas terrestres (Stürmer *et al.*, 2018). Diversos estudios han demostrado su efectividad para mejorar la calidad del suelo, crecimiento, nutrición y calidad de las plantas (Medina y Azcón, 2010; Ajeesh *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018; Falcón *et al.*, 2021) protección contra plagas (Vallejos *et al.*, 2021a; 2021b), capacidad para la recuperación de pastizales (Jenqui *et al.*, 2018), recuperación de suelos contaminados (Ramos, 2019) y en la restauración de áreas degradadas (Asmelash *et al.*, 2016).

En el Perú las investigaciones en HMA todavía son escasas y limitadas, más aún en el estudio de su diversidad. Asmelash *et al.*, (2016) sostiene que los mejores efectos de inoculación de HMA se obtienen cuando los inóculos están compuestos de hongos nativos en lugar de exóticos; por lo que es importante conocer nuestra diversidad para su protección y uso posterior. Por ejemplo en el departamento de San Martín se ha reportado cinco especies nuevas para el filo Glomeromycotina encontradas en agroecosistemas de sachá inchi (Corazón, *et al.*, 2019a; 2019b, 2019c, 2020) y una especie nueva en café (Corazón *et al.*, 2022), lo que refleja un gran potencial para su estudio y posterior uso en la agricultura y agroforestería que permita fortalecer programas de recuperación de áreas degradadas y restauración con especies forestales nativas.

Swietenia macrophylla G. King es una especie maderable “considerada por muchos como la mejor madera para la ebanistería a nivel mundial” (Guillén, 2014), “es una especie que se encuentra amenazada y que en el año 2003 fue incluida en el Apéndice II de la Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas (CITES)”, desde entonces se ha propiciado el conocimiento de las políticas públicas relacionadas con la conservación de la caoba (Lombardi *et al.*, 2003). *Swietenia macrophylla* G. King desarrolla simbiosis con HMA y permiten mejorar el crecimiento de plántulas (Reyes, 2011; Satyabrata y Santhoshkumar, 2020), sin embargo no existen estudios de la diversidad nativa en Perú asociadas a plantas cultivadas de *S. macrophylla* G. King en Perú.

En tal sentido el presente estudio planteó como objetivo identificar la diversidad de morfoespecies de HMA asociadas a *S. macrophylla* G. King, en plantas cultivadas, así como el número de esporas y el porcentaje de colonización considerando las variables biométricas de las plantas evaluadas en cinco zonas de muestreo de la Amazonía del Perú.

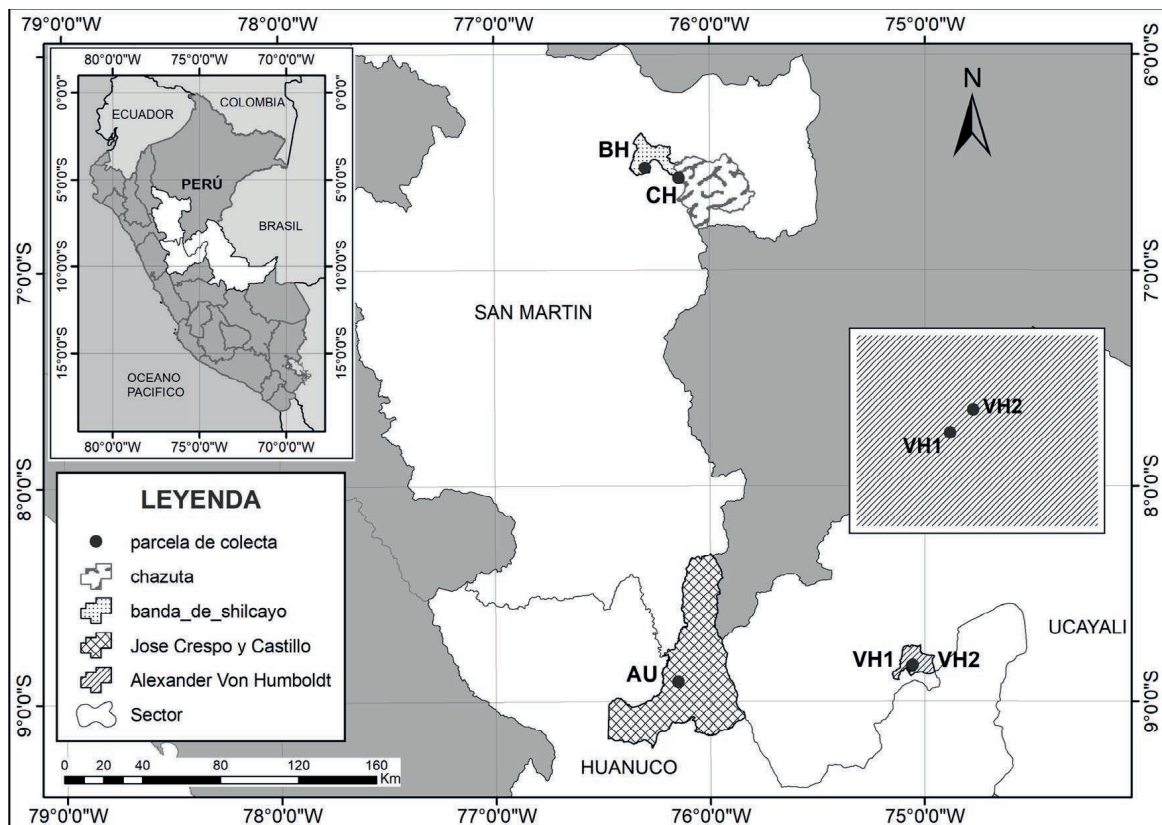


Fig. 1. Ubicación de zonas de muestreo en Perú en los departamentos de San Martín, Huanuco y Ucayali con las localidades de investigación [Chazuta (CH), Bello Horizonte (BH), Aucayacu (AU), y Von Humboldt (VH1 y VH2)].

Fig. 1. Geographic locations of the sampling areas in Peru, within the departments of San Martín, Huanuco and Ucayali, indicating the research localities [Chazuta (CH), Bello Horizonte (BH), Aucayacu (AU), and Von Humboldt (VH1 and VH2)].

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Cinco parcelas de *S. macrophylla* G. King se seleccionaron en los departamentos de San Martín, Ucayali y Huánuco (Fig. 1). Los sitios estudiados fueron: Chazuta (CH), Bello Horizonte (BH), Aucayacu (AU), y Von Humboldt (VH1 y VH2) (Tabla 1). El Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú [SENAMHI], (2021) menciona que, las zonas de muestreo CH y BH son de clima lluvioso, con humedad abundante todas las estaciones del año; cuyas fluctuaciones térmicas van de 20°C a 32°C durante el año; con precipitación anual de 1502 mm. La zona AU presenta un clima de tipo muy lluvioso, cálido y con humedad abundante todas las estaciones del año, presenta precipitación anual de 2848 mm, temperatura máxima de 30°C y mínima de 19°C (SENAMHI, 2021). Las zonas de muestreo VH1 y VH2 presentan un clima de tipo lluvioso, cálido y con humedad abundante todas las estaciones del año.

Tabla 1. Descripción de los sitios muestreados; altura de localidad y año de establecimiento de la plantación de *Swietenia macrophylla*.

Table 1. Description of the sampling sites, altitude, and year of establishment of the *Swietenia macrophylla* plantation.

Código	Departamento	Localidad	Altitud (msnm)	Año de instalación
AU	Huánuco	Aucayacu	591	2005
BH	San Martín	Bello Horizonte	332	2017
CH	San Martín	Chazuta	262	2017
VH1	Ucayali	Alexnder Von Humboldt	247	2008
VH2	Ucayali	Alexander Von Humboldt	236	2002

La temperatura máxima va entre 30°C, en verano y otoño y 32°C, en primavera; y la temperatura mínima, entre 20°C, en los meses de invierno, y 21°C, en primavera y verano. La precipitación anual es de 4283 mm.

Las parcelas de Chazuta y Bello Horizonte correspondían a parcelas experimentales conducidas por la dirección regional de San Martín del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) establecidas en predios de agricultores bajo un diseño de sistema agroforestal. La zona de muestreo CHA presentó asociaciones de *S. macrophylla* G.King (caoba) con *Theobroma cacao* L. (cacao), *Simarouba amara* Aubl. (marupa), *Azadirachta indica* A.Juss. (nim) y *Jatropha curcas* L. (piñón lanco). La zona de muestreo BH presentó asociación de *S. macrophylla* G.King con *T. cacao* L., *A. indica* A.Juss. y *J. curcas* L. La parcela de Aucayacu correspondía a un predio privado conducido bajo un sistema agroforestal de *S. macrophylla* G.King con *T. cacao* L. y presencia de cobertura nativa no identificada. El historial de la parcela fue caña braval-purma de cetico-cacao con plátano, asociado en los primeros años con maíz-frejol-tomate. El abonamiento se realizaba tres veces por año empleando compost Tropimax, roca fosfórica, guano de isla, urea y sulfato de potasio.

Las parcelas de Von Humboldt corresponden a ensayos experimentales del Instituto Nacional de Innovación Agraria, donde la parcela VH1 correspondía a un sistema de plantación mixta a campo abierto, establecido en octubre de 2008, suelo gleysol, plano, con drenaje deficiente, con cobertura de *Centrosema macrocarpum* Benth., establecido en el 2° año de plantación. Asimismo, la parcela VH2 se estableció el 2002, como un sistema agroforestal de cacao y arroz con especies forestales en línea. Su cobertura inicial fue de “mucuna”, la cual fue reemplazada posteriormente por *Centrosema macrocarpum* Benth., esta parcela corresponde a un suelo inceptisol, fisiografía colinosa y buen drenaje. Al momento del muestreo, solo se observaba el componente de cacao y las especies forestales.

Tabla 2. Altura, diámetro y proyección de copa de plantas de *Swietenia macrophylla*, en los sitios de muestreo. DAP: Diámetro a la altura de pecho. Media + error estándar de 15 plantas.

Table 2. Height, diameter and crown diameter of *Swietenia macrophylla* in the sampling sites. DAP: Diameter at breast height. Mean + standard error of 15 plants.

Código	Altura (m)	Diámetro basal (cm)	DAP (cm)	Proyección de copa (m)
AU	21,70 + 0,91		32,36 + 2,21	4,62 + 0,14
BH	1,33 + 0,06	3,87 + 0,13		0,53 + 3,28
CH	1,45 + 0,09	3,41 + 0,21		0,58 + 3,54
VH1	8,51 + 0,49		9,32 + 0,71	1,90 + 0,11
VH2	12,25 + 0,73		15,83 + 0,83	2,55 + 0,19

Muestreo

El muestreo se realizó entre abril y mayo del 2018, correspondiente a la estación de otoño. En cada sitio se seleccionaron quince plantas de *S. macrophylla* G.King, (Tabla 2), de las cuales se seleccionaron ocho plantas para el muestreo de raíces.

El muestreo de suelo consistió en extraer cuatro submuestras de cada planta, siguiendo la dirección de los puntos cardinales, cada uno distanciados del tronco a la mitad de la proyección de la copa, a una profundidad de 20 cm. Las muestras se obtuvieron con un muestreador de suelo.

El muestreo de raíces se realizó siguiendo las direcciones de las raíces de la planta de caoba (*S. macrophylla* G.King), con el objeto de ubicar raicillas de máximo 1 mm de espesor hasta contar con 30 segmentos de 1 cm por planta. Las raíces fueron conservadas en alcohol al 50% hasta su evaluación.

Análisis de suelo

Por cada parcela, las sub muestras de suelo de las 15 plantas se homogenizaron extrayendo 1 kg de muestra compuesta por sitio, para el análisis físico-químico. Para cada muestra se midieron las siguientes variables: potencial de hidrógeno (pH) en agua, materia orgánica (MO), nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) total, clase textural (Tabla 3), capacidad de intercambio catiónico (CIC) y cationes cambiables (Tabla 4).

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo en sitios de muestreo.**Table 3.** Physicochemical soil properties in the sampling sites.

Zona de muestreo	pH	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	Textura
AU	5,61	1,93	0,11	9,7	92	Franco
BH	4,90	1,25	0,10	4,2	52	Franco arenoso
CH	6,03	3,00	0,22	9,2	223	Arcilloso
VH1	4,73	2,55	0,12	2,5	90	Franco arcilloso
VH2	4,91	1,90	0,10	2,6	94	Franco arcilloso

Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria la Molina. 2018. pH: potencial de hidrógeno en agua; M.O: materia orgánica. N, P, K: nitrógeno, fósforo y potasio totales.

Soil, Plant, Water, and Fertilizer Analysis Laboratory of the National Agrarian University of La Molina. 2018. pH: potential of hydrogen in water; O.M: organic matter. N, P, K: total nitrogen, phosphorus, and potassium. Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria la Molina. 2018. pH: potencial de hidrógeno en agua; M.O: materia orgánica. N, P, K: nitrógeno, fósforo y potasio totales.

Tabla 4. Capacidad de intercambio catiónico (CIC) y cationes cambiabiles de suelos en los sitios muestreados.**Table 4.** Cation-exchange capacity (CIC) and exchangeable cations of soils in the sampling sites.

Zona de muestreo	CIC (meq/100g)	Cationes cambiabiles (meq/100g)				
		Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	Na ⁺	Al ⁺³ + H ⁺
AU	11,52	7,54	1,57	0,16	0,06	0,10
BH	6,40	3,13	0,63	0,12	0,10	0,10
CH	28,00	23,90	3,55	0,42	0,13	0,00
VH1	19,20	7,81	1,93	0,18	0,09	1,35
VH2	17,60	9,76	2,55	0,17	0,07	0,55

Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria la Molina. 2018. CIC: Capacidad de intercambio catiónico.

Soil, Plant, Water, and Fertilizer Analysis Laboratory of the National Agrarian University of La Molina. 2018. CIC: Cation exchange capacity.

Evaluación de esporas

Las esporas se extrajeron de la homogenización de las cuatro sub muestras tomadas de cada una de las 15 plantas, para lo cual se tamizó en una malla de 4mm de espesor. Se evaluaron 3 repeticiones de 20 g (balanza marca OHAUS, modelo Adventurer Pro AV3102) por cada muestra compuesta a través del método de Sánchez *et al.* (2010) que consistió en el tamizado y decantado por vía húmeda de los propágulos del hongo, los que se recolectaron sobre tamices de 250 y 45 μm de apertura y se separaron por centrifugación (centrífuga: marca Hettich, modelo Rotina 420 R) despues de establecer dos gradientes en los tubos de centrifugación: en el fondo una solución de azúcar de 70% sobre el tamizado con algo de agua. Por la centrifugación, las esporas se concentran en la superficie de la solución de azúcar. Las esporas se sacaron de la superficie del gradiente de azúcar con una jeringa, se pasaron a un tamiz de 45 micro de apertura para lavarlas con agua. Luego se pasaron las esporas con algo de agua a una caja de Petri en donde se realizó el conteo utilizando para guiar una red de líneas en el fondo fuera de la caja de Petri.

Se utilizó un estereomicroscopio a 45x de aumento (estereoscopio Trinocular, marca Olympus, modelo SZ61) para identificar las esporas. Para el cálculo del número de esporas por 100 g de suelo seco se secaron 20 g de suelo de cada una de las 15 muestras aplicando la siguiente fórmula de Sánchez *et al.* (2010):

$$N^{\circ} \text{ esporas} = \frac{\text{Esporas contadas}}{\text{Peso muestra}} \times \frac{P_i}{P_f} \times 100$$

Donde:

Peso muestra = peso de la muestra de donde se extraen las esporas,

P_i = peso inicial de la muestra usada para determinar humedad,

P_f = peso final de la muestra usada para determinar humedad.

Evaluación de porcentaje de colonización

Se seleccionaron al azar 30 segmentos de 1 cm de raíces de *S. macrophylla* G. King de cada uno de los árboles muestreados, las cuales fueron colocados en tubos de ensayo debidamente rotulados, se siguió el método descrito por (Lugo *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2015) que consistió en el aclarado de las raíces con KOH al 10% por 6 horas, realizando recambio de KOH antes del ingreso al baño maría (marca: Gemmyco, modelo: YCW-010E) donde se calentaron por 30 minutos a temperatura de 90°C. Posteriormente se eliminó el KOH y se agregó agua oxigenada diluida al 6%, por 30 minutos, culminado el tiempo se enjuago tres veces con agua. Para el teñido de raíces se agregó una solución conteniendo colorante de tinta Parker 5% y se llevó a baño maría por 1 min a 90°, culminado este proceso se descartó el tinte y se enjuago con agua por tres veces, luego se agregó la solución de lactoglicerol para eliminar el exceso de tinta y se dejó por 7 horas. Las raíces teñidas se distribuyeron en placas Petri, luego se realizó el montaje en láminas portaobjetos previamente rotulados en 10 segmentos de 1 cm y se añadió lactoglicerol, se cubrió las raíces con láminas cubreobjetos y se selló con esmalte transparente.

La determinación del porcentaje de colonización se realizó según la metodología de Ruiz y Rojas (2011). El porcentaje de colonización fúngica se contabilizó como porcentaje de densidad visual de colonización de raíces como descrito por anteriores autores. Las fotografías de estructuras de HMA encontradas en raíces se tomaron con la cámara Zeiss AxioCam ERc 5S.

Identificación de especies HMA

Para la identificación de morfoespecies de HMA se separaron esporas de 25 g de muestra de suelo como se describió arriba, una muestra compuesta de cada sitio. Las esporas se colectaron primero en una caja de Petri con agua y de esta se transfirieron los consorcios de morfotipos de esporas a láminas portaobjeto para microscopio con dos gotas de agua con ayuda de una pipeta. Después de la evaporación del agua se colocó una mezcla de alcohol polifenilico con ácido láctico (Koske y Tessier, 1983) y se taparon con cubre objeto y se dejaron secar. De estas láminas permanentes se observaron los morfotipos de HMA en un microscopio “Leitz Laborlux 8” a 100x y 400x de aumento y se tomaron fotos de esporas representativas con una cámara Nikon Coolpix 4500”, fijada al microscopio. La identificación se hizo considerando la formación típica de las esporas, las estructuras de sus paredes y de las conexiones hifales. La organización taxonómica a nivel de género fue según Wijayawardene *et al.* (2022). A nivel de morfo-especies se siguieron los trabajos de Oehl *et al.* (2011), Błaszowski (2012) y las descripciones posteriores de especies nuevas de hongos HMA (vease Dr. Janusz Błaszowski: https://zor.zut.edu.pl/Glomeromycota_2/Home.html). Las placas de microscopía se encuentran en la colección privada del Dr. Ewald Sieverding, en Alemania. La colección de las placas tienen los números 6372 hasta 6376 para el sitio Bello Horizonte (BH), 6377 hasta 6378 para Aucayacu (AU), 6379 hasta 6381 para Chazuta (CH), 6382 hasta 6386 para Von Humboldt 1 (VH 1) y 6387 hasta 6393 para Von Humboldt 2 ((VH 2). Notas de cada placa se encuentran en su Libro de Laboratorio “Mykorrhiza Nr. 7”, páginas 148-156.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R versión 4.3.2 (R Core Team, 2023). Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis del paquete agricolae (Versión 1.3-7), para comparar las diferencias entre las cinco zonas de muestreo (AU, BH, CH, VH1 y VH2) y efectuar las comparaciones post hoc, con un nivel de significación global de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Identificación y riqueza de especies de HMA

En este estudio se registraron un total de 35 morfoespecies de HMA, distribuidas en 12 géneros, 8 familias y 5 órdenes (Tabla 5 y 6). Siete morfo-especies se identificaron a nivel de género, dado que las esporas en estudio no se clasificaban con las descritas previamente, indicando un potencial de registro de nuevas especies. En las zonas de muestreo CH y AU se identificó una *Endogone* sp., no incluida en las tablas 5 ni 6, por ser un género que forma ect-endo-micorriza.

Tabla 5. Ocurrencia de especies (+) de Hongos Micorrizógenos Arbusculares en la rizósfera de *Swietenia macrophylla* en las diferentes localidades. Aquí las de los órdenes Archaeosporales y Diversisporales. Para abreviaciones de sitios véase Tabla 1.

Table 5. Occurrence of species (+) of Arbuscular Mycorrhizal Fungi species in the rhizosphere of established *Swietenia macrophylla* plants at the different sampling localities. Here those belonging to the Archaeosporales and Diversisporales orders. For sampling site abbreviations, see Table 1.

Orden / Familia / Especie	AU	BH	CH	VH1	VH2
ARCHAEOSPORALES					
Ambisporaceae					
<i>Ambispora reticulata</i>		+	+	+	+
<i>Ambispora</i> sp (no identificada amarilla de 70-80 um)	+				+
Archaeosporaceae					
<i>Archaeospora undulata</i>					+
<i>Archaeospora</i> sp.				+	
DIVERSISPORALES					
Acaulosporaceae					
<i>Acaulospora cavernata</i>		+			
<i>Acaulospora kentinensis</i>	+	+			
<i>Acaulospora lacunosa</i>		+			
<i>Acaulospora longula</i>		+	+	+	
<i>Acaulospora mellea</i>				+	+
<i>Acaulospora morrowiae</i>	+	+		+	
<i>Acaulospora rugosa</i>			+		
<i>Acaulospora scrobiculata</i>			+	+	+
<i>Acaulospora tuberculata</i>		+			
<i>Acaulospora</i> sp. (no conocida con depresiones regulares y espinas)			+		
<i>Acaulospora</i> sp. (no conocida espora alargada morena)				+	+
<i>Acaulospora</i> sp (no conocida espora oblonga amarilla con pared fina)			+		
<i>Kuklospora colombiana</i>				+	
Diversisporaceae					
<i>Diversispora epigaea</i>		+			
<i>Diversispora spurca</i>			+		
Pacisporaceae					
<i>Pacispora scintillans</i>			+		

Morfoespecies identificadas por Ewald Sieverding.

Morphospecies identified by Ewald Sieverding.

Ambispora reticulata fue la especie más ubicua, encontrándose en cuatro zonas de muestreo; además *Acaulospora longula*, *A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *Glomus ambisporum*, *G. heterosporum*, *Rhizoglosum fasciculatum* y *Paraglosum occultum* se encontraron en tres zonas de muestreo. Diecinueve especies se encontraron exclusivas en una de cada localidad muestreada. Las zonas de muestreo CH y VH1 presentaron mayor riqueza de morfoespecies (Tabla 7).

Los géneros con más altos números de especies fueron *Acaulospora* y *Glomus*, con 12 y 7 morfoespecies respectivamente (Fig. 2). El género *Acaulospora*, presentó mayor número de especies, en las zonas de muestreo, con plantas de menor tiempo de establecimiento: BH, CH y VH1 (Tabla 5).

Tabla 6. Ocurrencia de especies (+) de Hongos Micorrizógenos Arbusculares en la rizósfera de plantas establecidas de *Swietenia macrophylla* en las diferentes localidades. Aquí las de los órdenes Entrophosporales, Glomerales y Paraglomerales. Para abreviaciones de sitios de muestreo vease Tabla 1.

Table 6. Occurrence of species (+) of Arbuscular Mycorrhizal Fungi species in the rhizosphere of established *Swietenia macrophylla* plants at the different sampling localities. Here those belonging to the Entrophosporales, Glomerales and Paraglomerales. For sampling site abbreviations, see Table 1.

Orden / Familia / Especie	AU	BH	CH	VH1	VH2
ENTROPHOSPORALES					
Entrophosporaceae					
<i>Entrophospora etunicata</i>			+	+	
GLOMERALES					
Glomeraceae					
<i>Dominikia aurea</i>			+		
<i>Glomus ambisporum</i>		+	+	+	
<i>Glomus brohultii</i>		+	+		
<i>Glomus heterosporum</i>		+	+	+	
<i>Glomus macrocarpum</i>			+		
<i>Glomus</i> sp. (no identificada espora hialina de 60 um)		+			
<i>Glomus</i> sp. (no identificada con pared gruesa y espinas)	+				
<i>Glomus</i> sp. (no identificada similar a <i>Oehlia diaphana</i>)				+	
<i>Oehlia diaphana</i>			+		
<i>Rhizoglosum fasciculatum</i>		+	+	+	
<i>Rhizoglosum irregulare</i>	+			+	
<i>Sclerocystis clavispora</i>					+
<i>Sclerocystis coremioides</i>				+	+
PARAGLOMERALES					
Paraglomeraceae					
<i>Paraglomus occultum</i>		+		+	+

Morfoespecies identificadas por Ewald Sieverding.

Morphospecies identified by Ewald Sieverding.

Tabla 7. Número de especies de HMA de cada familia de HMA en los diferentes sitios de muestreo. Para abreviaciones de sitios véase Tabla 1.

Table 7. Number of AMF species found from each AMF family in the different sampling sites. For site abbreviations, see Table 1.

Familias	AU	BH	CH	VH1	VH2
Ambisporaceae	1	1	1	1	2
Archaeosporaceae	0	0	0	1	1
Acaulosporaceae	2	6	5	6	3
Diversisporaceae	0	1	1	0	0
Pacisporaceae	0	0	1	0	0
Entrophosporaceae	0	0	1	1	0
Glomeraceae	2	5	7	6	2
Paraglomeraceae	0	1	0	1	1
Riqueza de especies	5	14	16	16	9

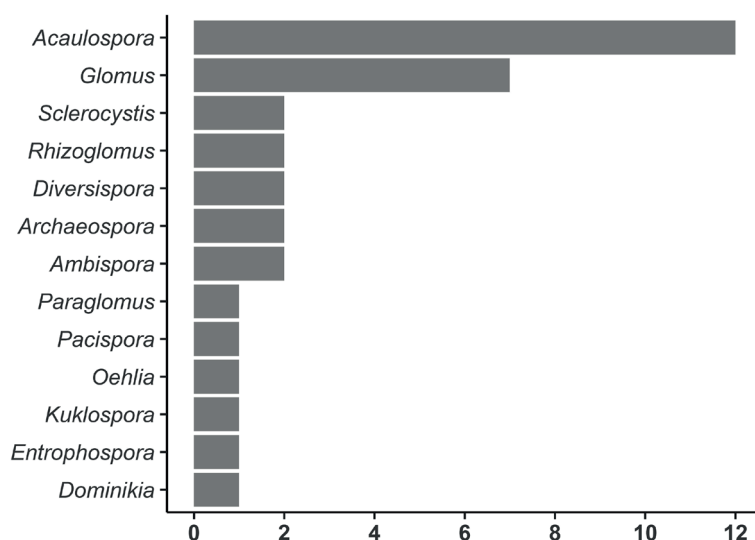


Fig. 2. Riqueza de morfoespecies de HMA en los géneros de Glomeromycotina en el área de estudio (Nº especies/género).

Fig. 2. Richness of AMF morphospecies in the genera of Glomeromycotina in the study area (Nº of species/genus).

Las familias Acaulosporaceae y Glomeraceae, presentaron la mayor riqueza de morfoespecies, con 13 por cada una, seguido por las familias Ambisporaceae, Archeosporaceae y Diversisporaceae con 2 morfoespecies respectivamente, mientras que las familias Entrophosporaceae y Pacisporaceae tuvieron menor registro con una morfoespecie (Tabla 5 y 6).

Número de esporas

El número de esporas se encontró en un rango de 100 a 2900 esporas en 100 g de suelo seco. La prueba de Kruskal y Wallis detectó diferencias significativas ($p < 0,01$) en relación con las zonas de muestreo (Fig. 3). La comparación post hoc de rangos indicó la formación de tres grupos, observándose mayor número de esporas en las zonas de muestreo BH, CH y VH1 con plantas de 1 a 10 años de establecidas comparativamente con las zonas de muestreo VH2 y AU con plantas de 13 y 16 años de establecidas.

Porcentaje de colonización

El porcentaje de colonización en *S. macrophylla* G. King en las zonas de muestreo presentó una media de 42%. La prueba de Kruskal y Wallis no detectó diferencias significativas ($p = 0,36$) para esta variable entre zonas de muestreo.

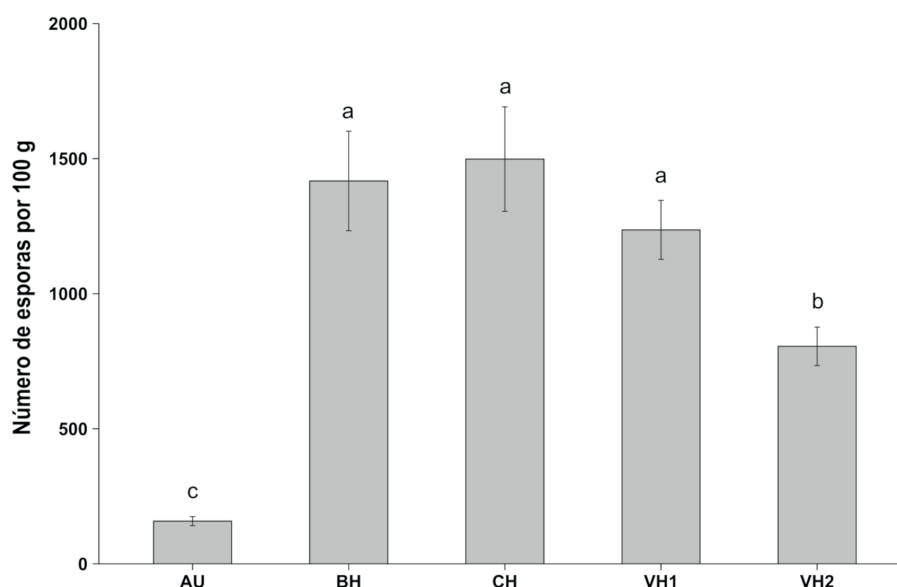


Fig. 3. Numero promedio de esporas de HMA en 100 g de suelo seco en las localidades de muestreo (medio número + error estándar). Para abreviaciones de localidades véase Fig. 1. Barras con letras distintas muestran diferencias estadísticas a $p < 0,01$.

Fig. 3. Mean number AMF spores per 100 g of dry soil in the sampling localities (mean + standard error). For locality abbreviations of locations see Fig. 1. Bars with different letters indicate statistical differences $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación incrementan la información de la diversidad de HMA en la Amazonía peruana. En este trabajo se reporta 35 morfoespecies distribuidas en 12 géneros, a partir de cinco zonas de muestreo (Tabla 5 y 6), este valor es mayor a los registrados en México y China (Shi *et al.*, 2006; Rodríguez-Morelos *et al.*, 2014), evidenciando un gran potencial de registro de nuevas especies en Perú, que podría contribuir a ampliar al conocimiento del phylum Glomeromycotina. De las morfoespecies presentadas en este trabajo *A. scrobiculata*, se reporta en tres zonas de muestreo, es una especie ubicua, dado que ha sido detectada en siete continentes (Stürmer *et al.*, 2018). Se encontró mayor riqueza de morfoespecies en zonas de muestreo CH y VH1, donde el porcentaje de materia orgánica fue mayor, pudiendo ser uno de los factores que explica, la mayor riqueza de morfoespecies en estas zonas. Shao *et al.* (2024) encontraron correlaciones significativas, entre la diversidad y abundancia de las comunidades de HMA con la materia orgánica del suelo en China.

A nivel de géneros *Acaulospora* y *Glomus* fueron los géneros más predominantes en número de especies HMA, resultados similares se reportan en el Neotrópico, México, Cuba y China (Araújo *et al.*, 2019; Pontes *et al.*, 2017; Stürmer *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

El género *Acaulospora* reportó mayor número de especies, en las zonas de muestreo con plantas de menor tiempo de establecimiento, resultados similares fueron encontrados en hábitat natural de *S. macrophylla* G. King (Rodríguez-Morelos *et al.*, 2014), probablemente porque especies de este género se reproducen rápido bajo condiciones tropicales con altas temperaturas y lluvias. Acaulosporaceae y Glomeraceae se reportan como más predominantes en la zona tropical de América del Sur (Cofré *et al.*, 2019).

El número promedio de esporas registrado alrededor del hospedante *S. macrophylla* G. King fue de 1023 por 100 g de suelo seco, mayor a lo reportado en bosques naturales y plantados en tres diferentes altitudes en China (Shi *et al.*, 2006), en un bosque natural de la India (Dhar y Mridha, 2006) y en plantas establecidas de cinco años de edad en Manaos (Hara *et al.*, 2021). En este trabajo encontramos mayor número de esporas en las zonas de muestreo CH, BH y VH1 con plantas jóvenes, comparado con las zonas de muestreo AU y VH2 con plantas adultas, estos resultados fueron contrarios a los encontrados por Rodríguez-Morelos *et al.* (2014). Se debe considerar también que la formación de esporas también depende de las condiciones edáficas de los suelos, aún en este estudio no se encontraron correlaciones expresas entre características del suelo y números de esporas. Un menor número de esporas en la zona de muestreo AU probablemente se deba a un menor grado de estrés en las plantas de *S. macrophylla* G. King bajo el sistema agroforestal. Este resultado concuerda con lo reportado por Araújo *et al.* (2019), quienes encontraron una menor cantidad de esporas en un bosque nativo, sugiriendo que los bajos valores se asocian con la estabilidad de los ecosistemas naturales. Adicionalmente, es posible que tanto la altitud como el mes de colecta hayan influido en la menor cantidad de propágulos en esta zona. Ramírez-Gómez *et al.* (2019), encontraron una correlación negativa entre el número de esporas y la altitud durante la época de lluvias, observando una menor cantidad de esporas a mayor altitud en este periodo.

Se requiere investigación adicional para comprender este resultado de porque haya tanta diferencia en la producción de esporas entre sitios. Pontes *et al.* (2017) señalan que algunas especies de HMA pueden producir una gran cantidad de esporas, mientras que otras generan pocas, incluso con una biomasa micelial similar. Así, en este estudio en los sitios AU y VH2 con menor número de esporas, hubo menos especies del género *Glomus* que es conocido de producir altos números de esporas; también se sabe que con más edad de cultivación hay una sucesión en la ocurrencia en géneros y especies de HMA que puede tener efectos sobre la esporulación (Oehl *et al.* 2009). Esta variabilidad puede depender de diversos factores, como las estrategias de vida de las especies, las características del entorno del suelo, los socios simbióticos, así como la humedad y las fluctuaciones de temperatura a lo largo de diferentes años.

En cuanto a la colonización en las raíces de *S. macrophylla* G. King, se observó colonización por estructuras de hongos micorrízicos (hifas, arbusculos y vesículas) con un promedio de 42%, sin diferencias entre plantas jóvenes o de mayor edad, ni dependiendo de las características de suelos. El grado de colonización de raíces con HMA es superior a los encontrados en China (Shi *et al.*, 2006), pero menores a los encontrados en Manaos (Hara *et al.*, 2021). Nuestros resultados pueden indicar que *S. macrophylla* G. King es una especie de árbol que se asocia rápido con diferentes especies nativas de HMA independiente de los géneros o familias de HMA.

CONCLUSIONES

Este estudio proporciona el primer reporte de morfoespecies de HMA en plantas cultivadas de *S. macrophylla* en la Amazonia de Perú, información que permitirá incrementar el reporte de morfoespecies de HMA en Perú y contribuir al entendimiento de la distribución de estos microorganismos, su uso potencial y conservación. Es importante destacar que aparentemente la colonización de raíces en plantas jóvenes es rápida y que resulta en rápida reproducción de esporas de HMA. Además, este estudio mostró una colonización estable durante el crecimiento de las plantas, desde el primer año hasta su etapa adulta. En este sentido, se debe investigar las ventajas que ofrece la inoculación de plantas en vivero, para incrementar la producción de biomasa en campo, o si fuera suficiente sembrar plantas sin inoculación de HMA. Para ello, se propone realizar ensayos en diferentes suelos de la región, comparando estos dos sistemas.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Rafael Troyas por su valioso apoyo brindado, durante el muestreo en su predio. A la Estación Experimental Alexander von Humboldt del Instituto Nacional de Innovación Agraria, por las facilidades brindadas para el muestreo, en sus parcelas experimentales. Al Ing. MSc. José Carlos Rojas García por sus orientaciones para el aclareo y tinción de raíces de caoba.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Se declara que los autores no presentan ningún conflicto de intereses relevante en este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajeesh, R., Santhoshkumar, S., Gopal, S. y Binu, N. (2017). Screening of selected native arbuscular mycorrhizal fungi at different levels for their symbiotic efficiency with *Tectona grandis* seedlings. *Journal Of Tropical Forest Science* 29 (4): 395-403. <https://doi.org/10.26525/jtfs2017.29.4.395403>
- Araújo, T. M., Silva, K. D., Pereira, G. M. D., Curcino, A., Stürmer, S. L. y Gomide, P. H. O. (2019). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroforestry, Conventional Plantations and Native Forests in Roraima State, Northern Brazil. *Journal of Agricultural Science* 11 (14): 282. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n14p282>
- Asmelash, F., Bekele, T. Birhane, E. (2016). The Potential Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Restoration of Degraded Lands. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01095>
- Błaszowski, J. (2012) *Glomeromycota*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Brundrett, M. C. y Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220 (4): 1108-1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Cofré, M. N., Soterias, F., Del Rosario Iglesias, M., Velázquez, S., Abarca, C., Risio, L., Ontivero, E., Cabello, M. N., Domínguez, L. S. y Lugo, M. A. (2019). Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in South America: A Review. En M.C. Pagano y M.A. Lugo (Eds.), *Mycorrhizal Fungi in South America* (pp. 49-72). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4_3
- Corazón, M., Cerna, A., Guerrero, J., Vallejos, A., Alves, G. A. y Oehl, F. (2019a). *Acaulospora aspera*, a new fungal species in the Glomeromycetes from rhizosphere soils of the inka nut (*Plukenetia volubilis* L.) in Peru. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 92. <https://doi.org/10.5073/jabfq.2019.092.035>
- Corazón, M., Cerna, A., Guerrero, J., Vallejos, A., Carballar, da Silva, G. A. y Oehl, F. (2019b). *Nanoglomus plukenetiae*, a new fungus from Peru, and a key to small-spored Glomeraceae species, including three new genera in the “Dominikia complex/clades”. *Mycological Progress* 18 (12): 1395-1409. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01522-1>
- Corazón, M., Cerna, A., Guerrero, J., Vallejos, A., Carballar, S., da Silva, G. A. y Oehl, F. (2019c). *Microkamienskia* gen. Nov. And *Microkamienskia peruviana*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from Western Amazonia. *Nova Hedwigia* 109: 355-368. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0551
- Corazón, M., Cerna, A., Guerrero, J., Vallejos, A., Ríos, O., Vallejos, G., De la Sota Ricaldi, A. M., Monique, V., Alves, G. y Fritz Oehl. (2020). *Paraglomus occidentale*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the sources of the Amazon river in Peru, with a key to the Paraglo-

- romycetes species. *Sydowia* 72: 85-94. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia72-2020-0085>
- Corazón, M., Vallejos, A., De la Sota, A., Vallejos, G., Ruíz, M., Monique, V., Alves, G. y Fritz, O. (2022). *Acaulospora flavopapillosa*, a new fungus in the Glomeromycetes from a coffee plantation in Peru, with an updated key for the identification of Acaulosporaceae species. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 95. <https://doi.org/10.5073/jabfq.2022.095.002>
- Dhar, P. P. y Mridha, M. A. U. (2006). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in different trees of madhupur forest, Bangladesh. *Journal of Forestry Research* 17 (3): 201-205. <https://doi.org/10.1007/s11676-006-0047-8>
- Falcón, E., Cobas, M., Bonilla, M., Rodríguez, O., Romero, C. V. y Rodríguez, E. (2021). Calidad de plántulas de *Swietenia mahagoni* L. Jacq. Producida en sustratos inoculados con hongo micorrízico arbuscular. *Revista de Ciencias Ambientales* 55 (2): 311-225. <https://doi.org/10.15359/rca.55-2.15>
- Guillén, R. (2014). Estimación del volumen de la caoba (*Swietenia macrophylla* King) usando ecuaciones de ahusamiento para el departamento de Madre de Dios. (Tesis de Grado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Lima, Perú.
- Hara, F. A., Silva, A. C., Moreira, F. W., Vendruscolo, J., Souza, L. C. y Oliveira, L. A. (2021). Ocorrência de fungos micorrízicos em pau-rosa (*Aniba duckei* kosterm) e mogno (*Swietenia macrophylla* king) em diferentes épocas de coleta na região de Manaus. *Research, Society and Development* 10 (4): e25010413666. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13666>
- Jenqui, P., Gonzáles, P., Ramírez, J. y Batista, J. A. (2018). Efecto de la inoculación micorrízica arbuscular en la rehabilitación de un pastizal cultivado de guinea (*Megathyrsus maximus* cv. *Likoni*). *Cultivos Tropicales* 38 (4): 30-38. <https://doi.org/10.1234/ct.v38i4.1400>
- Koske, R. E. y Tessier, B. (1983). A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycological Society of America Newsletter* 34: 59.
- Lombardi, I., Barrena, V., Huerta, P. y Gárnica, C. (2003). Propuesta para la recuperación de las poblaciones de Caoba (*Swietenia macrophylla* King) en el Perú Estrategia Nacional. Recuperado de https://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2525/technical/Propuesta%20para%20la%20recuperacion%20de%20las%20poblaciones%20de%20caoba%20en%20el%20Peru.pdf?v=1709403524
- Lugo, M., Iriarte, H., Crespo, E., Torres, L., Ontivero, E., Risio, L., Menoyo, E. y Balleteros, S. (2018). Manual de Metodologías para el trabajo con hongos y sus simbiosis. <https://www.researchgate.net/publication/329809810>
- Medina, A. y Azcón, R. (2010). Effectiveness of the application of arbuscular mycorrhiza fungi and organic amendments to improve soil quality and plant performance under stress conditions. *Journal of*

- Soil Science and Plant Nutrition* 10 (3). <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100009>
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Wiemken, A. y Boller, T. (2009). Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 134: 257-268.
- Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J., Ineichen K., da Silva G.A. (2011) Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2: 191-199.
- Öpik, M. y Davison, J. (2016). Uniting species- and community-oriented approaches to understand arbuscular mycorrhizal fungal diversity. *Fungal Ecology* 24: 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.07.005>
- Pontes, J. S., Oehl, F., Marinho, F., Coyne, D., Silva, D. K. A. D., Yano-Melo, A. M. y Maia, L. C. (2017). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil's Caatinga and experimental agroecosystems. *Biotropica* 49 (3): 413-427. <https://doi.org/10.1111/btp.12436>
- Ramírez-Gómez, M., Pérez-Moncada, U., Serralde-Ordoñez, D., Peñaranda-Rolón, A., Roveda-Hoyos, G. y Rodríguez, A. (2019). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi communities associated with cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) crops. *Agronomía Colombiana* 37 (3): 239-254. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n3.74008>
- Ramos, A. L. (2019). Efectos de la asociación simbiótica entre *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S.S.M.) C. Walker & A. Schübler y fabáceas nativas en el tratamiento de suelos contaminados con petróleo. Trabajo de grado. Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería Agraria. Universidad Católica SEDE SANPENTAE.
- R Core Team. (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Reyes, D. (2011). Evaluación del efecto inoculante de micorriza arbuscular nativa en el crecimiento de 3 especies forestales a nivel de vivero en Pucallpa (Tesis Pregrado), Universidad Nacional de Ucayali. Perú.
- Rodrigues, L. A., Barroso, D. G. y Figueiredo, F. A. M. M. D. A. (2018). Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* L. F. *Ciência Florestal* 28 (1): 25-34. <https://doi.org/10.5902/1980509831572>
- Rodríguez, Y., Arias, L., Mujica, Y., Medina, L., Kalyanne, F. y Aracely, M. (2015). Alternativa de la técnica de tinción para determinar la colonización micorrízica. *Cultivos Tropicales* 36 (2): 18-21. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10232.65287>
- Rodríguez-Morelos, V. H., Soto-Estrada, A., Pérez-Moreno, J., Franco-Ramírez, A. y Díaz-Rivera, P. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of seedlings and mature trees of *Swietenia macrophylla* (Magnoliophyta: Meliaceae) in Los Tuxtlas, Veracruz,

- Mexico. *Revista Chilena de Historia Natural* 87 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s40693-014-0009-z>
- Ruiz, P. y Rojas, K. (2011). Hongos de micorriza arbuscular. Protocolos y procedimientos de evaluación. Manual técnico. ASPERU. Perú.
- Sánchez, M., Posada, R., Velásquez, D. y Narvaez, M. (2010). Metodologías básicas para el trabajo con Micorriza Arbuscular y Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular. <https://www.researchgate.net/publication/271507112>
- Satyabrata, N. y Santhoshkumar, A. (2020). Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the Growth of Mahogany (*Swietenia macrophylla* King.) Seedlings under Nursery Condition. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences* 8 (6): 124-129. <https://doi.org/10.18782/2582-2845.8241>
- SENAMHI. (2021). CLIMAS DEL PERÚ Mapa de Clasificación Climática Nacional. Recuperado de <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/01404SENA-4.pdf>
- Shao L, Yan P, Ye S, Bai H, Zhang R, Shi G, Hu Y, Pang D, Niu X y Ni X (2024). Soil organic matter and water content affect the community characteristics of arbuscular mycorrhizal fungi in Helan mountain, an arid desert grassland area in China. *Frontiers in Microbiology* 15: 1377763. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1377763>
- Shi, Z. Y., Chen, Y. L., Feng, G., Liu, R. J., Christie, P. y Li, X. L. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the Meliaceae on Hainan island, China. *Mycorrhiza* 16 (2): 81-87. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0017-6>
- Stürmer, S. L., Bever, J. D. y Morton, J. B. (2018). Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): A phylogenetic perspective on species distribution patterns. *Mycorrhiza* 28 (7): 587-603. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0864-6>
- Vallejos T. G., Saboya P. A. y Arevalo L. A. (2021a). Efecto Bioprotector de Micorrizas Arbusculares en la Reducción de Roya (*Hemileia vastatrix*) en la Región San Martín. *Revista Agrotecnológica Amazónica* 1 (1): 34-44. <https://doi.org/10.51252/raa.v1i1.122>
- Vallejos-Torres, G., Espinoza, E., Marín-Díaz, J., Solis, R. y Arévalo, L. A. (2021b). The Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Against Root-Knot Nematode Infections in Coffee Plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 21 (1): 364-373. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00366-z>
- Wang, J., Wang, G. G., Zhang, B., Yuan, Z., Fu, Z., Yuan, Y., Zhu, L., Ma, S. y Zhang, J. (2019). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Tree Species in a Planted Forest of Eastern China. *Forests* 10 (5): 424. <https://doi.org/10.3390/f10050424>
- Wijayawardene N. N., Hyde K. D., Dai D. Q., Sánchez-García M., et al. (2022) Outline of Fungi and fungus-like taxa-2021. *Mycosphere* 13: 53-453.



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Mycophagy in the yellow-footed tortoise (*Chelonoidis denticulatus*): feeding trial experiments at Tijuca National Park (Rio de Janeiro, Brazil)

Micofagia de la tortuga de patas amarillas (*Chelonoidis denticulatus*): experimentos de pruebas alimentarias en el Parque Nacional da Tijuca (Río de Janeiro, Brasil)

Trierveiler-Pereira, Larissa^{1*}; Emily dos Santos Silva¹
Carolina Starling-Manne^{2,3}; Juliano M. Baltazar¹

¹ Laboratório de Estudos Micológicos (LEMic), Centro de Ciências da Natureza, Campus Lagoa do Sino, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Buri, SP, Brazil.

² Laboratório de Ecologia e Conservação de Populações (LECP), Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Refauna, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Corresponding author: Larissa Trierveiler-Pereira <larissapereira@ufscar.br>; UFSCar, R. Serafim Libâneo, 04, Centro, CEP: 13245-970, Caixa Postal: 64, Campina do Monte Alegre, SP, Brazil.

Abstract

The act of consuming any part of fungi is termed mycophagy. Certain basidiomes contain highly nutritious elements, such as proteins, vitamins, and minerals, which can be extremely valuable in the animal diet. Mycophagous behavior in animals is well-documented in ethological studies; however, due to the scarcity of macrofungi experts in Brazil, the fungal species consumed are often not identified. The Tijuca National Park (TNP) is a fragment of the Atlantic Forest located in the city of Rio de Janeiro (Brazil), covering an area of 3,953 hectares. The Refauna Association works within TNP to restore ecological interactions in the area through the reintroduction of vertebrate species previously present in the region. One of the reintroduced species is the yellow-footed tortoise (*Chelonoidis denticulatus*), a terrestrial chelonian. Several studies have documented the mycophagous behavior of chelonians; however, it is important to emphasize the lack of studies dedicated to identifying the fungal species comprising their diet. In November 2021, cafeteria-style

► Ref. bibliográfica: Trierveiler-Pereira, L.; Santos, E. S.; Starling-Manne, C.; Baltazar, J. M. 2025. Mycophagy in the yellow-footed tortoise (*Chelonoidis denticulatus*): feeding trial experiments at Tijuca National Park (Rio de Janeiro, Brazil). *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 97-109. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2073>

► Recibido: 9 de diciembre 2024 – Aceptado: 22 de abril 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.



OPEN ACCESS

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

feeding trials were conducted with Refauna's yellow-footed tortoises, in which they were offered the macrofungi collected from TNP were offered to the animals. A total of 21 basidiomycete specimens representing 13 taxa, were collected and offered. The morphology of the offered macrofungi was highly diverse, including agaricoid mushrooms, jelly fungi, gasteroid fungi (earthstar and sequestrate form), and coralloid fungi. The macrofungi were offered to seven individual tortoises, and only one rejected the offered mushrooms. Basidiomes from ten species were consumed by the tortoises, while three were either rejected or only partially accepted.

Keywords: Animal diet; chelonian; fauna reintroduction; fungi; fungivory.

Resumen

El acto de consumir cualquier parte de los hongos se denomina micofagia. Algunos basidiomas contienen elementos altamente nutritivos, como proteínas, vitaminas y minerales, que pueden ser extremadamente valiosos en la dieta animal. El comportamiento micofágico de animales está bien documentado en estudios etológicos; sin embargo, debido a la escasez de expertos en macrohongos en Brasil, las especies fúngicas consumidas a menudo no son identificadas. El Parque Nacional de Tijuca (PNT) es un fragmento de la Mata Atlántica ubicado en la ciudad de Río de Janeiro (Brasil), con una extensión de 3.953 hectáreas. La Asociación Refauna trabaja en el PNT para restaurar las interacciones ecológicas del área mediante la reintroducción de especies de vertebrados que previamente existían en la región. Una de las especies reintroducidas es la tortuga de patas amarillas (*Chelonoidis denticulatus*), un quelonio terrestre. Diversos estudios han documentado el comportamiento micofágico de los quelonios; sin embargo, es importante resaltar la falta de estudios dedicados a la identificación de las especies de hongos consumidas por estos animales. En noviembre de 2021, se realizaron experimentos de prueba alimentaria con las tortugas de patas amarillas de Refauna, a las que se les ofrecieron macrohongos recolectados en el PNT. Se recolectaron y ofrecieron un total de 21 especímenes de basidiomycetes representando 13 taxones. La morfología de los macrohongos ofrecidos fue altamente diversa, incluyendo hongos agaricoides, hongos gelatinosos, hongos gasteroides (estrella de tierra y forma sequestrada) y hongos coraloides. Los macrohongos fueron ofrecidos a siete tortugas individuales, y solo una tortuga no aceptó los macrohongos ofrecidos. Los basidiomas de diez especies fueron consumidos por las tortugas, mientras que tres fueron rechazados o consumidos solo parcialmente aceptados.

Palabras clave: Dieta animal, fungivoría, hongos, quelonio, reintroducción de fauna.

INTRODUCTION

Numerous animals feed on fungi, including invertebrates and vertebrates, and in some cases, fungi constitute their primary food source. Fungi serve as a food resource in forests and woodlands, providing protein and phosphorus, essential substances for many animals. The act of consuming any part of fungi is known as mycophagy (Longvah & Deosthale, 1998; Hanson *et al.*, 2003; Trierveiler-Pereira *et al.*, 2016; Elliott & Vernes, 2019). In addition to having caloric value, several mushrooms contain organic compounds that are important in the physiology of small mammals. An example of this is ergosterol, which plays a relevant role as a precursor to hormones (Milazzo, 1965; Shivrina *et al.*, 1968; Catalfomo & Trappe, 1970). Some fungi may also contain vitamins such as biotin, niacin, pantothenic acid, and riboflavin (Furlani & Godoy, 2007; Cheung, 2010).

According to the review presented by Elliott *et al.* (2019) on mycophagy in reptiles, 32 species of chelonian consume fungi. Tortoises have the ability to store water inside their bodies during dry periods and then reabsorb the liquid gradually. Since the basidiomas of fungi can be made up of up to 90% water, the consumption of mushrooms by the tortoises may assist with body hydration (Elliott *et al.*, 2019). It has also been observed that some species of the genus *Kinixys* (Bell, 1827) (African tortoises) showed an increase in growth rate when regularly consuming macrofungi (Mifsud & Stapleton, 2014).

In Brazil, two native species of land tortoises occur in the Atlantic Forest, namely: *Chelonoidis carbonaria* (Spix, 1824) and *C. denticulatus* (Linnaeus, 1766) (Sobral-Souza *et al.*, 2017). Jerozolimski (2005), in a study on the diet of wild populations of yellow-footed tortoise (*C. denticulatus*) and red-footed tortoise (*C. carbonaria*) in the state of Pará (Northern Brazil), found that macrofungi are considered the most important food for adult *C. denticulatus* individuals during the wettest season of the year. Additionally, fragments of macrofungi were found in 50% of the fecal samples, but fungal species were not identified. The yellow-footed tortoise is now locally extinct in many forests in Brazil, such as in the Tijuca National Park (Rio de Janeiro), where it is believed that the extinction occurred more than 200 years ago. In this location, the research project (now Association) 'Refauna' has been working on the reintroduction of the species into the park since 2018, with attempts involving more than 50 individuals (Fernandez *et al.*, 2017; Dorigo, 2021; Bragança & Menegassi, 2022; Santos *et al.*, 2022; Refauna, 2024).

To ensure the success of reintroductions, monitoring the adaptation of reintroduced animals is of utmost importance, aiming to observe the interactions and functions that may have been lost, since generalist species, such as the yellow-footed tortoise, have many ecological associations (Cid *et al.*, 2014; Genes *et al.*, 2017).

As knowledge about the animal's diet is crucial for ensuring the success of wildlife reintroduction programs, considering the importance of the mycophagous habit for species of tortoises and the gaps in knowledge about animals that consume macrofungi, this study was developed with the aim of contributing to the understanding of this topic in Brazil, identifying the fungal species consumed by the yellow-footed tortoise.

MATERIAL AND METHODS

The Tijuca National Park (TNP) is located in the central-south region of the State of Rio de Janeiro, within the municipality of Rio de Janeiro, covering an area of 3,953 hectares (Fig. 1). The forest fragment of TNP is part of the Atlantic Forest biome and constitutes the largest restored urban forest in the world (Zago *et al.*, 2020). According to the Köppen-Geiger classification (Peel *et al.*, 2007), the climate is Af (superhumid tropical), which contributes to the development of a considerable number of macrofungal species.

Cafeteria-style feeding trials were conducted with *Chelonoidis denticulatus* individuals over four days in November 2021. While trekking through different areas of TNP in search of tortoises monitored by the project, large

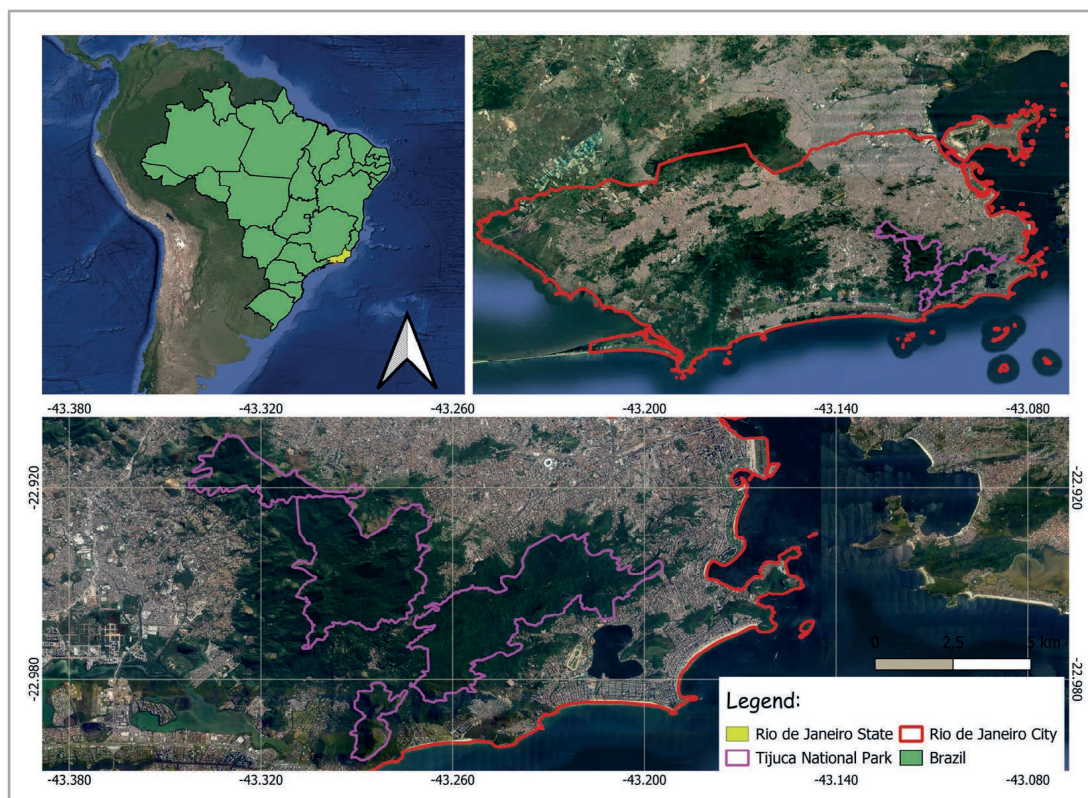


Fig. 1. Study area, Tijuca National Park (Rio de Janeiro, Brazil).

Fig. 1. Área de estudo, Parque Nacional Tijuca (Rio de Janeiro, Brasil).

basidiomes found were photographed from different angles (both *in situ* and *ex situ*), collected from the substrate with the aid of a pocket knife, and placed into collection bags and/or plastic boxes with individual compartments (Lodge *et al.*, 2004). Duplicates of the collections were separated to be offered to the tortoises on the same day (fresh basidiomes). The macro-fungal species were offered one at a time, and no other food was provided except for the macrofungi.

The reintroduced tortoises (six adults, four females and two males) in TNP were located in the forest with the aid of radio transmitters. One male individual (Xuanwu, No 63) that had not yet been reintroduced in the forest participated in the experiment within an enclosure. All tortoises involved in the study (seven in total) were identified by a name and a number. After locating the tortoises, the basidiomes collected during the trails were offered to them (Fig. 2), and their behavior in response to the offering was observed. The study used direct observation of mycophagic events to gather data (classified as consumed, partially consumed, or not consumed, irrespective of time), and Refauna holds all necessary permits to conduct the experiments. Data analysis was carried out qualitatively, aiming to identify the fungal species consumed.

Duplicates of the specimens offered to the tortoises were dehydrated, analyzed macro- and microscopically in the laboratory (LEMic-UFSCar), and then prepared for herbarium preservation (Wu *et al.*, 2004). Morphological analyses were carried out following traditional methods for studying macrofungi (Largent *et al.*, 1977; Largent, 1986; Singer, 1986; Pegler, 1997). The vouchers are deposited in the Mycological Collection of the SPSC Herbarium at UFSCar.



Fig. 2. Fresh basidiomes were offered directly from our hands (A) or were left in front of the tortoises (B). Photos: A. Larissa Trierweiler-Pereira; B. Amanda Prado-Elias.

Fig. 2. Basidiomas frescos fueron ofrecidos directamente desde nuestras manos (A) o fueron dejados frente a las tortugas (B). Fotos: A. Larissa Trierweiler-Pereira; B. Amanda Prado-Elias.

RESULTS AND DISCUSSION

During the feeding trials, six individuals of *C. denticulatus* consumed the offered basidiomes: Magali (No 38), Venus (No 15), Farol (n° 17), Grizzy (No 07), Iara (No 22), and Xuanwu (No 63) (Fig. 3). Individual n° 63 was the one that consumed the greatest diversity of macrofungi (six taxa in total), partially rejecting *Geastrum* cf. *saccatum* (consuming only the exoperidium – ‘rays’) and completely rejecting the coralloid fungus *Phaeoclavulina* sp. Similar to the previous one, No 07 also rejected *Geastrum* cf. *saccatum*, expelling part of it after chewing. Individual No 32 completely rejected the mushroom *Hygrocybe* cf. *conica*, the only fungus offered to it (Fig. 4).

All other offered fungi were consumed completely, as shown below. In total, 13 specimens were offered to the tortoises and were identified (at least to generic level). Table 1 presents the names of the taxa, along with other relevant information about the morphology of the basidiomes and the individuals that consumed them.

Table 1. Results of feeding trials conducted with yellow-footed tortoises (*Chelonoidis denticulatus*) individuals at the Tijuca National Park, RJ, Brazil.

Tabla 1. Resultados de experimentos de prueba alimentaria con las tortugas de patas amarillas (*Chelonoidis denticulatus*) en el Parque Nacional de Tijuca, RJ, Brasil.

Fungal taxon	Morphological group	Water Content*	Consumption**	Tortoise name and number
<i>Auricularia fuscosuccinea</i> (Mont.) Henn.	jelly fungus	HWC	CC	Venus (15), Farol (17), Grizzy (07)
<i>Clitocybula azurea</i> Singer	agaricoid mushroom	HWC	CC	Farol (17), Grizzy (07)
<i>Collybia violacella</i> Speg.	agaricoid mushroom	HWC	CC	Venus (15)
<i>Entoloma</i> cf. <i>bloxamii</i> (Berk. & Broome) Sacc.	agaricoid mushroom	HWC	CC	Iara (22)
<i>Favolus brasiliensis</i> (Fr.) Fr.	fleshy wood-ear	HWC	CC	Venus (15), Grizzy (07), Xuanwu (63)
<i>Geastrum</i> cf. <i>saccatum</i> Fr.	earthstar (gasteromycete)	MWC (exoperidium) / LWC (endoperidium)	PC	Grizzy (07), Xuanwu (63)
<i>Hygrocybe</i> cf. <i>conica</i> (Schaeff.) P. Kumm.	agaricoid mushroom	HWC	R	Esmeralda (32)
<i>Lactifluus</i> sp. (Pers.) Roussel	agaricoid mushroom	HWC	CC	Xuanwu (63)
<i>Lepiota</i> sp. ("La princesa") (Pers.) Gray	agaricoid mushroom	HWC	CC	Xuanwu (63)
<i>Leucopaxillus gracillimus</i> Singer & A.H. Sm.	agaricoid mushroom	HWC	CC	Magali (38)
<i>Oudemansiella cubensis</i> (Berk. & M.A. Curtis) R.H. Petersen	agaricoid mushroom	HWC	CC	Magali (38), Xuanwu (63)
<i>Phaeoclavulina</i> sp. Brinkmann	coralloid fungus	LWC	R	Xuanwu (63)
<i>Protuberia maracuja</i> Möller	sequestrate phalloid (gasteromycete)	HWC	CC	Farol (17)

*HWC (High Water Content); MWC (Medium Water Content); LWC (Low Water Content); **CC (Complete Consumption); PC (Partial Consumption); R (Rejected).

*HWC (Alto Contenido de Agua); MWC (Contenido Medio de Agua); LWC (Bajo Contenido de Agua); **CC (Consumo Completo); PC (Consumo Parcial); R (Rechazado).

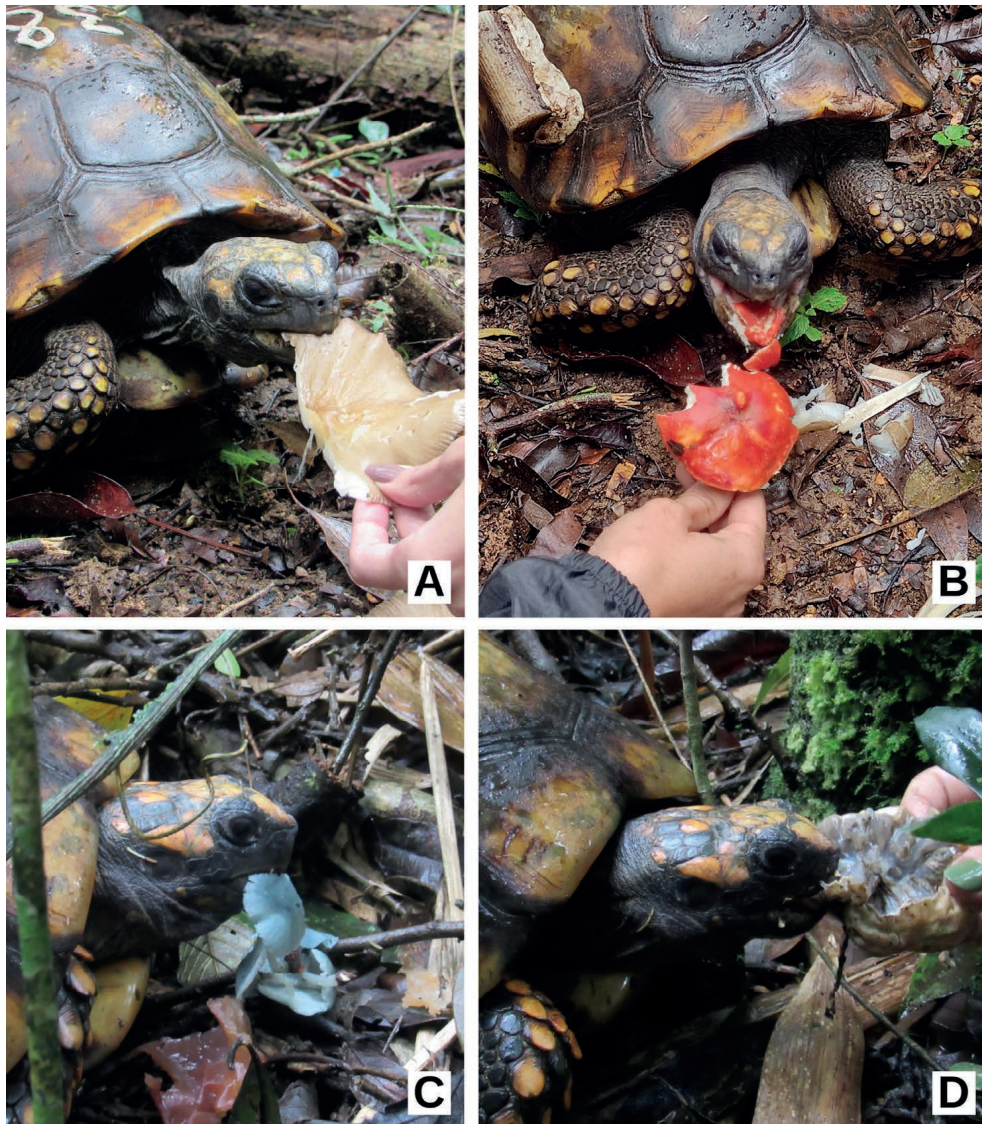


Fig. 3. Individuals of *Chelonoidis denticulatus* eating on the offered macrofungi (Tijuca National Park, RJ, Brazil). A-B) No. 38 eating on *Oudemansiella cubensis* (A) and *Leucopaxillus gracillimus* (B). C-D) No. 17 eating on *Clitocybula azurea* (C). and *Protuberia maracuja* (D). Photos: A, C, D. Larissa Trierweiler-Pereira; B. Amanda Prado-Elias.

Fig. 3. Individuos de *Chelonoidis denticulatus* alimentándose de los macrohongos ofrecidos (Parque Nacional da Tijuca, RJ, Brasil). A-B) N° 38 alimentándose de *Oudemansiella cubensis* (A) y *Leucopaxillus gracillimus* (B). C-D) N° 17 alimentándose de *Clitocybula azurea* (C) y *Protuberia maracuja* (D). Fotos: A, C, D. Larissa Trierweiler-Pereira; B. Amanda Prado-Elias.



Fig. 4. Refused basidiomes. A) Individual No. 63 only ate the exoperium ('rays') of *Geastrum* cf. *saccatum*. B) Individual No. 32 completely rejected *Hygrocybe* cf. *conica*. Photos: A. Larissa Trierveiler-Pereira; B. Amanda Prado-Elias.

Fig. 4. Basidiomas rechazados. A) Individuo N° 63 sólo consumió el exoperidio ("rayos") de *Geastrum* cf. *saccatum*. B) Individuo N° 32 rechazó completamente *Hygrocybe* cf. *conica*. Fotos: A. Larissa Trierveiler-Pereira; B. Amanda Prado-Elias.

The morphology and composition of the offered macrofungi were quite diverse: of the 13 macrofungi, eight are fleshy agaricoid mushrooms, which have a high water content. In addition to these, fungi with auricularioid, poroid, clavarioid, gasteroid (earthstar), and a fleshy sequestrate form (phalloid) were identified. It is noteworthy that only *Geastrum* cf. *saccatum* (partially consumed) and *Phaeoclavulina* sp. (rejected) have basidiomes with distinct textures, more rigid or papery. Among the completely rejected macrofungi, only *Hygrocybe* cf. *conica* had a high water content; however, it was offered to only one individual (Esmeralda, No 32). We can hypothesize that the tortoise No 07 was not hungry or was not attracted to the slimy pileus.

The mycophagous behavior of different groups of reptiles has been studied, often indirectly. Most studies report consumption based on observation and diet analysis methods, which fail to provide precise results. Studies using fecal or stomach analyses may also generate incomplete data, as fungi may be overlooked due to their digestibility.

For example, Koenig *et al.* (2001) mentioned that fungi were only detected in the diet of the blue-tongued lizard [*Tiliqua scincoides* (White, 1790)] through stomach dissection, but not through fecal analysis. Had the study not employed the dissection method, mycophagy would not have been detected, demonstrating that relying on just one method may lead to partial results. Assessing the importance of fungi as a component of the diet of reptiles is a challenging task, which explains why many diet studies neglect fungi (Elliott *et al.*, 2019).

Among studies on fungal consumption by reptiles, the majority focus on terrestrial chelonians, which is the group with the most data on this topic. This allows for more refined analyses of the impacts of these associations. It has been reported that all species of the genus *Kinixys* consume fungi and/or invertebrates (Hailey *et al.*, 1997). Elliott *et al.* (2019) compiled studies between 1892 and 2018 that documented mycophagous behavior in chelonians, resulting in reports from five families (Chelidae, Pelomedusidae, Emydinae, Geoemydidae, Testudinidae) across six regions (Africa, Asia, Europe, North America, and South America). The species *Terrapene carolina* (Linnaeus, 1758) has the highest number of mycophagous reports, likely due to its extensive distribution. *Chelonoidis denticulatus* is mentioned in five of these studies, with only one specifying the fungi it consumes. In a study on diet and food preference, Bayona & Rylander (1984) identified three macrofungi in its diet: *Favolus* sp., *Marasmius* sp., and *Auricularia* sp. Specimens of *Favolus* and *Auricularia*, which are abundant in the Atlantic Forest, were also consumed by the tortoises in the present study. From the Colombian Amazon, Vasco-Palacios *et al.* (2008) reported that native communities widely recognize that *C. denticulatus* consumes mushrooms, although no mushroom species were identified in the study.

Tortoises prefer humid areas close to water during the dry season, but during the rainy season they move away from these areas, as rivers and their tributaries may overflow (Bayona & Rylander, 1984). Moskovits & Bjorndal (1990) observed in their study, conducted on Maracá Island (northern Roraima, Brazil), that *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulata* consumed fungi more frequently during the dry season. It is hypothesized that the basidiomes they consume may serve as a hydration method for the tortoises, considering that some are composed of up to 90% water. Tortoises retain water to reabsorb when needed, and regular consumption of mushrooms may indicate an immediate hydration method or a way to store water for future use (Elliot *et al.*, 2019).

After evaluating the results, considering that most of the specimens offered were agarics (mushroom form) and had a high water content, it is assumed that the specimens rejected or partially consumed had a lower percentage of water or even a different texture from the others, as being rigid; consequently, they became less attractive compared to the other available options. Also, we must not forget that the tortoises may be attracted to the color and scent of the food, and these characteristics can influence their food choice.

It is known that tortoises are major seed dispersers, being highly effective in increasing germination rates by passing seeds through their digestive tract (Varela & Bucher, 2002; Jerozolinski *et al.*, 2009). However, there are not enough studies to understand how they contribute to fungal spore dispersal. To gather this information, studies which identifies the species consumed, are needed.

By identifying the specimens and assessing the viability of the spores, it is possible to measure the effects of disperser agents on the ecosystem. It is important to emphasize that data on animal behavior (e.g. feeding behavior), as well as the understanding of different ecological relationships occurring in nature, are crucial tools for developing strategies for the conservation of natural habitats (Reed, 2002).

This study reinforces the importance of mushrooms in the diet of the yellow-footed tortoise, but further research is needed in this area, over longer periods and using different methodologies, such as quantitative analyses, ecological studies, and spore viability tests.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank PIBIC-CNPq ('Edital 001/2021, ProPq-UFSCar') for the undergraduate research scholarship of ESS; financial support from 'Projeto Fazenda Escola Lagoa do Sino' (UFSCar) and LEMic-UFSCar; Amanda Prado-Elias for her help in the field and photographs; Parque Nacional da Tijuca (ICMBio), and the National Geographic Society.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Bayona, L. O. R. & Rylander, M. K. (1984). Notes on the biology of the tortoise *Geochelone denticulate* L. in Peru. *Amphibia-Reptilia* 5: 323-327.
- Bragança, D. & Menegassi, D. (2022). In Rio de Janeiro, a forest slowly returns to life, one species at a time. Retrieved from <https://news.mongabay.com/2022/03/in-rio-de-janeiro-a-forest-slowly-returns-to-life-one-species-at-a-time>
- Catalfomo, P. & Trappe, J. M. (1970). Ectomycorrhizal fungi: a phytochemical survey. *Northwest Science* 44 (1): 19-24.
- Cheung, P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin* 35 (4): 292-299. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01859.x>
- Cid, B., Figueira, L., Mello, A. F. T., Pires, A. S. & Fernandez, F. A. S. (2014). Short-term success in the reintroduction of the red-humped agouti *Dasyprocta leporina*, an important seed disperser, in a Brazilian Atlantic Forest reserve. *Tropical Conservation Science* 7 (4): 796-810. <https://doi.org/10.1177/194008291400700415>

- Dorigo, T., Siqueira, C., Oliveira, J. C. F., Fusinato, L. A., Santos-Pereira, M., Almeida-Santos, M. & Rocha, C. F. D. (2021). Anfíbios e répteis do Parque Nacional da Tijuca, Brasil, uma das maiores florestas urbanas do mundo. *Biota Neotropica* 21 (2): e20200978. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-0978>
- Elliott, T. F. & Vernes, K. (2019). Superb Lyrebird *Menura novaehollandiae* mycophagy, truffles and soil disturbance. *Ibis* 161 (1): 198-204. <https://doi.org/10.1111/ibi.12644>
- Elliott, T. F., Bower, D. S. & Vernes, K. (2019). Reptilian mycophagy: a global review of mutually beneficial associations between reptiles and macrofungi. *Mycosphere* 10 (1): 776-797. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/18>
- Fernandez, F. A. S., Rheingantz, M. L., Genes, L., Kenup, C. F., Galliez, M., Cezimbra, T., Cid, B., Macedo, L., Araujo, B. B. A., Moraes, B. S., Monjeau, A. & Pires, A. S. (2017). Rewilding the Atlantic Forest: restoring the fauna and ecological interactions of a protected area. *Perspectives in Ecology and Conservation* 15 (4): 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.09.004>
- Furlani, R. P. Z. & Godoy, H. T. (2007). Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Food Science and Technology* 27 (1): 154-157.
- Genes, L., Cid, B., Fernandez, F. A. S. & Pires, A. S. (2017). Credit of ecological interactions: a new conceptual framework to support conservation in a defaunated world. *Ecology and Evolution* 7 (6): 1892-1897. <https://doi.org/10.1002/ece3.2746>
- Hailey, A., Coulson, I. M. & Chidavaenzi, R. L. (1997). Fungus eating by the African tortoise *Kinixys spekii*. *Journal of Tropical Ecology* 13 (3): 469-474.
- Hanson, A. M., Hodge, K. T. & Porter, L. M. (2003). Mycophagy among primates. *Mycologist* 17 (1): 6-10. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(03\)00106-X](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(03)00106-X)
- Jerozolimski, A. (2005). Ecologia de populações silvestres dos jabutis *Geochelone denticulata* e *G. carbonaria* (Cryptodira: Testudinidae) no território da aldeia A'Ukre, TI Kayapó, sul do Pará. (Master Thesis), Universidade de São Paulo, Brazil.
- Jerozolimski, A., Ribeiro, M. B. N. & Martins, M. (2009). Are tortoises important seed dispersers in Amazonian forests? *Oecologia* 161: 517-528. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1396-8>
- Koenig, J., Shine, R. & Shea, G. (2001). The ecology of an Australian reptile icon: how do blue-tongued lizards (*Tiliqua scincoides*) survive in suburbia? *Wildlife Research* 28: 214-227. <https://doi.org/10.1071/WR00068>
- Largent, D. L. (1986). *How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features*. (3° Ed). Mad River Press: Eureka.
- Largent, D. L., Johnson, D. & Watling, R. (1977). *How to Identify Mushrooms to Genus III: Microscopic Features*. Mad River Press: Eureka.

- Lodge, D. J., Ammirati, J. A., O'Dell, T. E., Mueller, G. M., Huhndorf, S. M., Wang, C. J., Stokland, J. N., Schmit, J. P., Ryvarde, L., Leacock, P. R., Mata, M., Umana, L., Wu, Q. & Czederpiltz, D. L. (2004). Terrestrial and lignicolous macrofungi. In: Mueller, G. M., Bills, G. F. & Foster, M.S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods* (pp. 127–172). Elsevier Academic Press: Boston.
- Longvah, T. & Deosthale, Y. G. (1998). Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry* 63 (3): 331-334.
- Mifsud, D. A. & Stapleton, M. M. (2014). *Kinixys conservation blueprint: a comprehensive assessment to ensure the future of the genus*. Herpetological Resource and Management Technical Publication.
- Milazzo, F. H. (1965). Sterol production by some wood-rotting basidiomycetes. *Canadian Journal of Botany* 43 (11): 1347-1353.
- Moskovits, D. K. & Bjorndal, K. A. (1990). Diet and food preferences of the tortoises *Geochelone carbonaria* and *G. denticulata* in northwestern Brazil. *Herpetologica* 46: 207-218.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L. & McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* 11 (5): 1633-1644. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>
- Pegler, D.N. (1997). The agarics of São Paulo, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew.: London.
- Reed, J. M. (2002). Animal behavior as a tool in Conservation Biology. In: Aguirre, A. A., Ostfeld, R. S., House, C. A., Tabor, G. M. & Pearl, M. C. (Eds), *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice* (pp. 145-163). Oxford University Press: Oxford.
- Refauna (2024). Retrieved from: <https://refauna.com.br>
- Santos, A. M., de Araujo, J. S. & Rodrigues, M. N. (2022). Restauração de casco em jabuti-tinga (*Chelonoidis denticulata*). *Revista Sustinere* 10: 49-59. <https://doi.org/10.12957/sustinere.2022.65856>
- Shivrina, A. N., Platonova, E. G. & Cherotchenko, Y. U. (1968). Higher Basidiomycetes as sources of ergosterol. *Mikologiya i Fitopatologiya* 2: 65-69.
- Singer, R. (1986). The Agaricales in Modern Taxonomy. Koeltz Scientific Books: Koenigstein.
- Sobral-Souza, T., Lautenschlager, L., Morcatty, T. Q., Bello, C., Hansen, D. & Galetti, M. (2017). Rewilding defaunated Atlantic Forests with tortoises to restore lost seed dispersal functions. *Perspectives in Ecology and Conservation* 15 (4): 300-307. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.08.005>
- Trierveiler-Pereira, L., Silva, H. C. S., Funez, L. A. & Baltazar, J. M. (2016). Mycophagy by small mammals: new and interesting observations from Brazil. *Mycosphere* 7: 297-304. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/3/5>
- Varela, R. O. & Bucher, E. H. (2002). Seed dispersal by *Chelonoidis chilensis* in the Chaco dry woodland of Argentina. *Journal of Herpetology* 36: 137-140. <https://doi.org/10.2307/1565820>

- Vasco-Palacios, A. M., Suaza, S. C., Castaño-Betancur, M. & Franco-Molano, A. E. (2008). Conocimiento etnoecológico de los hongos entre los indígenas Uitoto, Muinane y Andoke de la Amazonía Colombiana. *Acta Amazonica* 38 (1): 17-30.
- Wu, Q., Thiers, B. M. & Pfister, D. H. (2004). Preparation, preservation, and use of fungal specimens in herbaria. In: Mueller, G. M., Bills, G. F. & Foster, M.S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods* (pp. 23–36). Elsevier Academic Press: Boston.
- Zago, J. P., Rocha, M. B. & Costa, I. J. O. (2020). Estudo sobre percepção ambiental de visitantes no Parque Nacional da Tijuca. *Research Society and Development* 9 (1): 81911675. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i1.1675>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Interacción entre *Cladorrhinum samala* (Sordariales, Ascomycota) y tomate (*Solanum lycopersicum* var. *platense*): promoción del crecimiento vegetal y colonización radicular

Interaction between *Cladorrhinum samala* (Sordariales, Ascomycota) and tomato (*Solanum lycopersicum* var. *platense*): promotion of plant growth and root colonization

Martin, Mara¹; Juan S. Guidobono^{2,3}; Laura Gasoni⁴; Viviana A. Barrera^{1,4}; Mario C. Nazareno Saparrat^{2,5,6*}

¹ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), INTA-CONICET. Las Cabañas y De los Reseros s/n, Hurlingham, C.P. 1686, Castelar, Buenos Aires, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, 1425 CABA, Argentina.

³ Laboratorio de Ecología de Poblaciones, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires IEGEBA, UBA, Buenos Aires, 1428 CABA, Argentina.

⁴ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, 1712 Castelar, Argentina.

⁵ Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), UNLP, CCT-La Plata-CONICET, 1900 La Plata, Argentina.

⁶ Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, 1900 La Plata, Argentina.

* Autor correspondiente: <masaparrat@yahoo.com.ar>

Resumen

En la actualidad, se han intensificado las investigaciones orientadas a la identificación de fuentes alternativas para la producción de biofertilizantes a base de hongos del suelo, con especial énfasis en especies poco estudiadas y escasamente caracterizadas. Durante el presente estudio se llevó a cabo un análisis comparativo de la capacidad de promoción del crecimiento de plantas de tomate por parte de tres aislamientos

► Ref. bibliográfica: Martin, M.; Guidobono, J. S.; Gasoni, L.; Barrera, V. A.; Nazareno Saparrat, M. C. 2025. Interacción entre *Cladorrhinum samala* (Sordariales, Ascomycota) y tomate (*Solanum lycopersicum* var. *platense*): promoción del crecimiento vegetal y colonización radicular. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 111-129. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2134>

► Recibido: 20 de febrero 2025 – Aceptado: 19 de mayo 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.



OPEN ACCESS

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

nativos de *Cladorrhinum samala* (INTA-AR1, INTA-AR5 e INTA-AR32), y dos cepas de referencia: *C. samala* CBS 302.9 y *C. foecundissimum* CBS 180.66. Los resultados obtenidos permitieron identificar a la cepa *C. samala* INTA-AR1 como la más prometedora, debido a los incrementos significativos en el peso seco radicular y en el peso fresco del tallo con respecto al tratamiento control (sin inoculación fúngica) y a los tratamientos con los otros hongos. Se evidenció un incremento del índice de verdor, que demostró un aumento progresivo asociado al incremento en el porcentaje de inóculo aplicado. Se observó que las hifas colonizaban la raíz de manera superficial a las 72 h y posteriormente en forma endófito a los 40 días. Este estudio permitió la selección de la cepa nativa de *C. samala* INTA-AR1 como candidata para su aplicación en diversos cultivos como promotora del crecimiento vegetal.

Palabras clave: *Cladorrhinum samala*; microorganismos del suelo; endófito radical; PGPF.

Abstract

Currently, research aimed at identifying alternative sources for the production of biofertilizers based on soil fungi has intensified, with special emphasis on understudied and poorly characterized species. This study conducted a comparative analysis of the growth-promoting capacity of tomato plants by three native isolates of *Cladorrhinum samala* (INTA-AR1, INTA-AR5, and INTA-AR32) and two reference strains: *C. samala* CBS 302.9 and *C. foecundissimum* CBS 180.66. The results identified the *C. samala* INTA-AR1 strain as the most promising, due to significant increases in root dry weight and stem fresh weight compared to the control treatment (without fungal inoculation) and the treatments with the other fungi. A progressive increase in the greenness index was observed, correlating with an increase in the percentage of inoculum applied. Hyphae were observed to colonize the root superficially at 72 h and subsequently endophytically at 40 days. This study led to the selection of the native *C. samala* INTA-AR1 strain as a candidate for application in various crops as a plant growth promoter.

Keywords: *Cladorrhinum samala*; soil microorganisms; root endophyte; PGPF.

INTRODUCCIÓN

Un conjunto de problemáticas y soluciones sustentables engloban a la agricultura actual, entre las cuales se encuentra la búsqueda de alternativas sostenibles en la producción de alimentos para el abastecimiento de la población humana creciente (FAO, 2016).

Desde la década de 1970 las investigaciones se orientaron en la búsqueda de alternativas ambientalmente amigables para el control de patógenos y la promoción del crecimiento vegetal. Entre ellos, los bioinsumos conteniendo PGPM (“*Plant Growth Promoting Microorganisms*”), involucran la utilización de hongos, algas y/o bacterias (Mamani y Filippone, 2018; Santoyo *et al.*, 2021). Los hongos promotores del crecimiento vegetal conocidos como PGPF (*Plant Growth-Promoting Fungi*), actúan a través de mecanismos directos, como el aumento en el suministro de nutrientes y la biosíntesis de fitohormonas; y mecanismos indirectos, como la acción antagónica contra agentes fitopatógenos (Valland y Goodman, 2004). Diversos hongos pertenecientes al phylum Ascomycota han sido reportados por poseer capacidad endófito y comportamiento como promotores del crecimiento vegetal. Los taxones descritos *Alternaria* y *Phoma* (Clase Dothideomycetes), *Aspergillus* y *Penicillium* (Clase Eurotiomycetes), *Beauveria bassiana*, diferentes especies de *Chaetomium* y *Fusarium*, *Metarhizium anisopliae*, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, *T. asperellum* y *T. saturnisporum* (Clase Sordariomycetes). También se han reportado representantes del phylum Basidiomycota como *Serendipita* (syn. *Piriformospora*; Clase Agaricomycetes), entre otros (Gill *et al.*, 2016; Hossain *et al.*, 2017; Martín *et al.* 2019; Spagnoletti y Chiocchio 2020; Adedayo y Babalola 2023).

Entre los años 2022 y 2023 se produjo una crisis de fertilizantes minerales (provocada por la guerra de Ucrania, caída de las exportaciones y aumento de los precios), generando escasez en la provisión de insumos desde Rusia y Bielorrusia como sales de potasio y metales catalizadores para la síntesis de amonio (Chojnacka *et al.*, 2023). Los fertilizantes son claves para incrementar el rendimiento de los cultivos; sin embargo, su uso inapropiado contribuye al cambio climático. Hay acciones que se realizan para mitigar el impacto de los efectos negativos provocados por el mal uso de los fertilizantes. Uno de los actores más importantes a nivel mundial es el IFA (*International Fertilizer Association*), cuya misión es la de promover el uso eficiente y responsable de los fertilizantes desde su producción hasta el manejo. Junto con la FAO se generó el código internacional sobre la conducta para el uso y manejo sustentable de los fertilizantes (*The international code of conduct for the sustainable use and management of fertilizers*). La importancia de la comunidad microbiana presente en la rizósfera es un factor determinante en la dinámica poblacional y en la composición de la vegetación de la rizósfera (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009).

Los microorganismos del suelo constituyen uno de los reservorios de biodiversidad más grandes del planeta, desempeñando un papel fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas y los procesos que en ellos ocurren (Ros *et al.*, 2024). En este contexto, los procesos que tienen lugar en la rizósfera han captado creciente interés, dado su importancia para comprender las interacciones suelo-planta. Algunos microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas de diferentes maneras: Pueden colonizar las células radiculares de forma intracelular (i-PGPM) o permanecen en la rizósfera de manera extracelular (e-PGPM). Ambos tipos desempeñan un papel crucial en la mejora del crecimiento y desarrollo vegetal mediante diversos mecanismos (Gopalan *et al.*, 2023).

Se pueden mencionar varias investigaciones realizadas sobre diferentes grupos de hongos como agentes activos en la formulación de biofertilizantes, indicadas como alternativas para la producción hortícola sostenible (Bohner *et al.*, 2013; Calabi-Floody *et al.*, 2018; Farias *et al.*, 2018; Chojnacka *et al.*, 2023). Las interacciones entre las plantas y los PGPF han demostrado generar efectos beneficiosos tanto en los órganos subterráneos como en los aéreos (Hossain *et al.*, 2017). El tomate (*Solanum lycopersicum*), es ampliamente utilizado como modelo de estudio sobre promoción del crecimiento vegetal debido a su sensibilidad y respuesta significativa a la inoculación con microorganismos beneficiosos del suelo, como hongos endófitos, micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Hernández-Valladares *et al.*, 2021; Leventis *et al.*, 2021; Miranda *et al.*, 2023). El tomate originario de América del Sur, es la segunda hortaliza más consumida a nivel mundial, después de la papa. Presenta una alta adaptabilidad a diversas condiciones de cultivo, sin embargo, puede presentar deficiencias nutricionales principalmente de potasio, fósforo, calcio, boro y zinc, las cuales pueden afectar la calidad, apariencia y producción de frutos (Blancard, 2011).

El género *Cladorrhinum* Saccardo y Marchal (1885) es un representante de la familia Lasiosphaeriaceae perteneciente al Orden Sordariales (Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota). En Argentina este género, hasta la fecha, está representado por las especies: *C. samala*, *C. bulbillosum* y *C. australe* (Carmarán *et al.*, 2015). Investigaciones iniciadas por Gasoni y Gurfinkel (1997) indicaron que *C. samala* A32 (actualmente tipificada como INTA-AR1) reveló un hábito endófito en raíces de plantas de algodón, ejerciendo estimulación del crecimiento vegetal en sustratos deficientes en fósforo. Los hongos endófitos se definen comúnmente como microorganismos cuya colonización interna en los tejidos vegetales puede demostrarse sin que se manifiesten síntomas evidentes de enfermedad o daño, al menos durante parte de su ciclo de vida (Schulz y Boyle, 2005). Estos hongos son componentes habituales del microbioma del suelo, y establecen asociaciones mutualistas con las plantas con las que interactúan (Waqar *et al.*, 2023). Se resalta la importancia de su estudio por los múltiples beneficios que generan en los cultivos, como el incremento en la absorción de nutrientes,

protección frente al estrés (biótico o abiótico), entre otros (Maciá-Vicente *et al.*, 2009). Se pueden clasificar de acuerdo con sus relaciones ecológicas con los hospedantes, como “clavicipitaceos” y “no clavicipitaceos” siguiendo a Rodríguez *et al.* (2009). *Cladorrhinum samala* fue incluido en la categoría no clavicipitaceos (Clase 2), en respuesta a su capacidad para colonizar diversos órganos vegetales y conferir protección frente a distintos tipos de estrés (Rodríguez *et al.*, 2009). Además, estos autores, describieron que esta clase de endófitos resulta fundamental para el crecimiento de algunas plantas y pueden llegar a incrementar la biomasa de raíces y brotes. Sin embargo, no hay información disponible sobre el tipo de interacción que se genera entre *Cladorrhinum* y las plantas de tomate.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto promotor del crecimiento de tres aislamientos nativos de *C. samala* y de dos cepas de referencia pertenecientes al género en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *platense*). Se evaluó también el efecto de diferentes concentraciones del inóculo de la cepa seleccionada *C. samala* INTA-AR1 en el crecimiento vegetal del tomate y el tipo de interacción que mantiene con sus raíces.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas y variedad vegetal

Las cepas de referencia utilizadas en este trabajo pertenecen a las especies *C. samala* CBS 302.9 y *C. foecundissimum* CBS 180.66 (Centro de Biodiversidad Fúngica de los Países Bajos). Se estudiaron también tres cepas nativas de *C. samala* (INTA-AR1, INTA-AR5, INTA-AR32) obtenidas de suelos de diversas regiones de Argentina (Carmarán *et al.*, 2015). Todas las cepas están depositadas en la colección de cultivos del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

Los ensayos se realizaron con plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Platense. Las semillas utilizadas en el estudio fueron provistas por el programa Pro-Huerta (campaña 2018/2019) perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria Área Metropolitana de Buenos Aires (EEA AMBA - INTA). Para todos los ensayos que requirieron cultivos *in vitro* de plantas de tomate, se utilizó medio de cultivo agar-agua al 1,2% (AA) dispuesto en distintos recipientes, según los requerimientos específicos de cada experimento. Los recipientes utilizados fueron: placas de Petri de 90 mm con 15 ml de medio, vasos de plástico con 125 ml de medio de cultivo y frascos de vidrio con 4 ml de medio de cultivo.

Para los cultivos *in vitro*, las semillas de tomate fueron previamente desinfectadas superficialmente antes de colocarlas sobre la superficie del medio de cultivo en cada recipiente. Para la desinfección superficial, las semillas se sometieron a tratamientos de lavado con alcohol al 70 % durante 30”,

con agitación manual moderada. Luego, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1 % durante otros 30" con agitación leve (Maeso y Walasek, 2012). Posteriormente, se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada estéril, cada uno de 30" de duración (Mroginski *et al.*, 1991). Para finalizar el tratamiento de desinfección, las semillas fueron transferidas, con pinzas desinfectadas, sobre hojas de papel de filtro estériles (101-102, Double Rings) y se dejaron secar durante 4 horas para evitar la humedad que pudiera inducir su germinación. Luego, se procedió según los requerimientos de cada ensayo. Todos los recipientes, fueron sellados con cinta de laboratorio (Parafilm®) y colocados en condiciones controladas a 25 °C y fotoperíodo de 16 h (Mir-154-PE, Panasonic) (Coronel, 2017).

Selección de las cepas de *Cladorrhinum* para promoción del crecimiento vegetal

Se evaluó la promoción del crecimiento en plantas de tomate inoculadas con *C. samala* CBS 302.9, INTA-AR1, INTA-AR5 y INTA-AR32 y la cepa de referencia *C. foecundissimum* CBS 180.66. Primeramente, las semillas de tomate desinfectadas fueron cultivadas *in vitro* en frascos de vidrio con el medio de cultivo e incubadas, siguiendo el protocolo previamente descrito, durante 7 días. A una distancia de 1 cm de la plántula se colocó un disco obtenido con sacabocado (5 mm) de Agar Papa Glucosado (APG) colonizado previamente con las cepas de *Cladorrhinum* y un disco sin el hongo para los tratamientos control. Luego de tres días de crecimiento (Gasoni y Stegman de Gurfinkel, 1997), se realizó el trasplante de cada plántula (inoculada y no inoculada) a tubetes C125 de 125 cm³ de polipropileno (Dassplastic) con sustrato compuesto por suelo, arena, vermiculita y perlita (3:3:3:1). Para mantener las condiciones controladas en la cámara de cultivo y evaluar exclusivamente la interacción hongo-planta, el sustrato fue esterilizado previamente en autoclave mediante dos ciclos consecutivos de 1 hora a 121 °C. Se colocaron 20 réplicas por tratamiento, con un total de 120 plantines de tomate, en condiciones controladas de 25 °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz blanca. Al cabo de 40 días se midió la longitud del tallo, su peso fresco y seco, la longitud de las raíces y su peso seco.

Evaluación del efecto de la cepa seleccionada sobre plantas de tomate

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se realizó un ensayo de interacción en suelo. Para ello, en primer lugar se obtuvo el inóculo fúngico cultivando la cepa de *C. samala* INTA-AR1 en arroz bajo condiciones de fermentación en estado sólido. Estos cultivos fúngicos se realizaron en frascos, que fueron incubados a 25 °C durante 15 días (Saparrat *et al.*, 2010).

Una vez colonizado completamente el arroz fue transferido a bandejas desinfectadas superficialmente con papel absorbente en la base, y luego colocadas sobre mesada en una zona con bajo flujo de corrientes de aire a temperatura ambiente. Se registró el peso de las bandejas a tiempo cero y luego, diariamente. Una vez que el peso se mantuvo constante (a las 72 h) se trituró el arroz con homogenizador (PH91, SMT process) hasta obtenerse un particulado fino y se tamizó utilizando una malla de 1 mm (Zonytest, Rey y Ronzini SRL.) previamente esterilizada por radiación UV (Borda y Arbeláez, 1993). El inóculo así preparado, se colocó en tubos de centrifuga de 50 ml estériles (Corning Incorporated) y se almacenó en una zona sin humedad y en oscuridad.

Con respecto a las plántulas, éstas se obtuvieron a partir de semillas que fueron incubadas en bandejas de germinación que contenían un sustrato no esterilizado compuesto por suelo, arena, vermiculita y perlita (3:3:3:1). El ensayo se realizó durante diez días en condiciones de invernáculo, con luz natural y temperaturas de 28 ± 5 °C en el mes de febrero, con el objetivo de evaluar el comportamiento de las plántulas en un ambiente más cercano al natural, preservando la microbiota nativa del sustrato

Posteriormente, las plántulas desarrolladas se trasplantaron a macetas de 3 kg, con el mismo sustrato mencionado anteriormente para el ensayo en las bandejas de germinación, al cual se le suplementaron diferentes cantidades del inóculo del hongo formulado a base de arroz. El ensayo se llevó a cabo con tres tratamientos: 1 % m/m; 0,5 % m/m; 0% (control sin inóculo), se utilizaron 25 plantas por tratamiento haciendo un total de 75 plantas. Luego de 63 días en condiciones de invernáculo, se descalzaron las plantas de las macetas y se midieron las variables: índice de verdor, longitud del tallo, longitud de raíz, peso fresco tallo, peso seco tallo, peso seco raíz.

Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo utilizando 3 concentraciones de inóculo fúngico en sustrato sólido, como se describió previamente, para evaluar específicamente el índice de verdor. Para ello, se tomaron diferentes concentraciones del inóculo (2 %, 1%, 0,5 %) y se mezclaron con 600 g de sustrato compuesto por suelo, arena, vermiculita y perlita (3:3:3:1), para el tratamiento control se siguió la misma metodología sin aplicación del inóculo. Paralelamente, se cultivaron semillas de tomate *in vitro* en frascos de vidrio, y tras siete días se trasplantaron 10 plántulas por bandeja por tratamiento. Las plántulas se incubaron por 60 días en condiciones controladas de 25 °C y fotoperíodo de 16 horas. La medición del índice de verdor, se realizó en todas las plantas tomando tres hojas vegetativas de los entrenudos apicales con un equipo medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica, Minolta).

Evaluación microscópica de raíces de plantas de tomate en sistemas conteniendo *C. samala*

Se realizaron microcultivos en portaobjetos (Deltalab, Eurotubo®) para ello se colocó AA al 1,2 % en condiciones de esterilidad hasta cubrir completamente el portaobjetos. Una vez solidificado se cortaron los extremos con un bisturí estéril. Se colocó en un extremo del portaobjetos una plántula de tomate cultivada *in vitro* en placa de Petri por diez días a 25 °C, con fotoperiodo de 16 h. En el otro extremo del portaobjetos se sembró la cepa *C. samala* INTA-AR1, previamente incubada a 28 °C durante 72 h. Estas condiciones de esterilidad permiten evitar la interferencia de hongos contaminantes en la interacción hongo-planta. Se colocaron los portaobjetos dentro de una placa de Petri estéril durante 72 h a 25 °C, se realizó por triplicado. Luego de la incubación, las raíces colonizadas fueron teñidas con azul de anilina al 1 % y se observaron en microscopio óptico (BX51, Olympus), en campo claro. Se tomaron fotografías de las estructuras fúngicas observadas. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Cool Snap-Pro (Media Cybernetics, Inc.) acoplada al microscopio y editadas con el programa Image-Pro Solution.

Para evaluar la interacción a mayor plazo se realizaron cultivos *in vitro* en vasos de plástico con 150 ml de medio de cultivo como fue descrito previamente, con una semilla por vaso por triplicado. Cada recipiente fue inoculado con un disco de APG (5 mm de diámetro) con la cepa *C. samala* INTA-AR1 y se incubaron los vasos durante 40 días a 25 °C con fotoperiodo de 16 h. Se realizaron las tinciones de las raíces con azul de anilina 1 % y blanco de calcoflúor 1 g/l (Fluka, Sigma-Aldrich). Las observaciones se llevaron a cabo con microscopio óptico y de fluorescencia, respectivamente. Finalmente, se tomaron muestras de las raíces colonizadas y se colocaron en placas de Petri con medio APG a 28 °C por 72 h. Se realizaron las tinciones de las raíces con azul de anilina 1 % y blanco de calcoflúor 1 g/l (Fluka, Sigma-Aldrich). Las observaciones se llevaron a cabo con microscopio óptico y de fluorescencia respectivamente, utilizando filtro WU con emisión de 420 nm para calcoflúor.

Análisis estadísticos

Para analizar el efecto de las cepas de *Cladorrhinum* evaluadas sobre la promoción de crecimiento, se utilizó un modelo de cuadrados mínimos generalizados (GLS por su denominación en inglés, *Generalized Least Squares models*) (Zuur et al., 2009). Se incluyó en el mismo análisis la modelación de la falta de homogeneidad de la varianza mediante una función de varianza constante (Pinheiro y Bates, 2000). Como prueba *a posteriori* para visualizar las diferencias entre cepas, se utilizó el test de Tukey.

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones del inóculo sólido de la cepa seleccionada sobre el índice de verdor en plántulas de tomate, se realizó un análisis de la varianza con una posterior visualización de las medias comparadas mediante análisis descriptivos, ya que en los casos de ANOVA donde se obtienen diferencias significativas para dos grupos no es necesario realizar test post hoc (Quinn y Keough, 2002). El valor de significancia utilizado en ambos análisis fue de 0,05 y se evaluaron previamente los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza, mediante los test de Shapiro-Wilks y de Levene, respectivamente. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Las variables que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se analizaron con pruebas no paramétricas, como el test de Kruskal–Wallis ($p \leq 0,05$) (Kruskal y Wallis, 1952), empleando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

RESULTADOS

Selección de las cepas de *Cladorrhinum* para promoción del crecimiento vegetal

En el análisis de promoción en cultivo de tomate, se observaron diferencias significativas en peso seco del tallo (estadístico $F = 4,87$, grados de libertad = 4, p -valor < 0,01), destacándose la cepa *C. samala* INTA-AR1 con los valores más altos para esta variable. Esta cepa, no mostró diferencias significativas en comparación con los tratamientos *C. foecundissimum* CBS 180.66 y INTA-AR32, pero sí en relación con los tratamientos control y al resto de las cepas evaluadas. En cuanto al peso seco de raíz, se obtuvieron valores superiores con la cepa *C. samala* INTA-AR1 con resultados significativos (estadístico $F = 2,94$, grados de libertad = 5, $p = 0,02$). No se observaron diferencias significativas con *C. foecundissimum* CBS 180.66, aunque sí frente a los otros tratamientos incluido el tratamiento control. Las demás variables analizadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1). En la figura 1 se muestra la comparación de las masas radiculares de las plantas colonizadas con *C. samala* INTA-AR1 y las raíces de las plantas control.

Evaluación del efecto de la cepa seleccionada sobre plantas de tomate

En la evaluación de la cepa *C. samala* INTA-AR1 aplicada en el cultivo de tomate en maceta, se destacan las diferencias significativas para las variables relacionadas con el tallo y el índice de verdor. En este caso, las mediciones realizadas en plantas de tomate inoculadas con *C. samala* INTA-AR1 fueron sometidas al análisis no paramétrico por no cumplir los supuestos de homocedasticidad, normalidad o ambos.

Tabla 1. Valores obtenidos de las variables medidas en plantas de tomate expuestas a la inoculación de cepas de *Cladorrhinum* spp. respecto de un tratamiento control (sin aplicación del inóculo fúngico).

Table 1. Values obtained from the variables measured in tomato plants exposed to inoculation with *Cladorrhinum* spp. strains compared to a control treatment (without fungal inoculum application).

Cepas	Medidas del tallo			Medidas de la raíz	
	Longitud (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Longitud (cm)	Peso fresco (g)
<i>C. samala</i> INTA-AR 1	8,71 ± 0,6 ^a	1,19 ± 0,15 ^a	0,39 ± 0,06 ^a	18,25 ± 0,86 ^a	0,27 ± 0,07 ^a
<i>C. foecundissimum</i> CBS 180.66	9,65 ± 0,5 ^a	1,55 ± 0,21 ^a	0,35 ± 0,06 ^{ab}	18,25 ± 1,54 ^a	0,19 ± 0,04 ^a
<i>C. samala</i> INTA-AR 32	9,24 ± 0,78 ^a	1,67 ± 0,25 ^a	0,28 ± 0,04 ^{abc}	16,69 ± 1,77 ^a	0,09 ± 0,01 ^b
<i>C. samala</i> CBS 302.9	8,57 ± 0,72 ^a	1,18 ± 0,15 ^a	0,21 ± 0,02 ^{cd}	17,54 ± 1,05 ^a	0,07 ± 0,01 ^b
<i>C. samala</i> INTA-AR 5	8,44 ± 0,52 ^a	1,32 ± 0,18 ^a	0,18 ± 0,03 ^d	18,37 ± 0,68 ^a	0,07 ± 0,01 ^b
Control	8,24 ± 0,059 ^a	1,48 ± 0,18 ^a	0,23 ± 0,03 ^{bcd}	16,83 ± 0,81 ^a	0,08 ± 0,01 ^b

* Diferentes letras para cada parámetro analizado denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

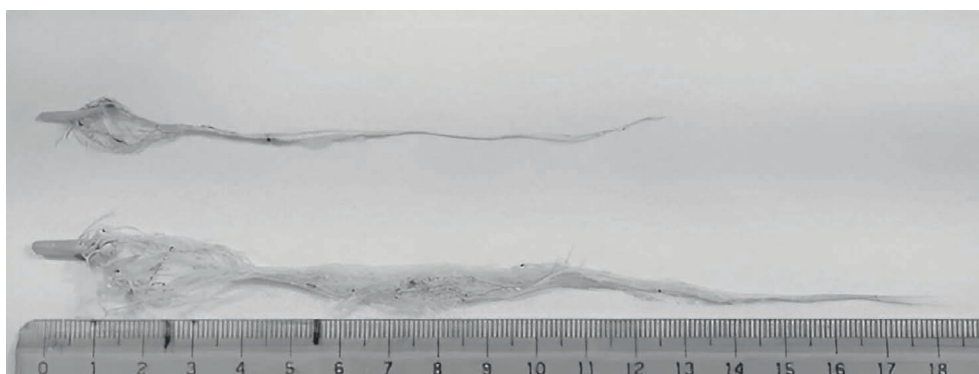


Fig. 1. Raíces de plantas de tomate: En la parte superior se observa la planta control sin inoculación y en la parte inferior la planta inoculada con *Cladorrhinum samala* INTA-AR1.

Fig. 1. Tomato plant roots: The upper part shows the control plant without fungal inoculation, while the lower part shows the plant inoculated with *Cladorrhinum samala* INTA-AR1.

El tratamiento con una concentración de inóculo del 1% presentó el mayor valor de peso fresco del tallo (estadístico $H = 48,72$; $gl = 5$; $p < 0,001$), superando significativamente al tratamiento con 0,5% y al control (sin inoculación). Para la longitud del tallo (estadístico $H = 32,20$; grados de libertad = 5, p -valor $< 0,01$) y el peso seco del tallo (estadístico $H = 28,97$, grados de libertad = 5, p -valor $< 0,001$), también se registraron los valores más altos para el tratamiento al 1%. No obstante, estas variables no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con 1% y 0,5% de inóculo, aunque ambos tratamientos se diferenciaron significativamente del control. Para el índice de verdor (estadístico $H = 42,28$, grados de libertad = 5, $p < 0,001$) se observaron los mayores valores significativos en el tratamiento al 1%. Al igual que en las variables anteriores, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al 1% y al 0,5%, pero sí respecto al tratamiento control. No se observaron diferencias significativas en las variables vinculadas a la raíz (Tabla 2).

Tabla 2. Valores obtenidos de las variables medidas en plantas de tomate aplicando los diferentes tratamientos del inóculo sólido.

Table 2. Values obtained from the variables measured in tomato plants with the different solid inoculum treatments.

Tratamiento	Índice de verdor	Medidas del tallo			Medidas de la raíz	
		Longitud (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Longitud (cm)	Peso fresco (g)
Trat. 1%	38,15 ± 0,79 ^a	65,18 ± 1,81 ^b	67,69 ± 2,36 ^c	4,67 ± 0,25 ^b	35,4 ± 2,42 ^a	0,52 ± 0,05 ^{ab}
Trat. 0.5%	37,03 ± 0,79 ^a	63,31 ± 1,89 ^b	57,87 ± 2,46 ^b	3,97 ± 0,26 ^b	44,27 ± 2,47 ^b	0,63 ± 0,05 ^b
Control	27,93 ± 0,75 ^b	48,28 ± 1,81 ^a	23,18 ± 2,36 ^a	2,38 ± 0,25 ^a	41,00 ± 2,37 ^{ab}	0,43 ± 0,05 ^a

* Diferentes letras para cada parámetro analizado denotan diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos para evaluar específicamente el índice de verdor en las plantas de tomate inoculadas con diferentes concentraciones de arroz colonizado con *C. samala* INTA-AR1, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (estadístico $F = 19,14$, grados de libertad = 3, $p < 0,001$) (Fig. 2 y Fig. 3). El tratamiento con un 2 % de inóculo presentó los valores más altos de índice de verdor, respecto al resto de los tratamientos (Fig. 2 y Fig. 3).

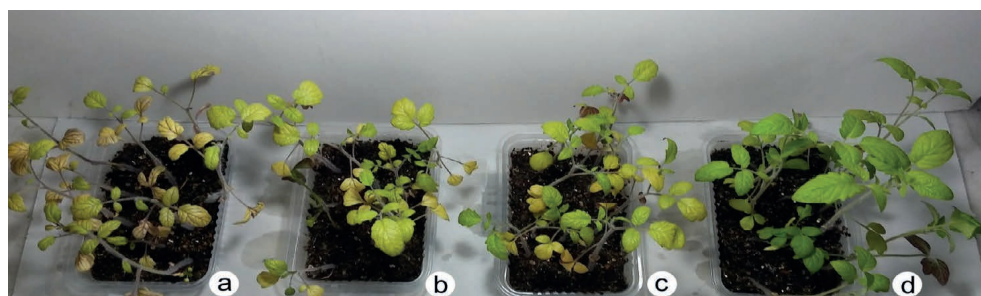


Fig. 2. Bandejas con plantas de tomate en sustrato inoculado con diferentes concentraciones de *Cladorrhinum samala* INTA-AR1 en arroz: a) Tratamiento control. b) Tratamiento 0,5 %. c) Tratamiento 1 %. d) Tratamiento 2 %.

Fig. 2. Trays with tomato plants grown in substrate inoculated with different concentrations of *Cladorrhinum samala* INTA-AR1 on rice: a) Control treatment. b) 0.5% treatment. c) 1% treatment. d) 2% treatment.

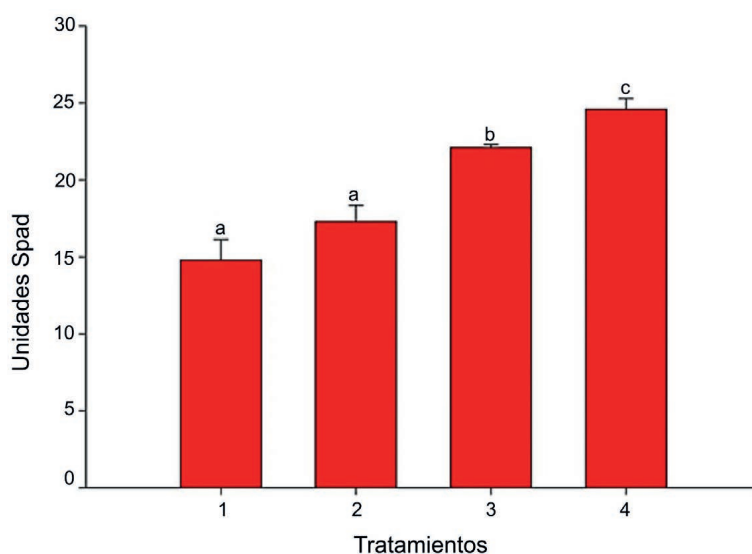


Fig. 3. Índice de verdor en plantas de tomate tratadas con *Cladorrhinum samala* INTA-AR1: 1) Control. 2) Tratamiento 0,5 %. 3) Tratamiento 1 %. 4) Tratamiento 2 %.

Fig. 3. Greenness index in tomato plants treated with *Cladorrhinum samala* INTA-AR1: 1) Control. 2) 0.5% treatment. 3) 1% treatment. 4) 2% treatment.

Evaluación microscópica de raíces de plantas de tomate en sistemas conteniendo *C. samala*

Mediante observación microscópica de las raíces de plantas de tomate control (Fig. 4A) y de aquellas en interacción con la cepa *C. samala* INTA-AR1, se identificaron dos patrones de interacción. El primero correspondió al enrollamiento superficial de las hifas alrededor de las raíces correspondiente a la interacción a corto plazo de 72 h (Fig. 4B-C). El segundo patrón fue la colonización fúngica inter- e intracelular de las hifas en los tejidos radiculares correspondiente a la interacción a largo plazo de 40 días (Fig. 4D).

DISCUSIÓN

Esta publicación contribuye al conocimiento sobre hongos endófitos de plantas los cuales se investigan como fuente alternativa de fertilizantes para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos esenciales para la estimulación de la germinación, la elongación del tallo y la expansión foliar (Waqas et al., 2012; Răut et al., 2021). El análisis del efecto de promoción del crecimiento en plantas de tomate utilizando diferentes cepas pertenecientes al género *Cladorrhinum* permitió seleccionar una cepa de *C. samala* que podría utilizarse para el desarrollo de bioinsumos con potencial como biofertilizante para cultivos intensivos. La cepa nativa *C. samala* INTA-AR1 y la cepa de referencia *C. foecundissimum* CBS 180.66 demostraron efectos positivos en los parámetros evaluados (tanto en raíces como en tallos), destacándose los mejores resultados con la cepa INTA-AR1.

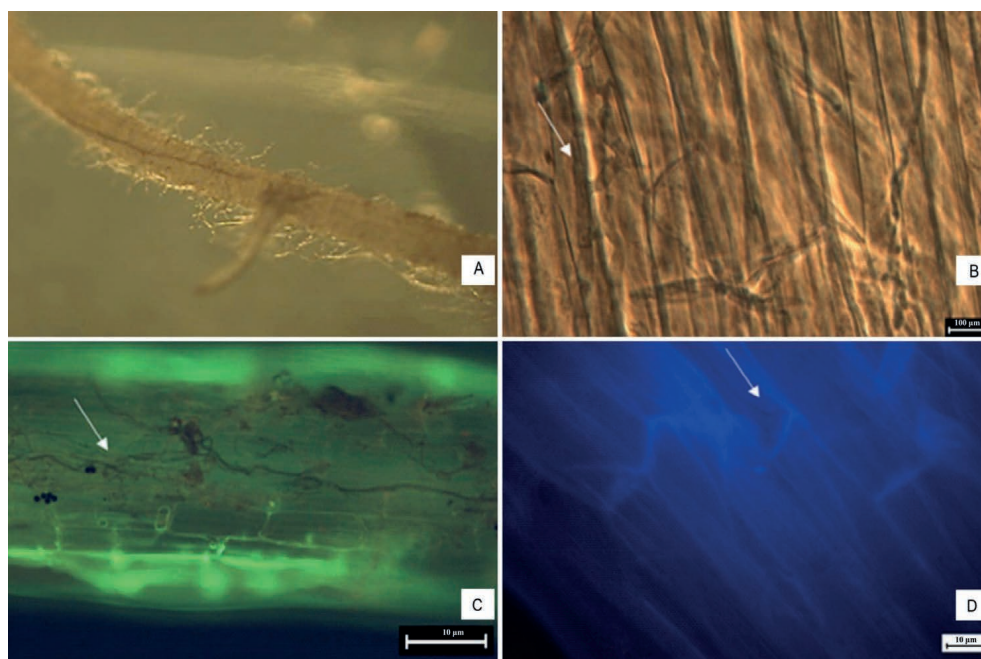


Fig. 4. Raíces de tomate colonizadas con *Cladorrhinum samala* INTA-AR1. A) Observación de la raíz bajo lupa. B) Raíz en interacción en microcultivo teñida con azul de anilina 1 %, la flecha indica hifa superficial (ref. 100 μ m). C) y D) Raíz teñida con calcoflúor, la flecha indica hifa intracelular (ref. 10 μ m).

Fig. 4. Tomato roots colonized by *Cladorrhinum samala* INTA-AR1. A) Root observed under a stereomicroscope. B) Root interacting in microculture stained with 1% aniline blue; the arrow indicates a superficial hypha (scale bar: 100 μ m). C) and D) Root stained with calcofluor; the arrow indicates an intracellular hypha (scale bar: 10 μ m).

Gasoni y Stegman de Gurfinkel (1997) ya habían reportado que la cepa *C. samala* INTA-AR1 actuaba como PGPF en ensayos de interacción con plantas de algodón, los autores evidenciaron una asociación planta-hongo a las 48 hs. Basándose en ese dato, y dado que se desconocían los tiempos de interacción con plantas de tomate, se decidió establecer un período de contacto hongo-planta de tres días para el cultivo *in vitro*. El presente estudio confirma y amplía el rango de plantas sobre las cuales la cepa *C. samala* INTA-AR1 ejerce un efecto promotor del crecimiento vegetal. Por otro lado, estos resultados respaldan la clasificación de endófitos no clavicipitáceo (Rodríguez *et al.*, 2009), *C. samala* coloniza un amplio rango de hospedantes y puede incrementar notablemente la biomasa radicular, lo que resalta su potencial como biofertilizante alternativo.

Para la medición del índice de verdor se incorporó un nuevo ensayo en bandejas, debido a que en la evaluación previa con inóculos sólidos de *C. samala* INTA-AR1 al 0,5 % y 1 % no se observaron diferencias significativas, aunque sí se evidenció una tendencia al aumento en los niveles del índice de verdor. Se utilizaron 10 plántulas por bandejas, debido a limitaciones en el ensayo, lo que impidió establecer réplicas verdaderamente independientes. Sin embargo, todas las unidades experimentales dentro de cada

tratamiento fueron manejadas de manera homogénea y bajo condiciones controladas, permitiendo una evaluación preliminar de las tendencias del efecto del inóculo sobre las variables estudiadas (Soval-Villa *et al.*, 2002; Porto *et al.*, 2014). Estos resultados obtenidos en bandejas resultan útiles en etapas exploratorias del estudio, si bien este tipo de ensayos pierde independencia de las réplicas sirve como un modelo a escala de prototipo para analizar el comportamiento de las plantas en contacto con los PGPF en el suelo.

Es relevante destacar el estudio de las hifas de *C. samala* INTA-AR1 en interacción con el tejido radicular de las plantas de tomate mediante microscopía. En una etapa inicial (primeras 72 horas), se observó que el hongo interactuaba de forma superficial con la rizodermis. Para evaluar posibles interacciones más profundas a lo largo del tiempo, se realizó un análisis a los 40 días, donde se evidenció la colonización del tejido cortical. Un patrón similar de interacción también fue reportado por Gasoni y Stegman de Gurfinkel (1997) en plantas de algodón, lo que sugiere una interacción efectiva entre la cepa *C. samala* INTA-AR1 y el tejido radicular de las plantas hospedantes.

La utilización del inóculo de *C. samala* INTA-AR1 en granos de arroz como soporte y vehículo de aplicación en el ensayo incrementó la biomasa radicular. Según Rothen (2018), muchos hongos endofíticos, bajo condiciones adecuadas, promueven beneficios significativos en el desarrollo de las plantas, particularmente en el crecimiento radicular. En cuanto al efecto de aumento de los valores de índice de verdor en hoja asociado al incremento de la concentración del inóculo sólido, este puede ser un indicador asociado al contenido relativo de nutrientes como el nitrógeno según lo descrito por Mendoza *et al.* (1998). Diversos autores concluyeron que el estado fenológico del cultivo influye también en los valores registrados por el medidor de clorofila, lo cual puede atribuirse a las variaciones en la actividad fisiológica de las hojas a lo largo del tiempo (Rodríguez *et al.*, 1998; Hurtado *et al.*, 2017; Novoa *et al.*, 2002). Por lo tanto, *C. samala* INTA-AR1 generó en las plantas de tomate una mejora en su estado nutricional, al menos evidenciado por el aumento en el índice de verdor. Futuros estudios deben realizarse para confirmar si este efecto es debido a la activación del metabolismo de nitrógeno de la planta y/o modula en forma específica la síntesis de clorofila a nivel foliar. El éxito en la producción del cultivo de tomate depende del estado fisiológico de las plántulas durante la etapa de vivero, ya que el trasplante posterior requiere ejemplares vigorosos que aseguren un adecuado establecimiento y desarrollo del cultivo (Balaguera *et al.*, 2008). La estimulación del desarrollo radicular inducida por *C. samala* INTA-AR1 podría resultar especialmente beneficiosa, dado que un sistema radicular robusto incrementa las probabilidades de éxito durante el trasplante.

Es importante destacar que hasta la fecha no existen registros sobre la producción de propágulos de hongos del género *Cladorrhinum* en granos de cereales, como arroz. Este sustrato sólido (Michel-Aceves *et al.*, 2008), es uno de los más utilizados para la obtención de propágulos de otros hongos filamentosos, como diferentes especies de los géneros *Beauveria* y *Trichoderma* (Martí *et al.*, 2021). Por lo tanto, éste es el primer reporte sobre la producción de inóculo del género *Cladorrhinum* bajo condiciones de fermentación sólida usando granos de arroz como sustrato.

CONCLUSIÓN

La capacidad de *C. samala* INTA-AR1 para colonizar raíces de tomate y su impacto como promotor en el crecimiento de sus plántulas, tal como fue observado en parámetros vinculados con los niveles de verdor (relativo al estado nutricional de la plantas), son indicativos del valor potencial de esta cepa para el desarrollo de un biofertilizante para el cultivo de tomate, e inclusive para otras especies vegetales. Así, este estudio refuerza la actividad benéfica de esta especie fúngica en otras especies de plantas correspondientes a cultivos intensivos, y ofrece alternativas rentables para la producción de inóculo fúngico utilizando arroz como soporte.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias a los recursos financieros derivados de los subsidios correspondientes al Proyecto de Incentivos a la Investigación (A344) de la Universidad Nacional de La Plata; CONICET (PIP 11220200100527CO) y FONCyT (PICT 2019-0207; PICT 2021 Aplicados CAT II 00036). Proyecto INTA PD I069.

CONFLICTO DE INTERESES

No existen conflictos de intereses entre autores o con terceros.

BIBLIOGRAFÍA

- Adedayo, A. A. y Babalola, O. O. (2023). Rhizosphere plant-growth-promoting fungi enhance the growth of crop plants. *Journal of Fungi* 9: 239.
- Balaguera H. E., Álvarez-Herrera, J. G. y Rodríguez, J. D. (2008). Efecto del déficit de agua en el trasplante de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomía Colombiana* 26 (2): 246-255. Retrieved April 29, 2025, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000200009&lng=en&tlng=es

- Blancard, D. (2011). Enfermedades del tomate: Identificar, conocer y controlar. *Ediciones Mundi-Prensa*, Madrid (España)- Cuauhtémoc (México).
- Bohner, T. O. L., Araújo, L. E. B. y Nishijima, T. (2013). O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. *Revista eletrônica do curso de direito da UFSM* 8: 329-341. URL <https://doi.org/10.5902/198136948280>
- Borda, F. y Arbeláez, G. (1993). Determinación del antagonismo del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en plantas de pepino cohombro. *Agronomía Colombiana* 10: 45-51.
- Calabi-Floody, M., Medina, J., Rumpel, C., Condrón, L. M., Hernandez, M., Dumont, M. y de La Luz Mora, M. (2018). Smart fertilizers as a strategy for sustainable agriculture. *Advances in Agronomy* 147: 119-157. URL <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.10.003>
- Carmarán, C. C., Berretta, M., Martínez, S., Barrera, V., Munaut, F. y Gasoni, L. (2015). Species diversity of *Cladorrhinum* in Argentina and description of a new species, *Cladorrhinum australe*. *Mycological Progress* 14: 1-11.
- Chojnacka, K., Skrzypczak, D., Szopa, D., Izydorczyk, G., Moustakas, K. y Witek-Krowiak, A. (2023). Management of biological sewage sludge: Fertilizer nitrogen recovery as the solution to fertilizer crisis. *Journal of Environmental Management* 326: 116602. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116602>
- Coronel, C., Alzugaray, C. y Bueno, M. (2017). Utilización de técnicas biotecnológicas para la multiplicación clonal de leñosas nativas de interés maderero y medicinal. XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Farias, C. P., Carvalho, R. C., Resende, F. M. L. y Azevedo, L. C. B. (2018). Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90 (4): 3649-3660. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820180161>
- Gasoni, L. y Stegman de Gurfinkel, B. (1997). The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots. Effects on phosphorus uptake and host grow. *Mycological Research* 101 (7): 867-870.
- Gill, S. S., Gill, R., Trivedi, D. K., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Ansari, M. W., ... y Tuteja, N. (2016). *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology* 7: 332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00332>
- Gopalan, N. R., Nikhil, P. T., Sharma, R. y Mohapatra, S. (2023). The use of microbes as a combative strategy for alleviation of abiotic and bio-

- tic stresses. *Unravelling Plant-Microbe Synergy* (pp 175-193). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99896-3.00010-2>
- Hernández-Valladares, N. L., Palemón-Alberto, F., Damián-Nava, A., Cruz-Lagunas, B., Herrera-Castro, N. D., Ortega-Acosta, S. Á., Jiménez, J. T. y Reyes-García, G. (2021). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal y su efecto en ecotipos de tomate. *Revista fitotecnia mexicana* 44 (4): 581-589. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.4.581>
- Hossain, M. M., Sultana, F. y Islam, S. (2017). Plant growth-promoting fungi (PGPF): phytostimulation and induced systemic resistance. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts* (pp 135-191).
- Hurtado, E., González-Vallejos, F., Roper, C., Bastías, E. y Mazuela, P. (2017). Propuesta para la determinación del contenido de clorofila en hojas de tomate. *Idesia (Arica)* 35 (4): 129-130. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292017000400129>
- Kruskal W. H. y Wallis. W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47 (260): 583-621.
- Leventis, G., Tsiknia, M., Feka, M., Ladikou, E. V., Papadakis, I. E., Chatzipavlidis, I., Papadopoulou K. y Ehaliotis, C. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance growth of tomato under normal and drought conditions, via different water regulation mechanisms. *Rhizosphere* 19: 100394.
- Maciá-Vicente J. G., Jansson H. B. y Lopez-Llorca L. V. (2009). Assessing fungal root colonization for plant improvement. *Plant Signaling & Behavior* 4 (5): 445-447. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8393>
- Maeso, D. y Walasek, W. (2012). Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Agrociencia (Uruguay)* 16 (1): 134-142.
- Mamani de Marchese, A. y Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 38 (1): 9-21.
- Martí, A. S., Ferrer, A. S., Gómez, R. B. y Casacuberta, A. A. (2021). Producción de biopesticidas fúngicos: una alternativa para la valorización de residuos agroindustriales. *IndustriaAmbiente: Gestión Medioambiental y Energética* 33: 24-30.
- Martin, M., Saparrat, M. C. N., Barrera, V. A. y Gasoni, L. (2019). Mini-review: *Cladorrhinum* species, their diversity and application in biotechnology. *Nova Hedwigia* 108 (3-4): 489-503.
- Mendoza, M., González, G., Santelises, A., Etchevers Barra, J. y Santizó Rincón, J. (1998). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra Latinoamericana* 16 (2): 135-141.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R. y Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 14 (2): 185-191.

- Miranda, V., Silva-Castro, G. A., Ruiz-Lozano, J. M., Fracchia, S. y García-Romera, I. (2023). Fungal endophytes enhance wheat and tomato drought tolerance in terms of plant growth and biochemical parameters. *Journal of Fungi* 9 (3): 384.
- Mroginski, L. A. y Roca, M. W. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia* 19-40.
- Novoa, S. A. R. y Villagrán A. N. (2002). Evaluación de un instrumento medidor de clorofila en la determinación de niveles de nitrógeno foliar en maíz. *Agricultura Técnica* 62 (1): 166-171. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072002000100017>
- Oliveros-Bastidas, A. D. J., Macías, F. A., Fernández, C. C., Marín, D. y Molinillo, J. M. (2009). Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova* 32: 198-213. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100035>
- Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) (2016). El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Cambio Climático, Agricultura y Seguridad Alimentaria. Recuperado de: goo.gl/6E2TtQ.
- Pinheiro, J. C. y Bates, D. M. (2000). Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. *Springer science & business media*.
- Porto, J. S., de Queiroz Costa, R., Rebouças, T. N. H., Lemos, O. L., Luz, J. M. Q. y Amorim, F. (2014). Índice SPAD e crescimento do tomateiro em função de diferentes fontes e doses de nitrogênio. *Scientia Plena* 10 (11).
- Quinn, G. P y Keough, M. J. (2002). Experimental Design y Data Analysis for Biologists. *Cambridge University Press*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511806384>
- Răut, I., Călin, M., Capră, L., Gurban, A. -M., Doni, M., Radu, N. y Jecu, L. (2021). *Cladosporium* sp. isolate as fungal plant growth promoting agent. *Agronomy* 11 (2): 392. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020392>
- Rodriguez, R. J., White Jr., J. F., Arnold, A. E. y Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182 (2): 314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Ros, M., Medrano, L., Alguacil, M. del M., Alejandre, J., Del Rio, G., Sacristan, D., Delgado-Baquerizo, M., Sánchez-Rodríguez, A. R., Ochoa-Hueso, R. y Pascual, J. A. (2024). Bioindicadores para el monitoreo de la biodiversidad y los servicios ecosistémicos del suelo. *Ciencia del Suelo* 42 (2). <https://ojs.suelos.org.ar/index.php/cds/article/view/867>
- Rothern, C., Miranda, V., Fracchia, S., Godeas, A. y Rodríguez, A. (2018). *Microdochium bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Physiological characterization and structural features of its association with wheat. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 53 (2): 1-10.
- Saccardo, P. A. y Marchal, E. L. (1885). Reliquiae mycologicae Westendorpianae. *Revue Mycologique Toulouse* 7: 140-149.

- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C. y Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology* 10 (6): 475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
- Saparrat, M. C. N., Estevez J. M., Troncozo M. I., Arambarri, A. y Balatti, P. (2010). *In vitro* depolymerization of *Scutia buxifolia* leaf-litter by a dominant Ascomycota *Ciliobothria* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64 (3): 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.02.001>
- Schulz, B. y Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research* 109 (6): 661-686.
- Spagnoletti, F. N. y Chiocchio, V. M. (2020). Tolerance of dark septate endophytic fungi (DSE) to agrochemicals *in vitro*. *Revista Argentina de Microbiología* 52 (1): 43-49.
- Soval-Villa, M., Wood, C. W. y Guertal, E. A. (2002). Tomato leaf chlorophyll meter readings as affected by variety, nitrogen form, and nighttime nutrient solution strength. *Journal of plant nutrition* 25 (10): 2129-2142.
- Valland, G. E. y Goodman, R. M. (2004). Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- Waqar, S., Bhat, A. A. y Khan, A. A. (2023). Endophytic fungi: Unravelling plant-endophyte interaction and the multifaceted role of fungal endophytes in stress amelioration. *Plant Physiology and Biochemistry* 206: 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108174>
- Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. -M., Kim, Y. -H. y Lee, I. J. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 17 (9): 10754-10773. <https://doi.org/10.3390/molecules170910754>
- Zuur, A. F., Ieno, E. N. y Meesters, E. H. W. G. (2009). *A Beginner's Guide to R*. New York: Springer.



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Efecto del fuego sobre las comunidades de ectomicorrizas asociadas a *Nothofagus antarctica* (Nothofagaceae) en condiciones de campo y vivero

Effect of fire on ectomycorrhizal communities associated with *Nothofagus antarctica* (Nothofagaceae) under field and nursery conditions

Soto-Mancilla Matias^{1,4*} ; A. Luciana Ebrecht^{1,4*} 
Jorgelina Franzese^{2,4} ; Verónica A. El Mujtar^{3,4} 
Natalia V. Fernández^{1,4} 

¹ Grupo de Microbiología Aplicada y Biotecnología Vegetal y del Suelo (MABves), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), Universidad Nacional del Comahue (UNCo), Quintral 1250, CP8400, Bariloche, Río Negro, Argentina.

² Grupo de Investigaciones de Ecología en Ambientes Antropizados, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), Universidad Nacional del Comahue (UNCo), Quintral 1250, CP8400, Río Negro, Bariloche, Río Negro, Argentina.

³ Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche (IFAB), Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias (INTA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Modesta Victoria 4450, CP8400, Bariloche, Río Negro, Argentina.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

* Estos autores contribuyeron de manera equivalente a este trabajo y comparten la autoría principal y mail de correspondencia.

* Autores correspondientes: <matias.soto@comahue-conicet.gob.ar> <lucianaebrecht@comahue-conicet.gob.ar>

Resumen

Los hongos ectomicorrícicos (HEcM) son esenciales para las plantas y los ecosistemas, especialmente luego de grandes disturbios como los incendios. Los bosques y matorrales Andino-patagónicos tienen asociados a su dinámica el fuego como disturbio natural, aunque en la actualidad los incendios ocurren de manera más frecuente e intensa. Los estudios

► Ref. bibliográfica: Soto-Mancilla, M.; Ebrecht, A. L.; Franzese, J.; El Mujtar, V.; Fernández, N. V. 2025. Efecto del fuego sobre las comunidades de ectomicorrizas asociadas a *Nothofagus antarctica* (Nothofagaceae) en condiciones de campo y vivero. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 131-156. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2138>

► Recibido: 5 de marzo 2025 – Aceptado: 15 de mayo 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

sobre las comunidades de HEcM suelen realizarse en condiciones de campo o de vivero, siendo la utilización conjunta de ambos enfoques poco frecuente. En este trabajo se compararon los efectos del fuego sobre la colonización, abundancia, diversidad taxonómica y funcional de comunidades de HEcM asociadas a *Nothofagus antarctica* (ñire) a través de dos enfoques complementarios: 1) luego de un incendio en condiciones naturales de campo y 2) mediante quemaduras experimentales en vivero. Se observó que mientras los porcentajes de colonización sólo se vieron afectados negativamente por el fuego en condiciones de campo, este disturbio impactó de forma negativa en la riqueza, diversidad taxonómica y composición de las comunidades de HEcM en plantas tanto de campo como de vivero. La diversidad funcional (tipos exploratorios) también se vio afectada por el fuego, reduciéndose la ocurrencia y abundancia de ectomorfotipos con mayor complejidad estructural. Conocer la dinámica de las comunidades de HEcM del suelo es relevante, debido a que pueden ayudar a los ecosistemas a recomponerse luego de los incendios, los cuales se proyectan más severos y frecuentes en la región.

Palabras clave: Hongos simbiotes; incendios forestales; matorral nativo; ñire; quema experimental.

Abstract

Ectomycorrhizal fungi (EcMF) are essential for plants and ecosystems, especially after major disturbances such as wildfires. Fire is a natural disturbance associated with the dynamics of Andean-Patagonian forests and shrublands; however, its frequency and intensity are currently increasing. Studies on EcMF communities are typically conducted under either field or nursery conditions, even though a combination of both approaches is uncommon. In this study, we compared the effects of fire on colonization, abundance, taxonomic and functional diversity of the EcMF communities associated with *Nothofagus antarctica* (ñire) using two complementary approaches: 1) after a wildfire under natural field conditions and 2) after experimental burns in a nursery experiment. While colonization rates were negatively affected by fire only under field conditions, this disturbance also negatively impacted the richness, taxonomic diversity, and composition of EcMF communities in both field and nursery plants. Functional diversity (exploration types) was also affected by the fire, leading to a reduction in the occurrence and abundance of ectomorphotypes with greater structural complexity. Understanding the dynamics of soil EcMF communities dynamics is relevant because they can help ecosystem recovery after wildfires, which are expected to become more severe and frequent in the region.

Keywords: Experimental burn; native shrubland; ñire; symbiotic fungi; wildfires.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrícicos son uno de los grupos de hongos más importantes en los suelos, ya que forman asociaciones generalmente mutualistas con las raíces de las plantas (Smith y Read, 2008; Brundrett y Tadersoo, 2018). Esta relación simbiótica suele beneficiar a las plantas al facilitar el acceso a agua y nutrientes minerales del suelo, así como al aumentar su resistencia a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos (p. ej., patógenos, sequía; Smith y Read, 2008; Tadersoo *et al.*, 2020). A cambio, los hongos obtienen productos carbonados derivados de la fotosíntesis y un hábitat adecuado para su desarrollo y reproducción (Smith y Read, 2008). Es posible distinguir entre dos grandes grupos de micorrizas: las endomicorrizas, que se desarrollan en el interior de las raíces, entre y dentro de las células corticales; y las ectomicorrizas (EcM), que forman una red intercelular en el córtex radical (red de Hartig) sin penetrar en el interior de sus células y además un manto hifal rodeando el exterior de las raíces finas de las plantas, lo que cambia su morfología (Smith y Read, 2008). Estos ápices modificados por hongos ectomicorrícicos (HEcM) se pueden agrupar en base a sus características morfológicas en grupos llamados ectomorfotipos.

Los ectomorfotipos también pueden clasificarse según la forma en la que exploran el suelo, lo que se conoce como tipo de exploración. El tipo de exploración es un rasgo funcional que vincula la presencia, morfología y diferenciación del micelio extraradical (hifas emanantes y cordones hifales denominados rizomorfos) que se proyecta desde el manto fúngico hacia el suelo, y que se asocia con diferentes estrategias de adquisición de nutrientes. Desde una perspectiva funcional, el tipo de exploración determina la capacidad de las EcM para colonizar nuevas raíces, formar redes micorrícicas o buscar, adquirir y transportar recursos (Agerer, 2001).

El establecimiento, el crecimiento y la supervivencia de diversas especies forestales de importancia a nivel global dependen de las EcM, incluidas las especies que se encuentran en los bosques templados y matorrales del hemisferio Sur (Smith y Read, 2008; Fernández *et al.*, 2015; Brundrett y Tadersoo, 2018). En particular, los bosques templados y matorrales Andino-patagónicos de América del Sur se caracterizan por la dominancia de especies de la familia Nothofagaceae (Donoso *et al.*, 2006). Los suelos de estos ambientes están compuestos por cenizas volcánicas (Andisoles), que se caracterizan por tener una alta capacidad de estabilizar materia orgánica, retener agua, amortiguar el pH y mantener bajos los niveles de fósforo (P) biodisponible para las plantas (Mazzarino y Gobbi, 2005; Fernández *et al.*, 2013). Las especies de *Nothofagus* poseen raíces ampliamente colonizadas por EcM (Nouhra *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2015; Floriani *et al.* 2024), las cuales son sumamente eficientes en la absorción de P. Por lo tanto, esta simbiosis se considera una adaptación clave para el establecimiento de *Nothofagus* en estos suelos con baja biodisponibilidad de P (Mazzarino y Gobbi, 2005; Diehl *et al.*, 2008).

El fuego es un disturbio natural asociado a la dinámica de los bosques y matorrales Andino-patagónicos (Veblen *et al.*, 1996). Sin embargo, en la actualidad, y debido al cambio global y al creciente impacto antrópico, estos ambientes se ven afectados por fuegos más frecuentes y de mayor intensidad (Alauzis *et al.*, 2004; Kitzberger *et al.*, 2022). Además, esta región presenta una estacionalidad climática marcada y la temporada de incendios coincide con el periodo de mayor déficit hídrico, que se concentra en los meses de verano (Kitzberger y Veblen, 2003). Muchos de los efectos de los incendios sobre los ecosistemas son directos, como la pérdida de biomasa vegetal y la abundancia y diversidad de los organismos del suelo, así como también la combustión del horizonte orgánico. Otros efectos son indirectos, como el aumento de la insolación del suelo y la disminución del albedo (Certini, 2005). Los organismos del suelo se ven afectados tanto por los efectos directos como indirectos (Adkins *et al.*, 2020; Dove y Hart, 2017; Chávez *et al.*, 2020).

Si bien luego de un incendio generalmente se observa una disminución de la riqueza y diversidad de hongos del suelo, también se han registrado efectos neutros o positivos sobre la diversidad fúngica (Cairney y Bastias, 2007; Dove y Hart, 2017). La variabilidad en las respuestas de las comunidades fúngicas del suelo puede depender de la severidad y frecuencia de los incendios (Dove y Hart, 2017), pero también de la capacidad de los hongos para tolerar las altas temperaturas, siendo algunos capaces de formar estructuras de resistencia como esporas o esclerocios (Neary *et al.*, 1999; Cairney y Bastias, 2007; Dove y Hart, 2017; Adkins *et al.*, 2020). En particular, el calentamiento del suelo es el principal factor que afecta a las comunidades de HEcM, ya que generalmente provoca una disminución de su biomasa (Stendell *et al.*, 1999; Vásquez-Gassibe *et al.*, 2016) y cambios significativos en la estructura de sus comunidades (Cairney y Bastias, 2007; Dove y Hart, 2017).

Nothofagus antarctica (G. Forst.) Oerst es una especie dominante en los matorrales Andino-patagónicos, extendiéndose latitudinalmente desde los 36° 30' hasta los 56° 00' S y altitudinalmente desde el nivel del mar hasta los 2.000 m s.n.m (Bahamonde *et al.*, 2011). Esta especie presenta sus raíces altamente colonizadas por EcM (Carron, 2021; Fernández *et al.*, 2022; Soto-Mancilla, 2022; Ebrecht, 2023), y el nivel de colonización suele depender de diversos factores ambientales o intrínsecos de las plantas, como el estado fisiológico o la edad de los individuos (Fernández *et al.* 2015; Moguilevsky, 2024). La propagación de *N. antarctica* depende principalmente de la reproducción vegetativa, produciendo rebrotes de raíz y de raíces adventicias desde ramas parcialmente enterradas (Veblen *et al.*, 1996), aunque esta capacidad puede reducirse luego de incendios intensos (Cóbar-Carranza *et al.*, 2014). Por lo tanto, luego de un fuego intenso es probable que se requiera de una recolonización desde semillas de ejemplares en pie debido a una disminución de la capacidad de rebrote o bien de procesos de restauración activa a partir de plantas cultivadas en vivero.

Dado que la regeneración natural por semillas es baja (Donoso *et al.*, 2006), una forma factible de estudiar el impacto de los incendios sobre las plántulas o estadíos de desarrollo tempranos de esta especie es mediante su cultivo en vivero.

Los ensayos en vivero son una herramienta valiosa para generar información novedosa que complementa aquella obtenida en campo. Estos ensayos simplifican la influencia de los factores ambientales, permitiendo enfocarse en variables particulares (p. ej., sequía, disponibilidad de nutrientes) o atributos específicos de la especie en estudio (Fernández *et al.*, 2022). El objetivo de este trabajo fue evaluar cómo el fuego afecta a la abundancia y la estructura de las comunidades de HEcM (riqueza, diversidad taxonómica y funcional) asociados a las raíces de *N. antarctica* en matorrales Andino-patagónicos mediante dos aproximaciones metodológicas complementarias: 1) en campo y en individuos adultos bajo condiciones naturales en sitios afectados o no afectados por un incendio forestal, y 2) bajo condiciones controladas de vivero, en plántulas que crecieron en suelo quemado y no quemado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie de estudio

Nothofagus antarctica (ñire) es una especie leñosa caducifolia que se encuentra ampliamente distribuida en la región Andino-patagónica de Argentina y Chile (Donoso *et al.*, 2006). Esta especie tiene una de las menores tasas de germinación entre las especies de *Nothofagus* en América (Donoso *et al.*, 2006), ya que tiene semillas con poca capacidad germinativa (Salinas *et al.*, 2014). Por tanto, es de las especies de *Nothofagus* que más depende de la reproducción vegetativa, estrategia que le permite regenerarse con relativa rapidez luego de los incendios, incluso llegando a ser la especie dominante (Veblen *et al.*, 1996). Sin embargo, la capacidad de rebrote de *N. antarctica* puede estar limitada por la intensidad del incendio (Cóbar-Carranza *et al.*, 2014). Un aspecto relevante a considerar es la capacidad de esta especie de asociarse con HEcM, tanto en condiciones de campo como de vivero (Carron, 2021; Fernández *et al.*, 2022; Soto-Mancilla, 2022; Ebrecht, 2023); por ende resulta importante entender las dinámicas de esta asociación en distintos contextos de fuego.

Diseño experimental

En este trabajo se evaluaron las variaciones de las comunidades de HEcM de *N. antarctica* mediante dos enfoques complementarios definidos según la procedencia de las plantas de estudio: condiciones naturales de campo y ensayos en vivero. En ambos enfoques se incluyeron dos tratamientos relacionados con el estado del suelo: 1) quemado y 2) no quemado. A continuación, se describen las actividades realizadas para cada enfoque.

Estudio a campo.— El estudio a campo se llevó a cabo en la región del Noroeste patagónico, específicamente en el paraje Cuesta del Ternerero, próximo a El Bolsón (Río Negro, Argentina). En este sitio, el día 24 de enero del 2021 se inició un incendio de origen antrópico, que prosiguió hasta su extinción un mes después, afectando diferentes tipos de ecosistemas nativos (bosque, matorral y estepa) (Mohr Bell, 2021). Aproximadamente 6.300 ha fueron afectadas y, en términos de la superficie total quemada, los matorrales de *N. antarctica* corresponden a los tipos de ecosistemas más afectados (793 ha); donde el fuego fue severo o moderado (Mohr Bell, 2021).

En diciembre de 2021, diez meses después del incendio, se definieron en Cuesta del Ternerero dos sitios de muestreo en función de su condición luego del incendio: quemado (41°52'43.31"S, 71°26'40.78"O, elevación 607 m snm) y no quemado (41°52'43.05"S, 71°26'41.62"O, elevación 605 m snm). En cada sitio se eligieron al azar cinco individuos vivos de *N. antarctica* que estaban a una distancia no menor a 50 m entre sí. De estos individuos se tomaron tres submuestras de suelo y raíces con un sacabocado de 20 cm de profundidad. En el sitio quemado los ejemplares a partir de los cuales se colectaron las raíces correspondieron a plantas quemadas de *N. antarctica* que sobrevivieron al incendio y que se encontraban rebrotando al momento del muestreo. Las tres submuestras tomadas alrededor de cada individuo fueron combinadas, homogeneizadas y reservadas hasta su procesamiento en el laboratorio. Las muestras fueron cernidas en un tamiz con malla de 2 mm para separar las raíces del suelo circundante. Estas fueron lavadas con agua corriente, secadas y conservadas a -10 °C hasta su análisis, el cual se describe en la sección tres.

Estudio en vivero.— Para llevar a cabo el ensayo en vivero se recolectó suelo de matorral nativo del noroeste patagónico con dominancia de *N. antarctica* el cual no presentó indicios de haber sufrido disturbios recientes por fuego. El suelo se recolectó luego de la remoción de la hojarasca mediante sacabocados de 10 cm de diámetro y 15 cm de profundidad procurando mantener la estructura del mismo lo más intacta posible, ya que se ha demostrado que los hongos del suelo pueden llegar a presentar una fuerte estratificación vertical (Clemmensen et al., 2014; Taylor et al., 2014; Day et al., 2019). Se rellenaron un total de 20 macetas metálicas de 1 L con suelo de matorral respetando su estructura vertical. El suelo recolectado y colocado en las macetas metálicas se dejó secar durante dos días para que pierda humedad antes de realizar las quemas experimentales, ya que los incendios suelen ocurrir en verano cuando la humedad del ambiente y del suelo son bajas (Castillo et al., 2003).

Las 20 macetas fueron subdivididas de forma aleatoria en dos grupos de igual número. Cada grupo correspondió a un tratamiento: quemado (temperatura superficial aproximada de 900 °C) y control (suelo sin quemar). La selección de la temperatura de quema del suelo se definió considerando las temperaturas registradas en ecosistemas mediterráneos durante

un evento de fuego. Para incendios forestales se estima que la temperatura máxima del suelo en superficie puede alcanzar los 200-300 °C, aunque en presencia de combustible como troncos y ramas gruesas es común que se alcancen los 500-700 °C, llegando a superar, esporádicamente, los 1500 °C (Urretavizcaya *et al.*, 2005). Para simular las condiciones experimentadas durante un evento natural de fuego de alta intensidad, las llamas se proporcionaron con un soplete desde la parte superior de la maceta. De esta manera, las mayores temperaturas se registraron en la superficie, con una disminución gradual a medida que aumentó la profundidad del sustrato. Para registrar la temperatura del suelo se utilizaron termocuplas tipo K conectadas a un datalogger. El fuego se proporcionó hasta que la temperatura superficial del suelo se mantuvo constante durante 30 segundos (para ello, se requirió un tiempo de quema total de entre 2 y 3 minutos). Luego de las quemaduras, las macetas se dejaron enfriar durante dos días antes del trasplante de las plántulas.

Las semillas para realizar el ensayo se adquirieron en el Laboratorio de Análisis de Semillas (LAS) del Instituto de Biotecnología Esquel (InBiEs). Previamente a la colecta y quema del suelo, las semillas de *N. antarctica* fueron desinfectadas en superficie con hipoclorito de sodio al 5 % (Varela y Arana, 2011) y se estratificaron en placas de Petri estériles bajo condiciones de humedad y frío (4 °C) durante 45 días (Premoli, 1991; Varela y Arana, 2011). Una vez finalizada la estratificación, las semillas se colocaron en un sustrato inerte compuesto de partes iguales de turba y arena volcánica (1:1) para su germinación (Azpilicueta *et al.*, 2010; Schinelli Casares, 2012). Las plántulas se trasplantaron a las macetas con el suelo correspondiente a cada tratamiento (quemado / no-quemado) cuando ya poseían sus primeras hojas verdaderas (solo una plántula en suelo quemado no prosperó hasta el final del ensayo).

Se plantó una plántula por maceta, teniendo diez macetas por cada uno de los tratamientos ($n = 10$; 20 macetas en total). Finalmente, las macetas fueron distribuidas aleatoriamente dentro de un vivero con riego automatizado durante seis meses. Transcurrido este tiempo, las raíces fueron separadas de la parte aérea de cada plántula y lavadas con agua corriente, secadas y conservadas a -10 °C hasta su análisis, el cual se describe a continuación.

Análisis de las comunidades de hongos ectomicorrícicos

En cada una de las muestras de raíz se cuantificó el porcentaje de colonización por HEcM siguiendo el método de conteo de puntas colonizadas descrito por Grand y Harvey (1982). Además, mediante el uso de microscopio estereoscópico y óptico se observaron las características morfológicas propias de esta simbiosis (forma, color, tamaño, ramificación, textura del manto, presencia y tipo de micelio extrarradical; Agerer, 1987-2006) y en

base a ellas se construyeron grupos de similitud morfológica, denominados ectomorfotipos. Además, se clasificaron los ectomorfotipos según los tipos exploratorios en tres grupos: 1) de contacto, que carece o posee escasas hifas emanantes por lo que el micelio se limita principalmente a la superficie de las raíces, con poca extensión en el suelo circundante; 2) de corta distancia, los cuales presentan hifas emanantes que se extienden desde las raíces y exploran áreas cercanas; y 3) de mediana y larga distancia, caracterizados por presentar rizomorfos (cordones de hifas de diferente complejidad) que se extienden lejos de las raíces permitiendo explorar mayor volumen de suelo (Agerer, 2001).

Para la identificación taxonómica, se realizaron extracciones de ADN de todos los ectomorfotipos presentes en las raíces de las plantas de campo y vivero. Para ello, se colocaron 20 mL de buffer de extracción en un Eppendorf estéril, al cual se le agregaron ápices radicales colonizados de cada ectomorfotipo. Los ápices se aplastaron contra las paredes del tubo con un pilón esterilizado para romper el tejido. Los tubos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y otros 10 minutos a 95 °C. Finalmente, se agregaron 20 μ L de una solución de BSA 3 % a cada tubo (Soto-Mancilla, 2022; Ebrecht, 2023). El ADN obtenido mediante este método fue utilizado como templado para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando los primers específicos para hongos: ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAACTAA-3'; Gardes y Bruns, 1993) e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; White *et al.*, 1990). La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 °C, 1 minuto y 10 segundos a 72 °C, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) y aquellos que presentaron una única banda fueron enviados a secuenciar a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos pública GenBank de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), utilizando la función BLASTn para la identificación de cada taxón. La asignación de especie a cada secuencia se realizó teniendo en cuenta un porcentaje de homología mayor al 97% (Nouhra *et al.*, 2013). Las secuencias fueron depositadas en la base de datos pública GenBank del NCBI y están disponibles bajo los números de acceso PQ105105-PQ105137 y PQ737335-PQ737342. La riqueza (número de taxones de HEcM por muestra) y los índices de diversidad de Shannon e inverso de Simpson se calcularon con los datos obtenidos de la secuenciación de los HEcM. Se consideraron ambos índices debido a que uno pondera principalmente las especies raras, mientras que el otro las especies dominantes, respectivamente.

Análisis estadístico

En ambas procedencias de las plantas (campo y vivero) el factor de análisis fue la condición del suelo (quemado / no-quemado) para todas las variables estudiadas. Para el porcentaje de colonización, riqueza de HEcM, diversidad de HEcM y abundancias de tipos exploratorios se emplearon modelos lineales simples, mientras que para el análisis de la proporción de ocurrencia (presencia / ausencia) de los diferentes tipos exploratorios se emplearon modelos lineales generalizados, utilizando una distribución binomial. También se llevó a cabo un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés) con distancias de Bray-Curtis calculadas en función de las abundancias relativas de los taxones de HEcM. Además, se realizó un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) para evaluar los cambios en la composición de las comunidades de HEcM entre tratamientos. La verificación de la homogeneidad de varianza de este análisis se llevó a cabo mediante la función *betadisper*. Por último, para identificar las especies que más contribuyen a la diferenciación entre las condiciones de quema de cada procedencia se realizó un análisis de porcentaje de similitud (SIMPER, por sus siglas en inglés). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R v. 4.3.2 (R Core Team, 2023). Se utilizó el paquete *lme4* para estimar los parámetros, el paquete *DHARMA* para verificar los supuestos de los modelos (Bartón, 2020), el paquete *emmeans* para las comparaciones post-hoc (Lenth, 2023), los paquetes *Vegan* y *PairwiseAdonis* para los análisis de composición de comunidades (Heine, 2023; Oksanen *et al.*, 2023), el paquete *BiodiversityR* para la estimación de los índices de diversidad (Shannon e Inverso de Simpson) y el paquete *ggplot2* para realizar los gráficos.

RESULTADOS

Todas las raíces analizadas de campo y vivero presentaron colonización por HEcM. El porcentaje de colonización por HEcM en las raíces de *N. antarctica* fue alto, encontrándose en todos los casos por encima del 70%. Sin embargo, se observaron respuestas diferentes para los tratamientos dependiendo de la procedencia de las plantas. Mientras que en el campo hubo una diferencia significativa en el porcentaje de colonización entre suelo quemado y no-quemado ($F_{1,8}=6,14$, $p=0,038$; Fig. 1A), en el vivero los porcentajes de colonización no variaron significativamente entre tratamientos ($F_{1,16}=1,28$, $p=0,273$; Fig. 1A). En términos generales, en campo los porcentajes de colonización fueron más altos que los observados en vivero (Fig. 1A).

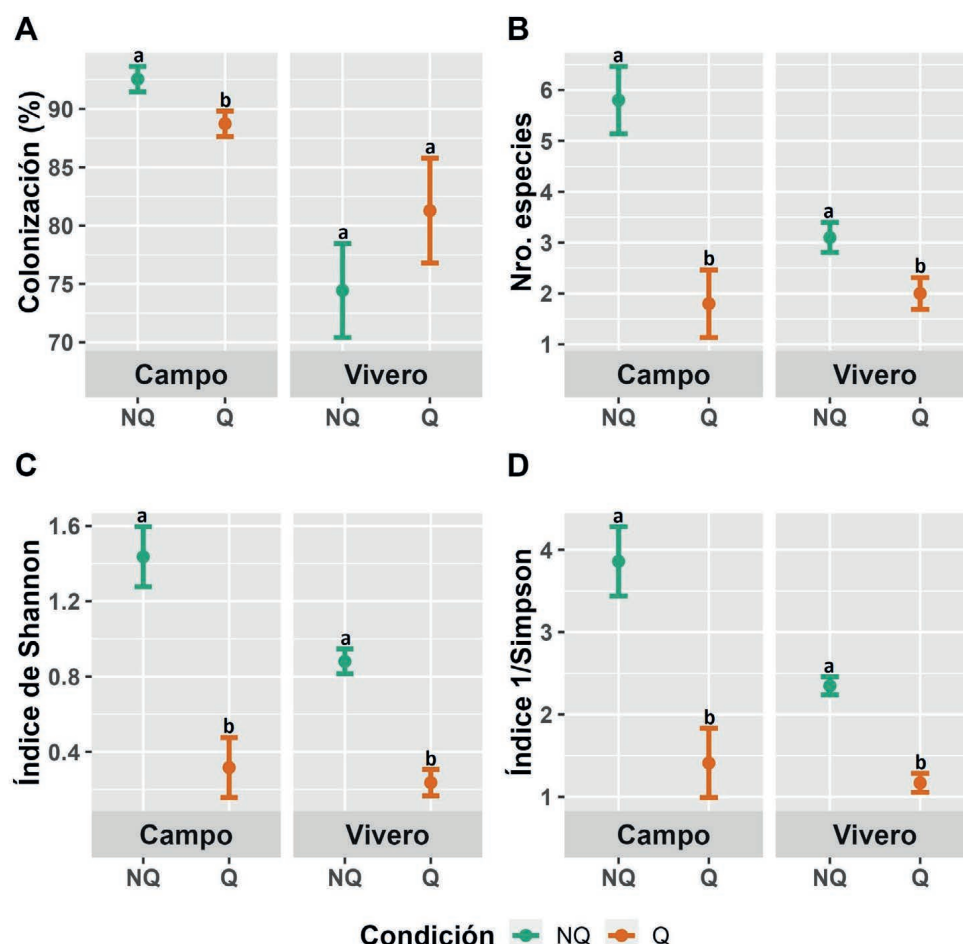


Fig. 1. A) Colonización. B) Riqueza. C) Índice de diversidad de Shannon. D) Inverso de Simpson de hongos ectomicorrícicos en raíces de *Nothofagus antarctica* en suelo no quemado (NQ) y quemado (Q) en condiciones de campo y vivero. Los puntos corresponden a la media y las barras al error estándar (n campo = 5, n vivero = 10). Las diferentes letras indican diferencias significativas.

Fig. 1. A) Colonization. B) Richness. C) Shannon diversity index. D) Inverse Simpson diversity index of ectomycorrhizal fungi in *Nothofagus antarctica* roots in unburned (NQ) and burned (Q) soils under field and nursery conditions. Points correspond to the mean and bars to the standard error (n field = 5, n nursery = 10). Different letters indicate significant differences.

Se encontraron un total de 16 especies de HEcM en las raíces de *N. antarctica* analizadas, perteneciendo cuatro al Filo Ascomycota y 12 al Filo Basidiomycota (Tabla 1). *Cenococcum geophilum* (Ascomycota) fue la única especie que se encontró tanto en plantas de campo como de vivero mientras que las restantes 15 se encontraron en condiciones de campo (ocho) o de vivero (siete). La mitad de las especies estuvieron presentes en suelos quemados, siendo *Descolea brunnea* y *Tulasnella* sp.1 (Basidiomycota) las que se encontraron exclusivamente en esta condición. Por otro lado, *Helotiaceae* sp. 1, *Cortinarius* sp. 1, *Cortinarius* sp. 3, *Hebeloma mesophaeum*, *Hysterangium* sp. 1, *Inocybaceae* sp. 1, *Thelephora terrestris* y *Tomentella* sp. 1 se hallaron únicamente en suelos no-quemados.

Tabla 1. Especies de hongos ectomicorrícicos presentes en raíces de *Nothofagus antarctica* y sus tipos exploratorios (contacto, corta y media distancia) según la condición del suelo (Q: quemado, NQ: no quemado) y la procedencia de las plantas (Campo o Vivero).

Table 1. Species of ectomycorrhizal fungi present in *Nothofagus antarctica* roots and their exploratory types (contact, short and medium distance) according to the soil condition (Q: Burned, NQ: Unburned) and plant origins (Field or Nursery).

Taxa	Tipo exploratorio	Campo		Vivero	
		NQ	Q	NQ	Q
Ascomycota					
<i>Cenococcum geophilum</i>	Corta	X		X	X
<i>Helotiaceae</i> sp. 1	Corta			X	
<i>Pyronemataceae</i> sp. 1	Corta	X	X		
<i>Ruhlandiella patagonica</i>	Contacto			X	X
Basidiomycota					
<i>Cortinarius</i> sp. 1	Media	X			
<i>Cortinarius</i> sp. 2	Media	X	X		
<i>Cortinarius</i> sp. 3	Media	X			
<i>Descolea brunnea</i>	Contacto				X
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	Media			X	
<i>Hysterangium</i> sp. 1	Media	X			
<i>Inocybaceae</i> sp. 1	Corta	X			
<i>Rickenella minuta</i>	Contacto			X	X
<i>Thelephora terrestris</i>	Corta			X	
<i>Tomentella patagonica</i>	Corta	X	X		
<i>Tomentella</i> sp. 1	Corta	X			
<i>Tulasnella</i> sp. 1	Corta				X

La riqueza de HEcM presente en las raíces de *N. antarctica*, tanto en campo como en vivero, fue mayor en el suelo no-quemado en comparación al quemado ($F_{1,8}=18,18$, $p=0,002$; $F_{1,17}=6,53$, $p=0,02$, respectivamente; Fig. 1B). Por otro lado, tanto las muestras provenientes del campo como las de vivero tuvieron índices de diversidad de Shannon ($F_{1,8}=24,56$, $p<0,001$; $F_{1,17}=44,76$, $p<0,001$, respectivamente; Fig. 1C) y del inverso de Simpson ($F_{1,8}=16,9$, $p=0,003$; $F_{1,17}=55,69$, $p<0,001$, respectivamente; Fig. 1D) significativamente más bajos en el suelo quemado con respecto al no quemado. Como puede observarse, en suelos no quemados la riqueza de HEcM y ambos índices de diversidad fueron casi el doble en el campo respecto al vivero, mientras que en los suelos quemados no se observó esta diferencia (Fig. 1B-D).

En el análisis de NMDS, para cada procedencia se observó una separación de las muestras en dos grupos. El NMDS indicó que la composición de las comunidades de HEcM se diferenciaron según la primera dimensión, siendo diferentes entre el suelo quemado y no-quemado (Fig. 2A-B). Esto puede asociarse a la condición de quema del suelo, lo cual fue confirmado por el PERMANOVA para ambas procedencias (campo: $F_{1,9}=6,98$; $p=0,01$; vivero: $F_{1,18}=88,91$; $p<0,001$).

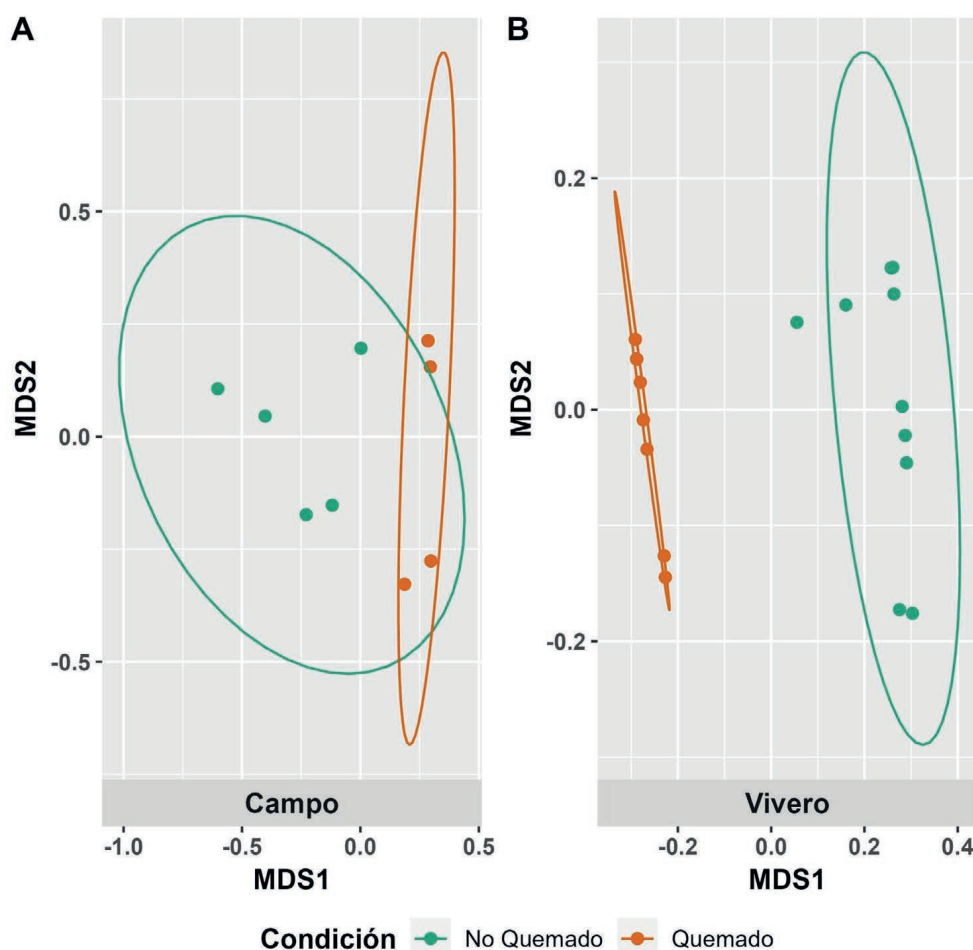


Fig. 2. NMDS de las comunidades de hongos ectomicorrícicos de *Nothofagus antarctica* según la condición del suelo (No quemado / Quemado) y procedencia de las plantas, (A) campo y (B) vivero (n campo = 5, n vivero = 10).

Fig. 2. NMDS of ectomycorrhizal fungal communities of *Nothofagus antarctica* according to soil condition (Unburned / Burned) and plant origin (A) field and (B) nursery conditions (n field = 5, n nursery = 10).

El análisis SIMPER mostró que en vivero, *Rickenella minuta* y *Thelephora terrestris* fueron las principales especies asociadas con la disimilitud de las comunidades de HEcM entre las condiciones de quemado y no-quemado (con una contribución del 45,3% y 42,3% a la disimilitud, respectivamente; Fig. 3). Mientras que en campo, *Tomentella patagonica*, *Inocybaceae* sp. 1, *Cortinarius* sp. 2 e *Hysterangium* sp. 1 fueron las principales especies asociadas con la disimilitud de las comunidades de HEcM entre quemado y no-quemado (con una contribución del 36,2%, 16,5%, 15,7% y 9,2% a la disimilitud, respectivamente; Fig. 3). En vivero, se observó que en suelos no-quemados *Rickenella minuta* y *Thelephora terrestris* presentaron abundancias relativas semejantes, mientras que en suelos quemados *Rickenella minuta* aumentó su abundancia relativa (Fig. 3).

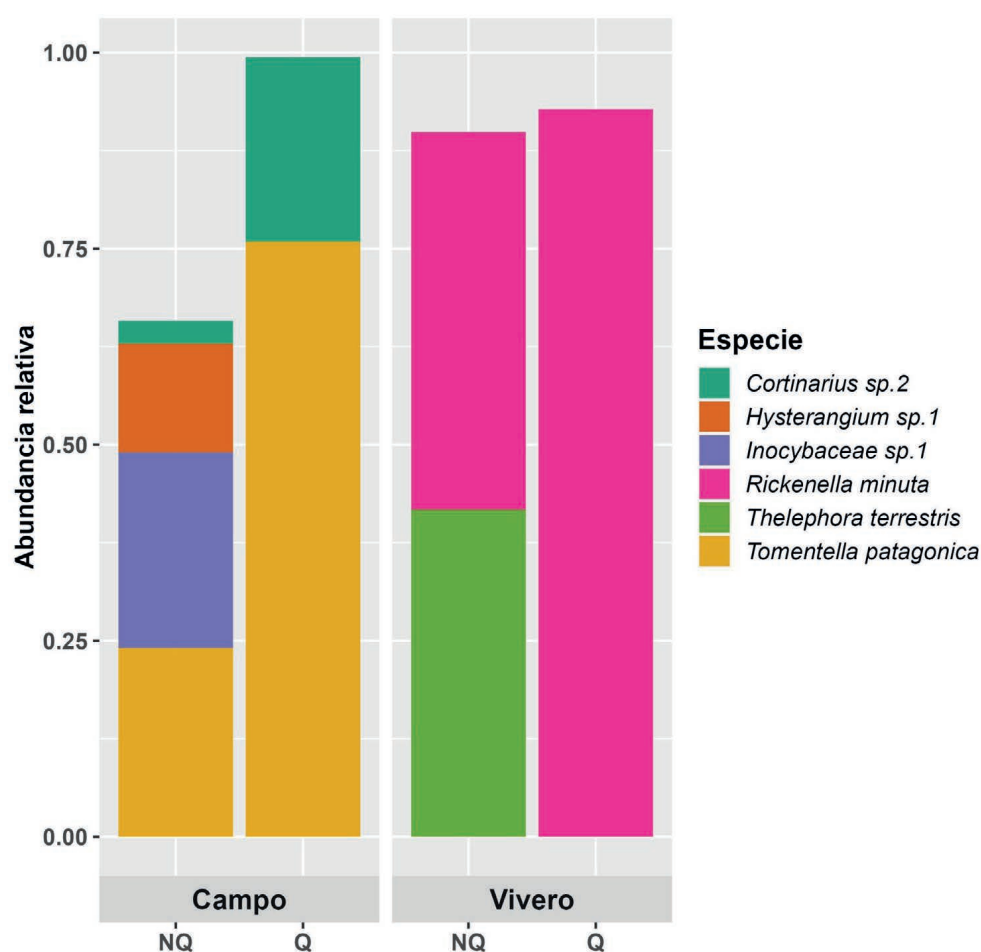


Fig. 3. Abundancia relativa apilada de las especies de hongos ectomicorrícicos que explican más del 70% de la variación, encontrados en raíces de *Nothofagus antarctica* según la condición de quema del suelo (NQ = no quemado, Q = quemado) y la procedencia de las plantas (campo o vivero).

Fig. 3. Stacked relative abundance of ectomycorrhizal fungal species that explain more than 70% of the variation, found in *Nothofagus antarctica* roots according to soil burning condition (NQ = unburned, Q = burned) and plant origin (field or nursery).

Por otro lado, en el suelo de campo no-quemado se observó una gran abundancia de *Tomentella patagonica* e *Inocybaceae sp. 1*, con una menor abundancia relativa de *Hysterangium sp. 1* y *Cortinarius sp. 2*; aunque en suelos quemados *T. patagonica* y *Cortinarius sp. 2* aumentaron sus abundancias relativas (Fig. 3).

De las 16 especies identificadas de HEcM en todas las muestras, tres (19%) corresponden al tipo de exploración de contacto, ocho (50%) de corta distancia y cinco (31%) de media distancia (Tabla 1). Los ectomorfotipos de contacto estuvieron presentes en las raíces de todas las plántulas de vivero, no observándose diferencia en la proporción de ocurrencia (número de plantas en las que estuvieron presentes) según la condición del suelo ($X^2_{1,17}=4,28$; $p=0,999$; Fig. 4A). Este tipo de ectomorfotipo no fue hallado en las raíces de las plantas provenientes del campo (Fig. 4A).

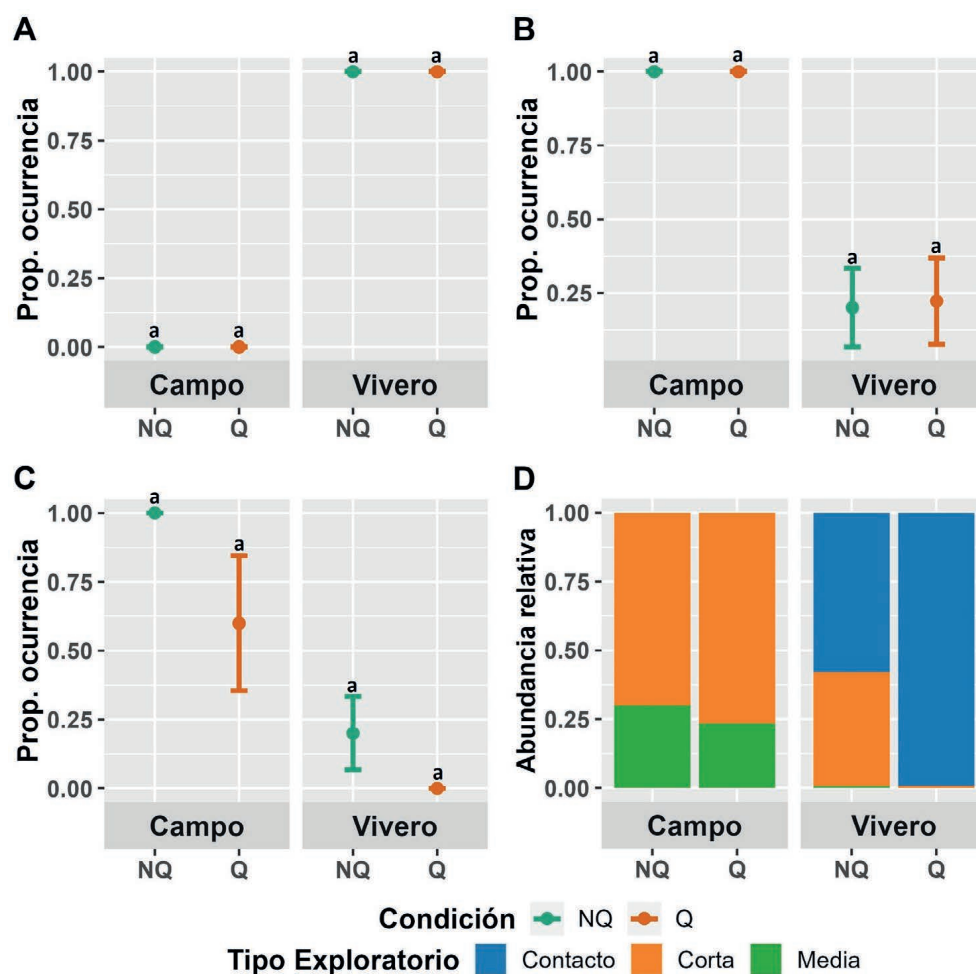


Fig. 4. Proporción de ocurrencia de los tipos exploratorios de contacto (A), corta distancia (B) y media distancia (C) encontrados en raíces de *Nothofagus antarctica* en suelos no quemados (NQ) y quemados (Q) en campo y vivero. Abundancia relativa de cada tipo exploratorio (D). Los puntos corresponden a la media y las barras al error estándar (n campo = 5, n vivero = 10). Las diferentes letras indican diferencias significativas.

Fig. 4. Proportion of occurrence for exploratory type; contact (A), short distance (B) and medium distance (C) found in *Nothofagus antarctica* roots in unburned (NQ) and burned (Q) soils under field and nursery conditions. Relative abundance of each exploratory type (D). Points correspond to the mean and bars to the standard error (n field = 5, n nursery = 10). Different letters indicate significant differences.

La proporción de ocurrencia de ectomorfotipos de corta y media distancia tampoco varió según la condición del suelo en las muestras de campo (corta: $X^2_1=4,28$; $p=0,999$; media: $X^2_1=6,73$; $p=0,070$; Fig. 4B y 4C) ni en las de vivero (corta: $X^2_1=19,54$; $p=0,905$; media: $X^2_1=10,01$; $p=0,095$; Fig. 4B y 4C).

Por último, con respecto a la abundancia relativa de cada tipo exploratorio, se observó que los ectomorfotipos de corta distancia fueron los dominantes en campo, mientras que en el vivero los más abundantes fueron los de contacto (Fig. 4D).

Si bien en las raíces de las plantas de campo la abundancia de ectomorfotipos de corta distancia tendió a aumentar y la de media distancia a disminuir en suelos quemados, las diferencias no fueron significativas ($F_{1,8}=0,174$, $p=0,687$; $F_{1,8}=0,173$, $p=0,687$, respectivamente; Fig. 4D). En cuanto a las plantas de vivero, la abundancia de ectomorfotipos de contacto se incrementó luego de la quema ($F_{1,17}=305,77$, $p<0,001$; Fig. 4D), mientras que los de corta distancia disminuyeron significativamente ($F_{1,17}=302,46$, $p<0,001$; Fig. 4D). La abundancia de ectomorfotipos de media distancia no presentó variaciones significativas ($F_{1,17}=1,607$, $p=0,222$; Fig. 4D).

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto que tuvo el fuego sobre las ectomicorizas (colonización, riqueza, diversidad taxonómica y funcional) de *N. antarctica* según dos enfoques: 1) en ejemplares de *N. antarctica* en un matorral nativo que sufrió un incendio forestal y 2) en plántulas en un ensayo de vivero con quema experimental.

La colonización ectomicorrícica en las raíces de *N. antarctica* mayor al 70% en todos los casos coincide con lo reportado para especies del género *Nothofagus* en Patagonia (Longo *et al.*, 2011, Fernández *et al.*, 2022). El fuego no afectó la colonización ectomicorrícica en las raíces de las plántulas de vivero, pero si disminuyó el porcentaje de colonización para las plantas a campo. Que en vivero la colonización luego del fuego no se haya visto afectada puede deberse a que, tanto en campo como en vivero, el impacto del fuego disminuye con la profundidad del suelo, así los horizontes más profundos pueden actuar como reservorio de esporas y/o micelio para permitir una colonización rápida luego de un incendio (Yang *et al.*, 2020). Es posible que el tiempo de quema durante el experimento no haya sido suficiente para afectar la fracción más profunda de las macetas. Por otro lado, que en campo las plantas del sitio quemado hayan presentado una menor colonización, puede estar explicado por la intensidad y duración del fuego, ya que en campo existe mayor cantidad de material combustible llegando a generar altas temperaturas durante tiempos más prolongados que los utilizados en el ensayo a vivero (Hanan *et al.*, 2022).

El hecho de que la riqueza y diversidad de HEcM fueran mayores en suelos no quemados, tanto en condiciones de campo como de vivero, coincide con lo reportado por Longo *et al.* (2011). Estos autores observaron diferencias en la riqueza y diversidad de HEcM en bosques maduros monoespecíficos de *N. pumilio* de Patagonia afectados por incendios de alta intensidad, pero sólo para el sitio con menor tiempo transcurrido desde el incendio (6-7 años). En el mismo trabajo, no se encontraron diferencias en la riqueza, diversidad y colonización por HEcM entre quemado y no quemado en aquellos sitios con mayor tiempo desde el incendio (10 años).

Por otro lado, los resultados obtenidos coinciden con el meta-análisis de Dove y Hart (2017), en el que se reporta una disminución significativa de la riqueza de HEcM en ambientes de matorral templado a causa del fuego. Aunque hay que considerar que el estudio de Dove y Hart (2017) también revela que los resultados varían según los grupos de hongos y metodologías empleadas en la evaluación de la riqueza. La disminución en los valores de los índices de diversidad en suelo quemado muestra que las comunidades de HEcM asociadas a las raíces de *N. antarctica* se vuelven menos equitativas, encontrándose dominadas por un reducido número de especies. Esto también explica el cambio observado por efecto del fuego en la estructura de las comunidades de HEcM, tanto en campo como vivero. Es así como el fuego puede actuar como un agente selectivo, propiciando a aquellas especies que presentan adaptaciones a las altas temperaturas y/o que sean tolerantes a las condiciones post-fuego (Neary *et al.*, 1999; Cairney y Bastias, 2007; Dove y Hart, 2017; Adkins *et al.*, 2020).

El hecho de que la colonización ectomicorrícica fue mayor en los ejemplares de campo y de que la composición de las comunidades de HEcM variara entre las procedencias de las plantas puede deberse a los distintos tipos de inóculo presentes en el sustrato en el que se desarrollaron las mismas. En el campo se estudiaron individuos cuyas raíces contaban con un nivel de colonización previo y se encontraban asociadas a redes micorrícicas pre-existentes, las cuales facilitan la colonización y promueven la diversidad de HEcM (Simard *et al.*, 2012). Por el contrario, las plántulas en vivero fueron colonizadas únicamente a partir del inóculo disponible en el suelo en forma de propágulos (esporas, fragmentos de micelio o de raíces colonizadas), ya que durante la recolección del suelo para el ensayo (mediante sacabocado) las redes micorrícicas se ven afectadas negativamente por disrupción de las mismas, lo que explicaría la menor colonización y diversidad de HEcM en estas plantas. Por otro lado, en el vivero las condiciones de temperatura y humedad suelen ser más estables que en el campo, favoreciendo el crecimiento de algunas especies de HEcM con respecto a otras (Rudawska *et al.*, 2006). Por ejemplo, es posible que especies de HEcM poco competitivas en condiciones naturales se beneficien bajo las condiciones del vivero, ya que la competencia entre HEcM puede ser contexto dependiente (Fernández *et al.*, 2013, Moeller y Peay, 2016, Rudawska *et al.*, 2006), contribuyendo así a las diferencias observadas en la composición de los HEcM de cada procedencia. Para explicar estas diferencias, también debe considerarse la edad de las plantas, ya que se ha observado en *Nothofagus* de Patagonia que los adultos en condiciones naturales tienden a presentar mayores porcentajes de colonización que las plántulas (Fernández *et al.* 2015; Fernández *et al.* 2022; Moguilevsky, 2024). Estos hechos también explicarían que, en el caso de plantas no sometidas al fuego, la riqueza y diversidad de HEcM haya sido superior en los ejemplares de campo con respecto a los de vivero, junto a factores anteriormente discutidos como la edad de las plantas y el contexto ambiental.

Entre las especies identificadas en este trabajo, hay especies de *Pyronemataceae*, *Cortinarius* y *Rickenella* y *T. patagonica* que son tolerantes al fuego y se las han encontrado en ambientes post-incendio (Buscardo *et al.*, 2010; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2015; Enright *et al.*, 2022). Incluso se han clasificado a diferentes especies de la familia *Pyronemataceae* como pirófilas, ya que se han detectado cuerpos fructíferos rápidamente en sitios que han sufrido un incendio reciente (Enright *et al.*, 2022) y cuentan con adaptaciones al fuego. Por ejemplo, algunas especies del género *Pyronema* (*Pyronemataceae*) y *Cortinarius* (*Cortinariaceae*) son capaces de formar esclerocios (estructuras de resistencia) que podrían ser termotolerantes (Smith *et al.*, 2015; Enright *et al.*, 2022), lo que explicaría su tolerancia a este disturbio. Respecto a *T. patagonica*, no se han encontrado reportes sobre la formación de estructuras de resistencia o sobre su presencia en alguna especie de *Nothofagus* post-fuego. Sin embargo, hay registros de especies del género *Tomentella* en condiciones post-incendio en otros ecosistemas (Buscardo *et al.*, 2010). Estas características podrían explicar el cambio en la abundancia relativa de estas especies, ya que varias de éstas aportan a explicar las diferencias entre ambas condiciones del suelo en campo y vivero. Hasta el momento, no hemos hallado reportes sobre la presencia de especies de *Pyronemataceae* y *T. patagonica* en ejemplares de *Nothofagus* post-fuego, por lo que este trabajo aporta información novedosa también en este aspecto. En cuanto a las especies cosmopolitas, *C. geophilum* y *Thelephora terrestris* han sido frecuentemente registradas en etapas tempranas post-fuego (Cowan *et al.*, 2016; Glassman *et al.*, 2016; Pulido-Chavez *et al.*, 2021). De hecho, algunas especies de *Cenococcum* y *Thelephora* son capaces de tolerar temperaturas por encima de los 700 °C (Cowan *et al.*, 2016). Por lo que la ausencia de éstas especies en condición de quemado en este trabajo resulta llamativa y requiere de mayores estudios.

Si bien la cosmopolita *C. geophilum* fue la única especie que se encontró tanto en campo como en vivero, todas las especies de HEcM identificadas son frecuentes en raíces del género *Nothofagus* (Fernández *et al.*, 2022; Floriani *et al.*, 2024). Algunas especies, como *R. patagonica* anteriormente identificada como *Peziza* sp. (Fernández *et al.*, 2013), se ha observado principalmente en plántulas y asociada a estadios sucesionales tempranos (Fernández *et al.*, 2013; Kraisitudomsook *et al.*, 2019). Por el contrario, las del género *Cortinarius* suelen ser comunes en individuos adultos o en plántulas que se desarrollan en estrecha relación con las redes micorrícicas de éstos (Moguilevsky, 2024), por lo que suelen aparecer más tarde en la sucesión ectomicorrícica (LeDuc *et al.*, 2013). Esto demuestra que las comunidades de HEcM en las raíces de los ejemplares de campo se asemejan más a las de individuos adultos o de sucesión tardía que a las plántulas de vivero, las cuáles están en estadios tempranos del proceso de sucesión. Por lo tanto, es evidente la importancia de las raíces y capas profundas del suelo como reservorio natural de estos hongos simbioses y para la óptima recuperación de la vegetación post-fuego.

Los tipos exploratorios pueden ser utilizados como indicadores de las estrategias de obtención de recursos que presentan los HEcM. Las especies vegetales ectomicorrícicas suelen poseer diferentes tipos exploratorios simultáneamente, ya que cada uno le brinda diferentes beneficios (Agerer, 2001). Una de las hipótesis propuestas para explicar la dominancia de HEcM de contacto en plántulas de vivero es su menor costo de carbono para la planta huésped (Fernández *et al.*, 2017). Por lo tanto, EcM de contacto podrían ser más propicias durante el desarrollo temprano de las plántulas, las cuales invierten la mayor parte de sus recursos en el crecimiento. Asimismo, la mayor prevalencia de este tipo exploratorio en plantas de vivero puede estar relacionada con la mayor disponibilidad de agua y, por lo tanto, menor necesidad de explorar el suelo en búsqueda de la misma. En este sentido, algunos trabajos han observado que los tipos de exploración de contacto se encuentran presentes en un amplio rango ambiental, pero son más frecuentes en ambientes húmedos y cálidos (Defrenne *et al.*, 2019), similares a las condiciones del vivero. En cuanto al efecto del fuego tras las quemaduras experimentales, el aumento en la abundancia de EcM de contacto en suelos quemados podría deberse a que las nuevas condiciones ambientales, como cambios en la disponibilidad de nutrientes o en las propiedades del suelo (ej. pH y conductividad), propician su desarrollo con respecto a los de corta distancia. Por otro lado, es posible que las especies de HEcM que formaban ectomorfotipos de corta distancia en vivero fueran más sensibles a las altas temperaturas.

Se ha reportado que, en condiciones naturales, luego de un incendio los tipos de exploración de media distancia suelen ser los más frecuentes (Olchowik *et al.*, 2021), ya que permiten explorar mayor volumen de suelo en búsqueda de recursos, en particular de agua, que se torna limitante luego de un incendio. Nuestros resultados contrastan con esta información, ya que se observó una dominancia del tipo exploratorio de corta distancia en todas las raíces provenientes del campo independientemente de la condición del suelo. Esta dominancia de ectomorfotipos de corta distancia podría deberse a la densidad de raíces en el suelo del matorral estudiado, ya que en áreas con alta densidad de raíces suelen desarrollarse mejor los ectomorfotipos con este tipo exploratorio (Peay *et al.*, 2011). En este trabajo la recolección de muestras se realizó en matorrales densos de *N. antarctica*, donde la densidad de raíces era elevada. Por otro lado, los ectomorfotipos de media distancia transfieren N de manera más efectiva desde la degradación de materia orgánica del suelo, pero su formación y mantenimiento conlleva altos costos metabólicos para la planta huésped (van der Linde *et al.*, 2018). En cambio, los ectomorfotipos de corta distancia son capaces de utilizar más fácilmente el N inorgánico presente en el suelo (Truong *et al.*, 2024) y requieren de un menor costo metabólico. Dado que se han observado elevados niveles de N inorgánico en los suelos luego de incendios (Prieto-Fernández *et al.*, 1998; Neary *et al.*, 1999), es de esperar que la abundancia de este tipo exploratorio sea alta tras este disturbio; ya que las

plantas podrían necesitar utilizar sus recursos eficientemente, reduciendo el aporte de energía para la formación de ectomorfotipos de alto costo, como las de media y larga distancia.

Conocer cómo cambian y se estructuran las comunidades luego de un incendio es relevante porque se genera conocimiento novedoso sobre los procesos de sucesión bajo condiciones naturales. Esta información es fundamental para comprender la dinámica de los ecosistemas y plantear posteriores estrategias de prevención, conservación y restauración. En particular para las comunidades de HEcM, los efectos a causa de este tipo de disturbios pueden durar varios años. Por ejemplo, estudios realizados cuatro años después de un incendio prescrito de intensidad media reportan aún una disminución significativa en la abundancia relativa de HEcM (Castaño *et al.* 2020). Asimismo, el metanálisis de Dove y Hart (2017) indica que los efectos de un incendio sobre las comunidades de HEcM pueden perdurar hasta dos décadas en algunos casos. Esto tiene particular importancia, ya que la presencia y diversidad de estos hongos simbiotes es fundamental para la recuperación de los suelos y la vegetación (Barreiro y Díaz-Raviña, 2021). Por lo tanto, contar con esta información en la región Andino-patagónica, donde los incendios se han tornado más frecuentes, intensos y de larga duración, afectando decenas de miles de hectáreas cada verano, es sumamente relevante y de gran importancia ecológica y aplicada.

CONCLUSIONES

Las dos aproximaciones experimentales utilizadas para evaluar cómo el fuego afecta las comunidades de HEcM asociados a *N. antarctica* en matorrales Andino-patagónicos, mostraron respuestas similares frente a los eventos de quema. Mientras que la colonización se vió negativamente afectada por el fuego únicamente en campo, la riqueza y diversidad taxonómica de los HEcM se redujo drásticamente en plantas de ambas procedencias. Además, en ambas aproximaciones se observó que luego del fuego se redujeron la ocurrencia y abundancia de tipos exploratorios de mayor complejidad estructural (de media distancia en ejemplares de campo y de corta distancia en vivero). En conjunto, estos cambios explican el marcado efecto del fuego sobre la estructura de estas comunidades de HEcM tanto en las plantas de campo como las de vivero, aunque la composición de especies entre ambas procedencias no fuese la misma.

La utilización conjunta de enfoques a campo y vivero para el estudio de las comunidades de HEcM es poco frecuente. Por lo tanto, el enfoque múltiple de este trabajo otorga una mirada más completa e integradora sobre los efectos complejos de los incendios en la colonización ectomicorrícica, la estructuración de las comunidades de HEcM y su diversidad taxonómica y funcional. Este tipo de estudios resultan fundamentales, ya que los HEcM cumplen funciones claves en los ambientes naturales y brindan numerosos

servicios ecosistémicos (provisión, regulación, soporte y culturales), por lo que son necesarios más estudios en distintas regiones afectadas por incendios en Patagonia a fin de poder comparar entre distintos contextos ecológicos y abordar de manera más integral esta problemática. Además, *N. antarctica* es una especie nativa de gran valor ecológico, económico y cultural en toda la Patagonia. Destacan aún más la importancia de este trabajo las proyecciones de ocurrencia de incendios más frecuentes y de mayor intensidad en la Patagonia argentina, principalmente como consecuencia del cambio global y el avance de las actividades antrópicas sobre los ambientes naturales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el financiamiento del proyecto PICT 2018-4029 con el cual fue posible realizar este trabajo, al Grupo de Genética Forestal del INTA EEA Bariloche y en particular a Alejandro Aparicio por brindarnos el espacio y herramientas necesarias para realizar el ensayo de vivero y al CONICET. Además, agradecemos a los revisores anónimos por sus valiosos comentarios, los cuales contribuyeron significativamente a la mejora de este artículo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Adkins, J., Docherty, K. M., Gutknecht, J. L. y Miesel, J. R. (2020). How do soil microbial communities respond to fire in the intermediate term? Investigating direct and indirect effects associated with fire occurrence and burn severity. *Science of the Total Environment* 745: 140957.
- Agerer, R. (1987-2006). Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Munich, Alemania.
- Agerer, R. (2001). Exploration types of ectomycorrhizae: a proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
- Alauzis, M. V., Mazzarino, M. J., Raffaele, E. y Roselli, L. (2004). Wildfires in NW Patagonia: long-term effects on a *Nothofagus* forest soil. *Forest Ecology and Management* 192 (2-3): 131-142.

- Azpilicueta, M. M., Gallo, L. A., Martínez, A. y Varela, S. (2010). Manual de viverización, cultivo y plantación de Roble Pellín en el norte de la región Andino Patagónica.
- Bahamonde, H. A., Peri, P. L., Monelos, L. H. y Martínez Pastur, G. (2011). Aspectos ecológicos de la regeneración por semillas en bosques nativos de *Nothofagus antarctica* en Patagonia Sur, Argentina. *Bosque* (Valdivia) 32 (1): 20-29.
- Barreiro, A. y Díaz-Raviña, M. (2021). Fire impacts on soil microorganisms: Mass, activity, and diversity. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 22: 100264.
- Bartón, K. (2020). DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package ver. 0.4.6. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA> (consultado en noviembre, 2024).
- Brundrett, M. C. y Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220 (4): 1108-1115.
- Buscardo, E., Rodríguez-Echeverría, S., Martín, M. P., De Angelis, P., Pereira, J. S. y Freitas, H. (2010). Impact of wildfire return interval on the ectomycorrhizal resistant propagules communities of a Mediterranean open forest. *Fungal Biology* 114 (8): 628-636.
- Cairney, J. W. y Bastias, B. A. (2007). Influences of fire on forest soil fungal communities. *Canadian Journal of Forest Research* 37 (2): 207-215.
- Carron, A. (2021). Impacto del manejo forestal del matorral nativo en el NO patagónico sobre las comunidades microbianas del suelo y los simbiontes radicales. (Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche).
- Castaño, C., Hernández-Rodríguez, M., Geml, J., Eberhart, J., Olaizola, J., Oria-de-Rueda, J. A. y Martín-Pinto, P. (2020). Resistance of the soil fungal communities to medium-intensity fire prevention treatments in a Mediterranean scrubland. *Forest Ecology and Management* 472: 118217.
- Castillo, M., Pedernera P. y Peña E. (2003). Incendios forestales y medio ambiente: una síntesis global. *Revista Ambiente y Desarrollo de CIPMA* 19 (3-4): 44-53.
- Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia* 143 (1): 1-10.
- Chávez, D., Machuca, Á., Fuentes-Ramirez, A., Fernández, N. y Cornejo, P. (2020). Shifts in soil traits and arbuscular mycorrhizal symbiosis represent the conservation status of *Araucaria araucana* forests and the effects after fire events. *Forest Ecology and Management* 458: 117806.
- Clemmensen, K. E., Finlay, R. D., Dahlberg, A., Stenlid, J., Wardle, D. A. y Lindahl, B. D. (2014). Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long term succession in boreal forests. *New Phytologist* 205 (4): 1525-1536.

- Cóbar-Carranza, A. J., García, R. A., Pauchard, A. y Pena, E. (2014). Effect of *Pinus contorta* invasion on forest fuel properties and its potential implications on the fire regime of *Araucaria araucana* and *Nothofagus antarctica* forests. *Biological Invasions* 16: 2273-2291.
- Cowan A. D., Smith, J. E. y Fitzgerald, S. A. (2016). Recovering lost ground: effects of soil burn intensity on nutrients and ectomycorrhiza communities of ponderosa pine seedlings. *Forest Ecology and Management* 378: 160-172.
- Day, N. J., Dunfield, K. E., Johnstone, J. F., Mack, M. C., Turetsky, M. R., Walker, X. J., ... y Baltzer, J. L. (2019). Wildfire severity reduces richness and alters composition of soil fungal communities in boreal forests of western Canada. *Global change biology* 25 (7): 2310-2324.
- Defrenne, C. E., Philpott, T. J., Guichon, S. H., Roach, W. J., Pickles, B. J. y Simard, S. W. (2019). Shifts in ectomycorrhizal fungal communities and exploration types relate to the environment and fine-root traits across interior Douglas-fir forests of western Canada. *Frontiers in Plant Science* 10: 643.
- Diehl, P., Mazzarino, M. J. y Fontenla, S. (2008). Plant limiting nutrients in Andean-Patagonian woody species: effects of interannual rainfall variation, soil fertility and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 255: 2973-2980.
- Donoso, C., Steinke, L. y Premoli, A. (2006). *Nothofagus antarctica* (G. Forster) Oerst. In: Donoso Zegers C ed. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. *Autoecología*. Valdivia, pp 401-410.
- Dove, N. C. y Hart, S. C. (2017). Fire reduces fungal species richness and in situ mycorrhizal colonization: a meta-analysis. *Fire Ecology* 13: 37-65.
- Ebrecht, A. L. (2023). Efecto de los incendios sobre las comunidades fúngicas a distintas profundidades del suelo en dos ecosistemas forestales nativos (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche).
- Enright, D. J., Frangioso, K. M., Isobe, K., Rizzo, D. M. y Glassman, S. I. (2022). Mega-fire in redwood tanoak forest reduces bacterial and fungal richness and selects for pyrophilous taxa that are phylogenetically conserved. *Molecular Ecology* 31 (8): 2475-2493.
- Fernández, N. V., Marchelli, P. y Fontenla, S. B. (2013). Ectomycorrhizas naturally established in *Nothofagus nervosa* seedlings under different cultivation practices in a forest nursery. *Microbial ecology* 66: 581-592.
- Fernández, N. V., Marchelli, P., Gherghel, F., Kost, G. y Fontenla, S. B. (2015). Ectomycorrhizal fungal communities in *Nothofagus nervosa* (Raulí): a comparison between domesticated and naturally established specimens in a native forest of Patagonia, Argentina. *Fungal ecology* 18: 36-47.
- Fernández, C. W., Nguyen, N. H., Stefanski, A., Han, Y., Hobbie, S. E., Montgomery, R. A., ... y Kennedy, P. G. (2017). Ectomycorrhizal fun-

- gal response to warming is linked to poor host performance at the boreal-temperate ecotone. *Global Change Biology* 23 (4): 1598-1609.
- Fernández, N., Fontenla, S., Fioroni, F., Soto-Mancilla, M., Carron, A., Moguelevsky, D., ... y Mestre, M. C. (2022). Mycorrhizas in *Nothofagus* From South America: What Do We Know From Nursery and Field Experiences?. In *Mycorrhizal Fungi in South America: Biodiversity, Conservation, and Sustainable Food Production* (pp. 281-304). Cham: Springer International Publishing.
- Floriani, F. D., El Mujtar, V., Mateo, C., Sola, G., Peñalba, M. G., Sbrancia, R., ... y Fernández, N. V. (2024). Site conditions shaped the effect of silvicultural management on the biodiversity of ectomycorrhizal fungi in mixed *Nothofagus* forests. *Forest Ecology and Management* 563: 121981.
- Gardes, M. y Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes — application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2 (2): 113-118.
- Glassman, S. I., Levine, C. R., DiRocco, A. M., Battles, J. J. y Bruns, T. D. (2016). Ectomycorrhizal fungal spore bank recovery after a severe forest fire: some like it hot. *The ISME journal* 10 (5): 1228-1239.
- Grand, L. F. y Harvey, A. E. (1982). Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots. En: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Shenck NC (Ed.). American Phytopathological Society, Saint Paul: 157-164.
- Hanan, E. J., Kennedy, M. C., Ren, J., Johnson, M. C. y Smith, A. M. (2022). Missing climate feedbacks in fire models: limitations and uncertainties in fuel loadings and the role of decomposition in fine fuel accumulation. *Journal of Advances in Modeling Earth Systems* 14 (3): e2021MS002818.
- Heine, J. H. 2023. pairwiseAdonis: Pairwise Comparison Using Adonis. R package ver. 0.4.0. <https://cran.r-project.org/web/packages/pairwise/index.html> (consultado en noviembre, 2024).
- Hernández-Rodríguez, M., Oria-de-Rueda, J. A. y Martín-Pinto, P. (2013). Post-fire fungal succession in a Mediterranean ecosystem dominated by *Cistus ladanifer* L. *Forest Ecology and Management* 289: 48-57.
- Kitzberger, T. y Veblen, T. T. (2003). Influences of climate on fire in northern Patagonia, Argentina. Fire and climatic change in temperate ecosystems of the western Americas: 296-321.
- Kitzberger, T., Tiribelli, F., Barberá, I., Gowda, J. H., Morales, J. M., Zalar, L. y Paritsis, J. (2022). Projections of fire probability and ecosystem vulnerability under 21st century climate across a trans-Andean productivity gradient in Patagonia. *Science of the Total Environment* 839: 156303.
- Kraisitudomsook, N., Healy, R. A., Mujic, A. B., Pfister, D. H., Nouhra, E. R. y Smith, M. E. (2019). Systematic study of truffles in the genus *Ruhlandiella*, with the description of two new species from Patagonia. *Mycologia* 111 (3): 477-492.

- LeDuc, S. D., Lilleskov, E. A., Horton, T. R. y Rothstein, D. E. (2013). Ectomycorrhizal fungal succession coincides with shifts in organic nitrogen availability and canopy closure in post-wildfire jack pine forests. *Oecologia* 172: 257-269.
- Lenth, R. V. (2023). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.8.8. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> (consultado en noviembre, 2024).
- Longo, M. S., Urcelay, C. y Nouhra, E. (2011). Long term effects of fire on ectomycorrhizas and soil properties in *Nothofagus pumilio* forests in Argentina. *Forest Ecology and Management* 262: 348-354.
- Mazzarino, M. J. y Gobbi, M. E. (2005). Indicadores de circulación de nutrientes en bosques Andino-Patagónicos. *IDIA* 21 (5):15-18.
- Moeller, H. V. y Peay, K. G. (2016). Competition-function tradeoffs in ectomycorrhizal fungi. *PeerJ* 4: e2270.
- Moguilevsky, D. (2024). Micorrizas y comunidades vegetales en bosques de *Nothofagus pumilio* afectados por la erupción del complejo volcánico Puyehue-Cordón Caulle. (Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche).
- Mohr Bell, D. (2021). Informe de superficie afectada por el Incendio de Paraje Los Repollos - Cuesta del Ternero, El Bolsón, provincia de Río Negro. CIFAB (9).
- Neary, D. G., Klopatek, C. C., DeBano, L. F. y Ffolliott, P. F. (1999). Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis. *Forest Ecology and Management* 122 (1-2): 51-71.
- Nouhra, E., Urcelay, C., Longo, S. y Tedersoo, L. (2013). Ectomycorrhizal fungal communities associated to *Nothofagus* species in Northern Patagonia. *Mycorrhiza* 23 (6): 487-496.
- Olchowik, J., Hilszczańska, D., Studnicki, M., Malewski, T., Kariman, K. y Borowski, Z. (2021). Post-fire dynamics of ectomycorrhizal fungal communities in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forest of Poland. *PeerJ* 9: e12076.
- Oksanen, J., F. Guillaume, D. Lyon, R. B. M. Simpson, P. Soetaert, H. y Wagner. (2023). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (consultado en noviembre, 2024).
- Peay, K. G., Kennedy, P. G. y Bruns, T. D. (2011). Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation?. *Fungal Ecology* 4 (3): 233-240.
- Premoli, A. C. (1991). Morfología y capacidad germinativa en poblaciones de *Nothofagus antarctica* (Foster) Oerst. del noroeste andino patagónico. *Bosque* 12 (2): 53-59.
- Prieto-Fernández, A., Acea, M. J. y Carballas, T. (1998). Soil microbial and extractable C and N after wildfire. *Biology and Fertility of Soils* 27: 132-142.

- Pulido-Chavez, M. F., Alvarado, E. C., DeLuca, T. H., Edmonds, R. L. y Glassman, S. I. (2021). High-severity wildfire reduces richness and alters composition of ectomycorrhizal fungi in low-severity adapted ponderosa pine forests. *Forest Ecology and Management* 485: 118923.
- R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. Version 4.3.2. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (consultado en noviembre, 2024).
- Rudawska, M., Leski, T., Trocha, L. K. y Gornowicz, R. (2006). Ectomycorrhizal status of Norway spruce seedlings from bare-root forest nurseries. *Forest Ecology and Management* 236 (2-3): 375-384.
- Salinas, S., Acuña Aroca, B., Koch, Z. y Uribe, M. (2014). Propagación sexual y asexual de Ñire *Nothofagus antarctica* (Forster) Oerst en la Patagonia Chilena.
- Schinelli Casares, T. (2012). Producción de *Nothofagus* bajo condiciones controladas. 1a Ed. Esquel: Ediciones INTA.
- Simard, S. W., Beiler, K. J., Bingham, M. A., Deslippe, J. R., Philip, L. J. y Teste, F. P. (2012). Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* 26 (1): 39-60.
- Smith, M. E., Henkel, T. W. y Rollins, J. A. (2015). How many fungi make sclerotia?. *Fungal Ecology* 13: 211-220.
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis (3rd edition). Academic press.
- Soto Mancilla, M. A. (2022). Impacto de la intensidad del fuego sobre el comportamiento micorrízico y crecimiento temprano de una especie forestal nativa (*Nothofagus antarctica*) y otra exótica invasora (*Pinus contorta*) (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche).
- Stendell, E. R., Horton, T. R. y Bruns, T. D. (1999). Early effects of prescribed fire on the structure of the ectomycorrhizal fungus community in a Sierra Nevada ponderosa pine forest. *Mycological Research* 103 (10): 1353-1359.
- Taylor, D. L., Hollingsworth, T. N., McFarland, J. W., Lennon, N. J., Nussbaum, C. y Ruess, R. W. (2014). A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological monographs* 84 (1): 3-20.
- Tedersoo, L., Bahram, M. y Zobel, M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science* 367 (6480): eab1223.
- Truong, C., Gabbarini, L. A., Moretto, A., Escobar, J. M. y Smith, M. E. (2024). Ectomycorrhizal fungi and the nitrogen economy of *Nothofagus* in southern Patagonia. *Ecology and Evolution* 14 (10): e70299.
- Urretavizcaya, M. F., Defossé, G. E. y Gonda, H. E. (2005). Cambios ambientales y restauración ecológica post incendio en bosques de *Austrocedrus chilensis*. (Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche).

- Van der Linde, S., Suz, L. M., Orme, C. D. L., Cox, F., Andreae, H., Asi, E., ... y Bidartondo, M. I. (2018). Environment and host as large-scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature* 558 (7709): 243-248.
- Vásquez-Gassibe, P., Oria-de-Rueda, J. A., Santos-del-Blanco, L. y Martín-Pinto, P. (2016). The effects of fire severity on ectomycorrhizal colonization and morphometric features in *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Forest Systems* 25 (1): e050-e050.
- Varela, S. A. y Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Serie técnica: "Sistemas Forestales Integrados". Área Forestal – INTA EEA Bariloche.
- Veblen, T. T., Donoso, C., Kitzberger, T. y Rebertus, A. J. (1996). Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. En: T.T Veblen (Ed.), The ecology and biogeography of *Nothofagus* forests (pp. 93-353). Yale University Press.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. Edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, New York. pp. 315-322.
- Yang, T., Tedersoo, L., Lin, X., Fitzpatrick, M. C., Jia, Y., Liu, X., ... y Chu, H. (2020). Distinct fungal successional trajectories following wildfire between soil horizons in a cold-temperate forest. *New Phytologist* 227 (2): 572-587.



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Evaluación morfológica de la interacción de raíces de *Pinus* y *Quercus* con hongos del género *Tuber* en el marco del primer proyecto desarrollado en la provincia de Tucumán (Argentina)

Morphological evaluation of the interaction of *Pinus* and *Quercus* roots with fungi of the genus *Tuber* in the framework of the first project developed in the province of Tucumán (Argentina)

Albornoz, Patricia L.^{1,2*}; Aldo Berettoni³; Jorge Ale³; Alicia Forns³; Myriam del V. Catania^{4*}

¹ Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo (UNT), Miguel Lillo 205, San Miguel de Tucumán T4000JFE, Argentina.

² Instituto de Morfología Vegetal, Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, San Miguel de Tucumán T4000JFE, Argentina.

³ Sección Horticultura, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Av. William, W. Cross 3150, T4101XAC San Miguel de Tucumán, Tucumán.

⁴ Instituto Criptogámico, Sección Micología, Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, San Miguel de Tucumán T4000JFE, Argentina.

* Autores correspondientes: <albornoz@csnat.unt.edu.ar> <mcatania@lillo.org.ar>

Resumen

Las trufas son hongos hipógeos que crecen en asociación con las raíces de ciertas especies arbóreas, formando una asociación simbiótica mutualista. En la provincia de Tucumán, en el año 2012, la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres llevó a cabo el primer proyecto provincial y regional para evaluar el cultivo de trufas como alternativa productiva en el noroeste argentino. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la interacción de inóculos ectomicorrícicos en especies forestales, caracterizar los diferentes tipos

► Ref. bibliográfica: Albornoz, P. L.; Berettoni, A.; Ale, J.; Forns, A.; Catania, M. del V. 2025. Evaluación morfológica de la interacción de raíces de *Pinus* y *Quercus* con hongos del género *Tuber* en el marco del primer proyecto desarrollado en la provincia de Tucumán (Argentina). *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 157-175. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2184>

► Recibido: 8 de marzo 2025 – Aceptado: 24 de mayo 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.



OPEN ACCESS

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

morfológicos de las estructuras micorrícicas y describir las características del esporoma de *Tuber uncinatum* diferenciado en la interacción. Las plantaciones fueron establecidas en cinco localidades de la provincia, ubicadas en zonas de piedemonte y en valles intermontanos y de altura. Se inocularon dos especies de *Pinus* y dos de *Quercus* con tres especies de *Tuber*. Los muestreos se llevaron a cabo en los meses de mayo y junio de los años 2015 a 2018, así como en diciembre de 2024. Se tomaron muestras de raíces, compuestas por tres submuestras, correspondiente a cada individuo/combinación/localidad. Posteriormente, se realizaron cortes transversales de las raíces a los cuales se aplicaron técnicas histológicas y tinciones convencionales. En todos los sitios analizados se evidenció la existencia de una simbiosis efectiva entre las raíces y los hongos inoculados, tal como fue corroborado por las características morfológicas y anatómicas observadas. Las estructuras se describen e ilustran en las seis combinaciones evaluadas. Esta producción forestal con diferenciación de esporomas de *Tuber* muestra un potencial de rentabilidad a futuro, consolidándose como una alternativa productiva prometedora para el desarrollo económico y ecológico de la región.

Palabras clave: Desarrollo regional; ectomicorizas; inoculación; *Pinus*; *Quercus*; *Tuber*.

Abstract

Truffles are hypogeous fungi that grow near the roots of certain tree species, forming a mutualistic symbiotic association. In the province of Tucumán, in 2012, the Obispo Colombres Agro-Industrial Experimental Station carried out the first provincial and regional project to evaluate truffle cultivation as a productive alternative in Northwestern Argentina. In this context, the present study aims to assess the interaction of ectomycorrhizal inocula in forest species, characterize the different morphological types of mycorrhizal structures, and describe the features of the *Tuber uncinatum* sporocarp, differentiated in the interaction. The plantations were established in five localities within the province, located in piedmont zones, intermontane and high-altitude valleys. Two species of *Pinus* and two of *Quercus* were inoculated with three species of *Tuber*. The samplings were carried out in the months of May and June from 2015 to 2018, as well as in December 2024. Root samples were taken with three subsamples, corresponding to each individual/combination/locality. Subsequently, cross-sections of the root were made, to which histological techniques and conventional staining methods were applied. An effective symbiosis between the roots and the inoculated fungi was evident at all analysed sites, as corroborated by the morphological and anatomical characteristics observed. These structures are described and illustrated in the six combinations evaluated. This forestry production with *Tuber* sporocarp differentiation shows a potential for future profitability, consolidating itself as a promising productive alternative for the economic and ecological development of the region.

Keywords: Ectomycorrhizae; inoculation; *Pinus*; *Quercus*; *Tuber*; regional development.

INTRODUCCIÓN

Las trufas son hongos hipógeos que establecen asociaciones simbióticas mutualistas con los sistemas radiculares de especies arbóreas específicas, principalmente encinas, robles y avellanos, entre otras (Boa, 2004; Quiroga *et al.*, 2024). Estos hongos pertenecen al género *Tuber* P. Micheli ex F.H. Wigg., de la familia Tuberaceae (Pezizales, Ascomycota). La "trufa" corresponde al esporoma, ascoma o cuerpo fructífero del hongo, cuya morfología y características organolépticas varían entre especies (Quiroga *et al.*, 2024).

Diversas especies del género *Tuber* poseen valor comercial, entre ellas *Tuber aestivum* Vittad., *T. borchii* Vittad., y *T. magnatum* Picco, siendo *T. melanosporum* Vittad. la más destacada a nivel mundial por su demanda y volumen de comercialización (Zambonelli *et al.*, 2017). Francia lidera la producción de la trufa negra del Périgord (*T. melanosporum*), seguida por Italia, principal productor de trufa blanca (*T. magnatum*). Otros países como España, Eslovenia, Grecia, Turquía, Argentina, Chile, Australia y Nueva Zelanda también cultivan trufa negra, mientras que Croacia sobresale en la producción de trufa blanca. Estados Unidos produce ambas variedades (Leonardi *et al.*, 2021).

En Argentina, la truficultura se inició en la década de 1990 con la importación de esporas europeas por parte de productores locales. En 2007, la empresa Trufas del Sur S.A., ubicada en Coronel Suárez (Buenos Aires), fundó la primera planta de producción de árboles micorrizados con *Tuber melanosporum*, con asesoramiento de especialistas españoles y chilenos (<https://trufasdelsur.com/>). Posteriormente, en 2011, se estableció Trufas del Nuevo Mundo, en Espartillar y Sierra de la Ventana (Buenos Aires), la cual desde 2020 exporta trufa negra argentina a mercados europeos y estadounidenses (<https://trufasdelnuevomundo.com/historia/>).

Actualmente, en Argentina, el cultivo de trufas se extiende desde el norte de la Patagonia hasta Tucumán, abarcando provincias como Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Neuquén y Mendoza, entre otras (Infocampo, 2025a). Existen más de 400 hectáreas plantadas en distintas etapas de desarrollo, de las cuales aproximadamente 75 hectáreas están en fase productiva (Lagos, 2025).

Bajo condiciones adecuadas, la producción puede comenzar alrededor del cuarto año tras el establecimiento de la forestación, aunque para fines de evaluación se considera el inicio del ciclo productivo a partir del quinto año. La mayor producción suele alcanzarse en torno a los 10 años, periodo de tiempo después del cual se estabiliza (Leonardi *et al.*, 2021). Una plantación de trufas tiene una vida útil estimada de entre 20 y 25 años, con posibilidad de realizar múltiples cosechas en una misma temporada, lo que incrementa su rentabilidad a largo plazo (Infocampo, 2025b).

La truficultura se considera un sistema agroforestal que no solo contribuye a la reforestación de terrenos, sino que también impulsa el desarrollo económico de zonas rurales con recursos limitados (Boa, 2004; Sáez y De Miguel, 2008; Reyna, 2012; Reyna y García-Barreda, 2014). En este marco, la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), en el año 2012, llevó a cabo el primer proyecto provincial para evaluar el cultivo de trufas como alternativa productiva en el noroeste argentino. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la efectividad de la inoculación con suspensión de esporas de diferentes especies de *Tuber* en cuatro plantaciones forestales, caracterizar los diferentes tipos morfológicos de las estructuras micorrícicas diferenciadas y describir las características del esporoma de *Tuber uncinatum* Chatin generado en la interacción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios del ensayo y muestreo

En la provincia de Tucumán, en el año 2012, se establecieron plantaciones de truferas en cinco localidades de la provincia: Las Carreras (Tafí del Valle, 26°54'30"S 65°45'47"O, 2270 m snm), Villa Padre Monti, (Burruyacú, 26°30'39"S 64°59'50"O, 915 m nsm), Rodeo Grande (Trancas, 26°28'43"S 65°33'49"O, 1494 m snm), Encalilla (Amaicha del Valle, 26°28'34"S 65°58'41"O, 1755 m snm), y Benjamín Paz (Trancas, 26°24'48"S 65°17'45"O, 769 m snm). La Tabla 1 presenta las interacciones entre especies del género *Tuber* y diversas especies de plantas forestales empleadas en los sitios previamente seleccionados, en función de sus condiciones climáticas y edáficas (Fig. 1).

Los muestreos se realizaron en mayo y junio del 2015 al 2018 y en diciembre del 2024. Se tomaron muestras de raíces, compuestas por tres submuestras, por individuo/combinación/localidad.

Inóculo-Hospedante

El inóculo consistió en particulados de esporomas específicos, procedentes de la Universidad de Perugia, Italia. Las especies de hongos fueron: *Tuber aestivum*, *T. borchii*, *T. melanosporum* y *T. uncinatum*. Este material fue utilizado para la generación de una suspensión mezclando 10 gr de inóculo en 1 l. de agua, la cual fue homogeneizada con un agitador magnético durante 12 h. La aplicación de cada suspensión se llevó a cabo a través de la inyección de 10 ml de la misma en el cuello de cada planta de no más de 15 cm de alto. Las especies arbóreas inoculadas fueron: *Quercus ilex* L., *Q. robur* L., *Pinus halepensis* Mill., *P. pinea* L. (Tabla 1).



Fig. 1. Plantaciones de truferas en la provincia de Tucumán. A, B) Tafí del Valle, *Pinus halepensis*. C, D) Rodeo Grande, *Quercus robur*. E, F) Benjamín Paz, *Pinus halepensis*.

Fig. 1. Truffle plantations in Tucumán province. A, B) Tafí del Valle, *Pinus halepensis*. C, D) Rodeo Grande, *Quercus robur*. E, F) Benjamín Paz, *Pinus halepensis*.

Tabla 1. Ubicación de las truferas y combinaciones de hospedantes con hongos ectomicorrícicos.
Table 1. Location of truffle trees and host combinations with ectomycorrhizal fungi.

Combinación (hospedante-trufa)	Número de plantas por localidad				
	Tafí del Valle	Rodeo Grande	Benjamín Paz	Va Padre Monti	Encalilla
HA <i>Pinus halepensis</i> inoculado con <i>Tuber aestivum</i>	51	50	32	49	61
IM <i>Quercus ilex</i> inoculado con <i>Tuber melanosporum</i>	51	50	49	55	20
PB <i>Pinus pinea</i> inoculado con <i>Tuber borchii</i>	51	50	50	35	62
PHB <i>Pinus halepensis</i> inoculado con <i>Tuber borchii</i>	51	50	60	60	63
RA <i>Quercus robur</i> inoculado con <i>Tuber aestivum</i>	51	50	60	62	68
RU <i>Quercus robur</i> inoculado con <i>Tuber uncinatum</i>	20	20	20	26	24

Análisis morfológico de las raíces

En el laboratorio, las raíces fueron cuidadosamente lavadas y observadas con microscopio estereoscópico (Olympus SZX7, Tokyo, Japan), para determinar la morfología de las últimas ramificaciones. Se caracterizó cada morfotipo siguiendo la metodología estándar (Agerer, 1991). Para la descripción morfológica de las ectomicorrizas se consideró el tipo de ramificación y el grosor del manto (Agerer, 1986, 1991; Agerer y Rambold, 2025). Además, se realizaron cortes transversales a mano libre, los que fueron decolorados con agua-lavandina (1:1), enjuagados y posteriormente teñidos con azul astrasafranina (D' Ambrogio de Argüeso, 1986). Por otra parte, se efectuaron cortes transversales ultrafinos de raíces fijadas en solución de Karnovsky (formaldehído 4%, glutaraldehído 5%, buffer fosfato sódico 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) y posteriormente fijadas con una solución buffer de fosfato de sodio 1/1 con 2% de tetróxido de osmio (Karnovsky, 1965). Luego, las mismas fueron incubadas a 4°C durante una noche, lavadas, embebidas en resina Spurr y seccionadas en ultramicrotomo. Se obtuvieron secciones de 3 µm de espesor, las que se tiñeron con azul de toluidina 0,05% (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1981). Las observaciones se realizaron con microscopio óptico (Axiostar Plus, Zeiss, Göttingen, Germany) y se fotografiaron con cámara digital (Canon A620, Power Shot 7.1 M.P.).

El análisis de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas del esporoma de *Tuber uncinatum* se realizó con material fresco utilizando microscopio estereoscópico (Leica MZ6) y microscopio óptico (Olympus CX31), respectivamente. Los ascos y las ascosporas se separaron de la gleba con una cuchilla descartable y fueron montados en agua. En total, se midieron 20 ascos y al menos 30 esporas.

Análisis de suelo

Para la caracterización del suelo rizosférico se consideraron diversas propiedades morfoedáficas, entre las que se incluyen la profundidad, el pH, el contenido de carbonatos, la textura, la materia orgánica, el fósforo y la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Las determinaciones analíticas correspondientes se realizaron mediante técnicas específicas. El pH se evaluó en agua destilada, utilizando una relación suelo:agua de 1:2,6, aplicando métodos colorimétricos y potenciométricos, según lo descrito por Atkins (1989). La determinación del contenido de carbonato se llevó a cabo mediante el método vasométrico.

La textura del suelo se estableció utilizando el método densimétrico, a través del densímetro de Bouyoucos. A partir de las fracciones obtenidas se clasificaron los suelos según las clases texturales, utilizando el triángulo de textura propuesto por Etcheverhere (1976).

La materia orgánica (expresada en porcentaje) se determinó por el método de Walkley-Black (1934). El fósforo extraíble fue cuantificado utilizando el método de Bray I (Bray y Kurtz, 1945), el cual permite medir tanto el fósforo soluble en agua como el fósforo lábil. Finalmente, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se expresó en meq/100 g de suelo, a saturación con acetato de sodio (NaAc) a pH 8,2.

RESULTADOS

La identificación de las estructuras simbióticas se basó en la caracterización morfológica de las ectomicorrizas, cuyos tipos se presentan a continuación.

Pinus halepensis + *Tuber aestivum*

(Fig. 2A; Fig. 3A; Fig. 4A, B; Fig 5A)

Raíces con morfología externa simple, dicotómica y pinnada irregularmente, con extremos de forma variable, de color castaño claro. El manto es pseudoparenquimático, compacto bien desarrollado, de 10,5-13,5 μm de espesor; hifas con tabiques; la red de Hartig penetra hasta la 3-4 estratos del parénquima cortical.

Quercus ilex + *Tuber melanosporum*

(Fig. 2B; Fig. 3B; Fig. 4C; Fig 5B)

Raíces simples o con ramificación monopodial pinnada, de ápices redondeados. Color castaño oscuro. El manto es prosenquimático, compacto, desarrollado, de 4,5-6 μm de espesor; hifas tabicadas; la red de Hartig penetra hasta la 2-3 estratos del parénquima cortical.

Pinus halepensis + *Tuber borchii*

(Fig. 2D; Fig. 3D, E; Fig. 4E; Fig 5D)

Raíces con morfología simple, monopodial pinnada, y dicotómica de color castaño oscuro, con extremos redondeados a ensanchados, castaño claro. El manto es plectenquimático, compacto bien desarrollado, de 7,5-10,5 μm de espesor; hifas con tabiques; la red de Hartig penetra hasta la primera capa del parénquima cortical.

Pinus pinea + *Tuber borchii*

(Fig. 2C; Fig. 3C; Fig. 4D; Fig 5C)

Raíces cortas, simples o con ramificación monopodial pinnada, de ápices generalmente agudos. Color castaño claro. El manto es plectenquimático, compacto, bien desarrollado, de 1,5-4,5 μm de espesor; hifas tabicadas; la red de Hartig penetra hasta la 2-3 estratos del parénquima cortical.

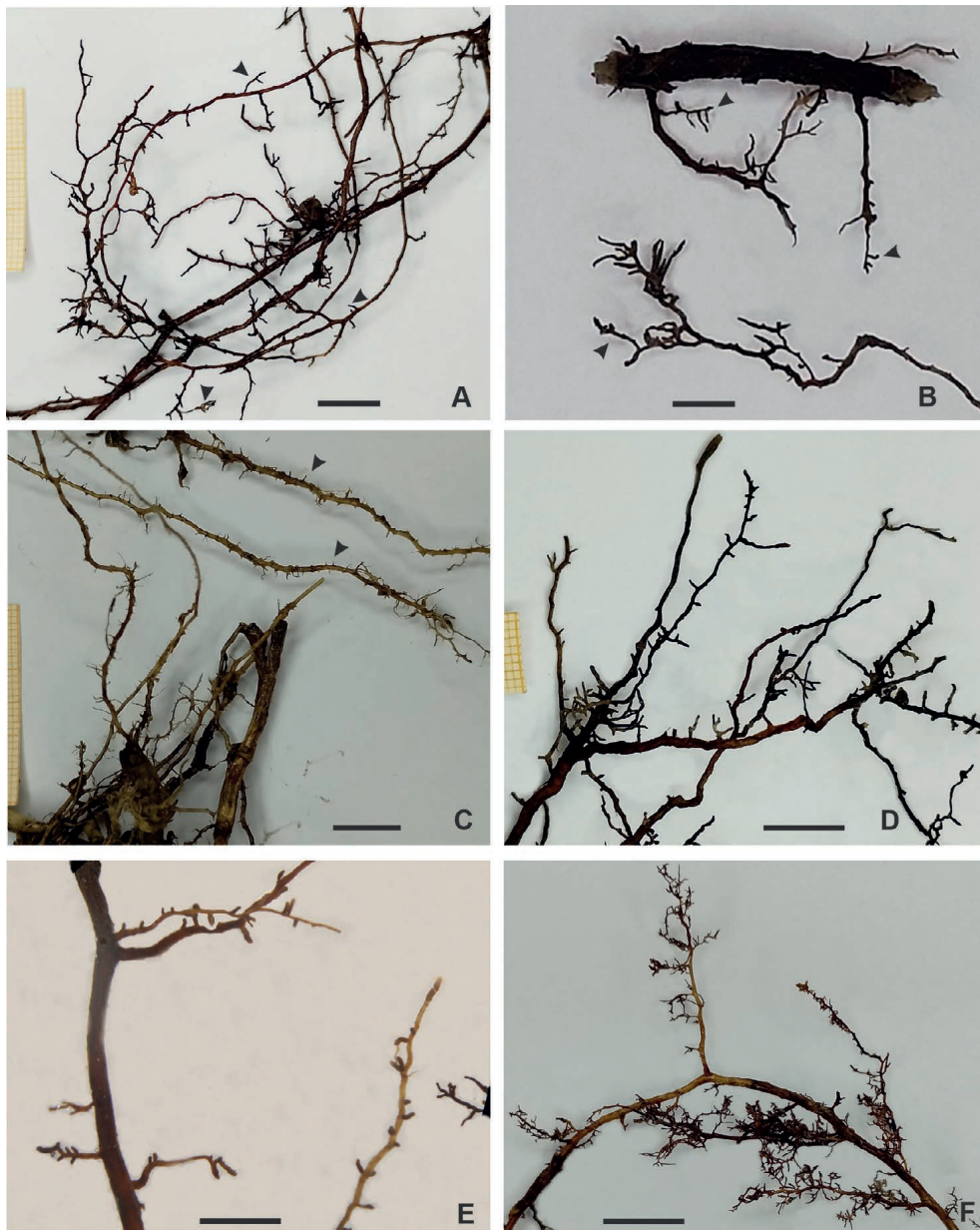


Fig. 2. Aspecto de las raíces. A) *Pinus halepensis* con *Tuber aestevium*. B) *Quercus ilex* con *T. melanosporum*. C) *P. pinea* con *T. borchii*. D) *P. halepensis* con *T. borchii*. E) *Q. robur* con *T. aestevium*. F) *Q. robur* con *T. uncinatum*. Escala: A-F = 1 cm.

Fig. 2. Appearance of roots. A) *Pinus halepensis* with *Tuber aestevium*. B) *Quercus ilex* with *T. melanosporum*. C) *P. pinea* with *T. borchii*. D) *P. halepensis* with *T. borchii*. E) *Q. robur* with *T. aestevium*. F) *Q. robur* with *T. uncinatum*. Scale bar: A-F = 1 cm.

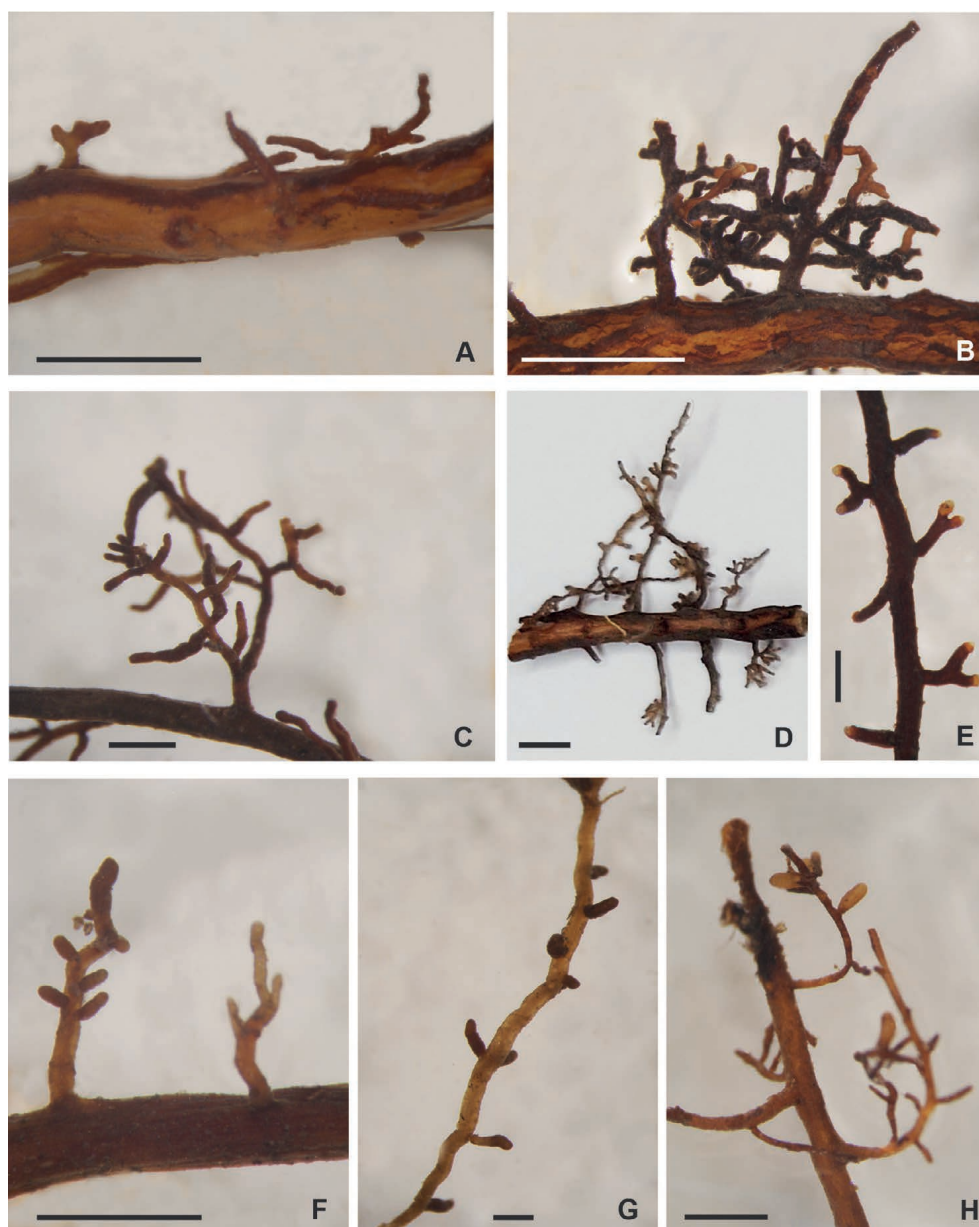


Fig. 3. Morfotipos de las raíces ectomicorrícicas. A) *Pinus halepensis* con *Tuber aestivum*. B) *Quercus ilex* con *T. melanosporum*. C) *P. pinea* con *T. borchii*. D, E) *P. halepensis* con *T. borchii*. F-G) *Q. robur* con *T. aestivum*. H) *Q. robur* con *T. uncinatum*. Escala: A-G = 10 mm. H: 5 mm.

Fig. 3. Ectomycorrhizal root morphotypes. A) *Pinus halepensis* with *Tuber aestivum*. B) *Quercus ilex* with *T. melanosporum*. C) *P. pinea* with *T. borchii*. D, E) *P. halepensis* with *T. borchii*. F-G) *Q. robur* with *T. aestivum*. H) *Q. robur* with *T. uncinatum*. Scale bar: A-G = 10 mm. H: 5 mm.

Quercus robur* + *Tuber aestivum

(Fig. 2E; Fig. 3F, G; Fig. 4F, G)

Raíces con morfología simple y monopodial piramidal, con extremos redondeados, de color castaño claro. El manto es prosenquimático, compacto bien desarrollado, de 7-10 μm de espesor; hifas tabicadas; la red de Hartig penetra la 1-2 capas del parénquima cortical.

Quercus robur* + *Tuber uncinatum

(Fig. 2F; Fig. 3H; Fig. 4H; Fig 5E)

Raíces con morfología simple y monopodial pinnada, con extremos redondeados a ensanchados, de color castaño. El manto es plectenquimático, compacto bien desarrollado, de 6-15 μm de espesor; hifas con tabiques; la red de Hartig penetra hasta la primera capa del parénquima cortical.

La asociación entre *Quercus ilex* + *Tuber melanosporum*, también evidenciaron la presencia de hifas tabicadas con fíbulas, lo que sugiere la existencia de otros hongos en la interacción.

Relevamiento de las plantaciones, diferenciación y recuento de esporomas

En todas las localidades, la inoculación con diferentes especies de *Tuber* ha demostrado ser efectiva en todas sus combinaciones. Sin embargo, hasta la fecha, Rodeo Grande ha sido la única localidad donde se ha observado la producción de esporomas de *Tuber*. Este sitio comenzó su plantación con una hectárea, luego amplió a tres hectáreas y, actualmente, cuenta con un total de 13 hectáreas, cultivando diversas especies arbóreas y especies de *Tuber*. En Rodeo Grande, en el año 2016, se logró la primera cosecha significativa: la combinación de *Pinus halepensis* inoculado con *Tuber borchii* produjo un total de 20 esporomas, cada uno de aproximadamente 50 gramos. Sin embargo, a finales de 2017 no se obtuvieron esporomas de *T. borchii* por la pérdida de los ejemplares de *P. halepensis*, debido al exceso de humedad en los suelos, provocado por el fenómeno de “El Niño”, que ese año generó precipitaciones intensas y persistentes (<https://www.unsta.edu.ar/el-fenomeno-el-nino-es-uno-de-los-generadores-de-las-precipitaciones-en-tucuman/>). Posteriormente, en 2019 y 2020, se encontraron esporomas de *Tuber* en las combinaciones *Quercus ilex* + *Tuber melanosporum* y *Quercus robur* + *Tuber uncinatum*.

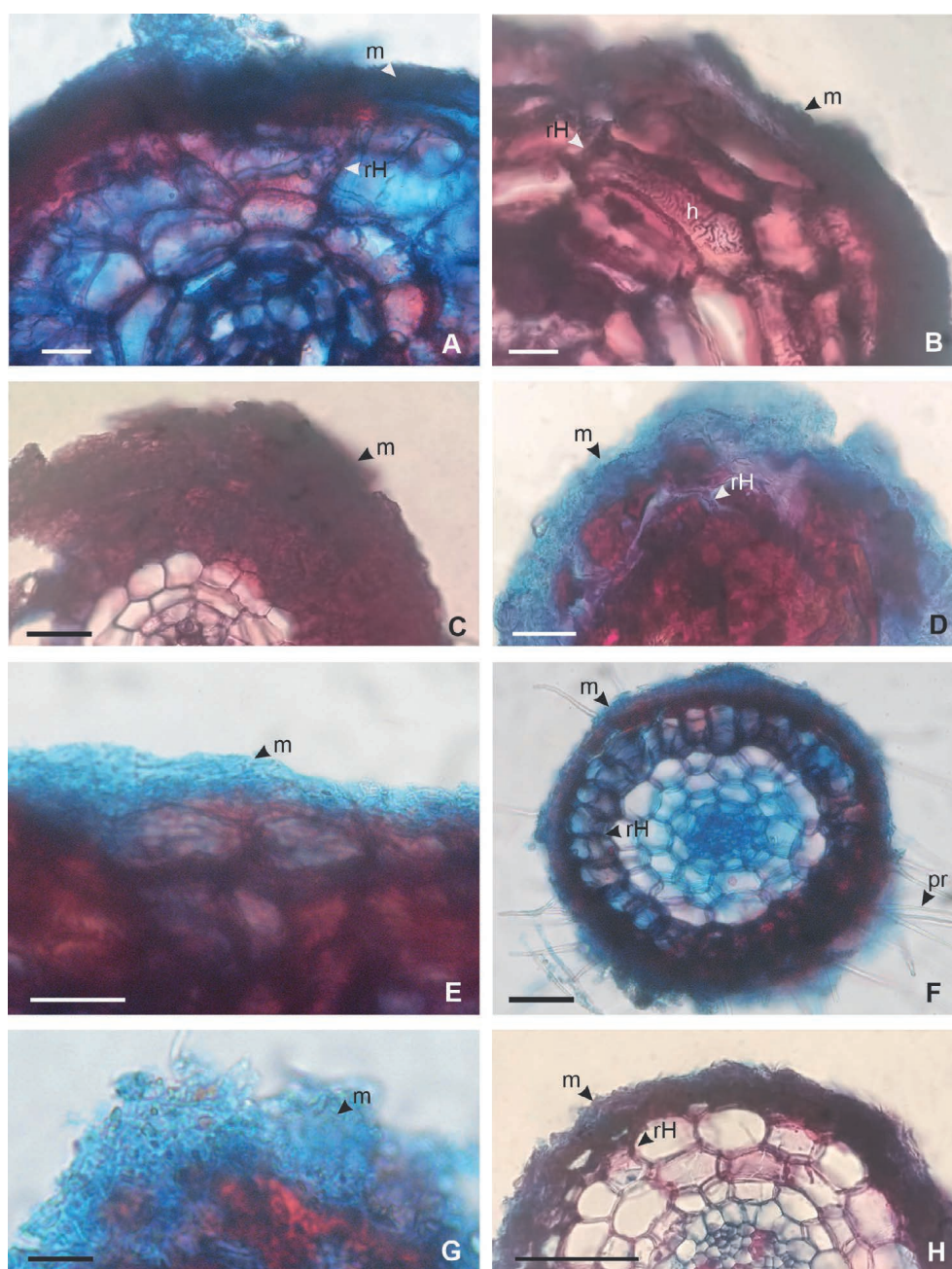


Fig. 4. Cortes transversales de raíces con ectomicorrizas (técnica “mano alzada”). A, B) *Pinus halepensis* con *Tuber aestevium*. C) *Quercus ilex* con *T. melanosporum*. D) *P. pinea* con *T. borchii*. E) *P. halepensis* con *T. borchii*. F, G) *Q. robur* con *T. aestevium*. H) *Q. robur* con *T. uncinatum*. Referencias: h: hifas, m: manto, pr: pelos radicales, rH: red de Hartig. Escala: A, B, E, F, H = 20 µm. C, D, G = 5 µm.

Fig. 4. Cross-sections of roots with ectomycorrhizae (“free-hand” technique). A, B) *Pinus halepensis* with *Tuber aestevium*. C) *Quercus ilex* with *T. melanosporum*. D) *P. pinea* with *T. borchii*. E) *P. halepensis* with *T. borchii*. F, G) *Q. robur* with *T. aestevium*. H) *Q. robur* with *T. uncinatum*. Reference: h: hifae, m: mantle, pr: root hairs, rH: Hartig net. Scale bar: A, B, E, F, H = 20 µm. C, D, G = 5 µm.

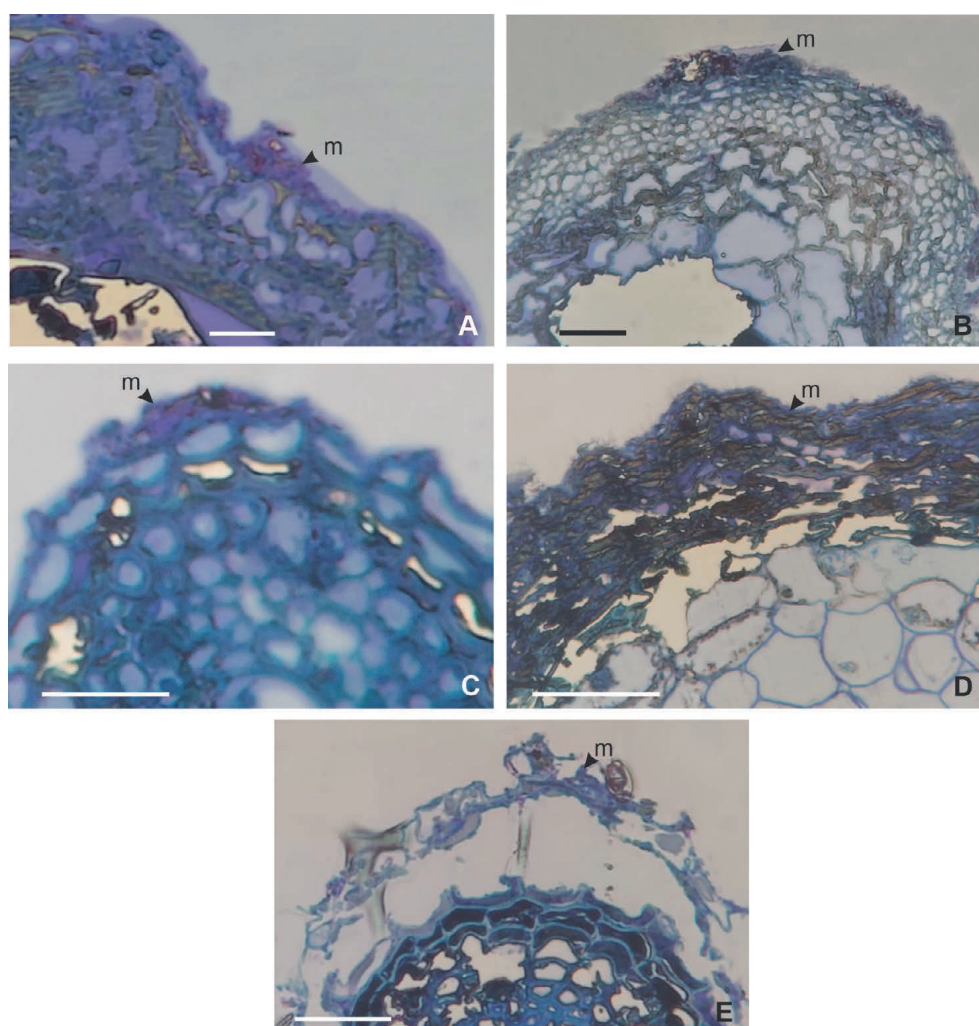


Fig. 5. Cortes transversales de raíces con ectomicorrizas (ultrafinos). A) *Pinus halepensis* con *Tuber aestivum*. B) *Quercus ilex* con *T. melanosporum*. C) *P. pinea* con *T. borchii*. D) *P. halepensis* con *T. borchii*. E) *Q. robur* con *T. uncinatum*. Referencia: m: manto. Escala: A, D, E = 30 μm . B, C = 10 μm .

Fig. 5. Cross-sections of roots with ectomycorrhizae (ultrafine). A) *Pinus halepensis* with *Tuber aestivum*. B) *Quercus ilex* with *T. melanosporum*. C) *P. pinea* with *T. borchii*. D) *P. halepensis* with *T. borchii*. E) *Q. robur* with *T. uncinatum*. Reference: m: mantle. Scale bar: A, D, E = 30 μm . B, C = 10 μm .

Caracterización de los esporomas de *Tuber uncinatum* diferenciados en asociación a *Quercus robur*.— Se describieron los esporomas de *Tuber uncinatum*, diferenciados en el 2024 en los ejemplares de *Quercus robur* implantados en Rodeo Grande (Fig. 6):

Ascoma hipógeo, 1-4 cm de diám., subgloboso a irregular, superficie castaño oscuro a negro, fuertemente verrugoso. Peridio de 50–100 μm de grosor. Verrugas de 2–5 mm de ancho en la base, piramidales, de 4–6 caras, con fisuras verticales. Gleba carnosa, con venas finas, meandriformes, blanco-ocre a oscuro, dependiendo del estado de madurez. Ascospores 70–85 x 57–67,5 μm , globosos a subglobosos, algunos irregulares, de paredes delgadas,

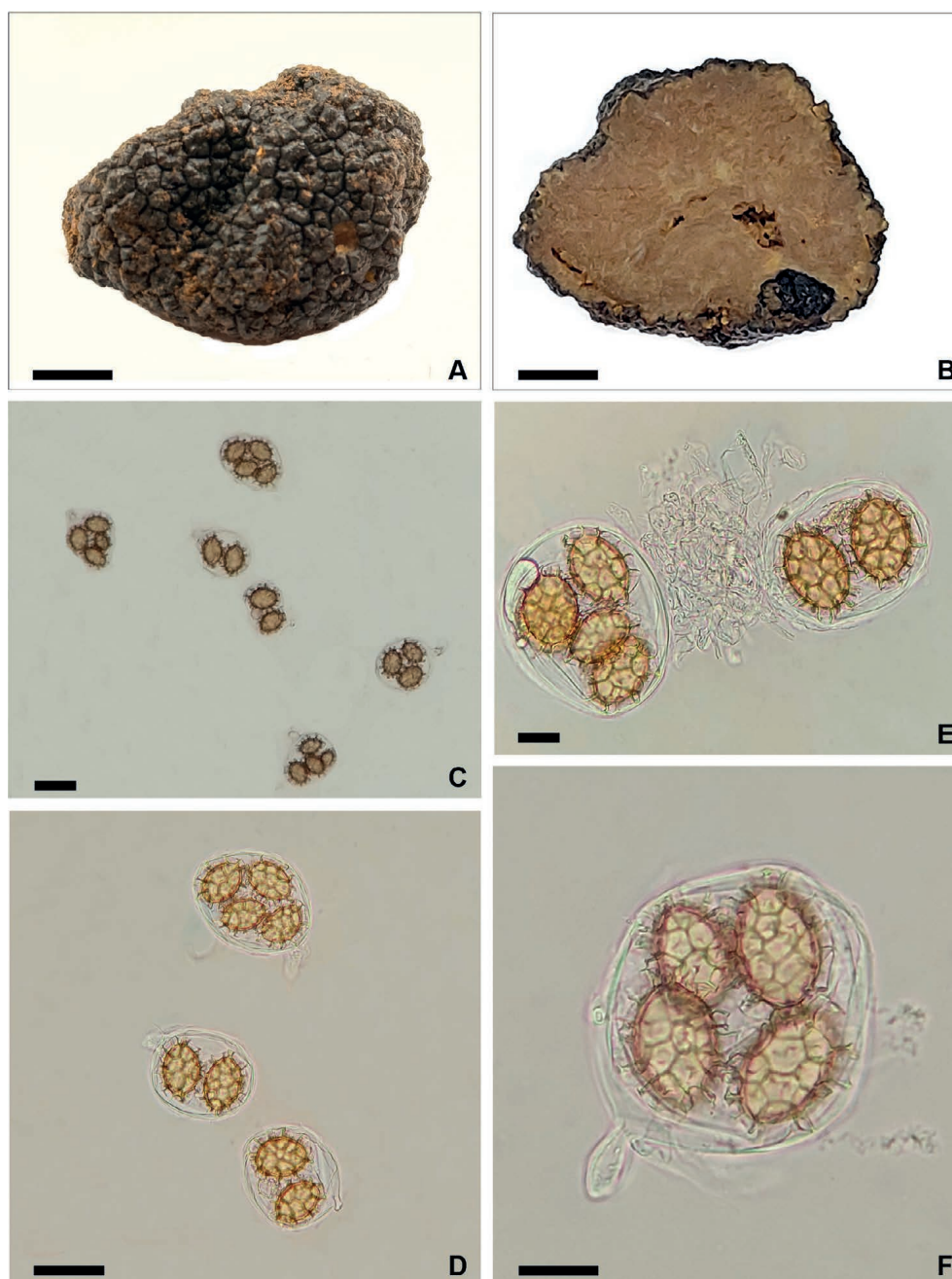


Fig. 6. *Tuber uncinatum*. A) Ascoma, vista externa. B) Ascoma en sección transversal con tejido glebal. C-D) Ascos con 2-4 esporas. E) Ascos con esporas. F) Asco, detalle. Escala: A, B = 10 mm. C, D, E = 50 μ m. F = 20 μ m.

Fig. 6. *Tuber uncinatum*. A) Ascomata external view. B) Ascomata in cross-section with gleba tissue. C-D) Asci with 2-4 spores. E) Asci with spores. F) Ascus, detail. Scale bar: A, B = 10 mm. C, D, E = 50 μ m. F = 20 μ m.

pedicelos cortos a veces alargados, hialinos, 2–4 (–6) esporas. Ascosporas 27,5–45 x 22,5–32,5 μm , subglobosas a elipsoides, ornamentación reticulada con areolas, hialinas cuando jóvenes, castaño claro a oscuro en la madurez.

Sitios de plantación forestal y análisis del suelo rizosférico.— Los sitios seleccionados para la instalación y evaluación de las truferas fueron identificados previamente por los expertos (Dr. Mario Honrrubia de la Universidad de Murcia, España, y el Ing. Forestal Gustavo Cortés, titular de la Dirección de Producción Forestal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina), como áreas con alto potencial para el cultivo de especies de trufas. Rodeo Grande, Benjamín Paz y Encalilla originalmente se encontraban cubiertos por pastura; en Villa Padre Monti, la vegetación era propia del monte, y en Tañi del Valle, se dedicaba al cultivo de papa.

En la Tabla 2 se detalla el análisis granulométrico y físico-químico realizado en los suelos procedentes de diferentes localidades de la provincia de Tucumán, donde se encuentran las plantaciones de *Pinus* spp. y *Quercus* spp.

En cuanto a la granulometría, se observó que los suelos de Tañi del Valle y Encalilla presentan una textura arenoso-franca; los de Rodeo Grande y Benjamín Paz, una textura franco-limosa; mientras que Villa Padre Monti muestra una textura franco-arcillosa.

El análisis físico-químico reveló que las localidades de Tañi del Valle y Rodeo Grande presentaron los valores de pH más bajos, por lo que fue necesario aplicar encalado, previo a la implantación del cultivo, para favorecer el crecimiento del hongo. En contraste, en Benjamín Paz, Villa Padre Monti y Encalilla se registraron valores de pH superiores a 7,5. Respecto al contenido de carbonato de calcio (Ca CO_3), Villa Padre Monti presentó el porcentaje más alto. En cuanto a la materia orgánica, fue mayor en Villa Padre Monti y Rodeo Grande, mientras que Encalilla presentó el menor porcentaje. El contenido de fósforo presente en el suelo tiene influencia directa con el grado de asociación micorrícica y en este sentido los resultados muestran que en todos los sitios analizados fue inferior a 20 ppm, siendo Encalilla la localidad con el mayor valor y Villa Padre Monti la que presentó el menor. La capacidad de intercambio catiónico fue mayor en Villa Padre Monti (20,4 me/100g); mientras que, los valores más bajo fueron en Encalilla.

Tabla 2. Análisis granulométrico y físico-químico de suelos rizosféricos procedentes de diferentes localidades de la provincia de Tucumán, donde se encuentran las plantaciones de *Pinus* spp. y *Quercus* spp.

Table 2. Granulometric and physicochemical analyses of rhizospheric soils from different locations in the Province of Tucumán, where *Pinus* spp. and *Quercus* spp. crops were established.

Localidad	Profundidad (cm)	pH (agua 1: 2,6)	Ca CO ₃ % Vasometría	Textura Capilaridad	Materia Orgánica, % Walkley-Black (1934)	Fósforo, ppm Bray y Kurtz (1945)	Capacidad de intercambio catiónico me/100g
Tafí del Valle	0-30	6,0	-	Arenoso franco	1,7	13,0	9,2
Rodeo Grande	0-30	6,1	-	Franco limoso	3,0	16,7	11,2
Benjamín Paz	0-30	7,5	0,4	Franco limoso	2,5	17,3	16,0
V ^a Padre Monti	0-30	7,9	6,7	Franco arcilloso	3,8	7,0	20,4
Encalilla	0-30	8,1	0,6	Arenoso franco	0,7	20,6	8,8

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este estudio preliminar aporta información valiosa sobre la morfología de las raíces diferenciadas en el ensayo, incluyendo la descripción, ilustración y análisis anatómico de las raíces pertenecientes a seis combinaciones específicas entre las especies arbóreas y hongos simbióticos utilizados. Cabe destacar que la simbiosis, en la planta huésped, se evidenció en todas las plantaciones analizadas después de los 4 años de su implantación. La caracterización detallada de las ectomicorrizas analizadas y sus tipos morfológicos contribuye a la vez al conocimiento de las interacciones planta-hongo bajo las condiciones donde se llevó a cabo el ensayo, lo que resulta esencial para la comprensión de los procesos ecológicos que se pueden explotar en ambientes variados como los correspondientes a unos con antecedentes de pasturas y cultivos de papa o prístinos propios del monte. En este sentido, los resultados obtenidos pueden ser utilizados como referencia en estudios de biodiversidad, conservación y manejo sostenible en ecosistemas forestales desarrollados en ambientes diversos.

En la provincia de Tucumán las truferas se implantaron en el año 2012. De las cinco localidades en donde se realizaron los ensayos, Rodeo Grande inició la producción de trufas en el año 2016. La combinación *Pinus halepensis* inoculado con *Tuber borchii* produjo 20 esporomas de aproximadamente 50 gramos cada uno, siendo menor el tiempo requerido para la diferenciación de los mismos (Leonardi *et al.*, 2021) quienes reportaron que la producción comienza generalmente alrededor de los 10 años. Este hecho podría estar relacionado con la implementación de un manejo agroforestal más eficiente, lo que favorece el establecimiento exitoso de la simbiosis micorrícica, y también responde a los principios de sostenibilidad y desarrollo rural señalados por diversos autores quienes destacan el potencial de producción para promover la reforestación y dinamizar economías locales en territorios con recursos limitados (Boa, 2004; Sáez y De Miguel, 2008; Reyna, 2012; Reyna y García-Barreda, 2014).

En lo que respecta al análisis de suelos, se considera esencial un pH superior a 8, un contenido de materia orgánica mayor al 3 %, niveles de fósforo inferiores a 20 ppm y una precipitación anual de entre 700 y 1.000 milímetros concentrada en primavera y verano, para asegurar condiciones óptimas para el establecimiento de la simbiosis, la colonización del hongo en la raíz y la posterior diferenciación de esporomas (InfoCampo, 2025b). No obstante, la respuesta productiva puede diferir según la especie de *Tuber*: por ejemplo, *T. melanosporum* tiende a desarrollarse mejor en suelos calizos con pH alto, mientras que *T. aestivum* puede adaptarse a una gama más amplia de condiciones edáficas, incluyendo suelos con pH ligeramente más bajo y mayor contenido de materia orgánica (Zambonelli et al., 2015).

Cabe destacar que el contenido de fósforo disponible en el suelo es una de las condiciones necesarias por la cual una especie vegetal puede depender de la asociación con hongos micorrícicos para subsistir; ese valor se estima por debajo de 20 ppm de fósforo (Smith y Read, 2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (3rd ed.). Academic Press.). Sin embargo, cada especie vegetal puede tener un nivel óptimo de fósforo soluble a partir del cual se estimularía fuertemente la colonización del hongo simbiote (Hirata et al., 1988). La materia orgánica no sólo afecta el intercambio aniónico, también interviene en la dinámica del fósforo por la formación de complejos órgano-fosfatados que son fácilmente atacables por los organismos del suelo que, al mineralizarse, contribuyen al fósforo disponible (Boschetti et al., 2003). Estas interacciones edáficas y micorrícicas también varían entre especies de árboles hospedantes, siendo más eficientes en algunas combinaciones planta-hongo que en otras, según lo evidencian estudios previos en otras regiones truferas (Hall et al., 2007).

Actualmente, en Tucumán se ha avanzado con el establecimiento de cinco truferas ubicadas en zonas de piedemonte y en valles intermontanos y de altura: Tafi del Valle, Rodeo Grande, Benjamín Paz, Villa Padre Monti y Encalilla. En todas ellas se observó a nivel morfológico la colonización fúngica en las raíces analizadas, lo que sugiere el éxito de la inoculación. Sin embargo, en la combinación *Quercus ilex* + *Tuber melanosporum*, se detectó además la presencia de hifas pertenecientes a un representante del phylum Basidiomycota, lo que sugiere la necesidad de estudios moleculares en las raíces a fin de verificar la presencia de los hongos aplicados al comienzo del ensayo. Los hongos ectomicorrícicos que coexisten en un mismo nicho del suelo pueden competir por los recursos nutricionales de las raíces de las plantas huésped o, en algunos casos, coexistir en equilibrio dinámico (Kennedy, 2010). En este contexto, es probable que, bajo condiciones naturales, las ectomicorrizas de *Tuber* se vean asociadas a otros micelios ectomicorrícicos estableciendo una simbiosis con diferentes hongos componentes (Leonardi et al., 2013). Para abordar esta cuestión, las técnicas moleculares han aclarado aspectos como la inoculación del suelo y la detección de microorganismos competidores o patógenos. Se ha descubierto que los genotipos de las micorrizas cambian con la edad de los árboles y que las especies

de *Tuber* son flexibles, adaptándose a diferentes raíces (Galappaththi *et al.*, 2025; Slavova *et al.*, 2025).

La producción forestal basada en la diferenciación de esporomas de *Tuber* demuestra un potencial de rentabilidad a mediano y largo plazo, constituyéndose como una alternativa productiva para el desarrollo económico y ecológico de la región.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos especialmente a los propietarios de las truferas, en particular al Ing. Antonio Posadas (Rodeo Grande) y al Sr. Eduardo Villagra (Benjamín Paz), por su generosa colaboración al facilitarnos los materiales necesarios para este estudio.

FINANCIACIÓN

Trabajo subsidiado por la Fundación Miguel Lillo, proyectos B-0002-1 y B-0024-1.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, R. (1986). Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon* 26: 473-492.
- Agerer, R. (1991). Characterization of ectomycorrhiza. En: Norris J.R., Read D.J. y Varma A.K. Eds. *Methods in microbiology* 23: Techniques for the study of mycorrhiza., pp. 25-73, Academic, London.
- Agerer, R. y Rambold, G. (2025). DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. www.deemy.de. (Consultada 02 de marzo de 2025).
- Atkins, P. W. (1989). *Physical chemistry* (4th ed.). Oxford University Press.
- Boa, E. (2004). Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people. Nonwood forest products Series 17. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, 147 p.
- Boschetti, N. G., Quintero, C. E., Benavidez, R. A. y Giuffrè, L. (2003). Cuantificación de las fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo en suelos de la Mesopotamia Argentina. *Ciencia del Suelo* 21: 1-8.
- Bray, R. H. y Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59 (1): 39-46.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de técnicas en histología vegetal*. Editorial Hemisferio Sur SA, Buenos Aires.

- Galappaththi, M. C. A., Dunstan, W. A., Hardy, G. E. S., et al. (2025). Advances in molecular genetics have increased knowledge of *Tuber* species' life cycle and population genetic structure, indicating ways to improve yield. *Mycorrhiza* 35: 2. <https://doi.org/10.1007/s00572-024-01177-1>
- Hall, I. R., Zambonelli, A. y Primavera, F. (2007). Edomycorrhizal fungi and their role in truffle production. Springer.
- Heslop-Harrison, Y. y Heslop-Harrison, J. (1981). The digestive gland of pinguicula: structure and cytochemistry. *Annals of Botany* 47: 293-319.
- Hirata, H., Masunaga, T. y Koiwa, H. (1988). Respose of chickpea grown on ando-soil to vesicular arbuscular mycorrhizal infection in relation to the level of phophorus application. *Soil Science and Plant Nutrition* 34: 441-449.
- Infocampo. (2025a). <https://www.infocampo.com.ar/lionel-el-messi-frances-de-las-trufas-negras-que-apuesta-por-argentina-es-un-pais-muy-prolif-ico-para-la-truficultura/>
- Infocampo. (2025b). ¿Cómo se adiestra un perro para que “coseche” trufas negras?: las claves del alimento premium que crece en Argentina. <https://www.infocampo.com.ar/como-se-adiestra-un-perro-para-que-coseche-trufas-negras-las-claves-del-alimento-premium-que-crece-en-argentina/>
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- Kennedy, P. (2010). Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future directions. *New Phytology* 187: 895-910. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03399>
- Lagos, D. A. (2025). Desarrollo y cultivo de trufas en Argentina. <https://elregionaldigital.com.ar/se-presento-el-primer-libro-sobre-trufas-en-la-argentina/>
- Leonardi, M., Iotti, M., Oddis, M., et al. (2013). Assessment of ectomycorrhizal fungal communities in the natural habitats of *Tuber magnatum* (Ascomycota, Pezizales). *Mycorrhiza* 23: 349-358. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0474-7>
- Leonardi, M., Iotti, M., Pacioni, G. R., Hall, I., Zambonelli, A. (2021). *Truffles: Biodiversity, Ecological Significances, and Biotechnological Applications*. In: Abdel-Azeem, A.M., Yadav, A.N., Yadav, N., Usmani, Z. (eds.) Industrially Important Fungi for Sustainable Development. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_4
- Quiroga, R., Morelli, G. A., de Hagen, T., Saparrat, M. C. N. (2024). *Carya illinoensis* y hongos del género *Tuber* en Argentina: un análisis bibliográfico. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 123: 1-17.

- Reyna, S. (2012). Sostenibilidad de la truficultura: aspectos ecológicos, económicos y sociales. En: Truficultura: fundamentos y técnicas. 2º Edición revisada y ampliada (Ed. Reyna S.), pp. 49-72. Ed. Mundiprensa. Madrid, España.
- Reyna, S. y García-Barreda, S. (2014). Black truffle cultivation: a global reality. *Forest Systems* 23 (2): 317-328.
- Sáez, R. y De Miguel, A. M. (2008). La trufa. Guía práctica de truficultura. ITGA, Pamplona, España, 132 p.
- Slavova, M., Leonardi, M., Iotti, M., Paz-Conde, A., Assyov, B. y Pacioni, G. (2025). Phylogenetic and morphological evidence supports the recently described *Tuber thracicum*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* 159 (2): 369-377. <https://doi.org/10.1080/11263504.2025.2472748>
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis (3rd ed.). Academic Press.
- Walkley, A. y Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37 (1): 29-38.
- Zambonelli, A., Iotti, M. y Murat, C. (2015). True Truffle (*Tuber* spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry. Springer.
- Zambonelli, A., Leonardi, P., Lotti, M. y Hall I. (2017). Ecological and genetic advances in the cultivation of *Tuber* spp. *Revista Fitotecnica Mexicana* 40 (4): 371-377.



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

A Study of Arbuscular Mycorrhizal Association in Three Species of *Asterella* (Aytoniaceae, Marchantiophyta) from Western Himalayan Region, India

Estudio de la asociación micorrízica arbuscular en tres especies de *Asterella* (Aytoniaceae, Marchantiophyta) de la región del Himalaya occidental, India

Pratibha Kumari^{1*} ; Priti Giri² ; Prem Lal Uniyal² 

¹ Department of Botany, Daulat Ram College, University of Delhi, 110007, Delhi, India.

² Department of Botany, Faculty of Sciences, University of Delhi, 110007, Delhi, India.

*Corresponding author: <mh.pratibha@gmail.com>

Abstract

Most plant species including bryophytes and pteridophytes, develop mutualistic connections with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi that facilitate greater water and nutrient uptake in plants and provide enhanced resistance against various biotic and abiotic stresses. The present study explores the diversity of AM associated with the thalloid liverwort *Asterella* sp. Three species of *Asterella* (*A. khasyana*, *A. blumeana*, and *A. wallichiana*) were studied to determine their association with AM fungi. The fungal association present in both types of rhizoids (smooth-walled and tuberculate) shows a higher degree of colonization in the smooth walled rhizoids as compared to the tuberculate rhizoids, validating the differential role of absorption performed by both types of rhizoids. *A. khasyana* and *A. blumeana* show the presence of both septate and aseptate fungal hyphae in their rhizoids, confirming the association of more than one fungus. Apart from rhizoids, the storage and midrib regions of the thallus show intense fungal colonization. Various AM structures, such as arbuscules and vesicles, are also observed in both

► Ref. bibliográfica: Kumari, P.; Giri, P.; Uniyal, P. L. 2025. A Study of Arbuscular Mycorrhizal Association in Three Species of *Asterella* (Aytoniaceae, Marchantiophyta) from Western Himalayan Region, India. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 177-192. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2184>

► Recibido: 13 de diciembre 2024 – Aceptado: 20 de mayo 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

rhizoids and the thallus. Spores of nine fungal species belonging to two genera, *Glomus* and *Gigaspora* were isolated from the rhizosphere soil of *A. Khasyana* and *A. wallichiana*.

Keywords: AM; arbuscules; mycorrhizae; liverworts; *Asterella*; rhizosphere; Glomeromycotina.

Resumen

La mayoría de las especies de plantas, incluidas las briófitas y las pteridofitas, desarrollan conexiones mutualistas con hongos micorrízicos arbusculares (MA) que facilitan una mayor absorción de agua y nutrientes en las plantas y proporcionan una mayor resistencia ante diversos estreses bióticos y abióticos. El presente estudio explora la diversidad de micorizas arbusculares asociadas con las hepáticas taloides *Asterella* sp. Se estudiaron tres especies de *Asterella* (*A. khasyana*, *A. blumeana*, *A. wallichiana*) para determinar la asociación con MA. Asociación fúngica presente en ambos tipos de rizoides (de paredes lisas y tuberculados), se encuentra un alto grado de colonización en los rizoides de paredes lisas en comparación con los rizoides tuberculados, lo que valida el papel diferencial de absorción realizado por ambos tipos de rizoides. *A. Khasyana* y *A. blumeana* muestran la presencia de hifas fúngicas tanto septadas como aseptadas en rizoides, lo que confirma la asociación de más de un hongo. Además de los rizoides, la región de almacenamiento y de la nervadura central del talo muestra una intensa colonización fúngica. También se observan varias estructuras de MA como arbuscúlos y vesículas tanto en rizoides como en talo. Se aislaron esporas de nueve especies de hongos pertenecientes a dos géneros *Glomus* y *Gigaspora* del suelo de la rizosfera de *A. Khasyana* y *A. wallichiana*.

Palabras clave: AM; arbuscúlos; micorizas; hepáticas; *Asterella*; rizósfera; Glomeromycotina.

INTRODUCTION

Bryophytes, the group of earliest land plants, invaded the terrestrial system and played a significant role in the habitat establishment. They constitute a significant component of some ecosystem eg. forest ecosystem. Microorganisms form intricate associations with bryophytes and play a pivotal role in establishment, promoting plant growth and facilitating nutrient cycling, contributing to the ecosystem functioning (Rousk *et al.*, 2017; Xiao and Bowker, 2020; Glime, 2020). Mycorrhiza is known to be the key innovation of the terrestrial plant system and played a very significant role in the establishment and survival of plants under various abiotic conditions. (Field and Pressel, 2018). This mutualistic association leads to bi-directional exchange of photosynthates and minerals. Photosynthetically fixed host plant carbon and lipids (van der Heijden *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2017) are utilized by

fungal symbiont and in return fungi provide host plant with phosphorus and nitrogen (Leake and Read, 2016; van der Heijden *et al.*, 2017).

Simple morphological structure of bryophytes with weak nutrient absorbing rhizoids facilitate symbiotic association with soil fungi to acquire water and nutrition from soil. AM association is frequently found in thalloid bryophytes such as liverworts and hornworts but lacks in mosses is likely due to their unique multicellular rhizoids removing the need for symbiosis (Pressel *et al.*, 2010; Field *et al.*, 2015). In bryophytes due to its lack of true root system, true mycorrhizal association is not considered by many workers (Humphreys *et al.*, 2010), however many studies confirmed mutualistic exchange of nutrient-for-carbon in early diverging liverworts (Marchantiopsida, Haplomitriopsida, and Jungermanniopsida) with fungi belongs to Glomeromycotina, Mucoromycotina and Ascomycota, indicating the possible mycorrhizal-like association (Field *et al.*, 2012, 2015, 2016; Kowal *et al.*, 2018). Liverworts are frequently found associated with ancient AM Fungi (AMF) of Glomeromycotina (Rimington *et al.* 2018).

Asterella, a thalloid liverwort belonging to the family Aytoniaceae, with 48 species shows world-wide distribution (Bischler, 1998; Long, 2006). *Asterella* species are found to grow mainly in the exposed and nutrient poor sites. Many species of *Asterella* such as *A. australis*, *A. bachmannii*, *A. bolanderi*, *A. chilensis*, *A. californica*, *A. khasyana*, *A. musicola*, *A. pringlei*, *A. tenera* and *A. wilmsii* are found to be associated with fungi specifically of Mucoromycotina/Glomeromycotina or both (Ligrone *et al.* 2007; Rimington *et al.*, 2020; Cottet and Messuti 2022).

A handful of information is available about fungal associated early land plants and their nutritional mutualisms. Himalaya is home to many diverse bryophytes, however a scanty information is available about the bryophyte-fungal association (Kumari *et al.*, 2015; Sharma and Langer 2017; Verma *et al.*, 2022). The fungal association with bryophyte can provide unique opportunities to unravel the origin and evolution of land plants on terrestrial systems. The present study explores the extent of occurrence of association of AMF with three species of *Asterella* (*A. blumeana*, *A. khasyana*, and *A. Wallichiana*).

MATERIALS AND METHODS

Collection of material

The samples of the *Asterella blumeana*, *A. khasyana*, and *A. Wallichiana*, growing on exposed and dry soil were collected from Pithoragarh (29.4° to 30.3° N and 80° to 81° E, Western Himalayan region, India) during the month of April. The site is located at an altitude of 1645 m and the average air temperature was around 25°C. The collection site has sub-tropical type of vegetation and collection was done from the exposed dry soil from the road sides.

Clearing and staining of samples

To observe associated AM structures, the thalli and rhizoids were washed several times with tap water to remove all unwanted debris. Clearing was done by using 0.01% KOH for 24 hours. After clearing, thallus and rhizoids were stained with 0.05% Trypan Blue stain (25% lactic acid, 25% phenol, 25% distilled water and a pinch of Trypan blue stain). Stained whole rhizoid and transverse section of thallus were mounted in glycerine and observed for AM structures (fungal hyphae, arbuscules and vesicles) and photographed under the microscope (Olympus CX2li).

Isolation of AM fungal spores

AM fungal spores were isolated by a technique standardized by Gerdemann and Nicolson (1963). 5g of air dried rhizosphere soil was taken in a beaker and a suspension was made in 500 ml of water. This suspension was then stirred for a few minutes, following which the coarse particles were allowed to settle down. The soil solution was passed through the sieves of mesh numbers 50, 200 and 300 micron placed in decreasing mesh size. The contents of each mesh were washed and suspended in water in a separate beaker. Spores being lighter floated on the water surface and have a strong tendency to stick to the glass surface. Therefore, the spore suspension was gradually stirred and then filtered through Whatman paper No.1. The fungal spores form a distinct ring on the filter paper. The spore ring was then observed under a stereo microscope. AM spores are easily distinguished from the soil particles by their characteristic hyaline to coloured subtending hyphae and the wall. These spores were picked up and mounted in Hoyer's medium (distilled water 50 ml, gum Arabic 30 gm, chloral hydrate 200 gm and glycerol 20 ml) and observed under microscope. Morphological identification of the fungal spores based on spore colour, spore size, wall layers and fungal hyphal attachments was done by using suitable references e.g. Schenck *et al.* (1990) and INVAM (2025).

Quantification of mycorrhizal association

The colonization of AM was determined by the presence of arbuscules, inter/intracellular hyphae and vesicles within rhizoids and colonization of fungus in the thallus. The degree of AM colonization was determined by method given by Nicolson (1955) as follows:

$$\text{Degree of AM colonization} = \frac{\text{No. of rhizoids colonized by mycorrhiza} \times 100}{\text{Total no. of rhizoids scanned}}$$

It was classified into five groups as follows (Kormanic and McGraw, 1982):

- Class I: up to 5%
- Class II: 6-25%
- Class III: 26-50%
- Class IV: 51-75%
- Class V: 76-100%

RESULT

Characteristics of fungal hyphae associated with different species of *Asterella*

Asterella blumeana (Nees) Kachroo

The AM association was present in rhizoids as well as in the thallus. Both types of rhizoids (smooth walled and tuberculate rhizoids) were found to have the AM (Fig. 1J, K). The degree of colonization of fungal hyphae in rhizoids was found to be high (76-100%) (Table 1) and specifically found higher in smooth walled rhizoids than that in tuberculate rhizoids. Two types of fungal hyphae (thin and thick) were recognized which were branched in some places. Thin hyphae were mainly present in tuberculate rhizoids. Both types, septate and aseptate hyphae were found with usually one or two hyphae strands across the length of the rhizoids. Rhizoids showed the mycelium invasion throughout the entire length. Vesicles are also formed within the rhizoids, which were darkly stained and cylindrical in shape (Fig. 1J). Fungal hyphae observed to be present throughout the thallus (Fig. 1D). Cells of the storage zone of the thallus showed extensive fungal hyphae. Vesicles of different shapes (round, cylindrical and elongated) were also observed in rhizoids and thallus. Lightly stained round vesicles were also observed in the thallus (Fig. 1G).

Asterella khasyana (Griff.) Pande, K.P. Srivat. et Sultan Khan.

The AM association was present in rhizoids as well as in thallus. Fungal hyphae were mainly present in smooth walled rhizoids and two to three fungal hyphae found running together, showing the intense invasion throughout the rhizoid. Rhizoids showed both thick and thin hyphae and some were branched (Fig. 1L, M). Hyphae showed formation of H-connection. The degree of colonization of hyphae in rhizoids was quite high (51- 75%) (Table 1). Hyphae showed differential staining with some darkly stained and some lightly stained (Fig. 1L). The hyphae were found to be aseptate type only. Cylindrical vesicles were observed in the rhizoids (Fig. 1M). Storage zone and midrib region of the thallus was also found to be associated with intense fungal invasion (Fig. E). Arbuscule-like structures were also observed

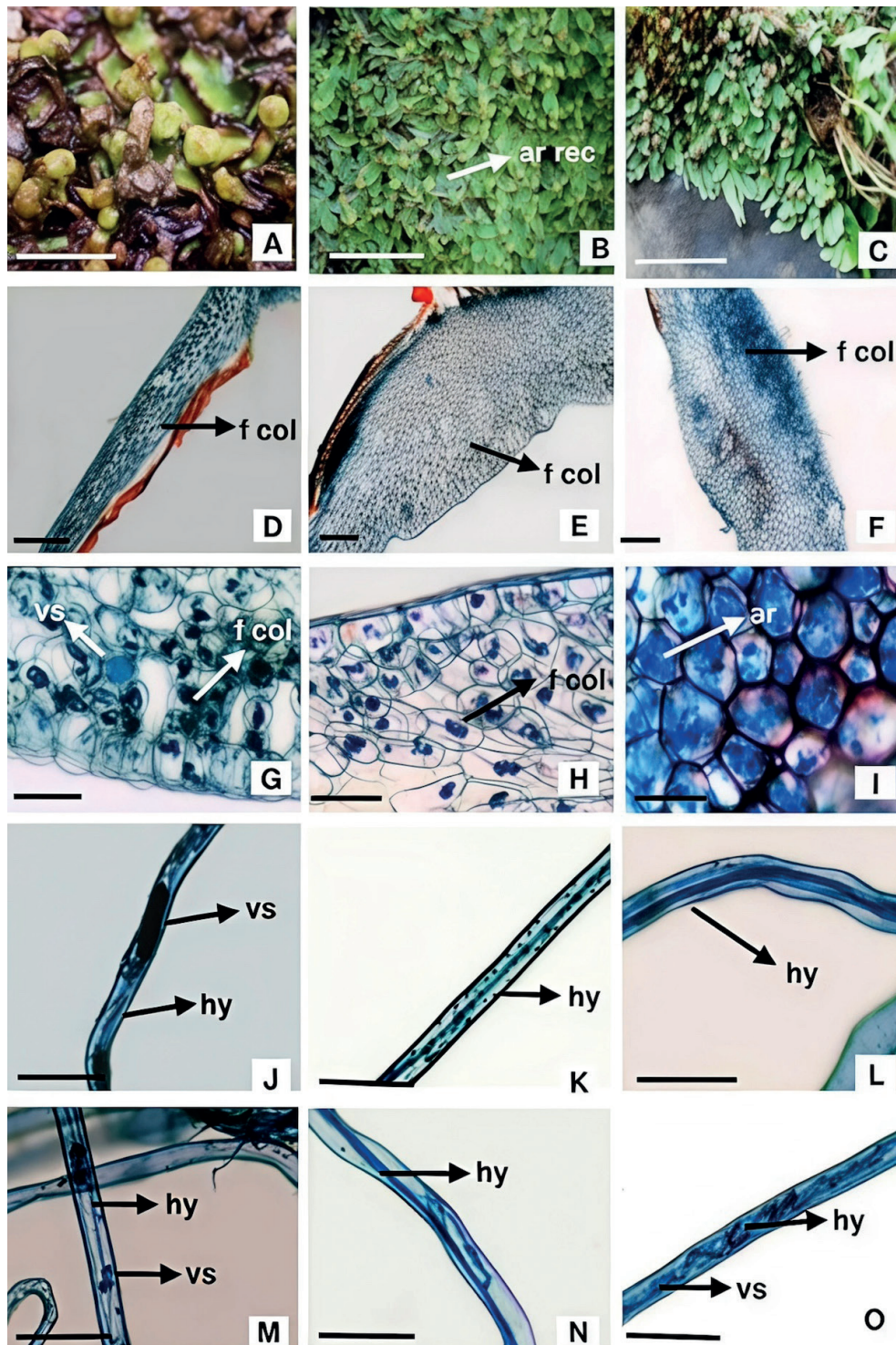


Fig. 1. A) Thallus of *A. blumeana* growing on dry soil. B) Thalli of *A. khasyana* growing on dry soil, showing the archegonial receptacle. C) Thallus of *A. wallichiana* growing on an exposed rock. D) Vertical section (V:S.) of the *A. blumeana* thallus showing fungal colonization (f col) in all zones. E) V.S. of the *A. khasyana* thallus showing greater fungal association (f end) in the storage zone, only a few cells show fungal association (f col). F) V.S. of the *A. wallichiana* thallus showing fungal association in the storage zone, with intense hyphal invasion (f col) observed in the upper region of the thallus. G) Enlarged view of the *A. blumeana* thallus, with cells showing fungal endophyte (f col). H) Enlarged section of the *A. khasyana* storage zone showing fungal colonization (f col). I) Section ➤

of the *A. wallichiana* thallus midrib showing arbuscules (ar). J) Smooth-walled rhizoid of *A. blumeana* showing cylindrical vesicles. K) Fungal hyphae (hy) within a tuberculate rhizoid of *A. blumeana*. L) Rhizoid showing parallel running hyphae (hy) in *A. khasyana*. M) Rhizoid of *A. khasyana* showing disintegrating vesicles (vs). N) Rhizoid of *A. wallichiana* showing Y-shaped connection formed by fungal hyphae (hy). O) Rhizoid of *A. wallichiana* showing hyphae (hy) and an oval vesicle (vs). Scale bars: Figs. A, B, and C = 3mm; D, E, and F = 50µm; G, H and I = 25µm; J-O = 100µm.

Fig. 1. A) Talo de *Asterella. blumeana* creciendo en suelo seco. B) Talos de *A. khasyana* creciendo en suelo seco mostrando el receptáculo arquegonial. C) Talo de *A. wallichiana* creciendo en roca expuesta. D) Corte vertical (V.S.) del talo de *A. blumeana* mostrando colonización fúngica (f col) en todas las zonas. E) Corte vertical (V.S.) del talo de *A. khasyana* mostrando mayor asociación fúngica (f end) en la zona de almacenamiento, solo unas pocas células muestran asociación fúngica (f col). F) Corte vertical (V.S.) del talo de *A. wallichiana* mostrando asociación fúngica en la zona de almacenamiento del talo, con una intensa invasión hifal (f col) observada en la zona superior del talo. G) Vista ampliada del talo de *A. blumeana*, células mostrando endófito fúngico (f col). H) Sección ampliada de la zona de almacenamiento de *A. khasyana* mostrando colonización fúngica (f col). I) Sección del nervio medio del talo de *A. wallichiana* mostrando arbusculos (ar). J) Rizoide de paredes lisas de *A. blumeana* que muestran vesículas cilíndricas. K) Hifas fúngicas (hy) dentro del rizoide tuberculado de *A. Blumeana*. L) Rizoide que muestra hifas paralelas (hy) en *A. Khasyana*. M) rizoide de *A. khasyana* que muestra vesículas desintegrables (vs). N) Rizoide de *A. wallichiana* que muestra conexión Y formada por hifas fúngicas (hy). O) rizoide de *A. wallichiana* que muestra hifas (hy) y vesícula ovalada (vs). Barras de escala: Fig. A, B y C = 3 mm; D, E y F = 50µm; G, H e I = 25 µm; J-O = 100 µm.

in the cells of the storage zone (Fig. 1H). Fungal spores of *Glomus citricola*, *G. fulvum*, *G. fasciculatum*, *G. macrocarpum* and *G. microcarpum* were isolated from rhizosphere soil of *A. khasyana* (Fig 2A, B,C,D,F,H).

Asterella wallichiana St.

The fungal hyphae were found in smooth walled rhizoids (Fig. 1N,O). The degree of colonization of fungal hyphae in rhizoids was estimated to be 51-75% (Table 1). The thick-walled and branched aseptate hyphae were found in rhizoids. Few darkly stained oval and cylindrical vesicles (Fig. 1O) and Y-connection of hyphae (Fig. 1N) were also recorded. In the thalli the hyphae were restricted to the midrib region, which showed many arbuscule-like structures (Fig. 1F, I). Fungal spores of eight species *Gigaspora rosea*, *Glomus citricola*, *G. fasciculatum*, *G. geospermum*, *G. macrocarpum*, *G. maculosum*, *G. microcarpum* and *G. monosporum* were isolated from rhizosphere soil of *A. wallichiana*.

Characteristics of fungal spores associated with different species of *Asterella*

Gigaspora rosea Nicolson & Schenck

Isolated from the rhizosphere soil of *A. wallichiana*. The colour observed from pale yellow to brown and shape varies from globose to subglobose

Table 1. List of three *Asterella* species and the fungal structures formed by arbuscular mycorrhizal fungi.**Tabla 1.** Lista de tres especies de *Asterella* y estructuras fúngicas formadas por hongos micorrícicos arbusculares.

Species N°	Taxa	Habitat	Degree of colonization	Presence of Hyphae in Rhizoids		Hyphae location	Characteristics of Hypae	Arbus-cules	Shape of vesicles	Fungal spore isolated from Rhizosphere soil
				SW	TUB					
1	<i>Asterella blumeana</i>	Dry soil	V	+	+	Rhizoids, thallus Rhizoids, thallus	Thick, thin, branched, aseptate, septate	+	Round, cylindrical, elongated	NR
2	<i>Asterella khasyana</i>	Dry soil	IV	+	-	Rhizoids, thallus	Thick, branched, septate, aseptate	+	Cylindrical	<i>Glomus citricola</i> , <i>G. fulvum</i> , <i>G. fasciculatum</i> , <i>G. macrocarpum</i> and <i>G. microcarpum</i>
3	<i>Asterella wallichiana</i>	On rocks, dry exposed places	IV	+	-		Thick, branched, aseptate	+	Cylindrical, oval	<i>Gigaspora rosea</i> , <i>Glomus citricola</i> , <i>G. fasciculatum</i> , <i>G. geospermum</i> , <i>G. macrocarpum</i> , <i>G. microcarpum</i> , <i>G. maculosum</i> , <i>G. monosporum</i>

SW= smooth-walled rhizoids, TUB= tuberculate rhizoids, (+) = present, (-) = absent, NR= Not reported.

SW = rizoides de pared lisa, TUB = rizoides tuberculados, (+) = presente, (-) = ausente, NR = No reportado.

with diameter ranges from 160 to 230 μm . Spore wall is three layered, outer layer hyaline, inner layer is hyaline with sublayers (Fig 2A).

Glomus citricola Tang & Zang

Spores isolated from *A. khasyana* and *A. wallichiana* and present singly. Shape varies from globose to ovoid with 35 to 65 μm in size. Spore consists of two layers, the outer layer is hyaline, the inner layer is 0.8-2.0 μm thick (Fig 2B).

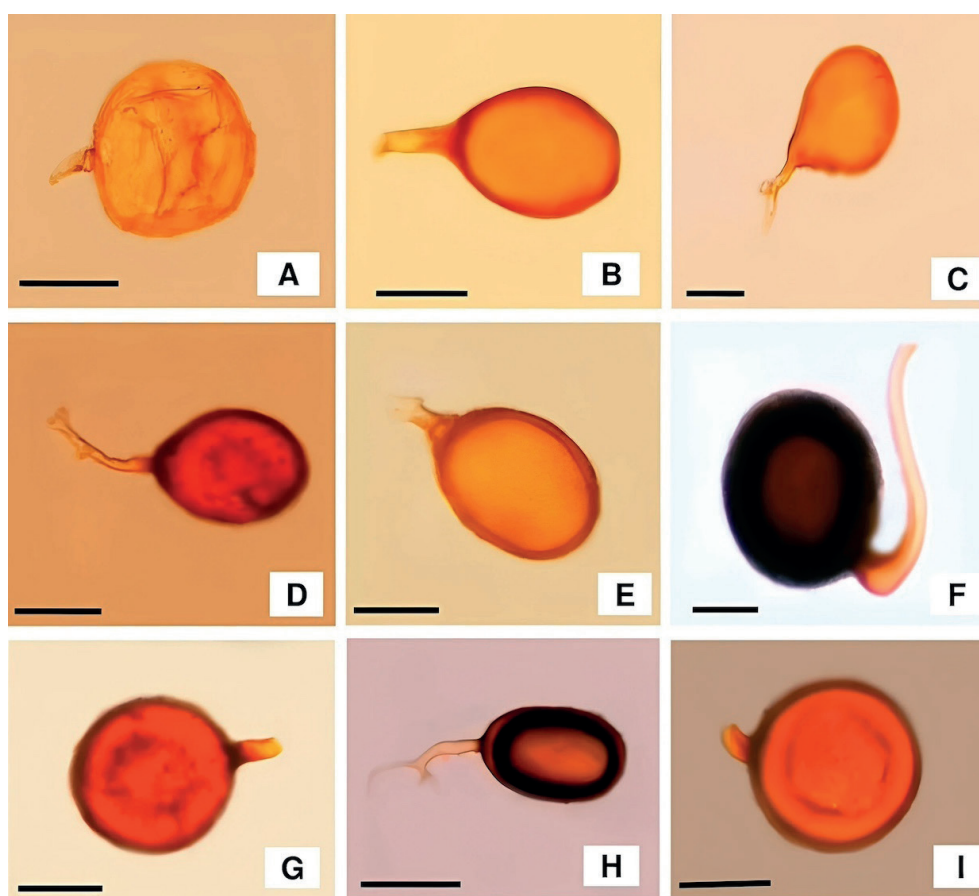


Fig. 2. Fungal spores isolated from the rhizosphere soil of *Asterella khasyana* and *A. wallichiana*. A) *Gigaspora rosea*. B) *Glomus citricola*. C) *G. fulvum*. D) *G. fasciculatum*. E) *G. geospermum*. F) *G. macrocarpum*. G) *G. maculosum*. H) *G. microcarpum*. I) *G. monosporum*. Scale Bars: Figs. A-I = 20 μ m.

Fig. 2. Esporas de hongos aisladas del suelo de la rizosfera de *Asterella khasyana* y *A. Wallichiana*. A) *Gigaspora rosea*. B) *Glomus citricola*. C) *G. Fulvum*. D) *G. Fasciculatum*. E) *G. Geospermum*. F) *G. Macrocarpum*. G) *G. Maculosum*. H) *G. Microcarpum*. I) *G. Mono-sporum*. Barras de escala: Figs. A-I = 20 μ m.

G. fasciculatum (Thaxt.) Gerdmann & Trappe.
emend. C. Walker & Koske

Spores are 50 to 130 μ m in size and are present singly with one subtending hyphae, isolated from the rhizosphere soil of *A. khasyana* and *A. wallichiana*. They are pale yellow in colour and shape varies from globose to sub-globose. Spore wall is three layered, the first layer is hyaline, second layer is smooth, pale yellow in colour and third layer is 0.5 μ m thick and flexible (Fig 2D).

G. fulvum (Berkeley & Broome) Trappe & Gerdmann

Spores isolated from *A. khasyana*, are clavate in shape. Spore wall is single laminated, hyaline to pale brown in colour. Single subtending hyphae is present at the point of attachment (Fig. 2C).

***G. geosporum* Gerdemann & Trappe**

Spores of *G. geosporum* were isolated from *A. wallichiana*. They were found singly in the soil. The colour ranges from yellow to orange and shape varies from globose to sub globose with a subtending hyphae at the point of attachment. Three layered spore wall is present. Outer layer is hyaline, middle layer is thick and yellow to orange in colour whereas, inner layer is semi rigid, pale yellow to orange coloured (Fig.2F).

***G. macrocarpum* Tulasnes & Tulasnes**

Reddish coloured *G. macrocarpum* spores were isolated from rhizosphere soil of both *A. khasyana* and *A. wallichiana*. They were present in sporocarps consisting of 2-15 spores in a group with globose to subglobose shape. Spore size varies from 80-149 μm in diameter consisting of two layered wall, outer hyaline often absent in mature spores, inner layer thicker, dark reddish brown. Spore wall is found perforated at maturity (Fig 2E).

***G. maculosum* Miller & Walker**

Spores of this species are found in the rhizosphere soil of *A. wallichiana*. They are globose to subglobes and borne singly in the soil with diameter 135 to 200 μm . They are hyaline, pale yellow coloured and become ochraceous at maturity with one to three subtending hyphae present. Spore wall is three layered, the outer layer is hyaline, the middle layer is pale straw to ochraceous coloured, and the inner layer is around 0.5-1.0 μm thick (Fig. 2G).

***G. microcarpum* Tulasnes & Tulasnes**

Spores of this species were isolated from the rhizosphere soil of *A. khasyana*, *A. wallichiana*. Spores are present in groups, with diameter ranges from 22 to 55 μm . Colour varies from pale yellow to golden yellow, possessing globose to sub globose shape with subtending hyphae. Wall consists of two layers, the outer layer is hyaline and rough, the inner layer is smooth, pale yellow to golden yellow (Fig.2H).

***G. monosporum* Gerdemann & Trappe**

Spores, isolated from rhizosphere soil of *A. wallichiana* were present singly, occasionally two or three. Spore shape varies from globose to sub globose. Wall of the spore is dull brown with single subtending hyphae (Fig.2I).

DISCUSSION

Present study confirms the presence of AM association with *Asterella blumeana*, *A. khasyana* and *A. wallichiana*. Arbuscules and hyphae were found in the internal parenchyma cells of the thallus in the midrib region. Rimington *et al.* (2018) confirmed AM association in *A. khasyana* showing association with fungi belonging to Mucoromycotina and Glomeromycotina. With respect to internal fungal colonization all three studied species of *Asterella* show association in both rhizoids as well as in the thallus. Frequent colonization observed at midrib region of thallus. Rimington *et al.* (2018) also reported fungal colonization at central midrib of liverwort thallus but its extent of fungal colonization varies from plants to plants. Bryophytes, being poikilohydric, absorb through the entire surface of the gametophyte. In present study it is observed that the mycorrhizal association in liverworts not only restricted to its absorptive organs (rhizoids) but also in midrib region and other parts of thallus. Presence of AM colonization apart from rhizoids might have helped in translocation and distribution of nutrients in absence of a well-developed conducting system in liverworts.

The primary role of rhizoids is the attachment to the substratum (Duckett *et al.*, 1998; Crandall-Stotler *et al.*, 2008; Goffinet *et al.*, 2008). In present investigation fungal colonization is observed to be more in smooth walled rhizoids as compared to tuberculate rhizoids. *A. blumeana* shows association in both types of rhizoids. Tuberculate rhizoids are thick walled, have small diameter and peg-like tubercles. Whereas, smooth rhizoids are thin walled and large diameters and highly efficient in water absorption (Cao *et al.*, 2014). McConaha (1941) stated that smooth-walled rhizoids normally grow forward, penetrate the soil, and help in absorption of water and minerals, whereas tuberculate rhizoids originate beneath the scales and prevent them from growing downwards. This acts as a capillary conducting system parallel to the thallus which helps in the distribution of water to all absorptive parts of the gametophyte. The variation in structure and distribution of the two types of rhizoids are related to its functions of anchoring, plant support and absorption (Cao *et al.*, 2014). Presence of higher fungal colonization in smooth-walled rhizoids, compared to tuberculate rhizoids, confirms the specialized functional role of these structures. Smooth-walled rhizoids primarily enhance nutrient absorption directly from the soil, whereas tuberculate rhizoids are more involved in the internal distribution of water and nutrients, showcasing a sophisticated division of labour within the plant architecture that optimizes its survival efficiency.

Liverworts associated with Glomeromycotina fungi produce variable structures like aseptate hyphae, arbuscules and vesicles, which are very similar to those formed by the same fungi associated with vascular plants. All three studied species show presence of AM structures like aseptate hyphae, arbuscules and storing structure vesicles (Fig 1A, Table 1).

A. blumeana and *A. khasyana* show association with both septate and aseptate hyphae in the rhizoids (Fig 1A). Presence of two types of fungal hyphae confirms diverse association of fungi with bryophytes. Pressel *et al.* (2010), Bidartondo *et al.* (2011), Field *et al.* (2012, 2015) and Rimington *et al.* (2020) also reported the association of liverworts not only restricted with fungi belongs to Glomeromycotina but with other groups like Mucoromycotina, Basidiomycota or Ascomycota fungi are also show association. A considerable variation in vesicles shape (round, cylindrical, oval and elongated) is also observed in present study (Fig. 1 G,J,M,O). The variation in shape, size, position of vesicles and diverse pattern of colonization show presence of diverse AM fungi (Ligrone *et al.* 2007; Rimington *et al.*, 2018). Marchantiopsida is reported to co-colonize with diverse AM fungi such as Archaeosporaceae, Claroideoglomeraceae, Diversisporaceae along with Glomeraceae are reported in *Marchantia* (Rimington *et al.*, 2018).

Nine fungal species belongs to two genera *Glomus* and *Gigaspora* were isolated from the rhizosphere soil of *A. khasyana* and *A. wallichiana* (Table 1, Fig. 2). Liverworts known to form association with fungi belong to Glomeromycotina, but it exhibits high specificity towards fungi belonging to Glomeraceae. It also commonly found to be associated with liverworts and hornworts (Rimington *et al.*, 2018). In previous studies *Glomus* spp. are most commonly reported to form association with many bryophytes (Parke and Lindernam 1980; Turnau *et al.*, 1999; Schüßler, 2000; Redecker *et al.*, 2000). Present study also supports earlier observation of high affinity of liverworts towards AM fungi belonging to Glomeraceae.

CONCLUSION

AM colonization is present in both thallus as well as in rhizoids of the studied species of *Asterella*. More colonization in smooth walled rhizoids as compared to tuberculate confirms the function of differential labour of rhizoids. The main function of absorption is performed by smooth walled rhizoids and its association with fungi enhances the absorption capability. Presence of two types of fungal hyphae suggest that association of liverworts with more than one fungi which helped not only in nutrient translocation but also helped to survive in stressful conditions. Liverworts occupy a critical phylogenetic position in the evolution of land plants, serving as vital models for studying the origins of plant-fungi symbiosis. Despite their importance, research into AM associations in liverworts remains scarce, highlighting a significant gap in our understanding of plant evolution. Our findings of *A. blumeana*, *A. khasyana*, and *A. wallichiana* forming AM association help in adding more information on AM associated *Asterella* sp. and also our knowledge of fungal associations with liverworts.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Bischler, H. (1998). Systematics and evolution of the genera of the Marchantiales. *Bryophyt. Biblioth* 51: 1-201.
- Bidartondo, M. I., Read, D. J., Trappe, J. M., Merckx, V., Ligrone, R. & Duckett, J. G. (2011). The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters* 7: 574-577. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.1203>
- Cao, J. G., Dai, X. L., Zou, H. M. & Wang, Q. X. (2014). Formation and development of rhizoids of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 141 (2): 126-134. <https://doi.org/10.3159/TORREY-D-13-00038.1>
- Cottet, A. C. & Messuti, M. I. (2022). New Record of Arbuscular Mycorrhiza in *Asterella chilensis* (Aytoniaceae, Marchantiophyta), Patagonia, Argentina. 2022. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 57 (1).
- Crandall-Stotler, B. & Stotler, R. E. (2008). Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Shaw A, Goffinet B. eds. *Bryophyte biology*. New York: Cambridge University Press, 1-54. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511754807.002>
- Duckett, J. G., Schmid, A. M. & Ligrone, R. (1998). Protonemal morphogenesis. In: Bates JW, Ashton NW, Duckett JG. eds. *Bryology for the twenty-first century*. Leeds, UK: *British Bryological Society*: 223-246. <https://doi.org/10.1201/9781315138626>
- Field, K. J., Cameron, D. D., Leake, J. R., Tille, S., Bidartondo, M. I. & Beerling, D. J. (2012). Contrasting arbuscular mycorrhizal responses of vascular and non-vascular plants to a simulated Palaeozoic CO₂ decline. *Nature Communications* 3 (1): 835.
- Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D. *et al.* (2015). First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytologist* 205 (2): 743-756.
- Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D., Duckett, J. G., Leake, J. R. & Pressel, S. (2016). Functional analysis of liverworts in dual symbiosis with Glomeromycota and Mucoromycotina fungi under a simulated Palaeozoic CO₂ decline. *ISME Journal* 10: 1514-1526. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.204>
- Field, K. J. & Pressel, S. (2018). Unity in diversity: structural and functional insights into the ancient partnerships between plants and fungi. *New Phytologist* 220 (4): 996-1011. <https://doi.org/10.1111/nph.15158>

- Gerdemann, J. W. & Nicolson, T. W. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting method. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-245.
- Glime J. M. (2020). Bryophyte Ecology. Ebook: <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyteecology/>. Accessed 15 July 2020
- Goffinet, B., Buck, W. R. & Shaw, A. J. (2008). Morphology, anatomy and classification of the Bryophyta. In: Shaw A, Goffinet B. eds. *Bryophyte biology*. New York: Cambridge University Press, 55-138. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511754807.002>
- Humphreys, C. P., Franks, P. J., Rees, M., Bidartondo, M. I., Leake, J. R. & Beerling, D. J. (2010). Mutualistic mycorrhiza- like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications* 1: 103. <https://doi.org/10.1038/ncomms1105>
- INVAM (2025). The International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. <https://invam.ku.edu/>
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X. & Tang, D. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science* 356: 1172-1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- Kormanic, P. P. & McGraw, A. C., (1982). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizas in plant roots. In *Methods and Principles of Mycorrhizal Research* (Ed. by N. C. Schenck), pp. 37-45. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
- Kowal, J., Pressel, S., Duckett, J. G., Bidartondo, M. I. & Field, K. J. (2018). From rhizoids to roots? Experimental evidence of mutualism between liverworts and ascomycete fungi. *Annals of Botany* 121: 221-227. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx126>
- Kumari, P., Chamola, B. P., Govindaparyi, H., Gupta, R. & Uniyal, P. L. (2015). Studies on the diversity of soil fungi (AM) associated with bryophytes in Uttarakhand, North Western Himalaya, India. *Annals of Forestry* 23 (1):11-19.
- Leake, J. R. & Read, D. J. (2016). Mycorrhizal symbiosis and pedogenesis throughout Earth's history. In: N.C. Johnson & C. Gehring & J. Jansa (Eds). *Mycorrhizal mediation of soil: fertility, structure and carbon storage* (9-33). Amsterdam: Elsevier.
- Long, D. G. (2006). Revision of the Genus *Asterella* P. Beauv. in Eurasia. *Bryophytorum Bibliotheca* 63: 1-299.
- Ligrone, R., Carafa, A., Lumini, E., Bianciotto, V., Bonfante, P. & Duckett, J. G. (2007). Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular and taxonomic analysis. *American Journal of Botany* 94: 1756-1777.
- McConaha, M. (1941). Ventral structures effecting capillary in the Marchantiales. *American Journal of Botany* 28: 301-306.
- Nicolson, T. H. (1955). The mycotrophic habit in grasses (Ph.D. Thesis) University of Nottingham.

- Pressel, S., Bidartondo, M. I., Ligrone, R. & Duckett, J. G. (2010). Fungal symbioses in bryophytes: New insights in the twenty first century. *Phytotaxa* 9: 238-253. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.9.1.13>
- Parke, J. L. & Linderman, R. G. (1980). Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with the moss *Funaria hygrometrica*. *Canadian Journal of Botany* 58: 1898-1904.
- Redecker, D., Koder R. & Graham, L. E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Rimington, W. R., Pressel, S., Duckett, J. G., Field, K. J. & Bidartondo, M. I. (2018) Ancient plants with ancient fungi: liverworts associate with early-diverging arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Royal Society B*. 285 (1888): 2018 2016.
- Rimington, W. R., Duckett, J. G., Field, K. J., Bidartondo, M. I. & Pressel, S. (2020). The distribution and evolution of fungal symbioses in ancient lineages of land plants. *Mycorrhiza* 30 (1): 23-49.
- Rousk, K., Degboe, J., Michelsen, A., Bradley, R. & Bellenger, J. P. (2017). Olybdenum and phosphorus limitation of moss-associated nitrogen fixation in boreal ecosystems. *New Phytologist* 214: 97-107. <https://doi.org/10.1111/nph.14331>
- Schüßler, A. (2000). *Glomus claroideum* forms and arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* 10: 15-21. <https://doi.org/10.1007/s005720050282>
- Schenck, N. C. & Perez, Y. (1990). A Manual for identification of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi, INVAM, (3rd edn.) University of Florida, Florida.
- Sharma, A. & Langer, A. (2017). Occurrence of mycorrhiza in a moss *Encalypta vulgaris* Hedw. *Journal of Plant Development Sciences* 9 (9): 881-883.
- Turnau, K., Ronikier, M. & Unrug, J. (1999). Role of mycorrhizal links between plants in establishment of liverworts thalli in natural habitats. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 68: 63-68. <https://doi.org/10.5586/asbp.1999.011>
- van der Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A. & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- van der Heijden, M. G., Dombrowski, N. & Schlaeppi, K. (2017). Continuum of root–fungal symbioses for plant nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 11574-11576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716329114>
- Verma, M., Parihar, P. & Akhtar, O. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Associations in Liverworts *Plagiochasma Appendiculatum* and *Marchantia Papillata*, an Evolutionary Amphibian Adaptation for Land Plant Colonization? *Jundishapur Journal of Microbiology* 15 (1): 7661-7679.

Xiao, B. & Bowker, M. A. (2020). Moss-biocrusts strongly decrease soil surface albedo, altering land-surface energy balance in a dryland ecosystem. *Science of The Total Environment* 741: 140425. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140425>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Mycorrhizal biofertilizer: advantages and hindrances in its application

Biofertilizante micorrízico: ventajas y desventajas en su aplicación

Ghosh, Somdatta^{ID}; Som S. Dutta^{*ID}; Suvashree Bhaumik^{ID};
Kunwar Hansda^{ID}; Debashis Kuila^{ID}

Mycorrhiza & Ecology Research Section, UG & PG Department of Botany, Midnapore College (Autonomous), Midnapore, West Bengal, 721101, India.

* Corresponding author: <somsubhradutta92@gmail.com>

Abstract

Global climate change, rising population growth, and the overuse of agrochemicals have led to various problems, including soil degradation, a decline in food production, and environmental issues affecting the agricultural sector. To overcome these challenges, biofertilizers (particularly, those of mycorrhizal origin) have emerged as a sustainable and eco-friendly alternative. Arbuscular mycorrhiza (AM) is an association between plant roots and fungi from the subphylum Glomeromycotina, found in approximately 72% of land plants, and is one of the most common and ancient types of symbiosis on Earth. AM fungi provide with numerous benefits in exchange for plant photoassimilates. Although AM fungi may represent a viable biofertilizer option, their use is significantly limited due to various issues, ranging from their production to field application. This review sheds light on the potential of AM fungi as biofertilizers, analyzing their diverse benefits while also addressing the limitations associated with their production and application for enhancing agricultural productivity.

Keywords: Agricultural productivity; agrochemicals; biofertilizers; global climate change; mycorrhiza.

- Ref. bibliográfica: Ghosh, S.; Dutta, S. S.; Bhaumik, S.; Hansda, K.; Kuila, D. 2025. Mycorrhizal biofertilizer: advantages and disadvantages in its application. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 193-221. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2141>
- Recibido: 12 de marzo 2025 – Aceptado: 31 de mayo 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.
- URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>
- Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



Resumen

El cambio climático global, el aumento de la población y el uso excesivo de productos agroquímicos han dado lugar a diversos problemas, como la degradación del suelo, la caída de la producción de alimentos y cuestiones medioambientales que han arrinconado al sector agrícola. Para superarlos, los biofertilizantes, en particular los micorrícicos, han surgido como una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente. La micorriza arbuscular (MA), una alianza entre las raíces de las plantas y los hongos del subfilo Glomeromycotina, que se encuentra en aproximadamente el 72% de las plantas terrestres, es uno de los tipos de simbiosis más comunes y antiguos de la Tierra. Los hongos MA proporcionan a las plantas multitud de beneficios a cambio de fotoasimilados vegetales. Aunque los hongos MA pueden ser una buena opción biofertilizante, su uso es muy limitado, ya que existen diversos problemas que van desde su producción hasta su aplicación. Esta revisión arroja luz sobre el potencial de los hongos MA como biofertilizantes, analizando sus diversos beneficios y abordando al mismo tiempo las limitaciones asociadas a su producción y aplicación para aumentar la productividad agrícola.

Palabras clave: Productividad agrícola; agroquímicos; biofertilizantes; cambio climático global; micorrizas.

INTRODUCTION

Global climate change, the exponential rise in the human population, the energy crisis, and the limited availability of natural resources have placed immense pressure on the agricultural sector (Kinge *et al.*, 2022). In addition, the long-term injudicious use of synthetic chemical fertilizers and pesticides to raise agricultural productivity has given rise to many problems, such as deterioration of soil quality, which has resulted in a decrease in food production (Naik *et al.*, 2020; Fasusi *et al.*, 2023) and has given rise to many environmental problems, such as eutrophication of water bodies (Bakhshandeh *et al.*, 2017; Ammar *et al.*, 2023). This, in turn, has led to the degradation of ecosystems and has jeopardized trophic interactions (Barros-Rodríguez *et al.*, 2024). This unprecedented situation has put various stakeholders, such as governments, policymakers, scientists, and farmers, in an alarming state (Stephenson *et al.*, 2013). The growing awareness of the environmental and ecological consequences of heavy reliance on synthetic fertilizers has prompted a shift towards more sustainable agricultural practices to ensure food security for this expanding population while simultaneously conserving Earth's natural resources, with biofertilizers emerging as a viable, eco-friendly, sustainable, and cost-saving solution (Hunter *et al.*, 2017; Nosheen *et al.*, 2021).

Biofertilizers are formulations containing microorganisms or microbial-derived molecules that enhance plant growth and productivity by approximately 10–40% (Shahwar *et al.*, 2023; Ferreyra-Suarez *et al.*, 2024). Among biofertilizers, mycorrhizal biofertilizers have garnered significant attention because of their ability to enhance plant nutrient acquisition and overall growth performance (Kour *et al.*, 2020; Ammar *et al.*, 2023). Mycorrhizae, first reported by Frank (1885), is the mutualistic association between fungal hyphae and plant roots in which there is a reciprocal exchange of nutrients in the form of photo-assimilates like hexose sugars and lipids from plants to fungi and mineral nutrients from fungi to plants (Kaiser *et al.*, 2014; Luginbuehl *et al.*, 2017). Mycorrhizal association can be categorized into four types: arbuscular mycorrhiza (AM), ectomycorrhiza (EcM), orchidioid mycorrhiza (OrM), and ericoid mycorrhiza (ErM) (Brundrett & Tedersoo, 2018). Among these, arbuscular mycorrhiza, a symbiotic association between plant roots and obligate biotrophic fungi of the subphylum Glomeromycotina (Spatafora *et al.*, 2016), is one of the most ancient and widespread symbioses on Earth (Kenrick & Strullu-Derrien, 2014). It is found in approximately 72% of terrestrial land plants (Genre *et al.*, 2020), ranging from bryophytes to angiosperms from a wide range of ecosystems (Redecker *et al.*, 2013), which played a pivotal role in allowing plants to transition from an aquatic environment before the evolution of true roots (Kenrick & Strullu-Derrien, 2014; Kuyper & Jansa, 2023). In contrast, ectomycorrhizal associations are found in only 2% of land plants, primarily those associated with temperate trees (Brundrett & Tedersoo, 2018). The other two types of mycorrhizal associations, Orchidioid and Ericoid, were restricted to specific plant families, Orchidaceae and Ericaceae, respectively (Brundrett & Tedersoo, 2018).

In addition to their widespread occurrence and distribution across ecosystems, arbuscular mycorrhizae provide plants with an array of benefits, such as providing them access to immobile soil nutrients (Smith & Smith, 2011; Yu *et al.*, 2022), promoting plant growth (Nadeem *et al.*, 2014), and helping plants adapt and survive under various abiotic (Begum *et al.*, 2019) and biotic stresses (Dey & Ghosh, 2022). They also improve soil structure through soil aggregation (Gosling *et al.*, 2010) and mediate communication between plants through a Common Mycorrhizal Network (CMN) (Walder *et al.*, 2012; Heklau *et al.*, 2021) (Fig. 1). In addition, they provide various ecosystem services, such as the breakdown of organic matter (Powell & Rillig, 2018), maintenance of belowground microbial diversity, and regulation of plant community diversity (Van Der Heijden *et al.*, 2015; Fall *et al.*, 2022). Thus, they have huge potential to be harnessed as a sustainable biofertilizer option for boosting agricultural productivity, with the potential to reduce reliance on synthetic fertilizers and pesticides while improving plant growth and resilience. However, they remain underutilized owing to inherent challenges associated with mass production, the risk of contamination, the need for skilled labour (Gianinazzi & Vosátka, 2004; Madawala,

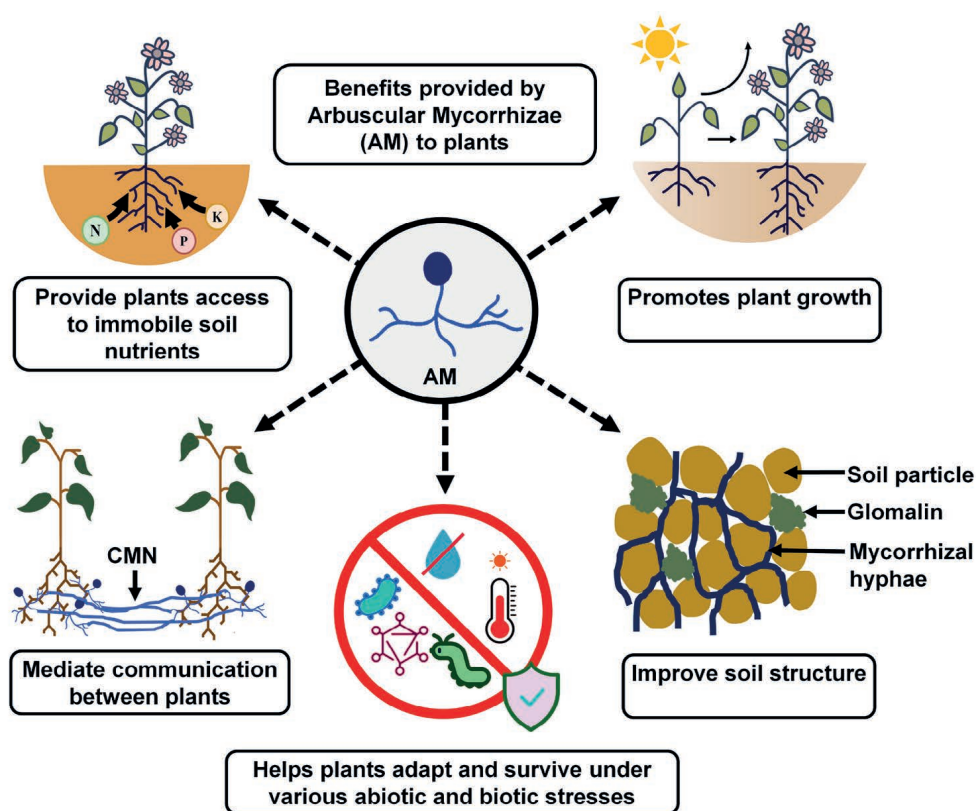


Fig. 1. Benefits provided by AM (Arbuscular Mycorrhizal) fungi to plants. Common Mycorrhizal Network (CMN).

Fig. 1. Beneficios que aportan los hongos MA (micorrizas arbusculares) a las plantas. Red común de micorrizas (CMN).

2021), and conventional agricultural practices, such as the application of agrochemicals, tillage, and crop rotation, which disrupt mycorrhiza development (Brito *et al.*, 2012; Bakhshandeh *et al.*, 2017). Among mycorrhizas, arbuscular mycorrhiza (AM) will be considered in this review, as they are found inclusively in all habitats and form symbiosis with nearly 72% of terrestrial land plants, whereas ectomycorrhizae associate with only 2% of land plants, mostly with trees found in forests of temperate regions (Brunnett & Tedersoo, 2018).

This review elucidates the potential of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi as biofertilizers by discussing the numerous benefits they offer. Furthermore, this paper highlights the various challenges that may arise in the application of AM fungi as biofertilizers intended to enhance agricultural productivity.

ADVANTAGES

The symbiotic association between plants and mycorrhizae provides the plants with an array of benefits and services that promote their growth and, at the same time, help them to cope with various stresses, which are discussed below.

Facilitation of nutrient uptake

Mycorrhizal colonization induces changes in the morphological characteristics of plant roots that are crucial for hosting mycorrhizal structures within the cells and enhancing nutrient uptake and accumulation by mycorrhizal plants (Neumann & George, 2010). The morphological modifications in the plant root system triggered by mycorrhizal colonization include an increase in total root length, a change in root-shoot ratio, an increase in root branching, and an increase in the number of root tertiary branches (Vierheilig *et al.*, 2008). Along with these root modifications, the hyphae of mycorrhizal fungi have the capacity to expand beyond the root surface by a distance greater than 10 cm (Jakobsen *et al.*, 1992). These hyphae are very thin, with an average diameter of 3 to 4 μm , which is much smaller than the finest root hairs, which have an average diameter of 10 μm (Johansen *et al.*, 1993); thus, they are able to extend their growth into the tiniest micropores of soil, which enhances their nutrient absorption efficiency (Bennett & Groten, 2022). Altogether, the root modifications induced by AM fungi and the AM hyphae form an extensive nutrient-absorbing network that expands the root zone absorption area by 10% to 100% (Etesami *et al.*, 2021) that stretches beyond the nutrient depletion zones that form around roots in the rhizosphere (The narrow zone of soil surrounding plant roots), which enables the AM-colonized roots to access a larger volume of the soil than roots that are not colonized by AM fungi (Cavagnaro *et al.*, 2015). AM also promotes the expression of phosphate transporters (PTs) in various host plants, including *StPT3* in potato (Rausch *et al.*, 2001), *MtPT4* in *Medicago truncatula* (Harrison *et al.*, 2002), and *OsPT11* in rice (Paszkowski *et al.*, 2002). These transporters play a critical role in facilitating the uptake of phosphate released by AM fungi at the symbiotic interface into plant cells (Wang *et al.*, 2017). In addition to phosphate transporters, plant ammonium transporters such as *GmAMT4.1* and *ATM2;3* in soybean and *Medicago* are induced by the presence of the fungus within arbuscule-containing cortical cells in the roots (Wang *et al.*, 2017).

Mycorrhizal fungi secrete enzymes, like acid phosphatases and proteases, which facilitate the solubilization of both organic and inorganic phosphorus compounds in the soil (Miransari *et al.*, 2009). This enzymatic activity enhances the bioavailability of phosphorus, thereby improving the availability of phosphorus to the plant host (Samantaray *et al.*, 2024).

Some mycorrhizal fungi produce siderophores (Low molecular weight organic compounds that have a high affinity for ferric ions) that complex iron and oxalate to increase potassium absorption from the soil, resulting in improved plant nutrition (Lindahl *et al.*, 2007).

Improvement of water absorption capacity

Mycorrhizal hyphae are very thin, usually having a diameter of 2–5 μm , which is approximately two times smaller than plant roots, which have an average diameter of 10–20 μm , which allows them to transport water through small soil cavities inaccessible to plant roots (Diagne *et al.*, 2020). In addition, the hyphal tips are also hydrophilic, which enhances the transport of water from the soil to the plant cells (Miransari, 2011).

AM fungi also produces glomalin, which is a glycoprotein containing 30–40% carbon compounds that is deposited on the soil particles and holds the soil particles together, forming stable soil aggregations that improve the water holding capacity of soil and protect the soil from desiccation (Verbruggen *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2017).

Mycorrhizal fungi also induce the expression of plant aquaporin genes in mycorrhizal roots, which encode integral membrane transporters that transport water, signalling molecules, and ions through cell membranes (Santander *et al.*, 2021). Aquaporins enhance the water absorption capacity of plants and improve their tolerance to drought stress. Thus, AM fungi improves plants resilience to drought stress through multilayered, controlled protection mechanisms.

Enhancement of growth and yield of crops

Mycorrhizal symbiosis plays a significant role in enhancing the productivity and quality of tropical agricultural crops, particularly in regions where phosphorus deficiency is prevalent in the soil (Hildermann *et al.*, 2010). Nziguheba and Smolders (2008) stated that 75% of the phosphorus applied to crops is not utilized by plants. *Zea mays* and flax are very dependent on AM fungi to meet their primary phosphorus requirements (Bai *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2013). AM fungi inoculation can provide up to 90% of plant phosphorus and 20% of plant nitrogen due to the hyphal network in the soil formed after symbiotic associations with the host plant (Johnson *et al.*, 2012). Most of the major agricultural crops are mycorrhizal hosts and increase the inoculum potential of the soil and colonization of future crops (Schliemann *et al.*, 2008). AM fungi have a widespread distribution, and their use in agroecosystems as mycorrhizae-based inoculants is increasing (Igiehon & Babalola, 2017). In the case of potatoes, AM inoculation was observed to increase the total crop yield by 9.5%.

When AM fungi inoculant (*Rhizophagus irregularis*) was applied to potatoes over a period of four years in North America and Europe under real field conditions and showed a highly significant increase (42.2 tons/ha) in potato yield compared to non-inoculated controls (38.3 tons/ha) (Hijri, 2016). AM fungi also contributes to enhancing crop yield in rainfed agricultural systems by promoting drought resistance in host plants, which is particularly important in mitigating yield losses attributed to phytopathogens and herbivores (Dowarah *et al.*, 2022).

Furthermore, AM fungi have been engaged in large-scale field production of maize (Sabia *et al.*, 2015). The inoculation of the AM fungus *Rhizophagus irregularis* with the cotton cultivar Lumian No. 1 reduced the requirement of fertilizer application in the field (Gao *et al.*, 2020). Thus, AM fungi possess a considerable potential for enhancing the yield of crops.

A positive relationship between mycorrhizal spore population and fruit yield (number and weight of fruits) has been observed in various fruit trees (Bona *et al.*, 2017). Zeng *et al.* (2014) observed increased levels of sugars, organic acids, vitamin C, flavonoids, and minerals in citrus fruits due to *Glomus versiforme*, resulting in improved quality. The inoculation of *Glomus macrocarpum*, *G. coledonum*, and *Acaulospora sp.* resulted in enhanced plant height, stem diameter, and biomass in trifoliate and troyer oranges (De Souza, 2000). Inoculation with *Gigaspora rosea* and *Glomus mosseae* enhanced the growth of different grape rootstocks and cultivars compared to uninoculated plants (Linderman & Davis, 2001). Arbuscular mycorrhizal fungi also increased the yield and productivity of apple trees when plants were co-inoculated with phosphate-solubilizing bacteria (Aslantaş *et al.*, 2007).

Contributes to soil sustainability

Arbuscular mycorrhizae are an essential component of the pedosphere that regulate important soil processes and are considered to have immense potential for improving soil sustainability (Powell & Rillig, 2018; Zhang *et al.*, 2024). AM fungi contribute to soil sustainability by regulating three major factors: the structure of the soil, physiological processes in plants, and ecological dynamics (Fall *et al.*, 2022).

Mycorrhizal fungi form a large amount of mycelia in the soil, which continuously regenerates and forms a matrix that wraps and interconnects soil particles, improving the stability of soil aggregates, minimizing soil compaction, and improving the water-holding capacity of soil (Chen *et al.*, 2018). Mycorrhizal fungi also secrete a negatively charged, hydrophobic, and thermotolerant glycoprotein, glomalin (Fall *et al.*, 2022). Glomalin acts as a glue that binds soil particles and stabilizes soil aggregation (Lehmann *et al.*, 2020). Furthermore, the hydrophobic nature of glomalin provides soil aggregates with water resistance. Additionally, glomalin is slowly biodegradable by soil microorganisms (Hu *et al.*, 2019).

Together, the formation of soil aggregates by the enmeshment action of hyphae and the increase in their stability by glomalin minimize the risk of soil compaction and increase the water-holding capacity of the soil, which results in reduced soil erosion, nutrient leaching, and denitrification, thereby improving soil fertility (Pellegrino *et al.*, 2020). The mycelial network, in addition to forming stable soil aggregates, also contributes to the formation of soil organic matter after death (Hawkins *et al.*, 2023).

Thus, AM fungi participate in various types of essential soil functions, such as nutrient cycling (Powell & Rillig, 2018; Frey, 2019), reducing soil nutrient loss by minimizing nutrient leaching from the soil (Cavagnaro *et al.*, 2015), and improving the soil structure by producing a hydrophobic glycoprotein glomalin (Leifheit *et al.*, 2014). AM also regulates various physiological processes in plants, such as enhancing their nutrient acquisition capacity from the soil (Rouphael *et al.*, 2015), modulating phytohormone levels in plants, and reprogramming the secondary metabolism of plants (Rivero *et al.*, 2015). AM also influences the ecological dynamics of soil by recruiting beneficial soil microorganisms, such as phosphate-solubilizing bacteria (PSB), nitrogen-fixing bacteria, and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), to the mycorrhizosphere (The zone of soil surrounding the plant roots colonized by mycorrhizal fungi) (Yu *et al.*, 2022).

Strengthens plant immunity to biotic stress

AM induces disease control by both indirect and direct means. Indirectly through nutrition improvement; synthesis of plant hormones (Song *et al.*, 2015) and competing with other harmful microbes on the root surface and within the root. AM fungi also produce some antifungal (Bencherif *et al.*, 2019) and antibacterial compounds (Kaur & Sussella, 2020) and toxins that act against pathogenic organisms (Wang *et al.*, 2018).

AM fungal symbiosis directly inhibits pathogens by mycorrhiza-induced resistance (MIR) (Nguvo & Gao, 2019) by creating systemic protection against a wide range of pathogens. MIR includes characteristics of both systemic acquired resistance (SAR), which occurs after pathogen infection in plants, and induced systemic resistance (ISR), which occurs following root colonization by non-pathogenic rhizobacteria (Cameron *et al.*, 2013). MIR activates both pathogen-specific and broad-range defence genes (Fiorilli *et al.*, 2018) to produce enzymes and pathogenesis-related (PR) proteins (Sanmartín *et al.*, 2020).

AM fungi are active against different types of nematodes (Da Silva Campos, 2020), bacteria (Sanmartín *et al.*, 2020), viruses (Aseel *et al.*, 2019), and fungi (Song *et al.*, 2015) in different hosts, though the protective effects vary with AM and host species or other conditions.

Enhancement of abiotic stress tolerance

Water stress, caused by drought and salinity, is one of the main abiotic stresses that impact plant growth and productivity. The symbiosis between plant roots and AM fungi is a common strategy for adapting to water stress (Brachmann & Parniske, 2006). Mycorrhizal fungi employ various strategies to sustain host vitality during water stress. Water stress decreases the turgor pressure and water potential of plant cells, which results in the formation of reactive oxygen species like superoxide and hydroxyl radicals (Laxa *et al.*, 2019). As mycorrhizal hyphae can explore a large volume of the soil, they enhance plants water absorption, which improves turgor potential, stomatal conductance, and hence elevates transpiration rate (Augé *et al.*, 2015). AM colonization also improves osmotic balance by inducing accumulation of osmo-protectants such as proline, polyamines, glycine betaine, non-structural carbohydrates, and inorganic solutes like K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} (Baslam & Goicoechea, 2012; Yooyongwech *et al.*, 2013) inside plant cells, which maintains the turgor pressure and protects plant cells from the adverse effects of water stress (Grümberg *et al.*, 2015).

Under salinity stress conditions, AM fungi enhance the uptake of nutrients like phosphorus (P), nitrogen (N), potassium (K), zinc (Zn), and copper (Cu) and maintain ionic homeostasis (Hanin *et al.*, 2016). AM fungi also enhance the levels of the abiotic stress hormone abscisic acid (ABA) in plants to cope with the detrimental effects of water and salinity stress (Martín-Rodríguez *et al.*, 2016). ABA regulates transpiration rates, stomatal movements, root hydraulic conductivity, and the expression of aquaporin-encoding genes (Ouledali *et al.*, 2019). ABA triggers stomatal closure, which in turn reduces transpiration and minimizes water loss during drought stress (Chitarra *et al.*, 2016). AM fungi also augment antioxidant activities to defend against damage by reactive oxygen species (ROS) and promote photosynthesis to minimize the detrimental effects of salts on the growth and development of plants (Evelin *et al.*, 2009). Crop plants inoculated with AM fungi have been reported to enhance growth and yield, while mitigating osmotic and ionic imbalances to normal levels, allowing crops to thrive under salinity stress (Hanin *et al.*, 2016).

All these adjustments by AM fungi improve plant resilience to various abiotic and biotic stresses, which improves plant growth and ultimately their productivity. Thus, AM can be utilized as a bioinoculant in the soil, which can maximize the output without compromising soil health while simultaneously ensuring soil sustainability.

HINDRANCES IN APPLICATION

Despite the multitude of benefits offered by mycorrhiza, their widespread adoption and successful implementation as biofertilizers in modern agriculture face several challenges (Fig. 2).

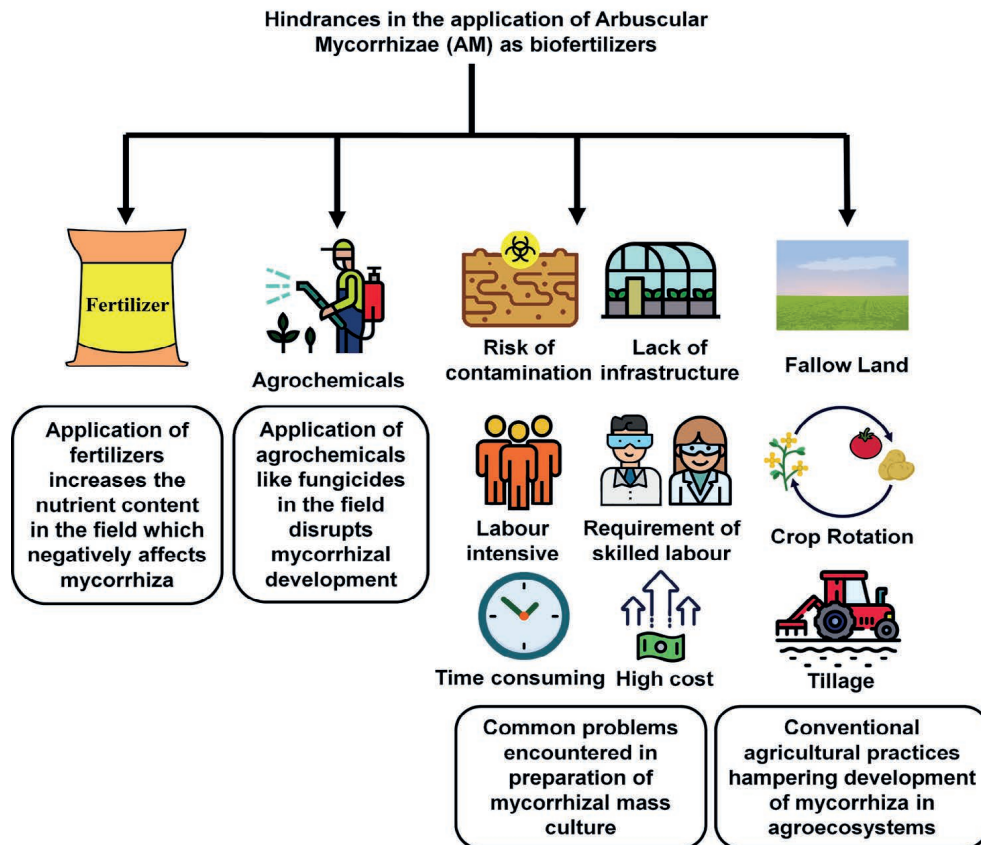


Fig. 2. Challenges associated with the use of arbuscular mycorrhiza as a biofertilizer in agroecosystems.

Fig. 2. Desafíos asociados al uso de micorrizas arbusculares como biofertilizante en agroecosistemas.

High nutrient content in soil

Under nutrient-poor conditions in the soil, plant roots release strigolactones (A family of carotenoid-derived phytohormones that promote seed germination in parasitic plants and facilitate the establishment of symbiosis between plants and AM fungi) into the soil, which induces the germination of AM spores and stimulate hyphal branching (Waters *et al.*, 2017). The AM fungi in response release *myc* factors that are perceived by plant receptors, resulting in the induction of the common symbiotic pathway leading to the establishment of symbiosis (Zhang *et al.*, 2015). However, in agroecosystems with high fertilizer input, the level of nutrients, especially phosphorus (P), becomes high, and plants can take up phosphorus (P) from the soil without seeking any help from the AM fungi, and the symbiotic association transforms to a parasitic one in contrast to mutualism under low soil N and P levels (López-Ráez *et al.*, 2017). Therefore, it is no longer feasible for plants to remain in this association, as there is a carbon cost; thus, the allocation of carbohydrates and lipids to AM fungi is reduced (Qin *et al.*, 2024).

Additionally, the release of strigolactones from plant roots decreases (López-Ráez *et al.*, 2011). Finally, plants also downregulate the expression of *phosphate transporter (PT) genes* (Sawers *et al.*, 2017). As a result, the AM fungal colonization and sporulation are reduced (Tiamtanong *et al.*, 2015). In addition to phosphorus (P), the mycorrhizal community is greatly affected by chronic nitrogen deposition. Many nitrogen fertilizers have been reported to decrease colonization in both field and pot experiments (Getman-Pickering *et al.*, 2021). Nitrogen fertilization alone or in combination with phosphorus disrupts AM symbiotic efficiency. Potassium (K) more than the natural soil K content decreased mycorrhizal colonization in maize (Ardestani *et al.*, 2011).

Application of agrochemicals

Agrochemicals (fungicides, pesticides etc.) are now integral part of technology dependent modern conventional agriculture as most high yielding crops are more susceptible to diseases than their wild genotypes. Systemic fungicides have selectivity and specificity for certain pathogens while non-systemic fungicides are broad spectrum and kill all organism exposed to these. Common non-systemic fungicides like *pentachloronitrobenzene* (PCNB), *thiram*, *fotran*, *arsan*, *langstan*, *Chlorothalinol*, *Captapol*, *chloroneb*, *metaxyl* and *ethazole* are highly toxic; while *Captan*, *Mylone*, *Vapram* and *Volax* are moderately toxic to mycorrhizal fungi. *Daconil*, *Sodium azide*, *terrazole*, *captain*, and *copper sulphate* may favour AM activity and development at low doses under specific environmental conditions (Vyas & Vyas, 2000).

Systemic fungicides are more detrimental to AM fungi as they get accumulated inside the roots (Jin *et al.*, 2013). As systemic fungicides are mostly fungi static, they have less effect on spore germination and hyphal growth, but they affect infection, colonization and sporulation. *Benomyl*, *Tridemorph*, *Triforine*, *Ethirimol*, *Etridiazole*, *Thiophanate methyl*, *Thiabendazole*, *Thiademifom* and *Carboxin* show detrimental effects on the development of AM in the root (Wang *et al.*, 2018). Almost all non-systematic fungicides adversely affect AM and are retained in soil (Ghosh *et al.*, 2024).

Selection and preparation of mass culture

The primary challenge in producing an AM fungi inoculum is the obligate symbiotic nature of AM fungi, which requires a host plant to grow and complete its life cycle. Thus, they cannot be cultivated in pure culture without their host plants (Säle *et al.*, 2015). Consequently, their propagation must include a cultivation phase with host plants maintained in fields, greenhouses, or growth chambers. This is labour intensive, costly, and at the same time requires considerable time and space (Gianinazzi &

Vosátka, 2004). Additionally, AM fungal inoculum is a combination of soil and AM propagules; therefore, these inocula cannot be entirely free from contamination with pathogens and weedy seeds (Kumar *et al.*, 2017). Furthermore, the soil makes AM inocula bulkier, and their transport becomes more challenging and expensive (Ceballos *et al.*, 2013). Apart from these evident limitations associated with the production of AM inocula on a large scale, there are additional obstacles like lack of infrastructure for inoculum production, storage, and skilled labour, as well as lack of a suitable carrier material, short shelf life, and inconsistency in the inoculum (Mukhongo *et al.*, 2016). Additionally, there is a lack of quality control protocols for AM fungal inoculum production; thus, the species listed in commercial products may not be entirely accurate (Hart *et al.*, 2018). Again, not all AM fungi species may be suitable for all hosts, soil types, or climates (Jansa *et al.*, 2014). Thus, screening is necessary.

Conventional agricultural practices like fallowing land, rotation with non-host plant and tillage

Conventional agricultural practices, aside from the application of agrochemicals, such as tillage and crop rotation, which inhibit the development of mycorrhizae, particularly in topsoil layers, are two commonly encountered challenges that prohibit the effective utilization of mycorrhizae as a biofertilizer in agroecosystems.

As an obligate symbiont, prolonged fallowing of land devoid of vegetation or with non-host vegetation leads to the depletion of arbuscular mycorrhizal (AM) propagules in the soil as AM spores are unable to germinate and proliferate in the absence of a host. Similarly, the cultivation of non-host crops, such as those belonging to the Brassicaceae family, which release glucosinolates into the soil, adversely affects AM propagules. Upon their release, glucosinolates decompose into isothiocyanates, which are antimicrobial compounds that further reduce the prevalence of AM propagules in the soil, even following the rotation with host plants (Kirkegaard & Sarwar, 1998; Ghosh *et al.*, 2004).

Intensive tillage disrupts the hyphal networks of mycorrhizae within the soil (Feilinezhad *et al.*, 2022) which can selectively affect various arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) groups based on their life and colonization strategies, either promoting or impairing specific groups, leading to a 40% reduction in AM fungal diversity (Brito *et al.*, 2012). Furthermore, mycorrhizal root colonization consistently demonstrates lower levels under tillage conditions compared to no-tillage environments (Castillo, 2006). During the initial stages of colonization, the direct impacts of conventional tillage systems are attributed to the physical disruption of the extraradical mycelium network, resulting in a slowdown of symbiotic efficiency. This disruption hampers AM activity related to nutrient and water uptake, glo-

malin-associated soil aggregate formation (Brito *et al.*, 2012), and bioprotection against soil pathogens (Patanita *et al.*, 2020).

Thus, conventional agricultural practices, aside from the application of agrochemicals, such as tillage and crop rotation, can inhibit the development of mycorrhizae in different agroecosystems. However, adopting practical alternatives such as utilizing organic fertilizers (manures and compost) and slow-release mineral fertilizers (like rock phosphate) (Cavagnaro, 2014), implementing reduced tillage (Ghorui *et al.*, 2024), and shortening the fallow period through crop rotation with mycorrhizal-dependent cover crops such as *Vicia villosa* Roth. and *Trifolium* spp. instead of non-mycorrhizal hosts like Brassicaceae can stimulate arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the field (Njeru *et al.*, 2015). Furthermore, the application of fungicides that do not negatively affect mycorrhizal fungi can lead to an increase in AM propagules and their species diversity (Rouphael *et al.*, 2015).

Methods of plant inoculation with mycorrhizal fungi

Inoculating plants with AM fungi employs advanced techniques that can significantly enhance plant health and productivity. These methods can be broadly categorized as follows.

Seed inoculation.— This method consists of coating seeds with a slurry of AM spores, ensuring that upon germination, the seeds are immediately exposed to the AM fungi (Kafle *et al.*, 2019).

Direct root inoculation.— This approach involves dipping the roots of seedlings into a suspension of AM spores during transplanting, thereby establishing direct contact between the AM fungi and the root system (Eulenstein *et al.*, 2017).

Soil inoculation.— This strategy involves broadcasting granular or powdered inoculum over the soil surface at the time of tillage or planting, making it suitable for large-scale agricultural operations where direct root inoculation may not be feasible (Aliyu *et al.*, 2019).

While these methods demonstrate potential for enhancing soil health and agricultural productivity, challenges persist in standardizing these practices.

Dual application of AM fungi and plant growth promoting bacteria (PGPB)

The simultaneous application of Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi and Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), represents an effective ecological strategy to enhance plant performance and soil health compared to single

inoculation (Feng *et al.*, 2023). AM fungi colonize the roots of terrestrial plants; on the other hand, PGPB colonizes the rhizosphere. The combination of these two groups can lead to improved plant performance by providing numerous benefits, such as nitrogen fixation, phosphate solubilization and mineralization, phytohormone production, and enhanced tolerance to various biotic and abiotic stresses (Wahid *et al.*, 2022).

The mechanism behind this synergistic effect is attributed to several factors, including PGPB enhancing AM spore germination and hyphal growth, which leads to more efficient mycorrhizal colonization (Sagar *et al.*, 2021). In return, the PGPB receive nourishment in the form of carbon-rich exudates from the AM fungi. This mutual enhancement results in a more robust root system that better absorbs nutrients and water, promoting plant growth and improving performance under various stresses (Wahid *et al.*, 2022).

The synergistic effect of dual inoculation with AM fungi and PGPB has been validated by several scientific studies. For example, in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars, HD-3086 and HD-2967, the co-application of *Bacillus subtilis* CP4 and the AM fungi *Glomus fasciculatum* significantly increased plant biomass and yield compared to single inoculation and uninoculated controls (Yadav *et al.*, 2021). Additionally, inoculating a strawberry variety (*Fragaria ananassa* var. Selva) with a consortium of AM fungi (*Rhizophagus intraradices*, *Glomus aggregatum*, *G. viscosum*, *Claroideoglomus etunicatum*, and *C. claroideum*) and *Pseudomonas fluorescens* Pf4 resulted in earlier flowering and fruiting, as well as increased yield and nutritional content (Bona *et al.*, 2015). In *Melissa officinalis* L., dual inoculation with the AM fungi *Glomus mosseae* and the PGPB *Azospirillum brasilense* Sp245 promoted plant growth and yield under water deficit conditions (Gorgi *et al.*, 2022). El-Sharkawy *et al.* (2022) found that inoculating *Rhizophagus irregularis* with the bacterium *Streptomyces viridosporus* HH1 improved growth parameters and induced defence responses in pea (*Pisum sativum* L.) against infection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*.

CONCLUSION

The use of mycorrhizae as biofertilizers is a cost-effective strategy for supplying essential nutrients and water and enhancing resilience to various environmental stresses, thereby contributing to sustainable, eco-friendly production that minimizes the use of agrochemicals and reduces environmental and human health risks. To fully harness the potential of AM fungi in enhancing the productivity of agroecosystems, it is essential to troubleshoot the negative effects of conventional agricultural practices on AM fungi, soil quality, ecosystem functioning, and human health. Therefore, to maximize the benefits of AM fungi, it is essential to develop an integrated management system, which is a comprehensive strategy that

combines multiple agricultural practices to increase the number, variety, and functioning of AM fungi. This enhancement aims to improve their symbiotic interaction of AM fungi with their host plants, thereby optimizing mycorrhizal advantages, leading to improved crop performance and agroecosystem sustainability while remaining within economic boundaries.

To achieve such a sustainable system, soil management practices like no-tillage farming or reduced tillage should be adopted, and cover crops should be implemented to promote soil aggregation and increase organic matter content in fields, creating a more favourable environment for mycorrhizal fungi, which will facilitate their growth and colonization of plant roots within agroecosystems. Besides soil management practices, nutrient management strategies should include the judicious application of fertilizers tailored to the specific needs of the crops and the existing soil nutrient levels to mitigate the suppression of mycorrhizal activity caused by excessive fertilization. Also, selecting crop varieties known to be highly responsive to mycorrhizal colonization is crucial to ensure that plants can successfully capitalize on the benefits provided by AM fungi.

An integrated management system should also incorporate strategies to introduce beneficial mycorrhizal fungi populations in the soil, taking into account the broader ecological context of the agroecosystem. This can be achieved by exploring native AM fungi and plant growth-promoting bacteria instead of relying on commercially available bioinoculants, as native populations are pre-adapted to the environment and can establish themselves better in the soil without promoting weed growth, which is often a concern with commercial bioinoculants (Duell *et al.*, 2022). Furthermore, fostering collaborative partnerships between government, researchers, and farmers is vital to facilitate the exchange of knowledge and best practices related to mycorrhizal management.

Additionally, investment in research and development for enhancing the infrastructure for propagule production and building a skilled workforce in this domain are critical to ensure their widespread adoption and success.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interest.

BIBLIOGRAPHY

- Aliyu, I. A., Yusuf, A. A., Uyovbisere, E. O., Masso, C. & Sanders, I. R. (2019). Effect of co-application of phosphorus fertilizer and in vitro-produced mycorrhizal fungal inoculants on yield and leaf nutrient concentration of cassava. *PLoS ONE* 14 (6): e0218969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218969>
- Ammar, E. E., Rady, H. A., Khattab, A. M., Amer, M. H., Mohamed, S. A., Elodamy, N. I., Al-Farga, A. & Aioub, A. A. A. (2023). A comprehensive overview of eco-friendly bio-fertilizers extracted from living organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 30 (53): 113119-113137. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30260-x>
- Ardestani, N. K., Zare-Maivan, H. & Ghanati, F. (2011). Effect of different concentrations of potassium and magnesium on mycorrhizal colonization of maize in pot culture. *African Journal of Biotechnology* 10 (73). <https://doi.org/10.5897/ajb11.556>
- Aseel, D. G., Rashad, Y. M. & Hammad, S. M. (2019). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Trigger Transcriptional Expression of Flavonoid and Chlorogenic Acid Biosynthetic Pathways Genes in Tomato against Tomato Mosaic Virus. *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46281-x>
- Aslantaş, R., Çakmakçı, R. & Şahin, F. (2007). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia Horticulturae* 111 (4): 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.016>
- Augé, R. M., Toler, H. D. & Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25 (1): 13-24. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0585-4>
- Bai, Z., Li, H., Yang, X., Zhou, B., Shi, X., Wang, B., Li, D., Shen, J., Chen, Q., Qin, W., Oenema, O. & Zhang, F. (2013). The critical soil P levels for crop yield, soil fertility and environmental safety in different soil types. *Plant Soil* 372: 27-37. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1696-y>
- Bakhshandeh, S., Corneo, P. E., Mariotte, P., Kertesz, M. A. & Dijkstra, F. A. (2017). Effect of crop rotation on mycorrhizal colonization and wheat yield under different fertilizer treatments. *Agriculture Ecosystems & Environment* 247: 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.027>
- Barros-Rodríguez, A., Pacheco, P., Peñas-Corte, M., Fernández-González, A. J., Cobo-Díaz, J. F., Enrique-Cruz, Y. & Manzanera, M. (2024). Comparative Study of *Bacillus*-Based Plant Biofertilizers: A proposed index. *Biology* 13 (9): 668. <https://doi.org/10.3390/biology13090668>

- Baslam, M. & Goicoechea, N. (2012). Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza* 22 (5): 347-359. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0408-9>
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N. & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant Growth Regulation: Implications in abiotic stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>
- Bencherif, K., Djaballah, Z., Brahimi, F., Boutekrabt, A., Dalpè, Y. & Sahraoui, A. L. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi affect total phenolic content and antimicrobial activity of *Tamarix gallica* in natural semi-arid Algerian areas. *South African Journal of Botany* 125: 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.024>
- Bennett, A. E. & Groten, K. (2022). The Costs and benefits of Plant–Arbuscular mycorrhizal fungal interactions. *Annual Review of Plant Biology* 73 (1): 649-672. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-124504>
- Bona, E., Lingua, G., Manassero, P., Cantamessa, S., Marsano, F., Todeschini, V., Copetta, A., D'Agostino, G., Massa, N., Avidano, L., Gamalero, E. & Berta, G. (2015). AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza* 25 (3): 181-193. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0599-y>
- Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F., Copetta, A., Lingua, G., D'Agostino, G., Gamalero, E. & Berta, G. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza* 27 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0727-y>
- Brachmann, A. & Parniske, M. (2006). The most widespread symbiosis on Earth. *PLoS Biology* 4 (7): e239. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040239>
- Brito, I., Goss, M. J., De Carvalho, M., Chatagnier, O. & Van Tuinen, D. (2012). Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 121: 63-67. <https://doi.org/10.1016/j.still.2012.01.012>
- Brundrett, M. C. & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220 (4): 1108-1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Cameron, D. D., Neal, A. L., Van Wees, S. C. & Ton, J. (2013). Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts?. *Trends in Plant Science* 18 (10): 539-545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.004>
- Castillo, C. G., Rubio, R., Rouanet, J. L. & Borie, F. (2006). Early effects of tillage and crop rotation on arbuscular mycorrhizal fungal propagules in an Ultisol. *Biology and Fertility of Soils* 43 (1): 83-92. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0067-0>

- Cavagnaro, T. R. (2014). Impacts of compost application on the formation and functioning of arbuscular mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemistry* 78: 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.007>
- Cavagnaro, T. R., Bender, S. F., Asghari, H. R. & Van Der Heijden, M. G. (2015). The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends in Plant Science* 20 (5): 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004>
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernández, C., Peña, R., Rodríguez, A. & Sanders, I. R. (2013). The *In Vitro* Mass-Produced Model Mycorrhizal Fungus, *Rhizophagus irregularis*, Significantly Increases Yields of the Globally Important Food Security Crop Cassava. *PLoS ONE* 8 (8): e70633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070633>
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E. & Reinhardt, D. (2018). Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – From ecology to Application. *Frontiers in Plant Science* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>
- Chitarra, W., Pagliarani, C., Maserti, B., Lumini, E., Siciliano, I., Cascone, P., Schubert, A., Gambino, G., Balestrini, R. & Guerrieri, E. (2016). Insights on the impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on tomato tolerance to water stress. *Plant Physiology* 171 (2): 1009-1023. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00307>
- Da Silva Campos, M. A. (2020). Bioprotection by arbuscular mycorrhizal fungi in plants infected with *Meloidogyne* nematodes: A sustainable alternative. *Crop Protection* 135: 105203. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105203>
- De Souza, P. V. D. (2000). Effect of arbuscular mycorrhizae and gibberellic acid interactions on vegetative growth of Carrizo citrange seedlings. *Ciência Rural* 30 (5): 783-787. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782000000500007>
- Dey, M. & Ghosh, S. (2022). Arbuscular mycorrhizae in plant immunity and crop pathogen control. *Rhizosphere* 22: 100524. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100524>
- Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P. I., Fall, D., Hoher, V. & Svistoonoff, S. (2020). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: Importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity* 12 (10): 370. <https://doi.org/10.3390/d12100370>
- Dowarah, B., Gill, S. S. & Agarwala, N. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi in conferring tolerance to biotic stresses in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 41 (4): 1429-1444. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10392-5>
- Duell, E. B., Cobb, A. B. & Wilson, G. W. T. (2022). Effects of commercial arbuscular mycorrhizal inoculants on plant productivity and Intra-Radical Colonization in Native Grassland: Unintentional De-Coupling of a symbiosis? *Plants* 11 (17): 2276. <https://doi.org/10.3390/plants11172276>

- El-Sharkawy, H. H. A., Rashad, Y. M. & Elazab, N. T. (2022). Synergism between *Streptomyces viridosporus* HH1 and *Rhizophagus irregularis* Effectively Induces Defense Responses to Fusarium Wilt of Pea and Improves Plant Growth and Yield. *Journal of Fungi* 8 (7): 683. <https://doi.org/10.3390/jof8070683>
- Etesami, H., Jeong, B. R. & Glick, B. R. (2021). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, Phosphate-Solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. *Frontiers in Plant Science* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>
- Eulenstein, F., Tauschke, M., Behrendt, A., Monk, J., Schindler, U., Lana, M. & Monk, S. (2017). The application of mycorrhizal fungi and organic fertilisers in horticultural potting soils to improve water use efficiency of crops. *Horticulturae* 3 (1): 8. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3010008>
- Evelin, H., Kapoor, R. & Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* 104 (7): 1263-1280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp251>
- Fall, A. F., Nakabonge, G., Ssekandi, J., Founoune-Mboup, H., Apori, S. O., Ndiaye, A., Badji, A. & Ngom, K. (2022). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on soil fertility: contribution in the improvement of physical, chemical, and biological properties of the soil. *Frontiers in Fungal Biology* 3. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.723892>
- Fasusi, O. A., Babalola, O. O. & Adejumo, T. O. (2023). Harnessing of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystem sustainability. *CABI Agriculture and Bioscience* 4 (1). <https://doi.org/10.1186/s43170-023-00168-0>
- Feilinezhad, A., Mirzaeiheydari, M., Babaei, F., Maleki, A. & Rostaminy, M. (2022). The effect of tillage, organic matter and mycorrhizal fungi on efficiency and productivity use of nutrients in maize. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 53 (20): 2719-2733. <https://doi.org/10.1080/00103624.2022.2072869>
- Feng, Z., Liu, X., Qin, Y., Feng, G., Zhou, Y., Zhu, H. & Yao, Q. (2023). Cooperation of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria to facilitate the host plant growth dependent on soil pH. *Frontiers in Microbiology* 14: 1116943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1116943>
- Ferreira-Suarez, D., García-Depraet, O. & Castro-Muñoz, R. (2024). A review on fungal-based biopesticides and biofertilizers production. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 283: 116945. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116945>
- Fiorilli, V., Vannini, C., Ortolani, F., Garcia-Seco, D., Chiapello, M., Novero, M., Domingo, G., Terzi, V., Morcia, C., Bagnaresi, P., Moulin, L., Bracale, M. & Bonfante, P. (2018). Omics approaches revealed how arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances yield and resistance to leaf pathogen in wheat. *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27622-8>

- Frank, A. B. (1885). Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 3: 128-145.
- Frey, S. D. (2019). Mycorrhizal fungi as mediators of soil organic matter dynamics. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 50 (1): 237-259. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062331>
- Gao, X., Guo, H., Zhang, Q., Guo, H., Zhang, L., Zhang, C., Gou, Z., Liu, Y., Wei, J., Chen, A., Chu, Z. & Zeng, F. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) enhanced the growth, yield, fiber quality and phosphorus regulation in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Scientific Reports* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59180-3>
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S. & Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 18 (11): 649-660. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>
- Getman-Pickering, Z. L., Stack, G. M. & Thaler, J. S. (2021). Fertilizer quantity and type alter mycorrhizae-conferred growth and resistance to herbivores. *Journal of Applied Ecology* 58 (5): 931-940. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13833>
- Ghorui, M., Chowdhury, S., Balu, P. & Burla, S. (2024). Arbuscular Mycorrhizal inoculants and its regulatory landscape. *Heliyon* 10 (9): e30359. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30359>
- Ghosh, S., Bhattacharya, D. & Verma, N. K. (2004). Mustard (*Brassica campestris* L.) cultivation reduces the vesicular-arbuscular mycorrhizal advantage of successive crops. *Mycorrhiza News* 16 (2): 12-14.
- Ghosh, S., Bhowmik, S. & Dutta, S. S. (2024). Challenges in Application of Arbuscular Mycorrhizal Inocula in Conventional Agriculture. In: Parihar, M., Rakshit, A., Adholeya, A. and Chen, Y (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Sustainable Agriculture: Inoculum Production and Application*. Singapore, Springer, (pp. 229–252). https://doi.org/10.1007/978-981-97-0296-1_11
- Gianinazzi, S. & Vosátka, M. (2004). Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Canadian Journal of Botany* 82 (8): 1264-1271. <https://doi.org/10.1139/b04-072>
- Gorgi, O. E., Fallah, H., Niknejad, Y. & Tari, D. B. (2022). Effect of Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizal fungi inoculations on essential oil in *Melissa officinalis* L. under drought stress. *Biologia* 77 (1): 11-20. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00919-2>
- Gosling, P., Ozaki, A., Jones, J., Turner, M., Rayns, F. & Bending, G. D. (2010). Organic management of tilled agricultural soils results in a rapid increase in colonisation potential and spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture Ecosystems & Environment* 139 (1-2): 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.08.013>
- Grümberg, B. C., Urcelay, C., Shroeder, M. A., Vargas-Gil, S. & Luna, C. M. (2015). The role of inoculum identity in drought stress mitigation

- by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. *Biology and Fertility of Soils* 51 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0942-7>
- Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L. & Masmoudi, K. (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01787>
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R. & Liu, J. (2002). A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell* 14 (10): 2413-2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>
- Hart, M. M., Antunes, P. M., Chaudhary, V. B. & Abbott, L. K. (2018). Fungal inoculants in the field: Is the reward greater than the risk? *Functional Ecology* 32 (1): 126-135. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12976>
- Hawkins, H., Cargill, R. I., Van Nuland, M. E., Hagen, S. C., Field, K. J., Sheldrake, M., Soudzilovskaia, N. A. & Kiers, E. T. (2023). Mycorrhizal mycelium as a global carbon pool. *Current Biology* 33 (11): R560-R573. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.02.027>
- Heklau, H., Schindler, N., Buscot, F., Eisenhauer, N., Ferlian, O., Salcedo, L. D. P. & Bruehlheide, H. (2021). Mixing tree species associated with arbuscular or ectotrophic mycorrhizae reveals dual mycorrhization and interactive effects on the fungal partners. *Ecology and Evolution* 11 (10): 5424-5440. <https://doi.org/10.1002/ece3.7437>
- Hijri, M. (2016). Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza* 26 (3): 209-214. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0661-4>
- Hildermann, I., Messmer, M., Dubois, D., Boller, T., Wiemken, A. & Mäder, P. (2010). Nutrient use efficiency and arbuscular mycorrhizal root colonisation of winter wheat cultivars in different farming systems of the DOK long-term trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture* n/a. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4048>
- Hu, D., Baskin, J. M., Baskin, C. C., Wang, Z., Zhang, S., Yang, X. & Huang, Z. (2019). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and achene mucilage have independent functions in seedling growth of a desert shrub. *Journal of Plant Physiology* 232: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.11.010>
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W. & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: Recalibrating Targets for Sustainable Intensification. *BioScience* 67 (4): 386-391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Igiehon, N. O. & Babalola, O. O. (2017). Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (12): 4871-4881. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8344-z>
- Jakobsen, I., Abbott, L. K. & Robson, A. D. (1992). External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifoli-*

- um subterraneum* L. *New Phytologist* 120 (3): 371-380. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01077.x>
- Jansa, J., Erb, A., Oberholzer, H., Šmilauer, P. & Egli, S. (2014). Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Molecular Ecology* 23 (8): 2118-2135. <https://doi.org/10.1111/mec.12706>
- Jin, H., Germida, J. J. & Walley, F. L. (2013). Suppressive effects of seed-applied fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) differ with fungicide mode of action and AMF species. *Applied Soil Ecology* 72: 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.013>
- Johansen, A., Jakobsen, I. & Jensen, E. S. (1993). External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist* 124 (1): 61-68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03797.x>
- Johnson, D., Martin, F., Cairney, J. W. G. & Anderson, I. C. (2012). The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New Phytologist* 194 (3): 614-628. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04087.x>
- Kaur, S. & Suseela, V. (2020). Unraveling arbuscular Mycorrhiza-Induced changes in plant primary and secondary metabolome. *Metabolites* 10 (8): 335. <https://doi.org/10.3390/metabo10080335>
- Kafle, A., Cope, K. R., Rath, R., Yakha, J. K., Subramanian, S., Bücking, H. & Garcia, K. (2019). Harnessing soil microbes to improve plant phosphate efficiency in cropping systems. *Agronomy* 9 (3): 127. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030127>
- Kaiser, C., Kilburn, M. R., Clode, P. L., Fuchslueger, L., Koranda, M., Cliff, J. B., Solaiman, Z. M. & Murphy, D. V. (2014). Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: mycorrhizal pathway vs direct root exudation. *New Phytologist* 205 (4): 1537-1551. <https://doi.org/10.1111/nph.13138>
- Kenrick, P. & Strullu-Derrien, C. (2014). The origin and early evolution of roots. *Plant Physiology* 166 (2): 570-580. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244517>
- Kinge, T. R., Ghosh, S., Cason, E. D. & Gryzenhout, M. (2022). Characterization of the Endophytic Mycobiome in Cowpea (*Vigna unguiculata*) from a Single Location Using Illumina Sequencing. *Agriculture* 12 (3): 333. <https://doi.org/10.3390/agriculture12030333>
- Kirkegaard, J. & Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil* 201 (1): 71-89. <https://doi.org/10.1023/a:1004364713152>
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S. & Saxena, A. K. (2020). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23: 101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>

- Kumar, A., Singh, R. & Adholeya, A. (2017). Biotechnological advancements in industrial production of arbuscular mycorrhizal fungi: achievements, challenges, and future prospects. In: Satyanarayana, T., Deshmukh, S. and Johri, B. (Eds.), *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. Singapore, Springer, (pp. 413–431). https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_21
- Kuyper, T. W. & Jansa, J. (2023). Arbuscular mycorrhiza: advances and retreats in our understanding of the ecological functioning of the mother of all root symbioses. *Plant and Soil* 489 (1-2): 41-88. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06045-z>
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants* 8 (4): 94. <https://doi.org/10.3390/antiox8040094>
- Lehmann, J., Hansel, C. M., Kaiser, C., Kleber, M., Maher, K., Manzoni, S., Nunan, N., Reichstein, M., Schimel, J. P., Torn, M. S., Wieder, W. R. & Kögel-Knabner, I. (2020). Persistence of soil organic carbon caused by functional complexity. *Nature Geoscience* 13 (8): 529-534. <https://doi.org/10.1038/s41561-020-0612-3>
- Leifheit, E. F., Veresoglou, S. D., Lehmann, A., Morris, E. K. & Rillig, M. C. (2014). Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation—a meta-analysis. *Plant and Soil* 374 (1-2): 523-537. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1899-2>
- Lindahl, B. D., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S. E., Högberg, P., Stenlid, J. & Finlay, R. D. (2007). Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173 (3): 611-620. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01936.x>
- Linderman, R. G. & Davis, E. A. (2001). Comparative Response of Selected Grapevine Rootstocks and Cultivars to Inoculation with Different Mycorrhizal Fungi. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (1): 8-11. <https://doi.org/10.5344/ajev.2001.52.1.8>
- López-Ráez, J. A., Pozo, M. J. & García-Garrido, J. M. (2011). Strigolactones: a cry for help in the rhizosphere. *Botany* 89 (8): 513-522. <https://doi.org/10.1139/b11-046>
- López-Ráez, J. A., Shirasu, K. & Foo, E. (2017). Strigolactones in Plant Interactions with Beneficial and Detrimental Organisms: The Yin and Yang. *Trends in Plant Science* 22 (6): 527-537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.03.011>
- Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G. V., Breakspear, A., Oldroyd, G. E. D. & Eastmond, P. J. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science* 356 (6343): 1175-1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>
- Madawala, H. M. S. P. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi as biofertilizers: Current trends, challenges, and future prospects. In: Rakshit, A., Meena, V.S., Parihar, M., Singh, H.B. and Singh, A.K (Eds.), *Biofertil-*

- izers: *Advances in Bio-Inoculants*. Cambridge, Woodhead Publishing (pp. 83–93). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821667-5.00029-4>
- Martín-Rodríguez, J. A., Huertas, R., Ho-Plágaro, T., Ocampo, J. A., Turečková, V., Tarkowská, D., Ludwig-Müller, J. & García-Garrido, J. M. (2016). Gibberellin–Absciscic Acid Balances during Arbuscular Mycorrhiza Formation in Tomato. *Frontiers in Plant Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01273>
- Miransari, M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances* 29 (6): 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.006>
- Miransari, M., Bahrami, H., Rejali, F. & Malakouti, M. (2009). Effects of arbuscular mycorrhiza, soil sterilization, and soil compaction on wheat (*Triticum aestivum* L.) nutrients uptake. *Soil and Tillage Research* 104 (1): 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.still.2008.11.006>
- Mukhongo, R. W., Tumuhairwe, J. B., Ebanyat, P., AbdelGadir, A. A. H., Thuita, M. N., & Masso, C. (2016). Production and use of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum in Sub-Saharan Africa: Challenges and ways of improving. *International Journal of Soil Science* 11 (3): 108–122. <https://doi.org/10.3923/ijss.2016.108.122>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A. & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32 (2): 429–448. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>
- Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Singh, P. K. & Choudhary, A. (2020). Microbial formulation and growth of cereals, pulses, oilseeds and vegetable crops. *Sustainable Environment Research* 30 (1). <https://doi.org/10.1186/s42834-020-00051-x>
- Neumann, E. & George, E. (2010). Nutrient uptake: The arbuscular mycorrhiza fungal symbiosis as a plant nutrient acquisition strategy. In: Koltai, H., Kapulnik, Y. (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Dordrecht, Springer, (pp. 137–167). https://doi.org/10.1007/978-90-481-9489-6_7
- Nguvo, K. J. & Gao, X. (2019). Weapons hidden underneath: bio-control agents and their potentials to activate plant induced systemic resistance in controlling crop Fusarium diseases. *Journal of Plant Diseases and Protection* 126 (3): 177–190. <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00222-y>
- Njeru, E. M., Avio, L., Bocci, G., Sbrana, C., Turrini, A., Bàrberi, P., Giovannetti, M. & Oehl, F. (2015). Contrasting effects of cover crops on ‘hot spot’ arbuscular mycorrhizal fungal communities in organic tomato. *Biology and Fertility of Soils* 51 (2): 151–166. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0958-z>
- Nosheen, S., Ajmal, I. & Song, Y. (2021). Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. *Sustainability* 13 (4): 1868. <https://doi.org/10.3390/su13041868>

- Nziguheba, G. & Smolders, E. (2008). Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *The Science of the Total Environment* 390 (1): 53-57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.031>
- Ouledali, S., Ennajeh, M., Ferrandino, A., Khemira, H., Schubert, A. & Secchi, F. (2019). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on the control of stomata functioning by abscisic acid (ABA) in drought-stressed olive plants. *South African Journal of Botany* 121: 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.024>
- Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C. & Briggs, S. P. (2002). Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (20): 13324-13329. <https://doi.org/10.1073/pnas.202474599>
- Patanita, M., Campos, M. D., Félix, M. D. R., Carvalho, M. & Brito, I. (2020). Effect of Tillage System and Cover Crop on Maize Mycorrhization and Presence of *Magnaportheopsis maydis*. *Biology* 9 (3): 46. <https://doi.org/10.3390/biology9030046>
- Pellegrino, E., Gamper, H. A., Ciccolini, V. & Ercoli, L. (2020). Forage rotations conserve diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and soil fertility. *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02969>
- Powell, J. R. & Rillig, M. C. (2018). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. *New Phytologist* 220 (4): 1059-1075. <https://doi.org/10.1111/nph.15119>
- Qin, Z., Tian, Y., Hao, W., Zhang, J., Feng, G., Christie, P. & Gai, J. (2024). Identifying the predictors of mycorrhizal response under multiple fertilization regimes. *Agriculture Ecosystems & Environment* 365: 108926. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2024.108926>
- Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N. & Bucher, M. (2001). A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414 (6862): 462-465. <https://doi.org/10.1038/35106601>
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B. & Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23 (7): 515-531. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0486-y>
- Rivero, J., Gamir, J., Aroca, R., Pozo, M. J. & Flors, V. (2015). Metabolic transition in mycorrhizal tomato roots. *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00598>
- Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M., De Pascale, S., Bonini, P. & Colla, G. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 196: 91-108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002>
- Sabia, E., Claps, S., Morone, G., Bruno, A., Sepe, L. & Aleandri, R. (2015). Field inoculation of arbuscular mycorrhiza on maize (*Zea mays* L.)

- under low inputs: preliminary study on quantitative and qualitative aspects. *Italian Journal of Agronomy* 10 (1): 30-33. <https://doi.org/10.4081/ija.2015.607>
- Sagar, A., Rathore, P., Ramteke, P. W., Ramakrishna, W., Reddy, M. S. & Pecoraro, L. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria, arbuscular mycorrhizal fungi and their synergistic interactions to counteract the negative effects of saline soil on agriculture: key macromolecules and mechanisms. *Microorganisms* 9 (7): 1491. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071491>
- Säle, V., Aguilera, P., Laczko, E., Mäder, P., Berner, A., Zihlmann, U., Van Der Heijden, M. G. & Oehl, F. (2015). Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 84: 38-52. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.005>
- Samantaray, A., Chattaraj, S., Mitra, D., Ganguly, A., Kumar, R., Gaur, A., Mohapatra, P. K., De Los Santos-Villalobos, S., Rani, A. & Thatoi, H. (2024). Advances in microbial based bio-inoculum for amelioration of soil health and sustainable crop production. *Current Research in Microbial Sciences* 7: 100251. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100251>
- Sanmartín, N., Sánchez-Bel, P., Pastor, V., Pastor-Fernández, J., Mateu, D., Pozo, M. J., Cerezo, M. & Flors, V. (2020). Root-to-shoot signalling in mycorrhizal tomato plants upon *Botrytis cinerea* infection. *Plant Science* 298: 110595. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110595>
- Santander, C., Aroca, R., Cartes, P., Vidal, G. & Cornejo, P. (2021). Aquaporins and cation transporters are differentially regulated by two arbuscular mycorrhizal fungi strains in lettuce cultivars growing under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 158: 396-409. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.025>
- Sawers, R. J. H., Svane, S. F., Quan, C., Grønlund, M., Wozniak, B., Gebre-selassie, M., González-Muñoz, E., Montes, R. a. C., Baxter, I., Goudet, J., Jakobsen, I. & Paszkowski, U. (2017). Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytologist* 214 (2): 632-643. <https://doi.org/10.1111/nph.14403>
- Schliemann, W., Ammer, C. & Strack, D. (2008). Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69 (1): 112-146. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.032>
- Shahwar, D., Mushtaq, Z., Mushtaq, H., Alqarawi, A. A., Park, Y., Alshahrani, T. S. & Faizan, S. (2023). Role of microbial inoculants as bio fertilizers for improving crop productivity: A review. *Heliyon* 9 (6): e16134. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16134>
- Sharma, S., Prasad, R., Varma, A. & Sharma, A. K. (2017). Glycoprotein Associated with *Funneliformis coronatum*, *Gigaspora margarita* and *Acaulospora scrobiculata* Suppress the Plant Pathogens In vitro. *Asian*

- Journal of Plant Pathology* 11 (4): 199-202. <https://doi.org/10.3923/ajp-paj.2017.199.202>
- Smith, S. E. & Smith, F. A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review of Plant Biology* 62 (1): 227-250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Song, Y., Chen, D., Lu, K., Sun, Z. & Zeng, R. (2015). Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00786>
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M. & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108 (5): 1028-1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Stephenson, J., Crane, S. F., Levy, C. & Maslin, M. (2013). Population, development, and climate change: links and effects on human health. *The Lancet* 382 (9905): 1665-1673. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61460-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61460-9)
- Thompson, J. P., Clewett, T. G. & Fiske, M. L. (2013). Field inoculation with arbuscular-mycorrhizal fungi overcomes phosphorus and zinc deficiencies of linseed (*Linum usitatissimum*) in a vertisol subject to long-fallow disorder. *Plant and Soil* 371 (1-2): 117-137. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1679-z>
- Tiamtanong, S., Sinma, K., Mala, T., Rungcharoenthong, P. & Amkha, S. (2015). Effects of Mycorrhizal Fungi with Phosphate Fertilizer Applications on Phosphate Solubilizing and Soil Properties of Grapes Orchard. *Modern Applied Science* 9 (1). <https://doi.org/10.5539/mas.v9n1p149>
- Van Der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M. & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205 (4): 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Verbruggen, E., Van Der Heijden, M. G. A., Weedon, J. T., Kowalchuk, G. A. & Rölting, W. F. M. (2012). Community assembly, species richness and nestedness of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Molecular Ecology* 21 (10): 2341-2353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05534.x>
- Vierheilig, H., Steinkellner, S., Khaosaad, T. & Garcia-Garrido, J. M. (2008). The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? In *Mycorrhiza* (pp. 307-320). https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_15
- Vyas, S. C. & Vyas, S. (2000). Effect of agrochemicals on mycorrhizae. In: Mukerji, K.G., Chamola, B.P. and Singh, J (Eds.), *Mycorrhizal Biology*.

- Boston, Springer, (pp. 289–327). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4265-0_18
- Wahid, F., Sharif, M., Fahad, S., Ali, A., Adnan, M., Rafiullah, N., Saud, S., Danish, S., Ali, M. A., Ahmed, N., Arslan, H., Arslan, D., Erman, M., Sabagh, A. E., Gholizadeh, F. & Datta, R. (2022). Mycorrhiza and phosphate solubilizing bacteria: Potential bioagents for sustainable phosphorus management in agriculture. *Phyton* 91 (2): 257-278. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.016512>
- Walder, F., Niemann, H., Natarajan, M., Lehmann, M. F., Boller, T. & Wiemken, A. (2012). Mycorrhizal Networks: Common Goods of Plants Shared under Unequal Terms of Trade. *Plant Physiology* 159 (2): 789-797. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195727>
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N. & Wang, E. (2017). Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant* 10 (9): 1147-1158. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
- Wang, Y., Wang, M., Li, Y., Wu, A. & Huang, J. (2018). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nitrogen uptake of *Chrysanthemum morifolium* under salt stress. *PLoS ONE* 13 (4): e0196408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196408>
- Waters, M. T., Gutjahr, C., Bennett, T. & Nelson, D. C. (2017). Strigolactone Signaling and Evolution. *Annual Review of Plant Biology* 68 (1): 291-322. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040925>
- Yadav, R., Ror, P., Rathore, P., Kumar, S. & Ramakrishna, W. (2021). *Bacillus subtilis* CP4, isolated from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi promotes biofortification, yield and metabolite production in wheat under field conditions. *Journal of Applied Microbiology* 131 (1): 339-359. <https://doi.org/10.1111/jam.14951>
- Yooyongwech, S., Phaukinsang, N., Cha-Um, S. & Supaibulwatana, K. (2013). Arbuscular mycorrhiza improved growth performance in *Macadamia tetraphylla* L. grown under water deficit stress involves soluble sugar and proline accumulation. *Plant Growth Regulation* 69 (3): 285-293. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9771-6>
- Yu, L., Zhang, W., Geng, Y., Liu, K. & Shao, X. (2022). Cooperation with arbuscular mycorrhizal fungi increases plant nutrient uptake and improves defenses against insects. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.833389>
- Zeng, L., Jian-fu, L., Jian-fu, L. & Ming-yuan, W. (2014). Effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on citrus quality under nature conditions. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* 27 (5): 2101-2105. <https://doi.org/10.16213/j.cnki.scjas.2014.05.067>
- Zhang, J., Zhao, R., Li, X. & Zhang, J. (2024). Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for soil health: A review. *Pedosphere* 34 (2): 279-288. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2024.02.002>

Zhang, X., Dong, W., Sun, J., Feng, F., Deng, Y., He, Z., Oldroyd, G. E. & Wang, E. (2015). The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *The Plant Journal* 81 (2): 258-267. <https://doi.org/10.1111/tpj.12723>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Epizoic diatom communities on chitons (Mollusca: Polyplacophora) and southern king crabs (Crustacea: Decapoda) from central coastal waters of San Jorge Gulf (Patagonian Sea, South Atlantic Ocean)

Comunidades de diatomeas epizoicas sobre quitones (Mollusca: Polyplacophora) y centollas (Crustacea: Decapoda) de aguas costeras centrales del Golfo San Jorge (Mar Patagónico, Océano Atlántico Sur)

Lameiro, Rubén A.^{1,2*} ; Adrián O. Cefarelli^{1,2} ; Aimé K. Astrada^{1,2} ; Amelia A. Vouilloud³ 

¹ Instituto Multidisciplinario para la Investigación y el Desarrollo Productivo y Social de la Cuenca Golfo San Jorge, CONICET-UNPSJB, Ruta Provincial N° 1 (Km. 4), Ciudad Universitaria, (U9005) Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

² Instituto de Desarrollo Costero, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Ruta Provincial N° 1 (Km. 4), Ciudad Universitaria, (U9005) Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/no. (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

* Corresponding author: <ralameiro@gmail.com>

Abstract

Diatoms constitute one of the most diverse groups of marine microalgae worldwide, both free-living as well as associated with different types of substrata. In particular, marine benthic macroinvertebrates represent surfaces to which diatoms can attach. The present study aims to characterize the diversity of diatom communities associated with chitons and southern king crabs from coastal waters of San Jorge Gulf (South Atlantic Ocean), and to analyze possible differences in diatom diversity among those communities according to the animal substrata, the environment and season of the year. For this purpose, we conduct-

► Ref. bibliográfica: Lameiro, R. A.; Cefarelli, A. O.; Astrada, A. K.; Vouilloud, A. A. 2025. Epizoic diatom communities on chitons (Mollusca: Polyplacophora) and southern king crabs (Crustacea: Decapoda) from central coastal waters of San Jorge Gulf (Patagonian Sea, South Atlantic Ocean). *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 223-246. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2178>

► Recibido: 31 de marzo 2025 – Aceptado: 21 de mayo 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.



OPEN ACCESS

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

ed manual samplings to collect chitons from the intertidal, and sea diving samplings to collect southern king crabs from the subtidal at different sampling sites near Comodoro Rivadavia during winter 2018 and summer and winter 2024. Each specimen was carefully brushed and scraped to obtain microalgal material, which was subsequently processed using conventional methods and analyzed under both light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM). We estimated the relative abundance (%) of the identified diatom taxa as well as species richness (S), Shannon-Weaver diversity index (H') and Pielou's Evenness index (J) for each sample for comparison. Epizoic diatom communities included 43 taxa in Polyplacophorans and 62 in Decapods, mainly pennate diatoms with a scarce representation of centric diatoms. Solitary diatoms were the most frequent, with adnate, erect and motile forms recognized; various various morphological types of colonies were also recorded. We observed significant differences ($\alpha=0.05$) in diatom diversity between the 2024 summer and winter for each invertebrate; however, no significant differences were found between the 2018 and 2024 winter samples. Polyplacophorans were studied for the first time as diatom hosts, and direct evidence of diatom attachment to the surface of both hosts is provided. This research study represents an important contribution to the knowledge of marine epizoic diatoms.

Keywords: Diatoms diversity; epibiosis; marine benthic macroinvertebrates; Patagonian Sea.

Resumen

Las diatomeas constituyen uno de los grupos de microalgas marinas más diverso a nivel mundial, tanto de vida libre como asociadas a diferentes tipos de sustratos. En particular, los macroinvertebrados bentónicos marinos representan superficies a las cuales las diatomeas se pueden adherir. Los objetivos del presente estudio son caracterizar la diversidad de las comunidades de diatomeas asociadas a quitones y centollas de aguas costeras del Golfo San Jorge (Océano Atlántico Sur) y analizar posibles diferencias en la diversidad de diatomeas entre dichas comunidades según el sustrato animal, el ambiente y la estación del año. Se realizaron muestreos manuales para coleccionar quitones del intermareal y muestreos mediante buceo autónomo para coleccionar centollas del submareal de sitios cercanos a Comodoro Rivadavia en Invierno de 2018 y Verano e Invierno de 2024. Cada ejemplar fue cepillado y raspado cuidadosamente para obtener el material microalgal que fue posteriormente tratado por métodos convencionales y analizado con microscopía de luz y electrónica de barrido. En cada muestra se estimó la Abundancia Relativa (%) de los taxa de diatomeas identificados así como la Riqueza Específica (S), Índice de Shannon-Weaver (H') y el Índice de Equitatividad de Pielou (J) para su comparación. Las comunidades de diatomeas epizoicas incluyeron 43 taxa en quitones y 62 taxa en centollas, siendo la mayoría diatomeas pennadas con escasa representación de diatomeas centrales. Las formas solitarias fueron las más frecuentes, reconociéndose formas adnatas, erectas y móviles; asimismo se registraron colonias

de diversa morfología. Se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre la diversidad de diatomeas de verano e invierno de 2024 para cada invertebrado, no así entre los inviernos de 2018 y 2024. Los quitones fueron estudiados por primera vez como hospedadores de diatomeas y se proporciona evidencia directa de la adhesión de diatomeas a la superficie de ambos hospedadores. Este trabajo representa una contribución al conocimiento de las diatomeas epizoicas marinas.

Palabras clave: Diversidad de diatomeas; epibiosis; macroinvertebrados bentónicos marinos; Mar Patagónico.

INTRODUCTION

Diatoms constitute one of the major and most diverse components of marine communities worldwide, contributing substantially to the marine primary productivity. In benthic environments they may live freely or associated with different types of substrata such as sand, rocks or even other organisms like algae (epiphytic diatoms) or animals (epizoic diatoms) (Round, 1971; Round *et al.*, 1990). Epibiont diatoms usually present highly silicified frustules and exhibit multiple mechanisms for attachment: some diatoms are adnate and attach strongly to their host's surface while other produce abundant mucilage that allow them to form mucilage stalks or pads for adhesion (Tiffany, 2011). Diatoms may be solitary or colonial or even constitute monospecific or polyspecific aggregations. When analyzing the diatom-animal association, diatoms may benefit by gaining protection against grazing, by accessing to higher nutrients and carbon dioxide concentrations produced by the animal metabolism and also by avoiding resuspension in sediments. Animals may benefit by capturing higher amounts of oxygen produced by photosynthesis, gaining camouflage against predators or, in some cases, they may be affected by a high density of diatoms that might reduce considerably their motility or even interfere with their reproduction (Totti *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2018). The diatom-animal association may have a degree of specificity that allows the identification of generalist and specialist diatoms that may live in many or a few animal hosts, respectively. In order to characterize the species diversity, spatial distribution, abundance and ecological aspects of the epizoic diatoms, it is important to consider the hardness and chemical composition of the animal substrata as well as environmental conditions (Tiffany, 2011).

Studies on epizoic diatoms have increased in the past decades, with records of diatoms associated to marine copepods (Hiromi *et al.*, 1985; Gómez *et al.*, 2018; Purushothaman *et al.*, 2024), sessile marine invertebrates such as sponges and cnidarians (Totti *et al.*, 2005, 2011; Romagnoli *et al.*, 2007), hard-shelled mollusks and crustaceans (Round, 1971; Gillan & Cadée, 2000; D'Alelio *et al.*, 2011; Madkour *et al.*, 2012) and also in vertebrates such as

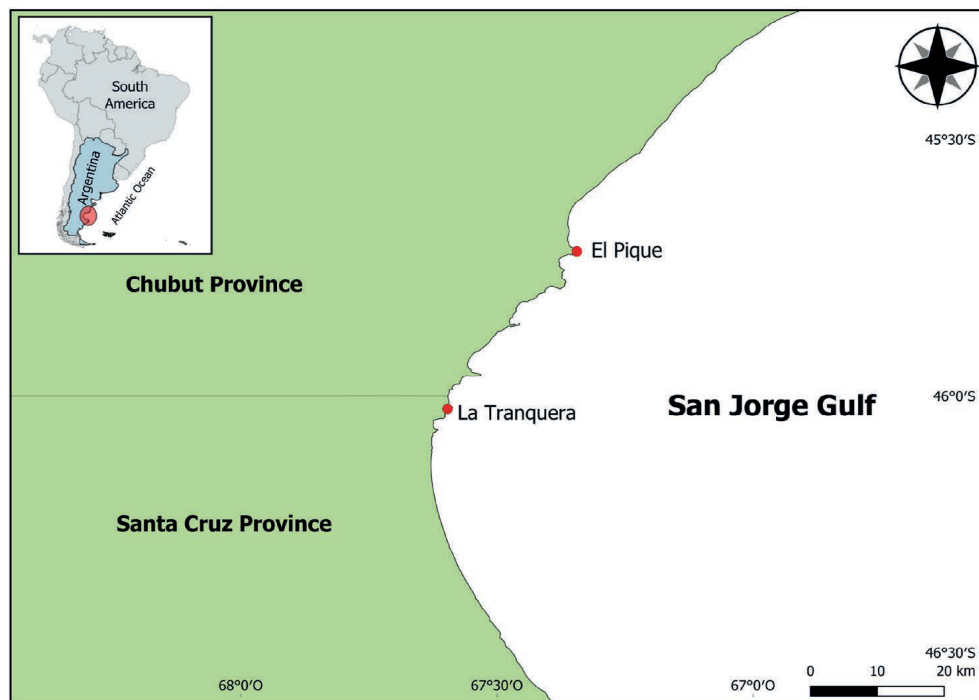


Fig. 1. Map of the San Jorge Gulf indicating the sampling sites (red dots).

Fig. 1. Mapa del Golfo San Jorge indicando los sitios de muestreo (puntos rojos).

sea turtles carapaces (Majewska *et al.*, 2015, 2021), seabird feathers (Holmes & Croll, 1984) and the skin of cetaceans (Nemoto 1958; Nemoto *et al.*, 1977; Holmes, 1985; Ferrario *et al.*, 2019; Ten *et al.*, 2022). In Argentina, Dr. Joaquín Frenguelli was a pioneer in the study of freshwater and marine diatom diversity, having described and characterized benthic diatoms along the Argentine Sea (Frenguelli 1930, 1938, 1939a, b). He analyzed samples obtained from the scrapping or washing of both marine macroalgae and macroinvertebrates, such as sponges, gastropod mollusks, bryozooans, ascidians, echinoderms and crustaceans, alongside marine sediments, which can be considered nowadays as early records of marine epibiont diatoms in Argentine waters. Later on, Sar and Sunesen (2014), Sunesen *et al.* (2015), Ferrario *et al.* (2019) and Cefarelli *et al.* (2024) recorded and described epizoic taxa, but this topic still remains as an unexplored subject with potential future prospects in the region.

This is a preliminary study of epizoic diatom diversity in San Jorge Gulf whose aim is to characterize the diatom flora associated to two benthic macroinvertebrates in the area, particularly chitons and the southern king crab. Additionally, possible differences according to the animal substrata, their environment and season of the year are evaluated. This will lead to a better understanding of the diversity and structure of epizoic diatoms communities on the study area.

MATERIAL AND METHODS

San Jorge Gulf is located in the mid-Atlantic Patagonian waters, between approximately 45°S and 47°S, covering about 40,000 km² with the predominance of coarse sediments in coastal areas (Reta, 1986; Fernández *et al.*, 2005). This gulf is considered one of the Southern Hemisphere's most productive ecosystems and its benthic environment supports a great diversity of living organisms (Longhurst, 2007; Dans *et al.*, 2020).

The macroinvertebrates collected in this study included Polyplacophoran Mollusks *Plaxiphora aurata* Spalowsky 1795 (Chiton) and the Decapod Crustacean *Lithodes santolla* Molina 1782 (Southern King Crab, SKC). They were collected in La Tranquera sampling site (46°01'31" S, 67°35'47" W, San Jorge Gulf) during summer (20 and 21-XII-2023) and winter (28-VII-2024 and 08-VIII-2024) of 2024. Additionally, exploratory SKC samples were collected during 2018 winter (01-VII-2018) at the same sampling site (Fig. 1). Chitons were collected by manual samplings in the intertidal zone during low tides whereas SKC were collected by sea diving in the subtidal zone at a depth between 12-15 m. Given the scarce and random distribution of SKC in the subtidal environment, at least three specimens of each invertebrate species under study were collected during each seasonal sampling (Fig. 2).

Sampled macroinvertebrates specimens were carefully brushed, scrapped and finally rinsed with filtered sea water *in situ*. This same proceeding was applied to a similar area of the rocky surface located in the proximities of the sampled invertebrates and constitute the corresponding environmental samples (except for 2018 winter when no environmental sample was taken).

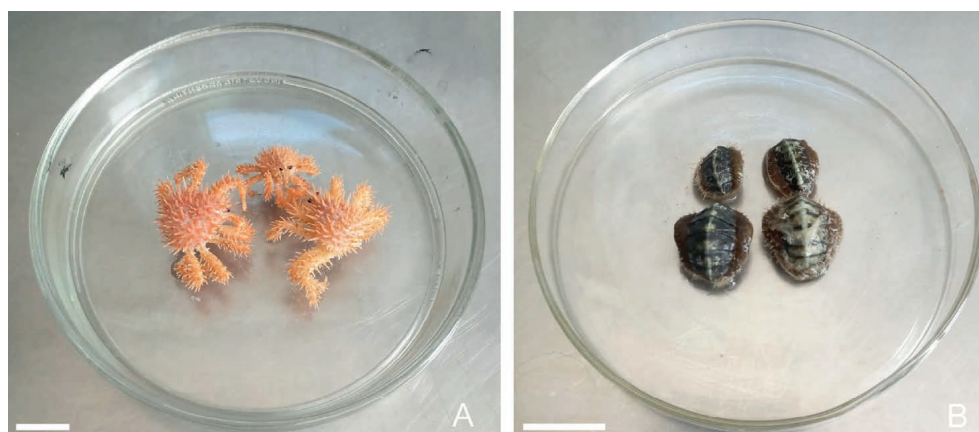


Fig. 2. Specimens of analyzed macroinvertebrates. A) *Lithodes santolla*. B) *Plaxiphora aurata*.

Fig. 2. Especímenes de los macroinvertebrados analizados. A) *Lithodes santolla*. B) *Plaxiphora aurata*.

All samples were fixed *in situ*, the 2018 winter and 2024 summer samples were fixed with 4% formaldehyde solution (due to processing later in time) while 2024 winter samples were fixed with 70% ethanol (due to processing briefly after sampling). In each case, the obtained microalgal material was treated to remove the organic matter according to Prygiel & Coste (2000). The cleaned material was mounted for light (LM) and scanning electron microscopy (SEM) according to Ferrario *et al.* (1995). Permanent slides were made with Naphrax medium. Permanent slides, SEM material as well as the remaining treated microalgal material fixed with 4% formaldehyde solution (preserved in appropriately labeled Eppendorf tubes) are stored at Instituto de Desarrollo Costero (IDC – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, UNPSJB) as a part of the “Colección de Diatomeas Epizoicas del Golfo San Jorge” for further studies.

Also, we had access to three chiton specimens from El Pique sampling site (45°43'06" S, 67°20'38" W, San Jorge Gulf) (Fig. 1) from 2023 winter (25-VII-2023) and a SKC moult from La Tranquera sampling site (August 2023) in order to determine the presence of diatoms directly attached to Polyplacophoran's spines and Decapod's carapace with LM and SEM.

The slides were examined using a Differential Interference Contrast (DIC) Leica DM2500 LM equipped with a Leica DFC420 digital camera and a DIC Olympus BX51 LM equipped with an Olympus DP71 digital camera. The SEM material was examined in different microscope services from Argentina including a Jeol JSM-6510 LV SEM from UNPSJB, a C. Zeiss Gemini 1 SEM from “Bernardino Rivadavia Museum” (MACN) microscopy service, a C. Zeiss Crossbeam 340 SEM from LANAIS-MIE (UBA-CONICET), a C. Zeiss (FE-SEM) Supra 40 from “Centro de Microscopías Avanzadas” (FCEN-UBA) and a C. Zeiss Sigma SEM from “Laboratorio de Análisis Materiales por Espectrometría de Rayos X” (LAMARX, UNC).

The Relative Abundance (RA) of diatoms on macroinvertebrates samples from 2018 winter and 2024 summer and winter were estimated by counting a minimum of 400 valves per permanent slide at a magnification of 1000x using a DIC Olympus BX51 LM and oil immersion, the results being expressed in percentages (Prygiel & Coste, 2000; Cefarelli *et al.*, 2024). It is important to remark that we could not estimate the relative abundance of environmental samples due to the impossibility of reaching the minimum amount of 400 valves thus we only indicate the presence of diatom taxa on those samples. We also estimated different diversity indexes such as Specific Richness (S), the Shannon-Weaver diversity index (H') and Pielou's Evenness index (J) in order to characterize each diatom community. Finally, Hutcheson's *t*-tests were applied to compare the H' indexes estimated for each seasonal sample and determine possible differences between them (Zar, 2010):

$$t = \frac{H'_1 - H'_2}{S_{H'_1} - S_{H'_2}}$$

where:

$$S_{H'_1} - S_{H'_2} = \sqrt{S_{H'_1}^2 + S_{H'_2}^2}$$

and the variance of each H' was approximated by:

$$S_{H'}^2 = \frac{\sum f_i \cdot \log^2 f_i - (\sum f_i \cdot \log f_i)^2 / n}{n^2}$$

where: n , sample size

f_i , number of observations in category i .

Indexes and t -tests were calculated using Microsoft Excel (Windows 10, 2024) with a significance level (α) of 0.05.

The estimated indexes constitute a preliminary effort to study possible similarities and differences in between the diatom communities associated to the macroinvertebrates here studied. Further samples will need to be analyzed in future studies in order to conduct a more thorough analysis.

The nomenclatural status of all taxa referred to in the study was consulted in AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2024) and DiatomBase (Kociolek *et al.*, 2024).

Epizoic diatoms morphology and determination follows Round *et al.* (1990), Witkowski *et al.* (2000).

RESULTS AND DISCUSSION

Diatom flora associated with marine macroinvertebrates

As a result of the analysis of the epizoic diatoms of both macroinvertebrates from La Tranquera we recorded 83 diatom taxa, 43 and 62 of them being recorded on chitons and SKC, respectively (Table 1).

Most of the diatoms observed on both invertebrates were mainly pennate and included within *Amphora* (8 taxa), *Cocconeis* (10 taxa), *Navicula* (6 taxa), *Nitzschia* (11 taxa) and *Tabularia* (2 taxa). Centric diatoms were generally scarce, mostly represented by *Odontella* spp. and *Paralia sulcata sensu lato*. Both invertebrate hosts shared 21 taxa.

We identified differences regarding diatom diversity associated to the hosts analyzed. Some taxa such as *Caloneis* sp., *Campylopyxis garkeana*, *Planothidium* spp., *Psammothidium* sp. and *Rhoicosphenia* spp. were only observed on chitons whereas *Amphiprora lata*, *Delphineis surirella*, *Grammatophora macilenta*, *G. angulosa* var. *islandica*, *Hyalodiscus radiatus*, *Licmophora flabellata*, *L. hyalina*, *L. aff. ehrenbergii*, *L. gracilis*, *Plagiotropis lepidoptera* and *Pleurosigma* spp. were only observed on SKC.

Table 1 (part 1 of 3). Diatom taxa recorded for chitons and southern king crabs from La Tranquera sampling site, indicating their presence (P) and percentual relative abundances (only when RA % > 3%) for each sampling season. Env.: environmental samples.

Table 1 (parte 1 de 3). Taxa de diatomeas registradas en quitones y centollas de La Tranquera indicando su presencia (P) y las abundancias relativas porcentuales (sólo cuando AR % > 3%). Amb.: muestra ambiental.

Invertebrate Host Diatom taxa/Season	Chitons				Southern King Crabs				
	Summer 2024	Env. Summer 2024	Winter 2024	Env. Winter 2024	Winter 2018	Summer 2024	Env. Summer 2024	Winter 2024	Env. Winter 2024
<i>Achnanthes</i> spp.			P	P					
<i>Achnanthes</i> cf. <i>adnata</i> Bory		P	P	P		P			
<i>Achnanthidium</i> spp.	P	P	P	P	P			P	
<i>Amphiproora lata</i> Greville								P	
<i>Amphora</i> aff. <i>crassa</i> W.Gregory								P	
<i>Amphora</i> aff. <i>proteus</i> Ehrenberg ex Kutzing	P	P	P		P			P	P
<i>Amphora</i> aff. <i>pusio</i> Cleve	P				P				
<i>Amphora</i> sp.I	P (14%)	P	P (5.5%)	P	P	P		P	
<i>Amphora</i> sp. II	P	P							
<i>Amphora</i> sp. III			P						
<i>Amphora</i> sp. IV			P						
<i>Amphora</i> sp. V						P			
<i>Bacillaria socialis</i> var. <i>kariana</i> (Grunow) Grunow	P				P (3%)	P	P	P (3%)	
<i>Bacillaria</i> sp. I								P	
<i>Caloneis</i> spp.			P	P					
<i>Campylopyxis garkeana</i> (Grunow) Medlin	P								
<i>Centric</i> spp.				P	P				
<i>Cocconeis convexa</i> Giffen						P			
<i>Cocconeis</i> cf. <i>disculus</i> (Schumman) Cleve					P				
<i>Cocconeis</i> cf. <i>patagonica</i> Riaux-Gobin & Cefarelli				P		P (4.5%)			
<i>Cocconeis scutellum</i> Ehrenberg	P (11.5%)	P	P (20.5%)	P	P (5.4%)	P (4.75%)	P	P (18.75%)	P
<i>Cocconeis stauroneiformis</i> H.Okuno					P				
<i>Cocconeis</i> sp.I		P			P (10.4%)	P (10%)		P (10.4%)	
<i>Cocconeis</i> sp.II		P						P (18.25%)	
<i>Cocconeis</i> sp.III		P						P	
<i>Cocconeis</i> sp.IV		P	P						
<i>Cocconeis</i> sp.V	P						P		
<i>Delphineis surirella</i> (Ehrenberg) G.W. Andrews				P			P	P	
<i>Donkinia carinata</i> (Donkin) Ralfs				P					
<i>Diploneis vacillans</i> var. <i>delicatula</i> Cleve			P			P	P		P

Table 1 (part 2 of 3). Diatom taxa recorded for chitons and southern king crabs from La Tranquera sampling site, indicating their presence (P) and percentual relative abundances (only when RA % > 3%) for each sampling season. Env.: environmental samples.

Table 1 (parte 2 de 3). Taxa de diatomeas registradas en quitones y centollas de La Tranquera indicando su presencia (P) y las abundancias relativas porcentuales (sólo cuando AR % > 3%). Amb.: muestra ambiental.

Invertebrate Host Diatom taxa/Season	Chitons				Southern King Crabs				
	Summer 2024	Env. Summer 2024	Winter 2024	Env. Winter 2024	Winter 2018	Summer 2024	Env. Summer 2024	Winter 2024	Env. Winter 2024
<i>Fallacia</i> spp.							P		
<i>Gomphonemoid</i> sp. I	P (3.75%)								
<i>Gomphonemoid</i> sp. II	P (10%)					P			
<i>Grammatophora marina</i> (Lyngbye) Kutzing	P		P		P (12.5%)	P		P	
<i>Grammatophora angulosa</i> var. <i>islandica</i> (Ehrenberg) Grunow								P	
<i>Grammatophora macilenta</i> W.Smith					P			P	
<i>Gyrosigma</i> spp.					P				
<i>Halamphora</i> aff. <i>granulata</i> W.Gregory					P	P			
<i>Homoeocladia angularis</i> (W.Smith) Kuntze	P		P (3.5%)						
<i>Hyalodiscus radiatus</i> (O` Meara) Grunow									
<i>Licmophora flabellata</i> (Greville) C.Agardh					P (12.6%)	P		P	
<i>Licmophora</i> aff. <i>ehrenbergii</i> (Kutzing) Grunow								P	
<i>Licmophora gracilis</i> (Ehrenberg) Grunow								P	
<i>Licmophora hyalina</i> (Kutzing) Grunow						P			
<i>Licmophora lyngbyei</i> (Kutzing) Grunow					P				
<i>Navicula</i> cf. <i>directa</i> (W.Smith) Brébbison		P	P (3%)		P	P	P	P (3.25%)	P
<i>Navicula</i> aff. <i>perminuta</i> Grunow				P					P
<i>Navicula oscitans</i> var. <i>curvipunctata</i> (Leuduger-Fortmorel) Frenguelli					P	P			
<i>Navicula</i> sp.I	P (6.75%)	P	P (7.25%)	P	P	P (5%)	P	P (5.25%)	P
<i>Navicula</i> sp. II	P								
<i>Navicula</i> sp. III						P			
<i>Nitzschia</i> spp.					P				
<i>Nitzschia</i> aff. <i>dlsspata</i> (Kutzing) Rabenhorst			P						
<i>Nitzschia</i> aff. <i>frustulum</i> (Kutzing) Grunow	P (12.5%)	P	P (18.25%)	P		P		P	P
<i>Nitzschia</i> aff. <i>hybrida</i> Grunow						P		P	
<i>Nitzschia</i> aff. <i>inconspicua</i> Grunow	P (15.5%)	P	P (6.25%)	P	P	P		P	P
<i>Nitzschia</i> aff. <i>media</i> Hantzsch		P	P			P			
<i>Nitzschia sigma</i> aff. var. <i>sigmatella</i> Grunow			P	P		P		P	
<i>Nitzschia</i> aff. <i>valida</i> Cleve & Grunow						P			
<i>Nitzschia</i> sp. I	P	P		P					P

Table 1 (part 3 of 3). Diatom taxa recorded for chitons and southern king crabs from La Tranquera sampling site, indicating their presence (P) and percentual relative abundances (only when RA % > 3%) for each sampling season. Env.: environmental samples.

Table 1 (parte 3 de 3). Taxa de diatomeas registradas en quitones y centollas de La Tranquera indicando su presencia (P) y las abundancias relativas porcentuales (sólo cuando AR % > 3%). Amb.: muestra ambiental.

Invertebrate Host Diatom taxa/Season	Chitons				Southern King Crabs				
	Summer 2024	Env. Summer 2024	Winter 2024	Env. Winter 2024	Winter 2018	Summer 2024	Env. Summer 2024	Winter 2024	Env. Winter 2024
<i>Nitzschia</i> sp. II			P (3.25%)						P
<i>Nitzschia</i> sp. III						P			
<i>Odontella</i> spp.	P		P						
<i>Odontella</i> aff. <i>aurita</i> C. Agardh					P				
<i>Odontella obtusa</i> Kützing						P		P	
<i>Paralia sulcata</i> s.l. (Ehrenberg) Cleve		P	P			P		P	
<i>Parlibellus</i> sp.	P	P	P		P	P	P		
<i>Pinnularia</i> spp.					P				
<i>Plagiotropis lepidoptera</i> (W.Gregory) Kuntze						P			
<i>Planothidium</i> spp.	P	P		P					P
<i>Pleurosigma</i> spp.				P	P	P			
<i>Psammodictyon</i> spp.			P					P	
<i>Psammolithidium</i> aff. <i>marginulatum</i> (Grunow) Bukhtiyarova			P						
<i>Pseudostaurosira cf. perminuta</i> (Grunow) Sabbe & Vyverman			P						
<i>Pseudogomphonema kaimtschaticum</i> (Grunow) Medlin		P							
<i>Rhoicosphenia</i> spp.					P				
<i>Rhoicosphenia genuliflexa</i> (Kützing) Medlin			P						
<i>Rhopalodia</i> spp.					P				
<i>Synedra</i> spp.	P		P		P				
<i>Synedra</i> aff. <i>gaillonii</i> (Bory) Ehrenberg						P			
<i>Synedrosphenia fulgens</i> (Greville) Lobban & Ashworth								P	
<i>Tabularia investiens</i> (W.Smith) D.M.Williams & Round	P (13%)	P	P (5.5%)	P	P (39.7%)	P (54.25%)		P (33%)	
<i>Tabularia parva</i> (Kützing) D.M.Williams & Round	P		P (4.75%)		P	P		P	
<i>Trachyneis aspera</i> (Ehrenberg) Cleve	P		P		P			P	
<i>Pennate</i> sp. I			P						
<i>Pennate</i> sp. II								P	
<i>Pennate</i> sp. III					P				
<i>Pennate</i> sp. IV		P							
<i>Pennate</i> sp. V		P							
Total taxa	25	23	33	19	32	32	8	33	11

Cefarelli *et al.* (2024) commented on the variation of diatom epibiosis in between different macroinvertebrate hosts, within a same host and among sampling sites of the San Jorge Gulf. Also, the authors had recorded a lower diatom epibiosis on the same host taxa analyzed in deeper waters within the gulf than in coastal shallow waters of the subtidal zone near Comodoro Rivadavia city. This difference between intertidal and subtidal samples highlights the importance of depth and light conditions of each area as key factors (Gómez *et al.*, 2018).

Regarding the presence of centric diatoms, Madkour *et al.* (2012) proposes that they are mainly planktonic but they are often found associated to invertebrates such as Decapod Crustaceans because they are tangled up to different morphological structures of the animal body and thus, they appear in some benthic-epizoic samples. Centric diatoms were not abundant in our epizoic material but the recurrent presence of some yet unidentified centric taxa indicates that these kinds of diatoms were not accidentally found and therefore could be epizoic.

Round (1981) and Totti *et al.* (2011) propose that the degree of epibiosis is inversely related to the motility of the animal host, concluding that active animals will be less colonized by diatoms than sessile animals. Chitons have reduced motility and may represent a more stable and easily colonizable surface for diatoms than SKC do given their motility. Cefarelli *et al.* (2024) reported SKC with and without epibiosis in different sites along the gulf and recorded *Amphora*, *Cocconeis*, *Grammatophora*, *Licmophora*, *Navicula*, *Nitzschia* and *Tabularia* as the more abundant diatom taxa as we also observed in our samples.

Diatoms life mode and growth forms

Most of the diatom taxa found were solitary forms and other taxa may form colonies of diverse morphologies such as “ribbon-like” colonies (*Bacillaria socialis* var. *kariana* and *Trachyneis aspera*), “fan-shape” colonies (*Licmophora flabellata* and *Tabularia investiens*, Fig. 3 A-B), “zig-zag” colonies (*Grammatophora marina* and *Odontella obtusa*, Fig. 3 C), “chain-like” colonies (*Paralia sulcata* s.l., Fig. 3 D) and “tube-like” colonies (*Parlibellus* spp. and undetermined naviculoids, Fig. 3 E-F). *Cocconeis* spp. specimens were observed gathered along the surface of chitons spines and SKC carapaces surface constituting polyspecific aggregations but not true colonies (Fig. 4 A-D).

We recognized three types of diatom growth forms according to their mechanisms of attachment to the invertebrate substrata: adnate diatoms which adhere strongly to the surface by means of their raphe valve (Figs. 4 A-D and Fig. 6 B), erect diatoms which form mucilaginous structures of adhesion such as “pads” and “stalks” (Figs. 3 A-C, Figs. 4 D, Figs. 5 A-C, Fig. 6 A) and, motile diatoms which have the capability to slide along the invertebrate surface (Figs 3 E-F, Fig. 6 A). D’Alelio *et al.* (2011) pro-

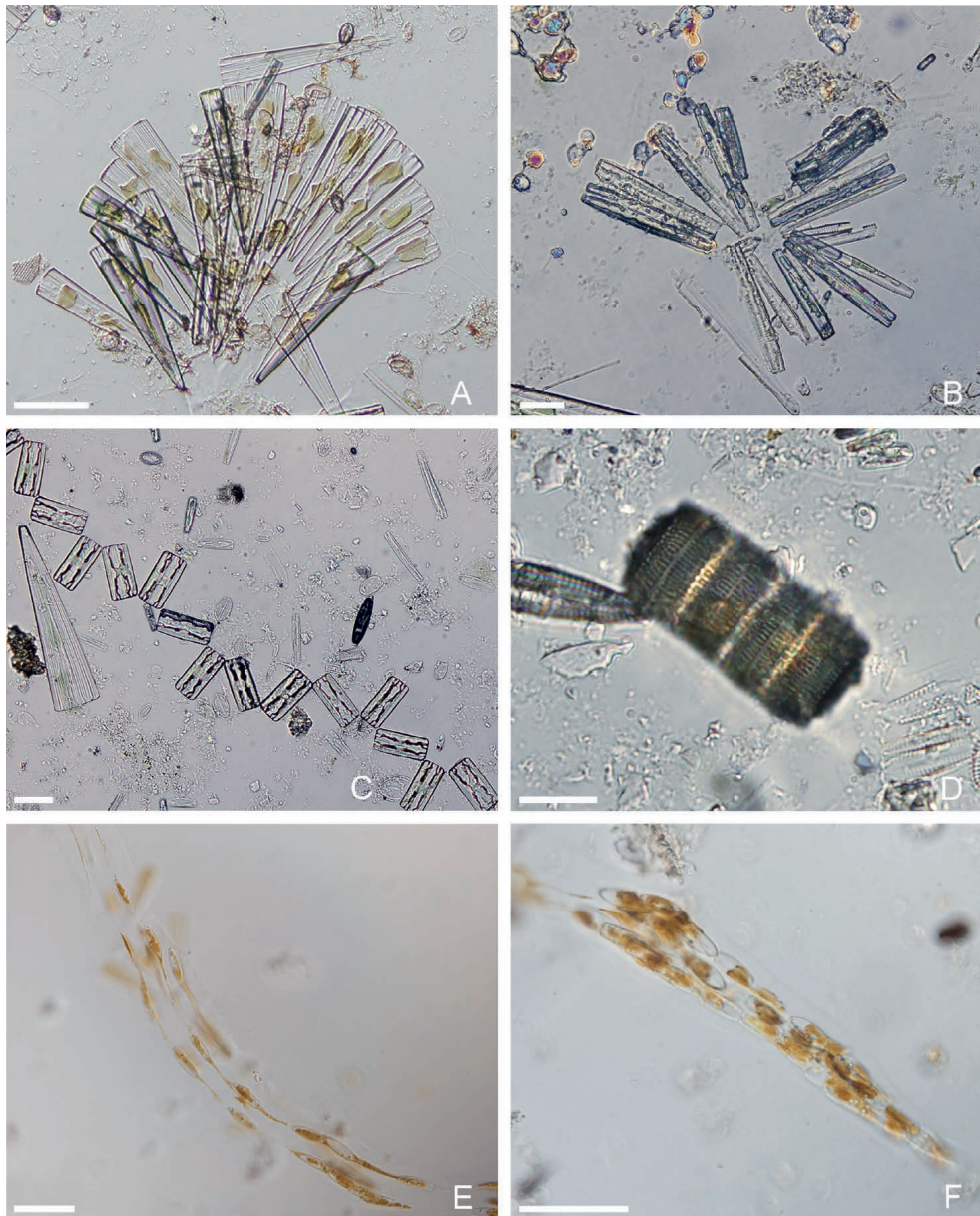


Fig. 3. LM. Diatom colonies of diverse morphologies. A-B) "Fan-shaped" colonies of (A) *Licmophora flabellata* and (B) *Tabularia investiens*. C) "Zig-Zag" colony of *Grammatophora marina*. D) "Chain-like" colony of *Paralia sulcata* s.l. E-F) "Tube-like" colonies of undetermined pennate diatoms. Scale bars 10 μm (A-D) and 50 μm (E-F).

Fig. 3. MO. Diatomeas formando colonias de diversa morfología. A-B) "Colonias en abanico" de (A) *Licmophora flabellata* y (B) *Tabularia investiens*. C) "Colonias en Zig-Zag" de *Grammatophora marina*. D) "Colonia en cadena" de *Paralia sulcata* s.l. E-F) "Colonias tubícolas" de diatomeas pennadas indeterminadas. Escala de 10 μm (A-D) y 50 μm (E-F).

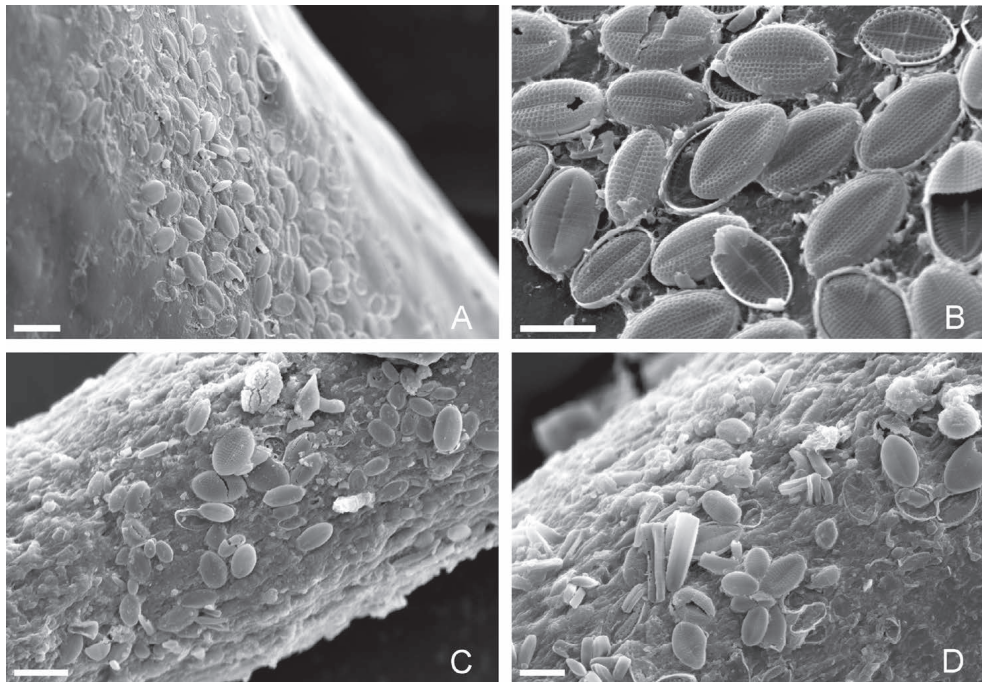


Fig. 4. SEM. Diatoms directly attached to chitons and southern king crabs surface. A) General view of diatoms attached to southern king crabs carapace. B) Detail of *Cocconeis* polyspecific aggregations, note the adnate diatom adhesion through the raphe valve. C) General view of diatoms attached to chitons spines. D) Detail of *Cocconeis* polyspecific aggregations alongside *Tabularia investiens* and *Nitzschia* specimens. Scale bars: 20 μm (A, C) and 10 μm (B, D).

Fig. 4. MEB. Diatomeas directamente adheridas a la superficie de quitones y centollas. A) Vista general de diatomeas adheridas al caparazón de las centollas. B) Detalle de agregaciones poliespecíficas de *Cocconeis*, nótese la adhesión de las diatomeas mediante la valva con rafe. C) Vista general de diatomeas adheridas a las espinas de quitones. D) Detalle de agregaciones poliespecíficas de *Cocconeis* junto a ejemplares de *Tabularia investiens* y *Nitzschia*. Escala de 20 μm (A, C) y 10 μm (B, D).

poses that, in terms of an ecological succession, the presence of all three diatom growth forms (adnate, erect and motile) is typical of a mature and well-structured diatom community. Thus, adnate forms are the first ones to colonize an animal substrate strongly adhering to their surface and then erect and motile forms partially adhere to the same surface. The macroinvertebrates here analyzed exhibited the three types of growth forms, hosting a possibly well-structured and mature diatom community.

From the analysis of Chitons' spines and SKC' carapace moults, we were able to record the presence of diatoms directly attached to both hosts' surfaces. Particularly, numerous *Cocconeis* spp. specimens forming conspicuous polyspecific aggregations alongside *T. investiens*, *Nitzschia* sp. and *Amphora* sp. (Fig. 4 A-D). Several authors have also previously indicated *Cocconeis* as an epibiont constituting mono or polyspecific aggregations on diverse living surfaces. For instance, De Stefano *et al.* (2000), Tiffany (2011) and Majewska *et al.* (2013) reported aggregations of diverse *Cocconeis* taxa on different marine macroalgae. Similarly, Romagnoli *et al.* (2007) and Totti

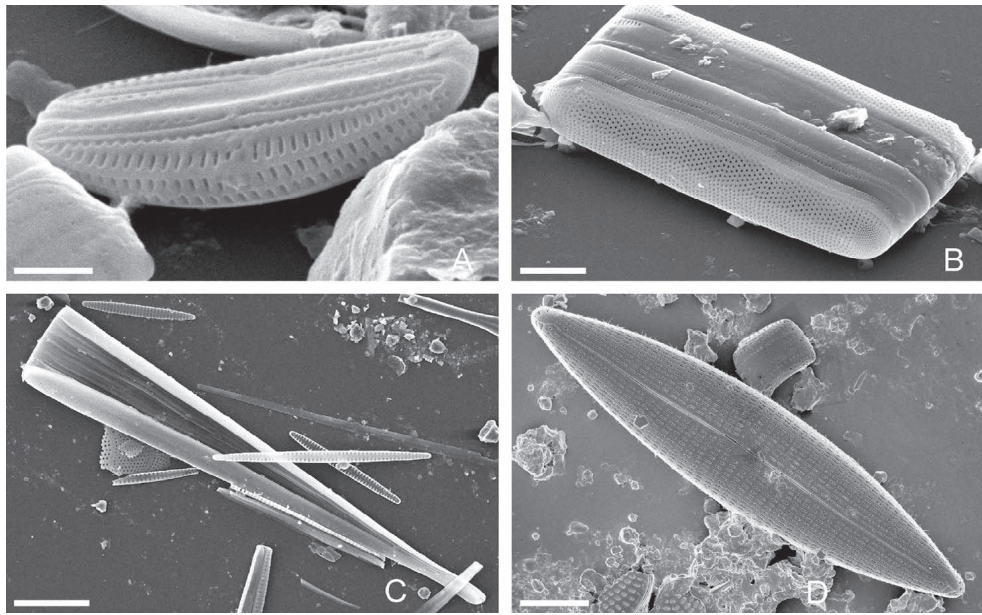


Fig. 5. SEM. Epizoic diatoms on chitons and southern king crabs. Frustules of (A) *Amphora*, (B) *Grammatophora marina* and (C) *Licmophora flabellata*. (D) External valve view of *Navicula* aff. *directa*. Scale bars: 2 μm (A), 5 μm (B, D) and 20 μm (C).

Fig. 5. MEB. Diatomeas epizoicas de quitones y centollas. Frústulos de (A) *Amphora*, (B) *Grammatophora marina* y (C) *Licmophora flabellata*. (D) Vista valvar externa de *Navicula* aff. *directa* (D). Escala: 2 μm (A), 5 μm (B, D) y 20 μm (C).

et al. (2011) reported epizoic communities integrated by *Amphora*, *Cocconeis* and *Tabularia*, among other taxa, growing on Hydroid Cnidarians. Recently, Cefarelli *et al.* (2024) described *Cocconeis patagonica* and *T. investiens* on Squad Lobsters (*Grimothea gregaria*) from San Jorge Gulf and provided LM evidence of the specimens directly attached to the carapaces surface.

Macroinvertebrates and environmental samples

When comparing the diatom flora associated to chitons and SKC with their respective environmental samples from 2024, each host shared 19 and 11 diatom species with them, respectively. Although the brushed surface of the invertebrates and environmental samples had similar dimensions, the scarce microalgal material obtained from the latter allows us to suggest that the host's surface may represent an optimal microhabitat for diatoms to attach to (Totti *et al.*, 2011) (Table 1).

Diatoms associated with chitons are likely to be similar to those benthic diatoms living in the surrounding rocky surfaces considering the host has reduced movement and represents an easily colonizable surface for diatoms (Round, 1971; Tiffany, 2011). Also, the chiton body is flat, and its entire body surface is quite close to the rocky intertidal substrata on which it lives so similarities with benthic diatom flora are to be expected. The 19 diatom taxa shared between chitons and environmental samples

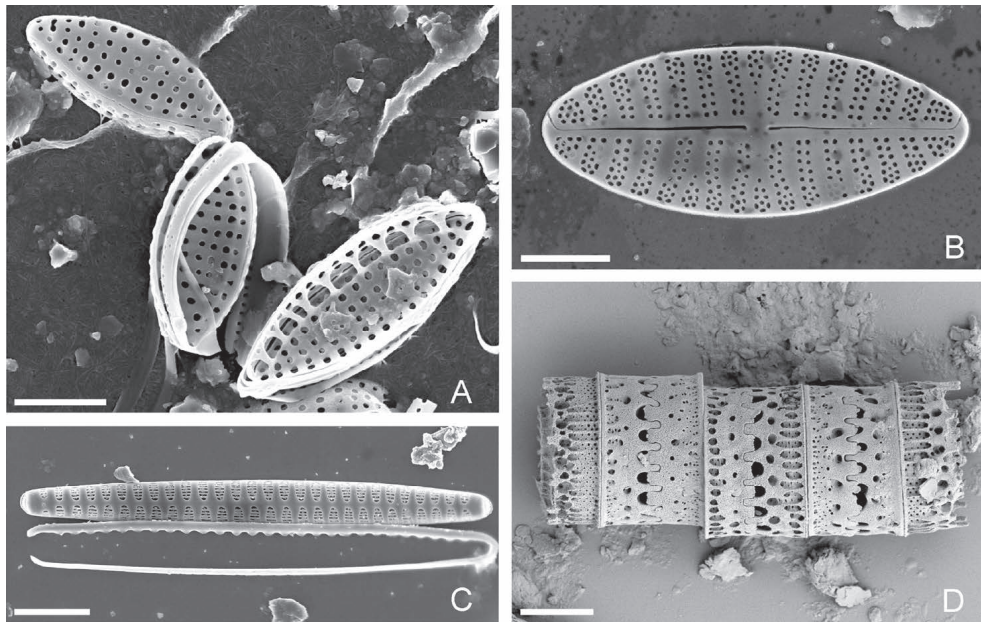


Fig. 6. SEM. Epizoic diatoms of chitons and southern king crabs. A) External and internal views of *Nitzschia* aff. *Inconspicua* valves. B) External valve view of *Planothidium* sp. R-valve. C) External valve view of *Tabularia investiens* with the detail of a girdle band alongside. D) *Paralia sulcata* s.l. frustules forming a "chain-like" colony. Scale bars: 2 μ m (A, B) and 5 μ m (C, D).

Fig. 6. MEB. Diatomeas epizoicas de quitones y centollas. A) Valvas en vistas externas e internas de *Nitzschia* aff. *inconspicua*. B) Vista valvar externa de valva-R de *Planothidium* sp. C) Vista valvar externa de *Tabularia investiens* con detalle de una banda de la cintura a su lado. D) Frústulos de *Paralia sulcata* s.l. formando una colonia "en cadena". Escala: 2 μ m (A, B) y 5 μ m (C, D).

are particularly very abundant on chitons suggesting a similarity between both surfaces' diatom flora. These taxa are mainly pennate and exhibited the three attachment mechanisms previously recorded for chitons.

Southern king crabs shared less diatom taxa (11) with their environmental samples suggesting that both samples may not be comparable considering the decapod motility. In this particular case, the common diatom taxa are mainly adnate and erect taxa.

Totti *et al.* (2011) proposes that colonized animals offer an extension of the available surface for the benthic diatoms in the surrounding areas to colonize. Hence, diatoms found on animal hosts are in fact mostly benthic diatoms who developed a particular closeness to hosts as can be the case of some diatom taxa on the chitons here analyzed. In particular, Brandani *et al.* (1974) reported *P. aurata* living over intertidal environments of the South Atlantic Ocean exposed to sunlight, constituting a microhabitat potentially colonizable by diatoms. Madkour *et al.* (2012) studied the Spider Crab *Schizophrys dahlak* (Decapod Crustacean) from Suez Canal and concluded that diatoms found on this particular host are in fact the same as those found on the proximities. This appears not to be the case of the SKC given the fact it did not share many diatom taxa with its environment.

Seasonal Epizoic diatom communities diversity comparison

A comparative analysis for the diatom communities associated to intertidal chitons and subtidal SKC from La Tranquera for 2024 summer and winter, and for an additional sample of SKC from 2018 winter is presented below.

Chitons.— Diatom's Species Richness (S) on chitons was higher in winter (33) than in summer samples (25). The comparison of Shannon-Weaver index (H') showed significant differences ($\alpha=0.05$) in between seasons with a higher diatom diversity in winter samples. Pielou's Evenness Index (J) were quite similar, indicating that there is no clear dominance of certain species over the rest (Table 2).

Table 2. Diversity indexes estimated for diatom communities from both invertebrate host during summer and winter (2018-2024).

Tabla 2. Índices de diversidad estimados para las comunidades de diatomeas obtenidas de ambos invertebrados durante el verano e invierno (2018-2024).

Invertebrate Host Index / Season	Chitons		Southern King Crabs		
	Summer 2024	Winter 2024	Winter 2018	Summer 2024	Winter 2024
S	25	33	32	32	33
H'	2.48	2.76	2.14	1.98	2.23
J	0.77	0.79	0.62	0.56	0.64

When comparing the diatom communities composition, summer and winter samples shared 34.8% of the taxa, the rest of them being different in between both seasons. *Amphora*, *Cocconeis*, *Navicula*, *Nitzschia* and *Tabularia* were the most representative genera in terms of relative abundance and species richness. *Cocconeis*, *Navicula* and *Nitzschia* were slightly more abundant in Winter whereas *Amphora* and *Tabularia* were more abundant in summer (Table 1; Fig. 7).

Mollusks have been previously studied as possible diatom hosts, particularly Bivalves and Gastropods given the nature of their hard shells and low motility which make them a potential surface for diatoms to colonize (Round, 1971; Totti *et al.*, 2011). Gillan & Cadée (2000) found *Cocconeis placentula* and *Achnanthes lemmermanii* forming biofilms on shells of marine gastropods. Also, D' Alelio *et al.* (2011) recorded *Amphora* and *Cocconeis* as the more abundant diatom genera on gastropod shell communities followed by *Grammatophora*, *Licmophora*, *Navicula*, *Nitzschia* and *Tabularia*. These taxa were also recorded in our material and suggest possible similarities in the composition of the epibiotic communities in different types of mollusks. However, this is the first ever study on Polyplacophoran mollusks as potential diatom host and further studies on these particular animal substrata will be conducted in the same area in the future.

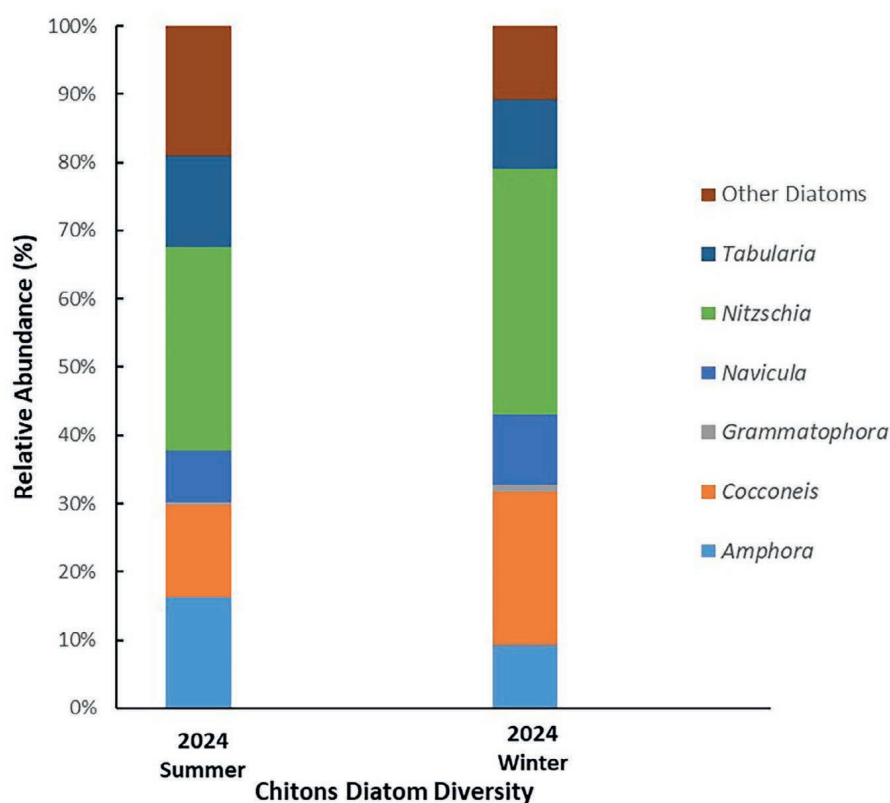


Fig. 7. Relative abundance (%) of the most abundant diatom genera for chitons 2024 summer and winter samples.

Fig. 7. Abundancia relativa de los géneros de diatomeas más abundantes para las muestras de quitones de verano e invierno de 2024.

Southern King Crabs.— Diatoms's Species Richness (S) on the SKC was slightly higher in 2024 winter (33) but the comparison of Shannon-Weaver indexes (H') showed significant differences ($\alpha=0.05$) in between both 2024 seasons with a higher diatom diversity in winter samples. Pielou's Evenness index (J) was also slightly higher in both winter samples showing intermediate values which may indicate the presence of some dominant diatom taxa. The diatom species richness, Shannon-Weaver and Pielou's Evenness indexes of 2018 and 2024 winter were similar (Table 2).

The 2024 summer and winter samples shared 33.3% of the taxa while 2018 and 2024 winter samples shared 43.4% of the taxa, the rest of them being different in each case. When analyzing and comparing the diatom composition between the three sampled seasons, *Cocconeis*, *Grammatophora*, *Licmophora*, *Navicula* and *Tabularia* were the more representative genera although some differences as to their abundance and species richness can be recognized in each sample.

Cocconeis was clearly more abundant in 2024 winter. *Navicula* and *Nitzschia* were slightly more abundant and diversified in both 2024 samples and *Tabularia* was the more abundant genus in all three sampled seasons. *Grammatophora* and *Licmophora* were particularly more abundant

in 2018 winter than in both 2024 samples (Table 1; Fig.8). *Tabularia* and *Cocconeis* can be regarded as dominant taxa in all seasons analyzed while *Grammatophora* and *Licmophora* were particularly dominant in 2018 winter as *Navicula* was in both 2024 samples.

Cefarelli et al. (2024) recorded *T. investiens* as the more abundant diatom species alongside *Cocconeis patagonica* and *Pseudogomphonema kamtschaticum* in a sample of SKC from San Jorge Gulf. We also found *T. investiens* to be the more abundant species on the analyzed hosts, *C. patagonica* was present but not as abundant and *P. kamtschaticum* was not found in the epizoid material but was recorded in environmental samples. *Cocconeis* has been already cited as an epizoid diatom genus on diverse animal substrata such as decapods (Cefarelli et al., 2024), bryozoans (Wuchter et al., 2003) and cnidarians (Di Camillo et al., 2005; Romagnoli et al., 2007; Totti et al., 2011). Among *Licmophora* species, commonly benthonic, *Licmophora flabellata* has been previously recorded in planktonic samples of the Bay of San Antonio (Argentine Sea) by Sar & Ferrario (1990) and also as an epiphyte species on marine seaweeds by Lobban et al. (2011) and Lobban & Santos (2022). Particularly, in this study the species is recorded for the first time as epizoid.

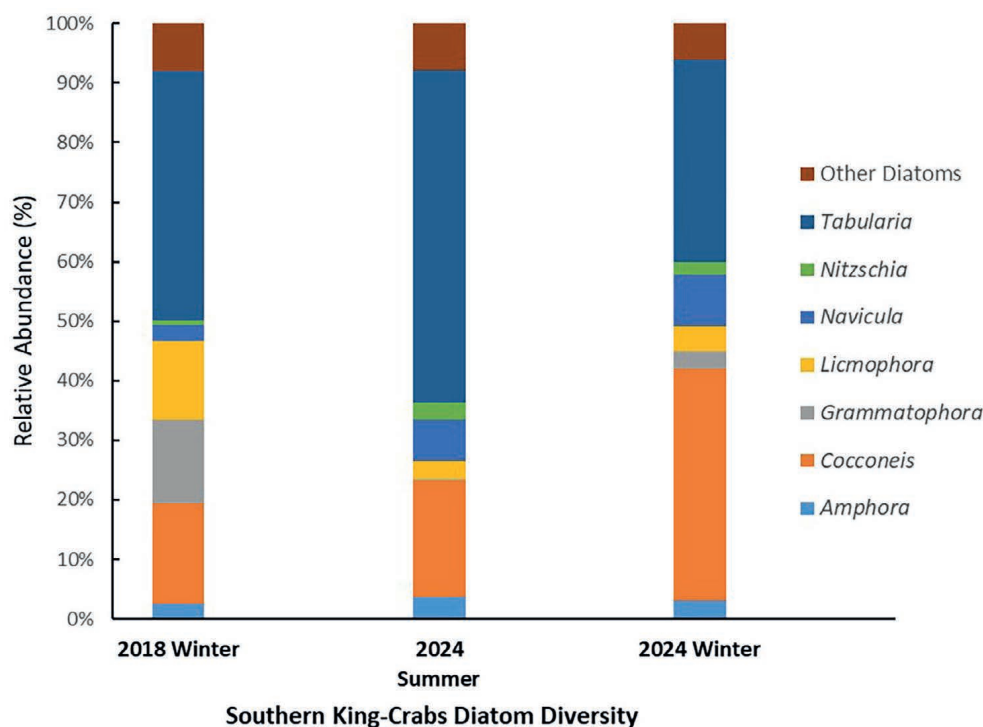


Fig. 8. Relative abundance (%) of the most abundant diatom genera for southern king crab samples from the 2018 austral winter and 2024 austral summer and winter.

Fig. 8. Abundancia relativa (%) de los géneros de diatomeas más abundantes para las muestras de centollas de invierno de 2018 y verano e invierno de 2024.

According to Carreto *et al.* (2007) and Dans *et al.* (2024), the phytoplankton abundance and productivity in San Jorge Gulf is lowest during winter and shows a clear peak in spring and towards summer when the environmental conditions are optimal for its proliferation. Overall and contrary to what we would have expected, diatoms were well represented and diversified during winter, exhibiting the capacity to proliferate and adapt to the winter's environmental conditions. Similarly, Madkour *et al.* (2012) analyzed the variation of diatom diversity and abundance on decapods through time and also recorded a higher diatom diversity in winter although abundances were clearly smaller for that season. This matter will be addressed in future studies in the area.

CONCLUSIONS

This study constitutes the first characterization of epizoic diatom communities associated with Polyplacophoran Mollusks providing SEM evidence of the direct attachment to the host spines as well as to SKC's carapace surface.

Diatom diversity and abundance indicate that these invertebrates represent suitable substrates for epizoic colonization and growth despite seasonal environmental differences.

The occurrence of three distinct diatom growth forms on both invertebrate hosts suggests the presence of well-structured epizoic diatom communities.

Amphora, *Cocconeis*, *Navicula*, *Nitzschia* and *Tabularia* are representative genera in terms of species richness and abundance for both invertebrate hosts. In this study, *L. flabellata* is recorded for the first time as an epizoic species.

Further studies need to be conducted in order to accomplish a more extensive and precise characterization of the structure and dynamics of epizoic diatom communities, the possible implications of this particular ecological interaction as well as to describe the diatom flora in the area.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Renato Frías (Professional Marine diver for IIDEPyS) for his help with the diving samplings as well as colleagues of Instituto de Desarrollo Costero (IDC-UNPSJB). We are also very grateful to the technicians of the different SEM services for their kind assistance and expertise. This study was funded by UNPSJB (Grant PI N° 1551) and Agencia I+D+i – FONCyT (Grant PICT 2019–03323).

REFERENCES

- Brandani, A., Faedo, J. C. & Penchaszadeh, P. E. (1974). Aspectos de la ecología de los quitones del litoral de Mar del Plata (Mollusca, Polyplacophora) con especial referencia a sus epibiosis. *Ecología* 2: 19-33.
- Carreto, J. I., Carignan, M. O., Montoya, N. G. & Cucchi-Colleoni, A. D. (2007). Ecología del fitoplancton en los Sistemas Frontales del Mar Argentino. *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros* 5: 11-31.
- Cefarelli, A. O., Riaux-Gobin, C., Varisco, M. A., Ferrario, M. E., Castaños, C., Bovcon, N. D. & Williams, D. M. (2024). A first approach to the study of epizoic diatoms on marine benthic macroinvertebrates in Atlantic Patagonian waters (San Jorge Gulf) with SEM description of the most abundant taxa: *Cocconeis patagonica* sp.nov., *Pseudogomphonema kamtschaticum* and *Tabularia investiens*. *Fottea* 24 (2): 244-260. <https://doi.org/10.5507/fot.2024.001>
- Dans, S. L., A. O. Cefarelli, D. E. Galván, M. E. Góngora, P. Martos & M. Varisco (Eds.). (2020). *Programa de investigación y monitoreo del Golfo San Jorge. Pampa Azul*. Fundación de Historia Natural Félix de Ázara. Buenos Aires.
- Dans, S., Cefarelli, A. O., Galván, D., Gongora, M. E., Martos, P., Varisco, M., Alvarez Colombo, G., Blanc, S., Bos, P., Bovcon, N., Charo, M., Cinquini, M., Derisio, C., Dogliotti, M., Ferreyra, G., Funes, M., Giberto, D., Halm, C., Hozbor, C., Irigoyen, A., Lewis, M., Macchi, G., Maenza, R., Nocera, A., Paparazzo, F., Parma, A., Pisoni, J.P., Prairio, I., Sánchez-Carnero, N., Sastre, V., Segura, V., Silva, R., Schiariti, A., Temperoni, B., Tonini, M., Tolivia, A., Trobbiani, G., Venerus, L., Vernet, M., Vinuesa, J., Villanueva Gomila, L., Williams, G., Yorío, P. & Zárate, M. (2024). *El Golfo San Jorge como área prioritaria de investigación, manejo y conservación en el marco de la iniciativa Pampa Azul*. In: Quesada Allué, L.A. & Alonso, P.R. (Eds.), *Patagonia: Investigaciones*

- y Futuro. Argentina (pp. 203-240). Buenos Aires, Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias.
- D'Alelio, D., Cante, M. T., Russo, G. F., Totti, C. & De Stefano, M. (2011). Epizoic diatoms on gastropod shells. When substrate complexity selects for microcommunity complexity. In: Seckbach, J. & Dubinsky, Z. (Eds). *All flesh is grass, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*. Netherlands (pp. 345-364). Dordrecht, Springer.
- De Stefano, M., Marino, D. & Mazzella, L. (2000). Marine taxa of *Cocconeis* on leaves of *Posidonia oceanica*, including a new species and two new varieties. *European Journal of Phycology* 35: 225-242.
- Di Camillo, C., Puce, S., Romagnoli, T., Tazioli, S., Totti, C. & Bavestrello, G. (2005). Relationships between benthic diatoms and hydrozoans (Cnidaria). *Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom* 85: 1373-1380.
- Fernández, M., Carreto, J. I., Mora, J. & Roux, A. (2005). Physico-chemical characterization of the benthic environment of the Golfo San Jorge, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 317-328.
- Ferrario, M. E., Sar, E. A. & Sala, S. E. (1995). Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. In: Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveira, E. C. & Sar, E. A. (Eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*. Chile (pp. 1-23). Universidad de Concepción, Concepción.
- Ferrario, M. E., Cefarelli, A. O., Fazio, A., Bordino, P. & Romero, O. (2019). *Bennettella ceticola* (Nelson ex Bennett) Holmes on the skin of Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) of the Argentinean Sea: An emendation of the generic description. *Diatom Research* 33 (4): 485-497.
- Frenguelli, J. (1930). Contribución al conocimiento de las diatomeas argentinas. VI Diatomeas marinas de la costa atlántica de Miramar (Provincia de Buenos Aires). *Anales Museo Nacional de Historia Natural Bernardino Rivadavia* 36 (2): 243-311.
- Frenguelli, J. (1938). XII Contribución al conocimiento de las diatomeas argentinas. Diatomeas de la Bahía de San Blas (Provincia de Buenos Aires). *Revista Museo de La Plata* 1 (5): 251-337.
- Frenguelli, J. (1939a). XV Contribución al conocimiento de las diatomeas argentinas. Diatomeas del Golfo de San Matías (Río Negro). *Revista Museo de La Plata* 2 (10): 201-226.
- Frenguelli, J. (1939b). XV Contribución al conocimiento de las diatomeas argentinas. Diatomeas de Rada Tilly en el Golfo de San Jorge (Chubut). *Revista Museo de La Plata* 2 (10): 179-199.
- Gillan, D. C. & Cadée, G. C. (2000). Iron-encrusted diatoms and bacteria epibiotic on *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia). *Journal of Sea Research* 43: 83-91.
- Gómez, F., Wang, L. & Lin, S. (2018). Morphology and molecular phylogeny of epizoic araphid diatoms on marine zooplankton, including

- Pseudofalcula hyalina* gen. & comb. nov. (Fragilariophyceae, Bacillariophyta). *Journal of Phycology* 54 (4): 557-570.
- Guiry, M. D. & Guiry, G. M. (2024). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, University of Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 6 de noviembre de 2024.
- Hiroimi, J., Kadota, S. & Takano, H. (1985). Diatom infestation of marine copepods. *Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory* 117: 37-45.
- Holmes, R. W. & Croll, D. A. (1984). Initial observations on the composition of dense diatom growths on the body feathers of three species of diving seabirds. In: Mann, D. G. (Ed.). *Proceedings of the Seventh Diatom-Symposium 1982* (pp. 265-277). Koenigstein, Otto Koeltz .
- Holmes, R. W. (1985). The morphology of diatoms epizoic on cetaceans and their transfer from *Cocconeis* to two new genera, *Bennettella* and *Epipellis*. *British Phycological Journal* 20: 43-57.
- Kociolek, J. P., Blanco, S., Coste, M.; Ector, L., Liu, Y., Karthick, B., Kulikovskiy, M., Lundholm, N., Ludwig, T., Potapova, M., Rimet, F., Sabbe, K., Sala, S., Sar, E., Taylor, J., Van de Vijver, B., Wetzel, C. E., Williams, D. M., Witkowski, A. & Witkowski, J. (2024). DiatomBase. Accessed at <https://www.diatombase.org> on 2024-11-07. <https://doi.org/10.14284/504>
- Lobban, C. S., Shefter, M. & Ruck, E. C. (2011). *Licmophora flucticulata* sp.nov. (Licmophoraceae, Bacillariophyceae), an unusual flabellate species from Guam and Palau. *Phycologia* 50 (1): 11-22.
- Lobban, C. S. & Santos, E. S. (2022). *Licmophora* species (Bacillariophyta: Licmophorales) from Heron Island (Great Barrier Reef) and Melbourne, Australia, in comparison with similar species from Guam: evidence for endemism in a marine diatom genus. *Australian Systematic Botany* 35 (6): 437-468. <https://doi.org/10.1071/SB22004>
- Longhurst, A. R. (2007). *Ecological Geography of the Sea*. Academic Press.
- Madkour, F., Sallam, W. & Wicksten M. (2012). Epibiotas of the spider crab *Schizophrys dahlak* (Brachyura: Majidae) from the Suez Canal with special reference to epizoic diatoms. *Marine Biodiversity Records* 5: 1-7. <https://doi.org/10.1017/S1755267212000437>
- Majewska, R., Gambi, M. C., Totti, C. M. & De Stefano, M. (2013). Epiphytic diatom communities of Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica: structural analysis and relations to algal host. *Antarctic Science* 25 (4): 501-513. <https://doi.org/10.1017/S0954102012001101>
- Majewska, R., Kociolek, J. P., Thomas, E. W., De Stefano, M., Santoro, M., Bolaños, F. & Van de Vijver, B. (2015). *Chelonicola* and *Poulinea*, two new gomphonemoid diatom genera (Bacillariophyta) living on marine turtles from Costa Rica. *Phytotaxa* 233 (3): 236-250.
- Majewska, R., Ashworth, M. P., Bosak, S., Goosen, W. E., Nolte, C., Filek, K., Van de Vijver, B., Taylor, J. C., Manning, S. R. & Nel, R. (2021). On

- sea turtle-associated *Craspedostauros* (Bacillariophyta), with description of three novel species. *Journal of Phycology* 57: 199-218.
- Microsoft Corporation. (2024). *Microsoft Excel*, Available at: <https://office.microsoft.com/excel>
- Nemoto, T. (1958). *Cocconeis* diatoms infected on whales in the Antarctic. *The Scientific Reports of the Whales Research Institute* 13: 185-191.
- Nemoto, T., Brownell, F. L. Jr. & Isfiimaru, T. (1977). *Cocconeis* Diatoms on the Skin of Franciscana. *The Scientific Reports of the Whales Research Institute* 29: 101-105.
- Prygiel, J. & Coste, M. (2000). *Guide Méthodologique pour la mise en œuvre de l'Indice Biologique Diatomées*. Agence de l'Eau, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Direction de l'Eau & CEMAGREF, France.
- Purushothaman, A., Francis, S. V., Sathish, T., Thomas, L. C. & Padmakumar, K. B. (2024). Copepods and diatoms: Classic examples of epibiosis along the southeastern Arabian Sea. *Regional Studies in Marine Science* 1-12. <https://doi.org/org/10.1016/j.rsma.2024.103806>
- Reta, R. (1986). *Aspectos Oceanográficos y Biológicos Pesqueros del Golfo San Jorge. Seminario de Grado de Licenciatura en Oceanografía*. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
- Romagnoli, T., Bavestrello, G., Cucchiari, E. M., De Stefano, M., Di Camillo, C. G., Pennesi, C., Puce, S. & Totti, C. (2007). Microalgal communities epibiotic on the marine hydroid *Eudendrium racemosum* in the Ligurian Sea, during an annual cycle. *Marine Biology* 151: 537-552.
- Round, F. E. (1971). Benthic marine diatoms. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 9: 83-139.
- Round, F. E. (1981) *The Ecology of Algae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Round, F. E., Crawford, R. M. & Mann, D. G. (1990). *The diatoms biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press.
- Sar, E.A. & Ferrario, M.E. (1990). *Licmophora flabellata*: Ultrastructure and Taxonomy I. Implication. *Diatom Research* 5 (2): 403-408.
- Sar, E. A. & Sunesen, I. (2014). The epizoid marine diatom *Sceptronema orientale* (Licmophoraceae, Licmophorales): epitypification and emendation of specific and generic descriptions. *Phytotaxa* 177: 269-279.
- Sunesen, I., Romero, S., Toubes, E. & Sar, E. A. (2015). Morphology and distribution of three araphid diatoms (Fragilariophyceae, Bacillariophyta) from marine coastal waters of Argentina. *Iheringia* 70 (2): 265-278.
- Ten S., Raga J. A. & Aznar F.J. (2022). Epibiotic Fauna on Cetaceans Worldwide: A Systematic Review of Records and Indicator Potential. *Frontiers in Marine Science* 9: 846558. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.846558>
- Tiffany, M. A. (2011). Epizoid and Epiphytic Diatoms. In: Seckbach, J. & Kocielek, J.P. (Eds). *The diatom world, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*. Netherlands (pp. 195-209). Springer, Dordrecht.

- Totti, C., Calcinai, B., Cerrano, C., Di Camillo, C., Romagnoli, T. & Baves-trello, G. (2005). Diatom assemblages associated with *Sphaerotylus antarcticus* (Porifera: Demospongiae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 795-800.
- Totti, C., Romagnoli, T., De Stefano, M., Di Camillo, C. & Baves-trello, G. (2011). The diversity of epizoic diatoms. Relationships between diatoms and marine invertebrates. In: Seckbach, J. & Dubinsky, Z. (Eds). *All flesh is grass, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*. Netherlands (pp. 323-343), Springer, Dordrecht.
- Witkowski, A., Lange-Bertalot, H. & Metzeltin, D. (2000). Diatom Flora of Marine Coasts I. *Iconographia Diatomologica* 7: 1-925.
- Wuchter, C., Marquardt, J. & Krumbein, W. E. (2003). The epizoic diatom community on four bryozoan species from Helgoland (German Bight, North Sea). *Helgoland Marine Research* 57: 13-19.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis* (5th. Ed.). Prentice Hall.



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Mycophagous behavior by small mammals observed through camera traps in a riparian forest fragment in Southwestern São Paulo, Brazil

Comportamiento micofágico de pequeños mamíferos observado mediante cámaras trampa en un fragmento de bosque ribereño en el suroeste de São Paulo, Brasil

Baltazar, Juliano M.*^{}; Thiago Ghiraldini Caetano^{};
Larissa Trierweiler-Pereira^{}

¹ Laboratório de Estudos Micológicos (LEMic-UFSCar), Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Lauri Simões de Barros, Km 12, Aracaçu, 18290-000 Buri, SP, Brazil.

* Corresponding author: <baltazar@ufscar.br>; R. Serafim Libaneo, 04, Centro, CEP: 18245-970, CP 64, Campina do Monte Alegre, SP, Brazil.

Abstract

Macrofungi play a crucial role in forest ecosystems by decomposing organic matter and influencing nutrient dynamics. They are characterized by the production of visible reproductive structures known as sporomes, commonly referred to as mushrooms, bracket fungi, among others. Macrofungi of various species are recognized as an important food resource for many animals. However, knowledge regarding the interactions between these fungi and native small mammals in the wild remains limited in Brazil. This study aimed to investigate the consumption of macrofungi by vertebrates in a riparian forest fragment along the Itapetininga River, in the southwestern region of São Paulo State, using camera traps. This study aimed to identify the vertebrate species that feed on macrofungi and to assess the efficacy of camera traps for this purpose. The images from the camera traps recorded the consumption of the coconut mushroom (*Oudemansiella cubensis*) by the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) and the Brazilian squirrel (*Guerlinguetus brasiliensis*). For the first time, this mycophagous behav-

► Ref. bibliográfica: Baltazar, J. M.; Caetano, T. G.; Trierweiler-Pereira, L. 2025. Mycophagous behavior by small mammals observed through camera traps in a riparian forest fragment in Southwestern São Paulo, Brazil. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 247-262. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2158>

► Recibido: 31 de marzo 2025 – Aceptado: 21 de mayo 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

ior is recorded for the white-eared opossum. This study also confirmed the effectiveness of camera traps as a non-invasive tool for monitoring fauna and their interactions in ethological research. Furthermore, the data generated contribute to a deeper understanding of the ecological dynamics between fauna and fungi in the Neotropics.

Keywords: Agaricales; ecological interactions; mushrooms; mycophagy; small mammals.

Resumen

Los macrohongos desempeñan un papel crucial en los ecosistemas forestales al descomponer la materia orgánica e influir en la dinámica de los nutrientes. Se caracterizan por la producción de estructuras reproductivas visibles conocidas como esporomas, comúnmente denominadas setas, hongos de repisa, entre otros. Los macrohongos de diversas especies son reconocidos como un recurso alimenticio importante para muchos animales. Sin embargo, el conocimiento sobre la interacción entre estos hongos y pequeños mamíferos nativos en estado silvestre sigue siendo limitado en Brasil. Este estudio tuvo como objetivo investigar el consumo de macrohongos por vertebrados en un fragmento de bosque ribereño a lo largo del río Itapetininga, en la región suroeste del estado de São Paulo, mediante el uso de cámaras trampa. El estudio buscó identificar qué especies de vertebrados se alimentan de macrohongos y evaluar la eficacia de las cámaras trampa con este fin. Las imágenes obtenidas registraron el consumo del hongo *Oudemansiella cubensis* por parte de la comadreja overa (*Didelphis albiventris*) y la ardilla brasileña (*Guerlinguetus brasiliensis*). Por primera vez, se registra este comportamiento micófago en la comadreja overa. El estudio también corroboró la eficacia de las cámaras trampa como herramienta para el monitoreo no invasivo de la fauna y sus interacciones en investigaciones etológicas. Además, los datos generados contribuyen a una comprensión más profunda de las dinámicas ecológicas entre la fauna y los hongos en el Neotrópico.

Palabras clave: Agaricales; interacciones ecológicas; micofagia; pequeños mamíferos; setas.

INTRODUCTION

Fungi play a crucial role in terrestrial ecosystems by decomposing organic matter, thereby contributing significantly to nutrient cycling and the maintenance of life on Earth (Webster & Weber, 2007). In addition to these ecosystem services, several studies have demonstrated that fungi serve as an important nutrient source for various animal species (Fogel & Trappe, 1978; Wheeler & Blackwell, 1984; Elliott & Vernes, 2021; Elliott *et al.*, 2019a, b, 2022; Santamaria *et al.*, 2023).

The term mycophagous refers to animals that incorporate fungi into their diet (Merritt, 2010). Mycophagy, defined as the consumption of fungi, has been documented in a wide range of animal groups, including invertebrates, birds, mammals, and reptiles. This behavior is ecologically relevant not only for the animals that consume fungi as a food resource but also for the fungi themselves, as ingestion by animals can aid in spore dispersal and influence various ecological processes, including ecological succession (Trappe *et al.*, 2009; Schickmann *et al.*, 2012; Trierveiler-Pereira *et al.*, 2016, 2024).

Fungal consumption by mammals in Brazil has been scarcely documented in literature. Peres (1993) reported the consumption of bracket fungi (Polyporaceae) by tamarins of the genus *Saguinus* Hoffmannsegg, 1807 in the Amazon. Later, Bordignon & Monteiro-Filho (1999) observed that mushrooms — identified only as fungi (Basidiomycota) — were consumed by the Brazilian squirrel [*Guerlinguetus brasiliensis* (Gmelin, 1788)], in secondary Araucaria forests, particularly during winter and spring. Correa *et al.* (2000) found that fungal consumption accounted for up to 19% of the foraging time of *Callithrix aurita* (É. Geoffroy, 1812), but the fungal species was not identified. Lopes & Rehg (2003) reported the consumption of *Auricularia* sp. by *Callimico goeldii* (O. Thomas, 1904) in the Amazon Rainforest of southeastern Acre. Vieira *et al.* (2006), analyzing fecal samples from three rodent species in Araucaria forests, concluded that fungi constitute an important component of their diet. Trierveiler-Pereira *et al.* (2016) reported the consumption of *Ascopolyporus* sp. by black-capped squirrel monkey (*Saimiri boliviensis* I. Geoffroy & Blainville, 1834) in the Amazon, as well as the ingestion of phalloid fungi (*Itajahya galericulata* Möller) by Azara's agouti (*Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823) in Santa Catarina (Southern Brazil). Hilário and Ferrari (2010) observed that fungi accounted for 64.8% of all feeding records for the buff-headed marmoset (*Callithrix flaviceps* Thomas, 1903) in Augusto Ruschi Biological Reserve (Espírito Santo, Southeastern Brazil) during their study period, particularly two species of the genus *Mycocitrus* (Ascomycota). More recently, Simionatto *et al.* (2024) documented mushroom consumption (identified as Basidiomycota) by *Mazama rufa* (Illiger, 1815) in Iguazu National Park (Paraná, southern Brazil), and Trierveiler-Pereira *et al.* (2024) reported the consumption of the coconut mushroom [*Oudemansiella cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) R.H. Petersen] by the Brazilian squirrel (*G. brasiliensis*) on Ilhabela, an island off the Atlantic coast of São Paulo, Brazil.

Seeking to better understand mycophagy among Neotropical mammals, the present study investigated the occurrence of fungal consumption in the southwestern region of São Paulo (Brazil), with a particular focus on small mammals. Additionally, it evaluated the effectiveness of camera traps as a methodological tool for documenting and analyzing mycophagous behavior in natural environments.

MATERIAL AND METHODS

Study area

The study was conducted in a riparian forest fragment along the Itapetininga River in the municipality of Campina do Monte Alegre, located in the Southwestern São Paulo (Fig. 1). This region is characterized by the presence of both Atlantic Forest and Cerrado phytophysiognomies, making it an ecotone area, in addition to containing areas of livestock farming, agriculture, and forestry. The climate is classified as subtropical, categorized as Cfa according to the Köppen-Geiger classification system (Peel *et al.*, 2007). The Itapetininga River is part of the Alto Paranapanema River basin, a region where approximately one-fifth of the territory is covered by native vegetation and which possesses significant water resources (CBH-ALPA, 2018). Preliminary field visits were conducted to know the area, and two locations were selected for the installation of camera traps, here defined as: point 1 (23° 35' 58.5" S, 48° 28' 34.0" W) and point 2 (23° 35' 58.4" S, 48° 28' 32.7" W). These locations were chosen due to the presence of large decomposing logs containing a considerable number of mushroom specimens and potential evidence of mycophagy (Fig. 2).

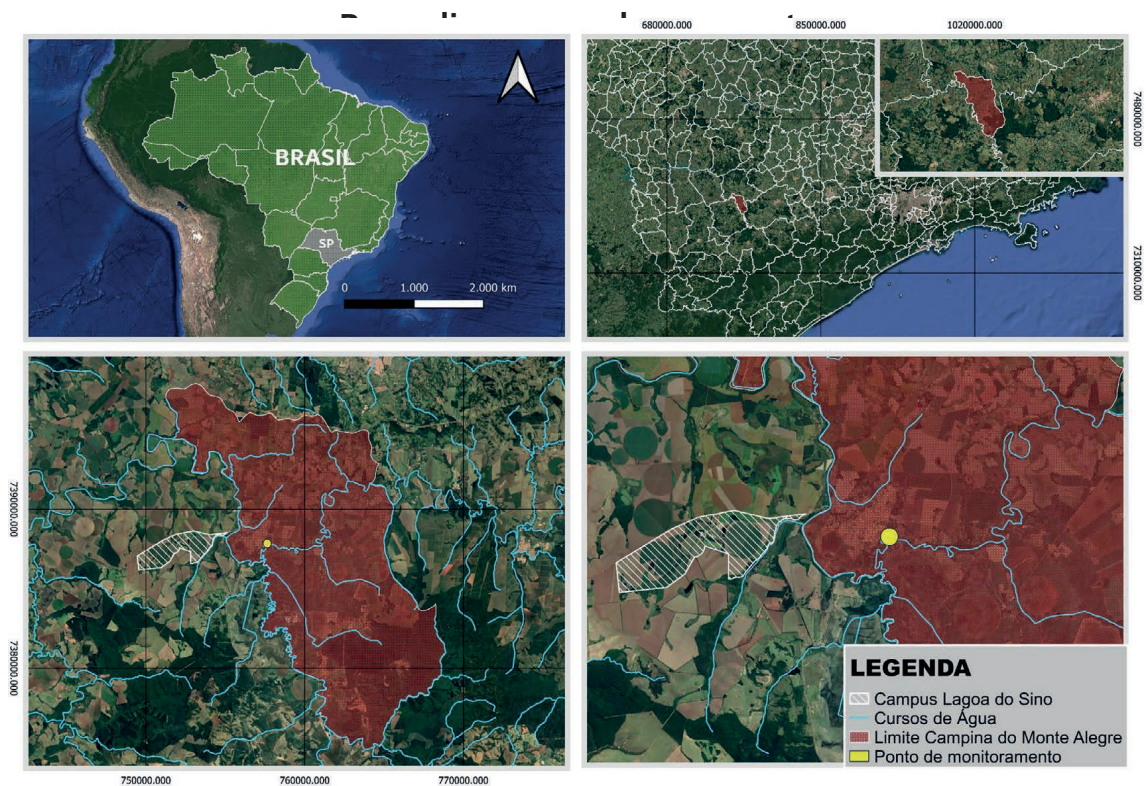


Fig. 1. Maps showing the study area in the municipality of Campina do Monte Alegre, State of São Paulo, Brazil.

Fig. 1. Mapas que muestran el área de estudio en el municipio de Campina do Monte Alegre, Estado de São Paulo, Brasil.



Fig. 2. Coconut mushroom (*Oudemansiella cubensis*) in the study area. A. Basidiomes on a decaying log *in situ*. B. Basidiomes showing signs of mycophagy.

Fig. 2. El hongo *Oudemansiella cubensis* en el área de estudio. A. Basidiomas sobre un tronco en descomposición *in situ*. B. Basidiomas con indicios de micofagia.

Two camera traps (Bushnell Trophy Cam) were installed in two points in the study area from October 2021 to April 2023. The camera traps were installed facing large fallen logs where researchers had previously observed the recurring and spontaneous emergence of mushrooms, primarily from the genera *Oudemansiella* and *Auricularia*. These devices were configured to capture images and record videos of up to 30 seconds. The camera traps were checked at intervals of no more than 30 days, during which images were copied, batteries were replaced, and the equipment was inspected for proper functionality. The total sampling effort amounted to 16,128 hours, with point 1 accounting for 12,936 hours from October 2021 to April 2023. Meanwhile, point 2 was monitored for a total of 3,192 hours, from October 2021 until its removal in February 2022. The difference in sampling effort between the two locations was due to the availability of camera trap equipment.

Collection and identification of mushrooms

Basidiomes were collected to confirm species identity following the standard methodology for macrofungi analysis (Vargas-Isla *et al.*, 2014). Specimens were carefully collected from the substrate using a pocketknife and subsequently analyzed macroscopically and microscopically. Microscopic analysis included the examination of fungal microstructures such as basidia,

basidiospores, cystidia, and hyphae, among other essential elements for species identification and classification. The specimens were then dehydrated using a food dehydrator set to a temperature below 40°C to preserve structural integrity and prevent damage to the fungus (Wu *et al.*, 2004). Species identification followed the description proposed by Meijer (2008). Dried specimens are kept at the Fungal Collection of Herbarium SPSC (Federal University of São Carlos, Brazil).

Identification of recorded animal species

Animal species identification was based on literature (Patton *et al.*, 2015; Graipel *et al.*, 2017, Verdade, 2018) and confirmed, when needed, by specialists. The study was conducted solely using images captured by camera traps, and no animals were captured or handled during this research.

Data analysis

The collected data were analyzed qualitatively to document and observe all relevant information for the study. After reviewing the equipment and copying image files, images of interest were selected while discarding those without relevant content.

A spreadsheet was created to document data on recorded animal species, including their scientific and common names, the date and time of capture (daytime, nighttime, or both), and whether interactions with fungi were observed (Table 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Animals and fungi recorded during the study

A total of 301 animal records were obtained, with 253 from point 1 and 48 from point 2. Forty species of animals were recorded, representing three major groups: birds (25 species), mammals (14 species), and reptiles (one species). Five species could not be identified at species level, including four birds and one mammal (rodent). All species are listed in Table 1. The most frequently recorded groups were birds and mammals, with the most commonly observed species being the white-eared opossum (*Didelphis albiventris* Lund, 1840) with 76 records, the pale-breasted thrush (*Turdus leucomelas* Vieillot, 1818) with 42 records, the white-tipped dove (*Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855) with 33 records, the domestic cat (*Felis silvestris catus* Linnaeus, 1758) with 26 records, the rufous-bellied thrush (*Turdus rufiventris* Vieillot, 1818) with 22 records, and the South American coati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with 17 records.

Table 1. Animals recorded during the study, their activity periods, and their interactions with fungi.**Tabla 1.** Animales registrados durante el estudio, sus períodos de actividad e interacciones con hongos.

Taxa / Sampling site	Animal species	Common name in English	Common name in Portuguese	Period of activity	Presence of mushrooms	Mushroom consumption
Birds						
1	<i>Athene cunicularia</i> (Molina, 1782)	Burrowing Owl	coruja-buraqueira	night	no	no
1	<i>Campephilus melanoleucos</i> (Gmelin, 1788)	Crimson-crested Woodpecker	pica-pau-de-topete-vermelho	day	no	no
1	<i>Campylorhamphus falcularius</i> (Vieillot, 1822)	Black-billed Scythebill	arapaçu-de-bico-torto	day	no	no
1	<i>Cathartes aura</i> (Linnaeus, 1758)	Turkey Vulture	urubu-de-cabeça-vermelha	day	no	no
1	<i>Celeus cf. flavescens</i> (Gmelin, 1788)	Blond-crested Woodpecker	pica-pau-de-cabeça-amarela	day	no	no
2	<i>Colaptes melanochloros</i> (Gmelin, 1788)	Green-barred Woodpecker	pica-pau-verde-barrado	day	no	no
1	<i>Coragyps atratus</i> (Bechstein, 1793)	Black Vulture	urubu-preto	day	no	no
1	<i>Coryphospingus cucullatus</i> (Statius Muller, 1776)	Red-crested Finch	tico-tico-rei	day	no	no
1 and 2	<i>Cyanocorax chrysops</i> (Vieillot, 1818)	Plush-crested Jay	gralha-picaça	day	no	no
1	<i>Furnarius rufus</i> (Gmelin, 1788)	Rufous Hornero	joão-de-barro	day	no	no
1 and 2	<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855	White-tipped Dove	juriti-pupu	day	yes	no
1 and 2	<i>Mesembrinibis cayennensis</i> (Gmelin, 1789)	Green Ibis	coró-coró	day	no	no
1	unidentified bird 1	unknown	unknown	day	no	no
2	unidentified bird 2	unknown	unknown	day	no	no
1	unidentified bird 3	unknown	unknown	day	no	no
2	unidentified bird 4	unknown	unknown	day	no	no
1	<i>Penelope obscura</i> Temminck, 1815	Dusky-legged Guan	jacuguaçu	day	yes	no
1	<i>Pitangus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	Great Kiskadee	bem-te-vi	day	no	no
1	<i>Stelpnia cayana</i> (Linnaeus, 1766)	Burnished-buff Tanager	saíra-amarela	day	no	no
1	<i>Tigrisoma lineatum</i> (Boddaert, 1783)	Rufescent Tiger-Heron	socó-boi	day	no	no
1	<i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850	Creamy-bellied Thrush	sabiá-poca	day	no	no
1 and 2	<i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	Pale-breasted Thrush	sabiá-barranco	day	yes	no
1 and 2	<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818	Rufous-bellied Thrush	sabiá-laranjeira	day	yes	no
1	<i>Tyrannus melancholicus</i> Vieillot, 1819	Tropical Kingbird	suiriri	day	no	no
1	<i>Volatinia jacarina</i> (Linnaeus, 1766)	Blue-black Grassquit	tiziu	day	no	no
Mammals						
1	<i>Canis lupus familiaris</i> Linnaeus, 1758	Domestic dog	cachorro-doméstico	both	no	no
1	<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Illiger, 1815)	Maned wolf	lobo-guará	night	no	no
1	<i>Dasypus cf. septemcinctus</i> Linnaeus, 1758	Seven-banded armadillo	tatuí	night	no	no
1 and 2	<i>Didelphis albiventris</i> P. W. Lund, 1840	White-eared opossum	gambá-de-orelha-branca	night	yes	yes
1 and 2	<i>Felis catus</i> Linnaeus, 1758	Domestic cat	gato-doméstico	night	yes	no
1 and 2	<i>Guerlinguetus brasiliensis</i> (Gmelin, 1788)	Brazilian squirrel	serelepe	day	yes	yes
1	<i>Leopardus guttulus</i> (Hensel, 1872)	Atlantic Forest oncilla	gato-do-mato-pequeno	night	no	no
1	<i>Lepus cf. europaeus</i> Pallas, 1778	European hare	lebre-europeia	night	no	no
1	<i>Lycalopex cf. vetula</i> (Lund, 1842)	Hoary fox	raposa-do-campo	night	no	no
1	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> Linnaeus, 1758	Giant anteater	tamanduá-bandeira	night	no	no
1 and 2	<i>Nasua nasua</i> Linnaeus, 1766	South American coati	quati-de-cauda-anelada	day	no	no
1	unidentified rodent	unknown	unknown	night	no	no
1	<i>Sapajus</i> sp.	Capuchin monkey	macaco-prego	day	no	no
1	<i>Tamandua tetradactyla</i> (Linnaeus, 1758)	Southern tamandua	tamanduá-mirim	night	no	no
Reptiles						
1	<i>Salvator merianae</i> Duméril & Bibron, 1839	Black and white tegu	teiú	day	yes	no

The most frequently occurring fungal species in the study area was the coconut mushroom [*Oudemansiella cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) R.H. Petersen], which was frequently present on the monitored logs. Another common fungal species in the monitored logs was the jelly fungi *Auricularia cornea* Ehrenb.

Of the 40 animal species recorded in this study, eight had occurrences coinciding with the presence of the coconut mushroom. Among these eight species, two were documented eating the mushroom *in situ*: the white-eared opossum (*D. albiventris*), a nocturnal animal, and the Brazilian squirrel (*G. brasiliensis*), a diurnal animal (Fig. 3 and 4). These findings highlight the potential ecological role of fungi as a food resource and suggest that fungal consumption by native Brazilian mammals may be more common than previously recognized.



Fig. 3. White-eared opossum (*Didelphis albiventris*) consuming the coconut mushroom (*Oudemansiella cubensis*).

Fig. 3. Comadreja overa (*Didelphis albiventris*) consumiendo el hongo *Oudemansiella cubensis*.



Fig. 4. Brazilian squirrel (*Guerlinguetus brasiliensis*) consuming the coconut mushroom (*Oudemansiella cubensis*).

Fig. 4. Ardilla brasilera (*Guerlinguetus brasiliensis*) consumiendo el hongo *Oudemansiella cubensis*.

Mycophagous behavior of the squirrel (*Guerlinguetus brasiliensis*)

The first recorded contact between the Brazilian squirrel and *Oudemansiella cubensis* occurred on November 7, 2021; however, mushroom consumption was not observed at that time. The second record was on August 14, 2022, when mushroom consumption was documented for the first time. In total, 15 records of *G. brasiliensis* were obtained, 14 at point 1 and one at point 2. In three of these 15 records, the squirrel was eating the mushroom. The frequency of these observations suggests that fungi might be an occasional but relevant food source for this species.

This is the third documented case of mycophagy by this squirrel species and the second involving the consumption of the coconut mushroom (*O. cubensis*) (Bordignon & Monteiro-Filho, 1999; Trierveiler-Pereira *et al.*, 2024). The latter authors recorded this mushroom being consumed by the squirrel in Ilhabela in 2019, an island on the coast of São Paulo, approximately 320 km from the present study area. These records emphasize the importance of fungi in the diet of *G. brasiliensis*, and their potential role in dispersing fungal spores. The consumption of fungi by squirrels of the family Sciuridae is well documented in the literature. In their comprehensive global review on mammalian mycophagy, Elliott *et al.* (2022) reported a total of 57 mycophagous squirrel species. Considering all Rodentia species, these authors documented fungal consumption in 220 species.

Mycophagous behavior of the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*)

The first record of the white-eared opossum (*D. albiventris*) occurred on October 19, 2021, followed by a second record two days later, on October 21, 2021. Periodic visits were observed at different intervals, sometimes daily, weekly, or biweekly. Based on these observations, it is believed that the coconut mushroom (*O. cubensis*) serves as a consistent food resource for the white-eared opossum.

Throughout the study, 76 photographic records of the white-eared opossum were obtained, ten of which coincided with the presence of the mushroom. In nine of these instances, fungal consumption was observed, confirming mycophagy. The frequency and regularity of these observations suggest that fungi may play a more significant role in the diet of *D. albiventris* than previously thought. This is the first documented case of the white-eared opossum consuming mushrooms, contributing valuable knowledge to the ecological interactions of this species and reinforcing its omnivorous diet (Silva *et al.*, 2014). On the other hand, mycophagy is well documented for another species of the genus, the Virginia opossum (*Didelphis virginiana* Kerr, 1792), with at least six studies reporting this behavior. Additionally, two species of *Marmosops* Matschie, 1916, also belonging to the family Didelphidae, are known to be mycophagous. Across all Metatheria (= Marsupialia), mycophagy has been reported in 54 species, according to Elliott *et al.* (2022).

Other relevant observations

As stated above, the Brazilian squirrel and the white-eared opossum were the only two species recorded consuming the coconut mushroom. It is worth highlighting that these interactions occurred during distinct periods — all records of the Brazilian squirrel were made during the day,

while all records of the white-eared opossum were made at night. Although these findings were expected, as these are the typical activity periods for each species, it is interesting to note that they can share the same food resource — the same mushroom species on the same log — by taking turns. Mycophagy among co-occurring vertebrates was also reported by Elliott and Vernes (2021), who observed eleven species consuming *Amanita* sp. mushrooms at the same time and location. Interestingly, that study also employed camera traps as a methodological tool.

During this study, the jelly fungus *Auricularia cornea* was recorded on the monitored logs but no evidence of mycophagy involving this fungus was observed. The genus *Auricularia* Bull. includes at least five species known to be consumed by various animal species, notably primates such as the golden bamboo lemur (*Hapalemur aureus* Meier, Albignac, Peyri  ras, Rumpler, & P. Wright, 1987), Goeldi’s monkey [*Callimico goeldii* (O. Thomas, 1904)], and the Japanese macaque (*Macaca fuscata* E. Blyth, 1875) (Hanson *et al.*, 2003, 2006; Porter, 2001). Capuchin monkeys (*Sapajus* sp.) were recorded during the study; however, in all instances, the presence of fungi could not be confirmed. These findings suggest several possibilities: (1) jelly fungi may be consumed in other parts of the study area that were not monitored; (2) animals may exhibit specific food preferences within their habitat, potentially influenced by factors such as the availability of alternative resources; or (3) *Auricularia* species may not be part of their natural diet.

Another noteworthy observation was the frequent presence of different animals on a decomposing log at one of the monitored sites. As previously mentioned, certain species, such as the white-tipped dove (*Leptotila verreauxi* Bonaparte, 1855), pale-breasted thrush (*Turdus leucomelas* Vieillot, 1818), rufous-bellied thrush (*Turdus rufiventris* Vieillot, 1818), and South American coati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766), were frequently recorded. It is believed that these animals were attracted to the log in search of other food resources, such as various invertebrates present in the decomposing wood, as they are all omnivorous species. Costa *et al.* (2022) investigated the consumption of *Macrolepiota bonaerensis* (Speg.) Singer mushrooms by the shiny cowbird (*Molothrus bonariensis* Swainson, 1832), a passerine bird similar to the pale-breasted thrush and the rufous-bellied thrush. However, these species were not observed consuming mushrooms in the present study.

While this study provides important insights into mycophagy, it is necessary to acknowledge potential methodological biases. Camera traps are an effective non-invasive technique, but their use in mycophagy research appears to be relatively recent. According to the review by Elliott *et al.* (2022), the first study to employ this method was conducted by Vernes *et al.* (2014), and only five studies have used camera traps for this purpose. Prior to the present study, the only research in Brazil to apply this technique was that of Simionatto *et al.* (2024), who reported mushroom consumption by

the red brocket deer (*Mazama rufa* Illiger, 1815). Despite the potential of camera traps for mycophagy studies, their use also presents limitations, such as a restricted field of view, potential misidentifications, and environmental factors — such as lighting conditions — that may affect image quality. Additionally, the mere presence of a camera trap could influence animal interactions with macrofungi. Future studies should incorporate complementary methods, including direct observation, fecal analysis for fungal spores, molecular sequencing techniques to detect fungal DNA in animal feces, and controlled experiments such as cafeteria trials, to achieve a more comprehensive understanding of fungal consumption by animals. These additional approaches could help determine whether fungi serve as an occasional or staple food source for certain species and clarify their role in forest ecosystems.

CONCLUSIONS

Camera trap monitoring resulted in the first recorded case of mycophagy by the white-eared opossum (*D. albiventris*) and the third documented instance of mycophagy by the Brazilian squirrel (*G. brasiliensis*) in Brazil. These findings contribute to a better understanding of fungus-animal interactions, a topic often overlooked in vertebrate dietary studies, where fungi are typically omitted or reported only in broad taxonomic categories, such as at the phylum level. The observed mycophagous behavior suggests that small mammals may contribute to fungal spore dispersal, in a manner analogous to seed dispersal by frugivores—an ecological process potentially important for fungal population dynamics and forest regeneration.

Documenting animal–fungi interactions in underexplored regions, such as southwestern São Paulo, contributes valuable data to biodiversity assessments and enhances our understanding of ecosystem functioning. These insights are particularly relevant for informing conservation strategies in ecotones and fragmented landscapes, where species interactions may be more vulnerable to environmental change and habitat loss.

This research reinforces the importance of mycophagy studies for a more comprehensive understanding of the ecological role of fungi and the dietary habits of Brazilian fauna. However, further long-term studies integrating multiple methodologies are necessary to refine our knowledge of mycophagous behavior across different animal species.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Emily dos Santos Silva for helping in some field trips and Guilherme Renzo Rocha Brito, Hugo B. Mozerle, Vinícius de Avelar São Pedro and Vítor de Queiroz Piacentini and for helping with identification of some animal species. We also thank the two anonymous

reviewers for their valuable suggestions, which improved the quality of the manuscript. Many thanks are due to Centro de Ciências da Natureza (UFSCar Campus Lagoa do Sino) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Chamada Universal CNPq/2016, Processo 422514/2016-0) for providing equipment and financial support.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Bordignon, M. & Monteiro-Filho, E. L. (1999). Seasonal food resources of the squirrel *Sciurus ingrami* in a secondary Araucaria Forest in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 34: 137-140.
- CBH-ALPA (Comitê da Bacia Hidrográfica do Alto Paranapanema). (2018). *Relatório II – Plano de Bacia. Plano da Bacia Hidrográfica do Alto Paranapanema* (UGRHI 14) – 2016-2027. Retrieved from https://sigrh.sp.gov.br/public/uploads/documents/CBH-ALPA/13699/pbh-alpa_relatorioii_final.pdf
- Correa, H. K. M., Coutinho, P. E. G. & Ferrari, S. F. (2000). Between-year differences in the feeding ecology of highland marmosets (*Callithrix aurita* and *Callithrix jacchus*) in southeastern Brazil. *Journal of Zoology* 252: 421-427. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb01224.x>
- Costa, A. L., Furlan-Lopes, C., Heberle, M. A. & Putzke, J. (2022). The bird shiny cowbirds (*Molothrus bonariensis*) in a relationship interesting of mycophagy with the mushroom *Macrolepiota bonaerensis* in the Brazilian pampa biome. *Studies in Multidisciplinary Review* 3 (2): 153-167. <https://doi.org/10.55034/smr3n2-011>
- Elliott, T. F., Bower, D. S. & Vernes, K. (2019a). Reptilian mycophagy: A global review of mutually beneficial associations between reptiles and macrofungi. *Mycosphere* 10 (1): 776-797. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/18>
- Elliott, T. F., Jusino, M. A., Trappe, J. M., Lepp, H., Ballard, G. A., Bruhl, J. J. & Vernes, K. (2019b). A global review of the ecological significance of symbiotic associations between birds and fungi. *Fungal Diversity* 98: 161-194. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00436-3>
- Elliott, T. F. & Vernes, K. (2021). Camera trap detection of mycophagy among co-occurring vertebrates. *Austral Ecology* 46 (4): 496-500. <https://doi.org/10.1111/aec.12988>
- Elliott, T. F., Truong, C., Jackson, S. M., Zúñiga, C. L., Trappe, J. M. & Vernes, K. (2022). Mammalian mycophagy: A global review of ecosystem interactions between mammals and fungi. *Fungal Systematics and Evolution* 9: 99-159. <https://doi.org/10.3114/fuse.2022.09.07>

- Fogel, R. D. & Trappe, J. M. (1978). Fungus consumption (mycophagy) by small mammals. *Northwest Science* 52: 1-31. Retrieved from: <https://andrewsforest.oregonstate.edu/publications/1757>
- Graipel, M. E., Cherem, J. J., Monteiro-Filho, E. L. A. & Carmignotto, A. P. (2017). Mamíferos da Mata Atlântica. In: Monteiro-Filho, E. L. A. & Conte, C. E. (Org.). *Revisões em Zoologia: Mata Atlântica*. Curitiba, Brasil: Ed. UFPR.
- Hanson, A., Hall, M., Porter, L. & Lintzenich, B. (2006). Composition and nutritional characteristics of fungi consumed by *Callimico goeldii* in Pando, Bolivia. *International Journal of Primatology* 27 (1): 323-346. <https://doi.org/10.1007/s10764-005-9014-z>
- Hanson, A. M., Hodge, K. T. & Porter, L. M. (2003). Mycophagy among primates. *Mycologist* 17 (1): 6-10. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(03\)00106-X](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(03)00106-X)
- Hilário, R. R. & Ferrari, S. F. (2010). Feeding ecology of a group of buffy-headed marmosets (*Callithrix flaviceps*): fungi as a preferred resource. *American Journal of Primatology* 72 (6): 515-521. <https://doi.org/10.1002/ajp.20804>
- Lopes, M. A. D. O. A. & Rehg, J. A. (2003). Observations of *Callimico goeldii* with *Saguinus imperator* in the Serrado Divisor National Park, Acre, Brazil. *Neotropical Primates* 11: 181-183. <https://doi.org/10.62015/np.2003.v11.557>
- Meijer, A. A. R. (2008). *Macrofungos notáveis das Florestas de Pinheiro-do-Paraná*. Colombo, Brasil: EMBRAPA.
- Merritt, J. F. (2010). *The biology of small mammals*. Baltimore, USA: The Johns Hopkins University Press.
- Patton, J. L., Pardiñas, U. F. J. & D'Elia, G. (2015). *Mammals of South America, Volume 2. Rodents*. Chicago and London: The University of Chicago Press.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L. & McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* 11 (5): 1633-1644. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>
- Peres, C. A. (1993). Diet and feeding ecology of saddle-back (*Saguinus fuscicollis*) and moustached (*S. mystax*) tamarins in an Amazonian terra firme forest. *Journal of Zoology* 230: 567-592. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1993.tb02707.x>
- Porter, L. (2001). Dietary differences among sympatric Callitrichinae in Northern Bolivia: *Callimico goeldii*, *Saguinus fuscicollis* and *S. labiatus*. *International Journal of Primatology* 22 (6): 961-992. <https://doi.org/10.1023/A:1012013621258>
- Santamaria, B., Verbeken, A. & Haelewaters, D. (2023). Mycophagy: A global review of interactions between invertebrates and fungi. *Journal of Fungi* 9 (2): 163. <https://doi.org/10.3390/jof9020163>
- Schickmann, S., Urban, A., Kräutler, K., Nopp-Mayr, U. & Hackländer, K. (2012). The interrelationship of mycophagous small mammals and

- ectomycorrhizal fungi in primeval, disturbed and managed Central European mountainous forests. *Oecologia* 170: 395-409. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2303-2>
- Silva, A. R. da, Forneck, E. D., Bordignon, S. A. de L. & Cademartori, C. V. (2014). Diet of *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Didelphimorphia, Didelphidae) in two periurban areas in southern Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 36 (2): 241-247. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v36i2.20444>
- Simionatto, T., Prasniewski, V. M., Szinwelski, N. & Brocardo, C. R. (2024). Consumo de cogumelos por *Mazama rufa* (Illiger, 1815) na Mata Atlântica subtropical. *Notas Sobre Mamíferos Sudamericanos* 6: e24.11.3. <https://doi.org/10.31687/SaremNMS24.11.3>
- Trappe, J. M., Molina, R., Luoma, D. L., Cázares, E., Pilz, D., Smith, J. E., Castellano, M. A., Miller, S. L. & Trappe, M. J. (2009). *Diversity, ecology, and conservation of truffle fungi in forests of the Pacific Northwest*. General Technical Report PNW-GTR-772. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland. 10.2737/PNW-GTR-772
- Trierveiler-Pereira, L., Silva, H. C. S., Funez, L. A. & Baltazar, J. M. (2016). Mycophagy by small mammals: new and interesting observations from Brazil. *Mycosphere* 7 (3): 297-304. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/3/5>
- Trierveiler-Pereira, L., Francisco, A. & Baltazar, J. M. (2024). New observation on mycophagy: consumption of coconut mushroom (*Oudemansiella cubensis*) by the Brazilian squirrel (*Guerlinguetus brasiliensis*). *Steviana* 16 (2): 5-11. https://doi.org/10.56152/StevianaFacenV16N2A1_2024
- Vargas-Isla, R., Cabral, T. S. & Ishikawa, N. K. (2014). *Instruções de coletas de macrofungos. Agaricales e gasteroides*. Manaus, Brasil: Editora INPA. Retrieved from: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/36179>
- Verdade, L. M. (Coord.). (2018). *Mamíferos da região de Angatuba*. São Paulo: Author's edition.
- Vernes, K., Smith, M. & Jarman, P. (2014). A novel camera-based approach to understanding the foraging behaviour of mycophagous mammals. In: Meek, P., Fleming, P., Ballard, G., Banks, P., Claridge, A., Sanderson, J. & Swann D. (Eds.). *Camera Trapping in Wildlife Management and Research*. Melbourne, Australia: CSIRO Publishing. <https://doi.org/10.1071/978148630040228.215.224.2014.28>
- Vieira, E. M., Paise, G. & Machado, P. H. (2006). Feeding of small rodents on seeds and fruits: a comparative analysis of three species of rodents of the Araucaria forest, southern Brazil. *Acta Theriologica* 51: 311-318. <https://doi.org/10.1007/BF03192683>
- Webster, J. & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi* (3^a ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511809026>

- Wheeler, Q. D. & Blackwell, M. (Eds.). (1984). *Fungus-insect relationships: Perspectives in ecology and evolution*. New York, USA: Columbia University Press. <https://doi.org/10.1086/414669>
- Wu, Q., Thiers, B. M. & Pfister, D. H. (2004). Preparation, preservation, and use of fungal specimens in herbaria. In: Mueller, G. M., Bills, G. F. & Foster, M. S. (Eds.). *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Boston, USA: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50031-3>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Micorriza arbuscular en dos especies de *Anemia* (Anemiaceae) con diferentes requerimientos ecológicos

Arbuscular mycorrhizas in two species of *Anemia* (Anemiaceae) with different ecological requirements

Grosso Dalúz, Luciano¹; Gabriela Romagnoli^{1*}; Marcelo Arana^{2,3}; Patricia Liliana Albornoz^{1,4}

¹ Facultad Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán, Argentina.

² Instituto Criptogámico, Sección Pteridología, Fundación Miguel Lillo. San Miguel de Tucumán, Argentina.

³ Grupo GIVE, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Instituto ICBIA (UNRC-CONICET), Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

⁴ Instituto de Morfología Vegetal, Área Botánica, Fundación Miguel Lillo. San Miguel de Tucumán, Argentina.

* Autor correspondiente: <mgromagnoli@csnat.unt.edu.ar>

Resumen

De las 1200 especies de licofitas y helechos analizados hasta el momento, el 67% evidenciaron la presencia de micorriza arbuscular. Entre ellas, las pertenecientes a Anemiaceae presentan la máxima frecuencia de micorrización arbuscular a nivel mundial. En Argentina se reconocen siete especies de *Anemia*, entre ellas *A. australis* y *A. phyllitidis*, con diferentes nichos ecológicos. El objetivo de este trabajo fue documentar, caracterizar el tipo morfológico y determinar el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular en *A. australis* y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis*. Se colectaron sistemas radiculares de cinco individuos por especie en el Jardín Botánico Horco Molle (Tucumán); los mismos fueron tratados con técnicas convencionales. Ambos taxones evidenciaron la colonización de micorrizas arbusculares con los tipos morfológicos *Arum* y *Paris*. El porcentaje de colonización hifal fue superior al 90 % en ambas especies, siendo el arbuscular significativamente mayor en *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* y el vesicular mayor en *A. australis*. Esto podría

► Ref. bibliográfica: Grosso Dalúz, L.; Romagnoli, G.; Arana, M.; Albornoz, P. L. 2025. Micorriza arbuscular en dos especies de *Anemia* (Anemiaceae) con diferentes requerimientos ecológicos. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 263-275. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2081>

► Recibido: 11 de diciembre 2024 – Aceptado: 9 de junio 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

reflejar los requerimientos de las especies debido a los distintos hábitats que ocupan las mismas. Asociados a los HMA se detectó la presencia de endófitos septados. Se describe por primera vez la presencia de micorrizas arbusculares para *A. australis* y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis*.

Palabras clave: *Anemia australis*; *A. phyllitidis*; micorrizas; endófitos.

Abstract

Of the 1200 species of lycophytes and ferns analyzed to date, 67% showed the presence of arbuscular mycorrhizas. Among them, species belonging to Anemiaceae show the highest frequency of arbuscular mycorrhization worldwide. In Argentina, seven species of *Anemia* are recognized, including *A. australis* and *A. phyllitidis* which occupy different ecological niches. The aim of this work is to document, characterize the morphological type, and determine the percentage of arbuscular mycorrhizal colonization in *A. australis* and *A. phyllitidis* var. *phyllitidis*. Root systems from five individuals per species were collected from the Horco Molle Botanical Garden (Tucumán) and were processed using conventional techniques. Both taxa evidenced arbuscular mycorrhizal colonization with *Arum* and *Paris* morphological types. The percentage of hyphal colonization was over 90 % in both species, with arbuscular colonization being significantly higher in *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* and vesicular colonization was higher in *A. australis*. This could indicate the specific physiological requirements of each species, given the diverse range of habitats they occupy. Septate endophytes were detected in association with AMF. This is the first report of the presence of arbuscular mycorrhizae in *A. australis* and *A. phyllitidis* var. *phyllitidis*.

Keywords: *Anemia australis*; *A. phyllitidis*; mycorrhizae; endophytes.

INTRODUCCIÓN

Anemia Sw. (Anemiaceae) comprende alrededor de 115 especies de helechos con una distribución fundamentalmente gondwánica, siendo su centro de diversidad América tropical y subtropical, con escasos representantes en África (tropical y austral), Madagascar e India meridional (Labiak *et al.*, 2015; Mickel, 2016). Las especies de este género se caracterizan por los esporangios, que poseen un anillo de dehiscencia (annulus) subapical y esporas triletes, tetrahédricas, estriadas (Mickel, 2016). El género posee tres subgéneros, de los cuales en Argentina está presente únicamente *Anemia* subgénero *Anemia*, que morfológicamente se distingue porque sus rizomas poseen un indumento de tricomas de color naranja variando desde naranja rojizo hasta ocráceo y las frondes, que en general presentan pinnas hemidimorfás, con dos pinnas basales fértiles y erectas (Smith *et al.*, 2006; Labiak *et al.*, 2015). El subgénero está representado por siete especies (Ramos Gia-

cosa, 2016), entre las que se encuentran *A. australis* (Mickel), M. Kessler & A.R. Sm y *A. phyllitidis* (L.) Sw. La primera se distribuye en Perú, Bolivia y ambientes serranos del centro y noroeste de Argentina, mientras que *A. phyllitidis* se halla ampliamente distribuida desde México hasta el sur de Brasil, Uruguay, Paraguay y en Argentina principalmente, en el noroeste y noreste (Mickel, 2016; Ramos Giacosa, 2016). Esta especie posee cuatro variedades, de las cuales tres habitan en Argentina, mientras que *A. phyllitidis* var. *fraxinifolia* (Raddi) Hass., es endémica de Brasil (Mickel, 2016). De las tres variedades presentes en Argentina, sólo *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* está presente en el Noroeste argentino, las otras dos variedades están restringidas al sector noreste del país (Mickel, 2016).

Anemia phyllitidis var. *phyllitidis* posee hábito herbáceo, de 20 a 70 cm de longitud, con rizoma corto cubierto de tricomas castaño-rojizos. Las frondes presentan láminas pinnadas, con las pinnas fértiles próximas a las estériles, sobrepasando la longitud de la lámina (Ramos Giacosa, 2016). En cambio, *Anemia australis* es un helecho herbáceo erguido, de hasta 50 cm de longitud, con rizoma horizontal, con tricomas color naranja-ocráceo (Luján *et al.*, 2000). Las frondes poseen láminas 2-pinnadas a 2-pinnado-pinnatifidas, con las pinnas fértiles erectas y distanciadas de las estériles (Ramos Giacosa, 2016).

Aunque estas especies habitan desde selvas y bosques húmedos o secos, roquedales, hasta estepas gramíneas de montaña (De la Sota, 1968, 1977); son frecuentes en áreas abiertas con suelos propensos a sequías periódicas. En estos ambientes se expresan una serie de caracteres xeromórficos, los cuales evidencian las adaptaciones morfo-anatómicas tendientes a reducir la pérdida de agua (Labiak *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2019; Romagnoli *et al.*, 2021). Además, estas especies habitan en hábitats muy diferentes: *Anemia australis* crece en ambientes con estación seca muy marcada, habitando en roquedales y lugares abiertos como pastizales, con luz solar directa, mientras que *A. phyllitidis*, posee preferencia por el sotobosque húmedo y ambientes riparios, incluso de bosques en galería (Mickel, 2016; Romagnoli *et al.*, 2021). En los suelos de lugares que presentan una marcada estacionalidad de precipitaciones, las plantas asociadas a hongos micorrízicos arbusculares (HMA) incrementan la absorción y transporte de agua, debido a que las hifas generan redes de micelio que además mejoran la estructura del suelo (Marschner y Dell, 1994; Zhao *et al.*, 1999; Morte *et al.*, 2000). Por otra parte, la micorriza arbuscular desempeña un papel importante en el ciclado de nutrientes, ya que las conexiones hifales permiten el intercambio de elementos esenciales entre el hongo y las plantas (Smith y Read, 2008; Kottke *et al.*, 2008; Field *et al.*, 2015; van Der Heijden *et al.*, 2015).

Los HMA, pertenecen al Subphylum Glomeromycotina (Spatafora *et al.*, 2016), al colonizar las raíces de sus hospederos la micorriza arbuscular que forman puede exhibir dos tipos morfológicos: *Arum* y *Paris* (Dickson, 2004). Lehnert y Kessler (2016) y Lehnert *et al.* (2017) mencionan que de 1200 especies de licofitas y helechos analizados, un 67% evidencian este tipo

de asociación. Anemiaceae ha sido considerada como una familia con la máxima frecuencia de micorrización a nivel mundial (Lehnert *et al.*, 2017).

En lo que respecta a las especies de interés, se han documentado antecedentes de colonización micorrízica arbuscular solo para *Anemia phyllitidis* (Andrade *et al.*, 2000; Zubek *et al.*, 2010; Lara Pérez *et al.*, 2015), mientras que no existen registros para *A. australis*.

Coexistiendo con la MA, es frecuente observar también hongos endófitos septados oscuros (ESO), pertenecientes a los Ascomycetes dematiáceos, que colonizan el tejido cortical (Jumpponen, 2001) y pueden formar asociaciones mutualistas similares a los HMA facilitando la absorción de nutrientes y la protección contra varios factores de estrés en las plantas hospedadoras (Valdez Nuñez *et al.*, 2022). Además, se ha sugerido que la melanización de las hifas de estos hongos podría contribuir a la adaptación de la planta hospedadoras a condiciones adversas, ya que la melanina jugaría un rol importante en la eliminación de radicales libres que se generan bajo estrés abiótico (Redman *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo fue documentar, caracterizar y comparar el tipo morfológico de micorriza arbuscular en *Anemia australis* y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis*, así como determinar el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular en estas especies de helechos que cohabitan, pero que tienen requerimientos ecológicos diferentes por lo que se esperaría encontrar diferencias en la colonización micorrízica y los hongos septados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los ejemplares de *Anemia australis* y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* (Fig. 1A, B) fueron colectados en el Jardín Botánico Horco Molle (JBHM), perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales e IML de la UNT (Yerba Buena, Tucumán), depositándose un ejemplar de referencia de cada especie en el herbario LIL (Thiers, 2024). La región presenta un clima templado con una temperatura media anual entre 18°C y 20°C, de inviernos tenues y secos, y veranos cálidos y lluviosos, con precipitaciones anuales entre 600-1000 mm (Mendoza y González, 2011). El Jardín constituye un espacio de recuperación del ambiente original representativo del distrito de las Selvas de Transición, provincia biogeográfica Yungas. Este distrito ocupa las llanuras al pie de las montañas y los cerros bajos, posee una estación seca muy marcada que coincide con el invierno y con precipitaciones menores y mayores temperaturas que otras áreas. Se caracteriza por la dominancia de especies arbóreas como *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul y *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze (Fabaceae) *Calycophyllum multiflorum* Griseb. (Rubiaceae), *Cedrela balansae* C. DC. (Meliaceae) y *Phyllostylon rhamnoides* (J. Poiss.) Taub. (Ulmaceae), en general de hoja caduca (Arana *et al.*, 2021). El relieve se caracteriza por zonas de laderas con pendientes pronunciadas, con densa



Fig. 1. Esporofitos. A) *Anemia australis*, hábito. B) *Anemia phyllitidis* var. *phyllitidis*, hábito. Escalas= A-B: 5 cm.

Fig. 1. Sporophytes. A) *Anemia australis*, habit. B) *Anemia phyllitidis* var. *phyllitidis*, habit. Scales= A-B: 5 cm.

cobertura vegetal y suelos poco profundos (Quiroga, 2020), con perfiles tipo A/Bt/C, con importante aporte orgánico en los horizontes superficiales y procesos de eluviación/iluviación de arcillas (Puchulu y Fernández, 2014).

Ejemplares de referencia

Anemia australis: Argentina, Tucumán, Depto Yerba buena, Jardín botánico Horco Molle, 26°47'34"S, 65° 18'55"O, 604 m snm, 10-VI-2024, M. Romagnoli & M. Arana 30 (LIL618266).

Anemia phyllitidis var. *phyllitidis*: Argentina, Tucumán, Depto Yerba buena, Jardín botánico Horco Molle, 26°47'34"S, 65°18'55"O, 604 m snm, 10-VI-2024, M. Romagnoli & M. Arana 31 (LIL618267).

Tratamiento de raíces

Se colectó material fresco de sistemas radiculares de 5 individuos por especie, los que se trataron con la técnica de Grace y Stribley (1991). Las raíces se clarificaron con KOH al 10% durante 3 días a temperatura ambiente, posteriormente para acelerar la clarificación se sometieron durante 2 horas a 90° C en baño maría. Luego de la clarificación las raíces fueron tratadas con H₂O₂ de 20 volúmenes a baño maría por una hora para terminar de remover los compuestos fenólicos que quedaban en las paredes de algunas células. Las raíces fueron enjuagadas tres veces con agua destiladas y acidificadas con HCL al 2%. Finalmente, se tiñeron con azul de anilina 0,05%.

Para la estimación de la colonización micorrízica, se utilizó la técnica del microscopio compuesto (McGonigle *et al.*, 1990). Se examinaron 150 intersecciones por individuo por especie, para un total $n=450$ (por especie), con un microscopio óptico a un aumento de 200x. En cada intersección de la raíz con la retícula vertical del ocular, se registró la presencia o ausencia de arbusculos, vesículas e hifas. La colonización arbuscular, vesicular e hifal se calculó como la proporción de la longitud de la raíz que contenía cada una de estas estructuras fúngicas. Se obtuvieron los siguientes porcentajes: colonización hifal, vesicular y arbuscular. En todos los casos se estimó la media ($\bar{x}$) y el error standard, salvo la frecuencia de los tipos morfológicos, que se estimó por observación directa. Para la cuantificación de los ESO, se registró el número de puntos de colonización y se identificaron estructuras características (hifas oscuras, hifas hialinas y microesclerocios). Posteriormente, se estimó la frecuencia de colonización en el sistema radicular ($F\%$), definida como el porcentaje de fragmentos de raíz observados que presentan cualquier estructura micorrízica (Trouvelot *et al.*, 1986). Para la medición de las hifas y vesículas se tomó, al azar, la medida de 5 hifas y vesículas por preparado y se obtuvo un promedio de las mismas. Las observaciones se realizaron con microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar Plus, Göttingen, Alemania). Las microfotografías se tomaron con cámara digital (Olympus SP350, 8.0MP, Tokio, Japón). Todas las mediciones se realizaron con la reglilla incluida en el ocular micrométrico, realizándose las conversiones pertinentes dependiendo del aumento en el que se tomó la medición.

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó la prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis (Zar, 1996). Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (Zar, 1996).

RESULTADOS

Anemia australis y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* evidenciaron la presencia de micorriza arbuscular con los tipos morfológicos *Arum* y *Paris*, siendo la morfología *Arum* la más frecuente. En ambos taxones el grosor de las hifas fue similar para cada tipo morfológico; en la morfología *Arum* las hifas intercelulares presentaron un grosor de 1,3-2,6 μm , con arbusculos intracelulares (Fig. 2A-C); mientras que en *Paris* las hifas intracelulares formaron circunvoluciones con arbusculos y presentaron de 3,9-5,2 μm de grosor (Fig. 2D, E). La morfología *Arum* fue la más frecuente. Se evidenciaron vesículas intercelulares esféricas ($19 \times 18 \mu\text{m}$) y elipsoidales ($36 \times 22,5 \mu\text{m}$), además de esporas adheridas a las raíces ($34,5 \times 22,5 \mu\text{m}$) (Fig. 2F, G).

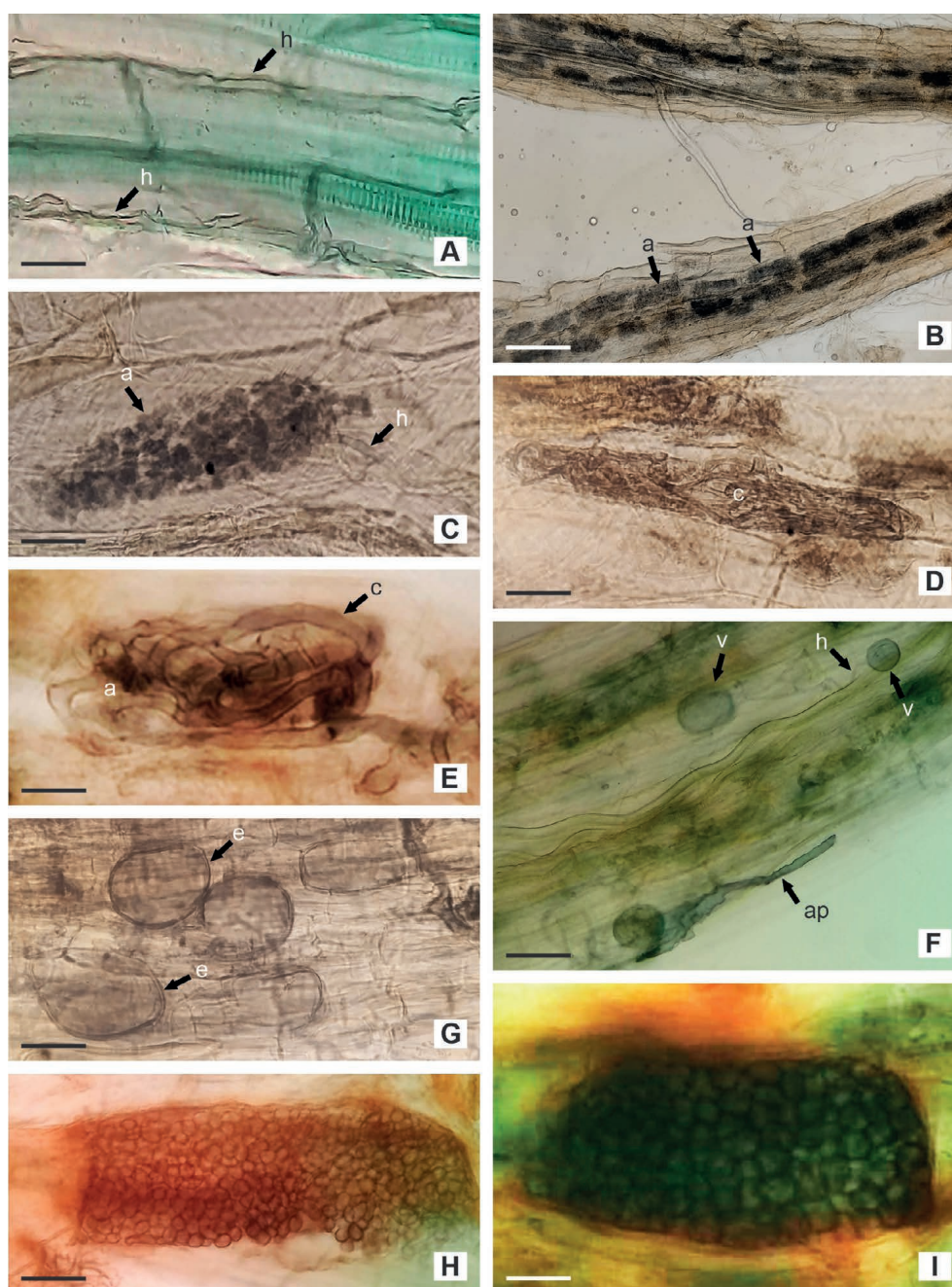


Fig. 2. Endófitos fúngicos. A-G) Micorrizas arbusculares. A-C) Morfología *Arum*. D, E) Morfología *Paris*. F) Vesículas. G) Esporas de Glomeromycotina. H) Esclerocios de endófitos septados oscuros. I) Esclerocios de otros hongos septados. Abreviaturas= a: arbúsculos; ap: apresorio; c: circunvolución; e: espora; h: hifa; v: vesícula. Escalas= A-D: 25 μm ; B: 150 μm ; C-E-F: 30 μm ; G-H-I: 20 μm .

Fig. 2. Fungal endophytes. A-G) Arbuscular mycorrhiza. A-C) *Arum* morphology. D, E) *Paris* morphology. F) Vesicles. G) Glomeromycotina spores. H) Sclerotia of dark septate endophytes. I) Sclerotia of other septate fungi. Abbreviations= a: arbuscules; ap: appressorium; c: coil; e: spore; h: hypha; v: vesicle. Scales= A-D: 25 μm ; B: 150 μm ; C-E-F: 30 μm ; G-H-I: 20 μm .

Tabla 1. Porcentaje de colonización micorrízica arbuscular en *Anemia australis* y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* colectadas en el Jardín Botánico Horco Molle.

Table 1. Percentage of arbuscular mycorrhizal colonization in *Anemia australis* and *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* collected at the Horco Molle Botanical Garden.

Especies	% HMA		
	Hifal	Arbuscular	Vesicular
<i>Anemia australis</i>	91,24±1,67a	33,41±1,28a	5,58±0,79b
<i>Anemia phyllitidis</i>	90,81±1,14a	43,59±0,81b	2,70±0,66a

En la Tabla 1 se muestra la colonización por MA en las especies estudiadas; con respecto a la colonización hifal, la misma fue elevada, no evidenciando diferencia entre las especies; la colonización arbuscular fue significativamente mayor en *Anemia phyllitidis* var. *phyllitidis* (43,59%), mientras que la colonización vesicular fue mayor en *A. australis* (5,58%).

Además, se encontraron otros endófitos coexistiendo con los HMA. Por un lado, los ESO con hifas intercelulares melanizadas y microesclerocios intracelulares ($96 \times 31,5 \mu\text{m}$), los cuales no presentaron diferencias significativas en su colonización, que fue del 7% *Anemia australis* y del 4% en la *A. phyllitidis* var. *phyllitidis* (Fig. 2H). Por el otro, la presencia de otros hongos septados con microesclerocios intracelulares ($76 \times 48 \mu\text{m}$) (Fig. 2I).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los sistemas radicales de *Anemia australis* y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis*, evidenciaron un alto porcentaje de colonización por micorrizas arbusculares, con la presencia simultánea de los tipos morfológicos *Arum* y *Paris*. Estos resultados difieren de lo reportado por Andrade *et al.* (2000) y Lara Pérez *et al.* (2015), quienes identificaron sólo la morfología *Paris* en individuos de *A. phyllitidis* recolectados en bosques de araucaria en Brasil y en bosques caducifolios de México, respectivamente. Por otra parte, Zubek *et al.* (2010) registraron una elevada riqueza arbuscular en individuos de la misma especie provenientes del bosque húmedo de Honduras, aunque no diferenciaron entre tipos morfológicos. En el presente estudio, sin embargo, la morfología *Arum* resultó ser la más frecuente en los taxones analizados.

La morfología *Paris* ha sido considerada predominante en comunidades naturales de plantas terrestres (Brundrett y Kendrick, 1990), especialmente en licofitas y helechos (Smith y Smith, 1997). De acuerdo con Dickson (2004) y Dickson *et al.* (2007) el tipo morfológico que es posible observar en las raíces que presentan la simbiosis micorrízica puede estar influenciada por múltiples factores, incluidos el tipo de hongo micorrízico arbuscular involucrado en la asociación, la especie hospedadora y las condiciones edáficas.

Además, se ha observado que los patrones de colonización micorrízica pueden variar, incluso dentro de la misma especie, en diferentes sitios y se ha sugerido que esto estaría relacionado con las condiciones ambientales de cada lugar (Muthukumar y Prabha, 2013).

La colonización arbuscular fue significativamente mayor en *Anemia phyllitidis* var. *phyllitidis* mientras que, la colonización vesicular fue mayor en *A. australis*.

Dado que los arbuscúlos son estructuras efímeras asociadas que actúan principalmente como estructuras de intercambio de nutrientes, mientras que las vesículas se consideran estructuras de almacenamiento (Parniske, 2008); la mayor colonización arbuscular en *A. phyllitidis* podría indicar que esta especie posee un intercambio de agua y nutrientes más activo, al vivir en ambientes de sotobosque más húmedo. Por otra parte, la mayor colonización vesicular en *Anemia australis* podría indicar que las plantas colonizadas de esta especie, al vivir en lugares con mayor estrés hídrico y luminosidad plena, generan una cantidad significativamente alta de vesículas que permiten el almacenamiento, particularmente de agua y nutrientes.

Además de los HMA, se observaron otros hongos conocidos como ESO. Estos fueron citados por Zubek *et al.* (2010) y Lara Pérez *et al.* (2015) en *A. phyllitidis*. Según Treu *et al.* (1995) los ESO no forman micorrizas; sin embargo, Jumpponen (2001) sugiere que, bajo ciertas condiciones, podrían funcionar como este tipo de asociación; aunque su papel fisiológico y ecológico en los ecosistemas es desconocido (Jumpponen y Trappe 1998). Currah y Van Dyk (1986) observaron que los ESO se dan en suelos pobres en materia orgánica, por lo que podría inferirse que el bajo porcentaje de ESO, en las especies analizadas, probablemente se pueda atribuir a la alta cantidad de materia orgánica presente en el suelo del JBHM.

De acuerdo con Lara Pérez *et al.* (2017), el conocimiento sobre la interacción biológica entre los sistemas radicales de helechos con hongos Glomeromycotina permitirán a futuro tomar decisiones para la propagación y conservación de este grupo de plantas, que a su vez, debido a su rol como plantas colonizadoras, pueden ser útiles en la restauración de ecosistemas, como las actividades que se están llevando a cabo en el Jardín Botánico Horco Molle; ya que el estudio de la simbiosis micorriza arbuscular puede ser utilizado como un índice de restauración para ecosistemas con diferentes niveles de degradación, debido a su rol en la agregación de los suelos (Rillig *et al.*, 2002), particularmente en ambientes riparios (Pagano *et al.*, 2022). El presente trabajo da a conocer, por primera vez, las interacciones simbióticas fúngicas de los helechos *Anemia australis* y *A. phyllitidis* var. *phyllitidis*, evidenciando la presencia, el tipo morfológico y la cuantificación de la micorriza arbuscular, además de la coexistencia con otros endófitos septados.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia o relaciones personales entre autores que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, A. C. S., Queiroz, M. H., Hermes, R. A. L. y Oliveira, V. L. (2000). Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. *Mycorrhiza* 10: 131-136. <https://doi.org/10.1007/s005720000070>
- Arana, M. D., Natale, E. S., Ferretti, N. E., Romano, G. M., Martínez, G., Posadas, P. y Morrone, J. J. (2021). Esquema biogeográfico de la República Argentina. *Opera Lilloana* 56: 1-240.
- Brundrett, M. y Kendrick, B. (1990). The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants: II. Structural aspects of morphology. *New Phytologist* 114 (3): 469-479. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00415.x>
- Currah, R. S. y Van Dyk, M. (1986). A survey of some perennial vascular plant species native to Alberta for occurrence of mycorrhizal fungi. *Canadian field-naturalist* 100 (3): 330-342.
- De la Sota, E. R. (1968). Sinopsis de las especies argentinas del género *Anemia* Swartz (Schizaeaceae). *Revista del Museo de La Plata* 61 (11): 133-152.
- De la Sota, E. R. (1977). Pteridophyta. En: A. L. Cabrera (Eds.), *Flora de la provincia de Jujuy, República Argentina, parte 2, colección científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* (pp 1-275). Buenos Aires: INTA.
- Dickson, S. (2004). The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *The New Phytologist* 163 (1): 187-200.
- Dickson, S., Smith, F. A. y Smith, S. E. (2007). Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next?. *Mycorrhiza* 17: 375-393. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0130-9>
- Field, K. J., Leake, J. R., Tille, S., Allinson, K. E., Rimington, W. R., Biddartondo, M. I. y Cameron, D. D. (2015). From mycoheterotrophy to mutualism: mycorrhizal specificity and functioning in *Ophioglossum vulgatum* sporophytes. *New Phytologist* 205 (4): 1492-1502. <https://doi.org/10.1111/nph.13263>
- Grace, C. y Stribley, D. P. (1991). A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological research* 95 (10): 1160-1162. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80005-1)
- Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes - are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza* 11: 207-211. <https://doi.org/10.1007/s005720100112>

- Jumpponen, A. y Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140 (2): 295-310. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>
- Kottke, I., Haug, I., Setaro, S., Suárez, J. P., Weiß, M., Preußing, M. y Oberwinkler, F. (2008). Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology* 9 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2007.03.007>
- Labiak, P. H., Mickel J. T. y Hanks J. G. (2015). Molecular phylogeny and character evolution of Anemiaceae (Schizaeales). *Taxon* 64 (6): 1141-1158. <https://doi.org/10.12705/646.3>
- Lara Pérez, L. A., Zulueta Rodríguez, R. y Andrade Torres, A. (2017). Micorriza arbuscular, Mucoromycotina y hongos septados oscuros en helechos y licofitas con distribución en México: una revisión global. *Revista de Biología Tropical* 65 (3): 1062-1081. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i3.29443>
- Lara Pérez, L.A., Valdés Baizabal, M.D., Noa Carrazana, J.C., Zulueta Rodríguez, R., Lara Capistrán, L. y Andrade Torres, A. (2015). Mycorrhizal associations of ferns and lycopods of central Veracruz, Mexico. *Symbiosis* 65: 85-92. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0320-8>
- Lehnert, M. y Kessler, M. (2016). Mycorrhizal relationships in Lycophytes and ferns. *Fern gazette* 20 (3): 101-116. <https://doi.org/10.5167/uzh-124998>
- Lehnert, H., Serfling, A., Enders, M., Friedt, W. y Ordon, F. (2017). Genetics of mycorrhizal symbiosis in winter wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* 215 (2): 779-791. <https://doi.org/10.1111/nph14595>
- Luján, M. C., Barboza, G. E., Weler de Serra, S. y Ariza Espinar, L. (2000). Control de calidad en dos helechos medicinales y su inserción en el mercado local. *Studia Botánica* 19: 75-94.
- Marschner, H. y Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159: 89-102. <https://doi.org/10.1007/BF00000098>
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. y Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist* 115 (3): 495-501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>
- Mendoza, E. A. y González, J. A. (2011). Las ecorregiones del noroeste argentino basadas en la clasificación climática de Köppen. *Series Conservación de la Naturaleza* 19: 3-41.
- Mickel, J. T. (2016). *Anemia* (Anemiaceae). *Flora Neotropica* 118: 1-182.
- Morte, A., Lovisolo, C. y Schubert, A. (2000). Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense* - *Terfezia clavervyi*. *Mycorrhiza* 10: 115-9. <https://doi.org/10.1007/s005720000066>

- Muthukumar, T. y Prabha, K. (2013). Asociaciones fúngicas de micorrizas arbusculares y endófitos septados en licofitas y helechos del sur de la India. *Simbiosis* 59: 15-33. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0185-z>
- Pagano, M. C., Correa, E. J. A., Lugo, M. A. y Duarte, N. F. (2022). Diversity and Benefits of Arbuscular Mycorrhizae in Restored Riparian Plantations. *Diversity* 14 (11): 938. <https://doi.org/10.3390/d14110938>
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6 (10): 763-775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Puchulu, M. E. y Fernández, D. S. (2014). Características y distribución espacial de los suelos de la provincia de Tucumán. En: S. Moyano, M. E. Puchulu, D. Fernández, G. Aceñolaza, M. E. Vides, S. Nieva (Eds.), *Geología de Tucumán* (pp. 1-17). San Miguel de Tucumán: Colegio de Graduados en Ciencias Geológicas de Tucumán.
- Quiroga, P. A. (2020). Plan de Manejo del Jardín Botánico Horco Molle de la Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo (Tesis Magister), Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Ramos Giacosa, J. P. (2016). Anemiaceae. En: M. M. Ponce, M. D. Arana (Coords.), *Flora Vascular de la República Argentina, Vol. 2: Licofitas, Helechos y Gymnospermae* (pp. 47-52). Buenos Aires: Estudio Sigma.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J y Henson, J. M. (2002). Thermo tolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298: 1581-1584. <https://doi.org/10.1126/science.1078055>
- Ribeiro Wetzel, M. L., Guerra Santos, M., Barros Barros C. F y Gonçalves Costa C. (2019). Leaf anatomy of two fern species and a hybrid of *Anemia* (Anemiaceae). *American Fern Journal* 109 (1): 44-53. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-109.1.44>
- Rillig, M. C., Wright, S. F. y Eviner, V. T. (2002). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: Comparing effects of five plant species. *Plant Soil* 238: 325-333.
- Romagnoli, M. G., Hernández, M. A. y Albornoz, P. L. (2021). Anatomy of the sporophyte of *Anemia phyllitidis* var. *phyllitidis* (Anemiaceae) from a riparian forest (Tucumán, Argentina). *Acta Botánica Mexicana* 128: e1830. <https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1830>
- Smith, F. A. y Smith, S. E. (1997). Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 137 (3): 373-388. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00848.x>
- Smith, S. E. y Read D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. (3º Ed). Londres Academic Press.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H. y Wolf, P. G. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon* 55 (3): 705-731. <https://doi.org/10.2307/25065646>

- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., ... Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108 (5): 1028-1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Thiers, B. (2024). Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Recuperado de <http://sweetgum.nybg.org/ih>
- Treu, R., Laursen, G. A., Stephenson, S. L., Landolt, J. C. y Densmore, R. (1995). Mycorrhizae from Denali national park and preserve, Alaska. *Mycorrhiza* 6: 21-29. <https://doi.org/10.1007/s005720050101>
- Trouvelot, A., Kough, J. y Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Evaluation of VAM infection levels in root systems. Research for estimation methods having a functional significance. En: Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi S. (Eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizal* (pp. 217-221). Paris: INRA Press.
- Valdez Núñez, R. A., Rojas García, J. C. y Bedmar, E. J. (2022). Dark septate endophytes: A review. *Mol* 22: 1-13.
- van Der Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A. y Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New phytologist* 205 (4): 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Zar, J. D. (1996). *Bioestatistical analysis*. Tercera edición. Prentice Hall Inc., New Jersey.
- Zhao, Y. J., Guo, S. X. y Gao, W. W. (1999). The symbiosis of endopytic fungi with *Cymbidium goeringii* and its effects on the mineral nutrition absorption. *Acta Horticulturae Sinica* 26 (2): 110-5.
- Zubek, S., Piątek, K., Naks, P., Heise, W., Wayda, M. y Mleczko, P. (2010). Fungal root endophyte colonization of fern and lycophyte species from the Celaque National Park in Honduras. *American Fern Journal* 100 (2): 126-136. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-100.2.126>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Micorrizas y otros hongos endófitos radicales en siete especies vegetales nativas de los Valles Calchaquíes (Tucumán, Argentina)

Mycorrhizae and other root endophytic fungi in seven native plant species from the Calchaquíes Valleys (Tucumán, Argentina)

Álvarez, María de los A.^{1*}; María I. Mercado¹; Patricia L. Albornoz^{1,2}

¹ Instituto de Morfología Vegetal, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251. (T4000JFE) San Miguel de Tucumán. Tucumán. Argentina.

² Cátedra de Anatomía Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales e IML, UNT. Miguel Lillo 205. (T4000JFE) San Miguel de Tucumán. Tucumán. Argentina.

* Autor correspondiente: <malvarez@lillo.org.ar>

Resumen

Las interacciones simbióticas entre plantas y hongos son fundamentales para la adaptación de especies vegetales en ambientes áridos. Este estudio documentó la presencia de hongos endófitos radicales en siete especies nativas de los Valles Calchaquíes (Tucumán, Argentina), región caracterizada por suelos alcalinos, baja disponibilidad de nutrientes y estrés hídrico. Se analizaron raíces de *Atriplex cordobensis*, *Flourensia fiebrigii*, *Larrea cuneifolia*, *Lippia turbinata*, *Portulaca grandiflora*, *Zinnia peruviana* y *Zuccagnia punctata* mediante técnicas de tinción convencionales. Los resultados revelaron que todas las especies establecieron asociaciones micorrízicas y en algunos casos con hongos endófitos septados oscuros (HESO) o desconocidos (HESD). Los análisis edáficos mostraron suelos alcalinos (pH 7,16–9,80), pobres en nitrógeno (0,01–0,08%) y fósforo (5,8–15,6 ppm). Este estudio confirmó la presencia de asociaciones micorrízicas y de otros tipos de hongos endófitos en las raíces de siete

► Ref. bibliográfica: Álvarez, M. de los A.; Mercado, M. I.; Albornoz, P. L. 2025. Micorrizas y otros hongos endófitos radicales en siete especies vegetales nativas de los Valles Calchaquíes (Tucumán, Argentina). *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 277-293. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2156>

► Recibido: 31 de marzo 2025 – Aceptado: 18 de junio 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

especies nativas de los Valles Calchaquíes, una región caracterizada por suelos alcalinos, con bajos niveles de nitrógeno y fósforo disponible.

Palabras clave: Endófitos; micorrizas; plantas xerófitas; septados oscuros.

Abstract

Symbiotic interactions between plants and fungi are crucial for the adaptation of plant species in arid environments. This study documented the presence of root endophytic fungi in seven native species from the Calchaquíes Valleys (Tucumán, Argentina), a region characterized by alkaline soils, low nutrient availability, and water stress. Roots of *Atriplex cordobensis*, *Flourensia fiebrigii*, *Larrea cuneifolia*, *Lippia turbinata*, *Portulaca grandiflora*, *Zinnia peruviana*, and *Zuccagnia punctata* were analyzed using conventional staining techniques. The results revealed that all species established mycorrhizal associations, and in some cases, also associations with dark septate endophytes (DSE) or unknown septate endophytes (USD). Edaphic analyses showed alkaline soils (pH 7.16–9.80) with low nitrogen (0.01–0.08%) and phosphorus (5.8–15.6 ppm). This study confirmed the presence of mycorrhizal associations and other types of endophytic fungi in the roots of seven native species from the Calchaquíes Valleys, a region characterized by alkaline soils with low levels of available nitrogen and phosphorus.

Keywords: Dark septate; endophytes; mycorrhizae; xerophytic plants.

INTRODUCCIÓN

Las raíces de las plantas albergan comunidades complejas y heterogéneas, en las cuales los elementos fúngicos desempeñan funciones esenciales (Glynou *et al.*, 2016; Jumpponen *et al.*, 2017; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). Las micorrizas constituyen asociaciones simbióticas mutualistas entre las raíces de plantas vasculares y los hongos. Esta asociación, le proporciona numerosos beneficios a la planta, incluyendo mayor tolerancia frente a factores de estrés bióticos y abióticos (Galindo-Flores *et al.*, 2015; Hosseini Moghaddam *et al.*, 2021). A su vez, el hongo adquiere fotosintatos producidos por la planta y un entorno estable que facilita su reproducción y supervivencia (Smith y Smith, 2011). Tradicionalmente las micorrizas se clasifican en dos grandes grupos: las micorrizas arbusculares (MA) y las ectomicorrizas (EcM) (Galindo-Flores *et al.*, 2015; Huey *et al.*, 2020).

Por su parte, las MA se clasifican según su morfología en los tipos *Arum* y *Paris*. El tipo *Arum* se caracteriza por presentar hifas inter e intracelulares que forman arbusculos; mientras que, el tipo *Paris* exhibe hifas intracelulares que forman circunvoluciones o ‘coils’, pudiendo o no desarrollar arbusculos (Nagaraj *et al.*, 2015).

Además, en las raíces pueden encontrarse otros hongos endófitos no micorrícicos, como los hongos endófitos septados oscuros (HESO), grupo polifilético que posee hifas septadas, melanizadas intercelulares y esclerocios intracelulares (Fracchia *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012; Jumpponen *et al.*, 2017; Miranda *et al.*, 2019). Por otra parte, diversos autores han descripto la existencia de otros hongos endófitos denominados septados desconocidos (HESD), los cuales presentan un patrón de colonización similar a los HESO, aunque carecen de estructuras melanizadas (Lizarraga *et al.*, 2018; Alborno *et al.*, 2022; Romagnoli *et al.*, 2024).

En la actualidad, se observa un creciente interés por los HESO, ya que pueden establecer asociaciones mutualistas similares a las micorrizas; desempeñando roles multifuncionales en la planta huésped, mejorando la absorción de nutrientes, aumentando la tolerancia al estrés biótico y abiótico, y manteniendo las relaciones hídricas esenciales para la supervivencia de la planta (García *et al.*, 2012; Lugo *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2019; Zuo *et al.*, 2020).

Los hongos endófitos micorrícicos y HESO son relevantes para la supervivencia de plantas xerófitas que habitan ambientes áridos y semiáridos (con elevada irradiación solar, con déficit hídrico y de nutrientes) (Sun *et al.*, 2012; Lugo *et al.*, 2015.; Zhou *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2019; Zuo *et al.*, 2020). Por su parte, las plantas se adaptan a estas condiciones mediante cambios morfológicos y fisiológicos, donde las asociaciones simbióticas juegan un rol fundamental (Villagra *et al.*, 2011; Duval *et al.*, 2015; Gairola *et al.*, 2018; Zuo *et al.*, 2020). A su vez, la diversidad de hongos endófitos y los componentes de las comunidades fúngicas dependen principalmente de factores ambientales (Hosseyni Moghaddam *et al.*, 2021).

El conocimiento sobre la presencia de hongos endófitos radiculares (micorrizas y endófitos septados) en plantas adaptadas a ambientes áridos, ofrece una oportunidad para explorar la diversidad y distribución de estas interacciones simbióticas (Steidinger *et al.*, 2019), lo que contribuirá a una mejor comprensión de la supervivencia de las plantas en dichos entornos. Las simbiosis radiculares entre hongos y plantas nativas han sido estudiadas en otros ecosistemas áridos de la Argentina (Cofré *et al.*, 2019; Lugo *et al.*, 2023); sin embargo, no hay reportes de estas interacciones en los Valles Calchaquies.

Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue documentar la presencia hongos endófitos radiculares en especies arbustivas y herbáceas que presentan diferentes ciclos de vida y hábitos de crecimiento, en la región de los Valles Calchaquies (Tucumán, Argentina).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

En la provincia biogeográfica del Monte, Localidad de Amaicha del Valle, Departamento de Taí del Valle (Tucumán, Argentina), se seleccionaron cuatro sitios de muestreo. En el área de estudio se recolectaron los sistemas radiculares completos de un total de siete especies, considerando tres individuos por especie (Tabla 1). Además, se recolectaron ejemplares completos para ser depositados como material de referencia en el herbario LIL. Cabe destacar que no todas las especies estuvieron presentes de forma simultánea en todos los sitios, ya que la composición vegetal varía entre ellos.

El clima en la provincia biogeográfica del Monte se clasifica como desértico frío según Köppen-Geiger, con zonas marginales clasificadas como estepario frío (Cabrera, 1976; Bianchi y Cravero, 2010). El régimen de precipitaciones es de 80-250 mm anuales, con distribución estival (70% concentrado en diciembre-marzo) (Bianchi *et al.*, 2005). Presenta variabilidad interanual alta, con sequías prolongadas y eventos torrenciales esporádicos (Villagra *et al.*, 2011), amplitud térmica diaria entre 15-25°C con noches frías y días cálidos y amplitud térmica anual con temperaturas máximas entre 35-40°C (verano) y mínimas de -5 a -10°C (invierno) (Bianchi y Cravero, 2010). La radiación solar es de 2500-2800 horas/anuales, con alta irradiación UV (Villagra *et al.*, 2011). Evapotranspiración potencial de 1500-2000 mm/año (Villagra *et al.*, 2011), presentando un déficit hídrico permanente, con suelos frecuentemente en capacidad de marchitez (Álvarez *et al.*, 2021).

Material vegetal

Las especies fueron seleccionadas según su abundancia en cada sitio y por ser representativas de la provincia biogeográfica del Monte. Se clasificaron de acuerdo a sus diferentes ciclos de vida, hábitos de crecimiento y estrategias de supervivencia en el ambiente árido (Tabla 1).

Table 1. Especies estudiadas, clasificación según ciclo de vida de la planta, hábito de crecimiento, adaptaciones al hábitat, status y sitio de recolección.

Tabla 1. Studied species, classification according to plant life cycle, growth habit, habitat adaptations, status and collection site.

Especie	Familia	Ciclo de vida	Hábito de crecimiento	Adaptación al hábitat	Status	Sitio
<i>Atriplex cordobensis</i> Gand. & Stuck	Chenopodiaceae	Perenne	Subarbusto	Xerófita y halófita	Nativa	3
<i>Flourensia fiebrigii</i> S.F. Blake	Asteraceae	Perenne	Arbusto	Xerófita	Nativa	1
<i>Larrea cuneifolia</i> Cav.	Zygophyllaceae	Perenne	Arbusto	Xerófita	Endémica	2
<i>Lippia turbinata</i> Griseb.	Verbenaceae	Perenne	Arbusto	Mesoxerófita	Nativa	4
<i>Portulaca grandiflora</i> Hook	Portulacaceae	Anual	Hierba	Xerófita	Nativa	1
<i>Zinnia peruviana</i> (L.) L.	Asteraceae	Anual	Hierba	Mesoxerofita	Endémica	1
<i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	Fabaceae	Perenne	Arbusto	Xerófita	Endémica	2

Material de referencia

- ARGENTINA. Prov. Tucumán, Sitio 1, Dpto. Taí del Valle, Localidad Ampimpa, 26°36'29,9"S-64°50'41,3"O, 2224 m snm, 03-III-2024. *Flourensia fiebrigii* S.F.Blake., (Asteraceae), *Álvarez y Mercado* S/N (LIL); *Portulaca grandiflora* Hook., (Portulacaceae) *Álvarez y Mercado* S/N (LIL); *Zinnia peruviana* (L.) L., (Asteraceae); *Álvarez y Mercado* S/N (LIL).
- ARGENTINA. Prov. Tucumán Sitio 2, Dpto. Taí del Valle, Localidad Amaicha del Valle, 26°35'29,9"S-65°52'05,3"O, 2226 m snm, 03-III-2024. *Larrea cuneifolia* Cav., (Zygophyllaceae) *Álvarez y Mercado* S/N (LIL) y *Zuccagnia punctata* Cav., (Fabaceae) *Álvarez y Mercado* S/N (LIL).
- ARGENTINA. Prov. Tucumán, Sitio 3, Dpto. Taí del Valle, Localidad de Tío Punco, 26°33'04,0"S-65°57'53,2"O, 1840 m snm, 03- III-2024, *Atriplex cordobensis* Gand. & Stuck (Chenopodiaceae); *Álvarez y Mercado* S/N (LIL).
- ARGENTINA. Prov. Tucumán, Sitio 4. Dpto. Taí del Valle, Localidad El Pichao, 26°20'47,9"S-66°00'54,1"O, 2048 m snm, 03-III-2024 *Lippia turbinata* Griseb., (Verbenaceae) *Álvarez y Mercado* S/N (LIL).

Identificación de hongos endófitos radiculares

Para determinar la presencia de EcM, las raíces fueron lavadas y observadas bajo un estereomicroscopio Zeiss (Stemi 305, Carl Zeiss Ltd, Herts, UK). Posteriormente se realizaron cortes transversales de 15 μ m de espesor con micrótopo rotatorio Thermo ScientificTM HM 325 (Mercado y Ponessa, 2021). Las secciones obtenidas fueron decoloradas con hipoclorito de sodio 50%, lavadas con agua destilada, teñidas con coloración doble sucesiva de azul astra-safranina y finalmente montadas en agua-glicerina (1:1, v/v). Las observaciones se realizaron en microscopio óptico Zeiss (Carl Zeiss Ltd, Herts, UK).

Para determinar la presencia de hongos MA y otros endófitos, los sistemas radiculares completos fueron lavados con agua, clarificados con hidróxido de potasio 10%, luego acidificados con ácido clorhídrico 0,1N y posteriormente teñidos con azul de anilina (0,05% p/v) (Phillips y Hayman, 1970; Grace y Stribley, 1991). Se seleccionaron 30 fragmentos de 1 cm de longitud, por cada individuo/especie, los que fueron montados en agua glicerina (1:1, v/v). Las observaciones se realizaron en microscopio óptico mencionado anteriormente. Las fotografías se tomaron con cámara digital Zeiss (Axiocam ERc 5s).

Análisis de suelo

Para evaluar las características edáficas, en cada sitio se tomaron tres muestras de suelo a 20 cm de profundidad. Las mismas fueron mezcladas y homogeneizadas para obtener una muestra compuesta de 500 g. Dichas muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas a 4°C hasta su análisis en el servicio privado de análisis de suelos. Las variables fisicoquímicas evaluadas fueron: pH (método potenciométrico con pHchímetro ORP ST2200-F con electrodo ST320 Ohaus); conductividad eléctrica (CE), (dS/m = mmhos/cm con conductímetro de Digicom, 2006); materia orgánica (% = 10g/kg), por el método de Walkley y Black (1934) modificado por Eyherabide *et al.* (2014); fósforo disponible (ppm = mg/kg) (Bray y Kurtz, 1945); nitrógeno total (%), (método de Kjeldhal modificado por Kuss *et al.*, 2007); cationes Na⁺ - K⁺, mediante el fotómetro de llama Arcano F640 (cmol+/kg = meq/100gr); cationes Ca²⁺ - Mg²⁺ mediante EDTA (cmol+/kg = meq/100gr) y textura con el método de Bouyoucos (1962).

RESULTADOS

Las siete especies estudiadas establecieron interacciones simbióticas con hongos micorrícicos, en algunos casos, coexistiendo con HESO y/o HESD (Tabla 2).

En *Portulaca grandiflora*, *Zinnia peruviana* y *Zuccagnia punctata*, se determinó la presencia de EcM, MA y HESD (Tabla 2). Las tres especies mencionadas exhibieron EcM de morfología simple (Fig. 1A-C). En corte transversal de raíz se observa la presencia de un manto insipiente e hifas intercelulares formando la red de Hartig en los primeros estratos celulares del parénquima cortical (Fig.1D-E).

Tabla 2. Micorrizas y endófitos septados oscuros y desconocidos en siete especies de la provincia biogeográfica del Monte.

Table 2. Mycorrhizae, dark and unknown septate endophytes in seven species of the Monte biogeographic province.

Especies vegetales	Presencia de EcM	Presencia de MA	Morfología de MA	Presencia de HESO	Presencia de HESD
<i>A. cordobensis</i>	-	+ ²	<i>Arum-Paris</i>	-	+
<i>F. fiebrigii</i>	-	+ ¹	<i>Arum-Paris</i>	+	+
<i>L. cuneifolia</i>	-	+ ¹	<i>Arum</i>	+	+
<i>L. turbinata</i>	-	+ ¹	<i>Arum-Paris</i>	+	-
<i>P. grandiflora</i>	+	+ ¹	<i>Arum</i>	-	+
<i>Z. peruviana</i>	+	+ ¹	<i>Arum-Paris</i>	-	+
<i>Z. punctata</i>	+	+ ¹	<i>Arum</i>	-	+

+ Indica presencia; - indica ausencia; 1vesículas; 2células auxiliares intracelulares. EcM: ectomicorriza; MA: micorrizas arbusculares; HESO: hongos endófitos septados oscuros; HESD: hongos endófitos septados desconocidos.

+ indicates presence; - indicates absence; 1vesicles; 2intracellular auxiliary cells. EcM: ectomycorrhizae; MA: arbuscular mycorrhizae; HESO: dark septate endophytes; HESD: unknown septate endophytes.

Estas especies presentaron MA tipo *Arum* con vesículas (Tabla 2, Fig. 2B y D), *Z. peruviana* además mostró MA tipo *Paris* y esporas intracelulares.

Por su parte, en *Atriplex cordobensis*, *Flourensia fiebrigii* y *Lippia turbinata*, se observaron MA, coexistiendo los tipos morfológicos *Arum* y *Paris* (Tabla 2, Fig. 2A, C), con presencia de *vesículas* en *F. fiebrigii* y *L. turbinata*; y células auxiliares en *A. cordobensis* (Fig. 2 E-F). En *F. fiebrigii* se evidenciaron además esporas (Tabla 2). Finalmente, *Larrea cuneifolia* exhibió MA tipo *Arum* y vesículas (Tabla 2).

En cuanto a los hongos endófitos septados, se registró la presencia de HESO en *F. fiebrigii*, *L. cuneifolia* y *L. turbinata* (Tabla 2, Fig. 3A) y de HESD en *A. cordobensis*, *F. fiebrigii*, *L. cuneifolia*, *P. grandiflora*, *Z. peruviana* y *Z. punctata* (Tabla 2, Fig. 3B-C).

En la Tabla 3 se presenta el análisis de suelos que revela que los sitios 1, 2 y 3 son alcalinos, especialmente el sitio 3 (pH 9,8), mientras que el 4 tiende a la neutralidad (pH 7,16). Los sitios 1 y 2 presentan salinidad moderada (1,10 y 1,82 dS/m respectivamente). Todos tienen bajo contenido de materia orgánica. Los sitios 1 y 2 presentan además bajo contenido de fósforo y nitrógeno, mientras que los sitios 3 y 4 son moderadamente pobres en esos elementos.

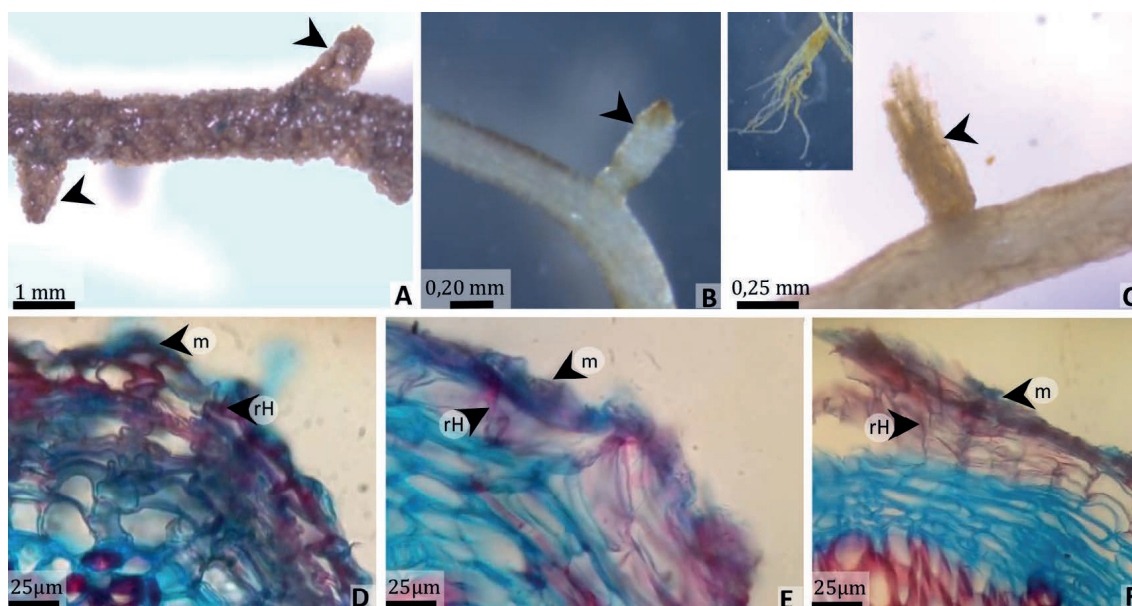


Fig 1. Ectomicorizas de morfología simple. A-C) Aspecto general. A) *Zuccagnia punctata*. B) *Zinnia peruviana*. C) *Portulaca grandiflora*, en inserto se muestran variantes de la morfología. D-F) Manto y red de Hartig en corte transversal de raíz. D) *Z. punctata*. E) *Z. peruviana*. F) *P. grandiflora*. Álvarez y Mercado S/N (LIL). Referencias: m, manto; rH, red de Hartig.

Fig. 1. Ectomycorrhizae of simple morphology. A-C) General appearance. A) *Zuccagnia punctata*. B) *Zinnia peruviana*. C) *Portulaca grandiflora*, insets show morphological variations. D-F) Mantle and Hartig net in root cross-section. D) *Z. punctata*. E) *Z. peruviana*. F) *P. grandiflora*. Álvarez and Mercado S/N (LIL). References: m, mantle; rH, Hartig net.

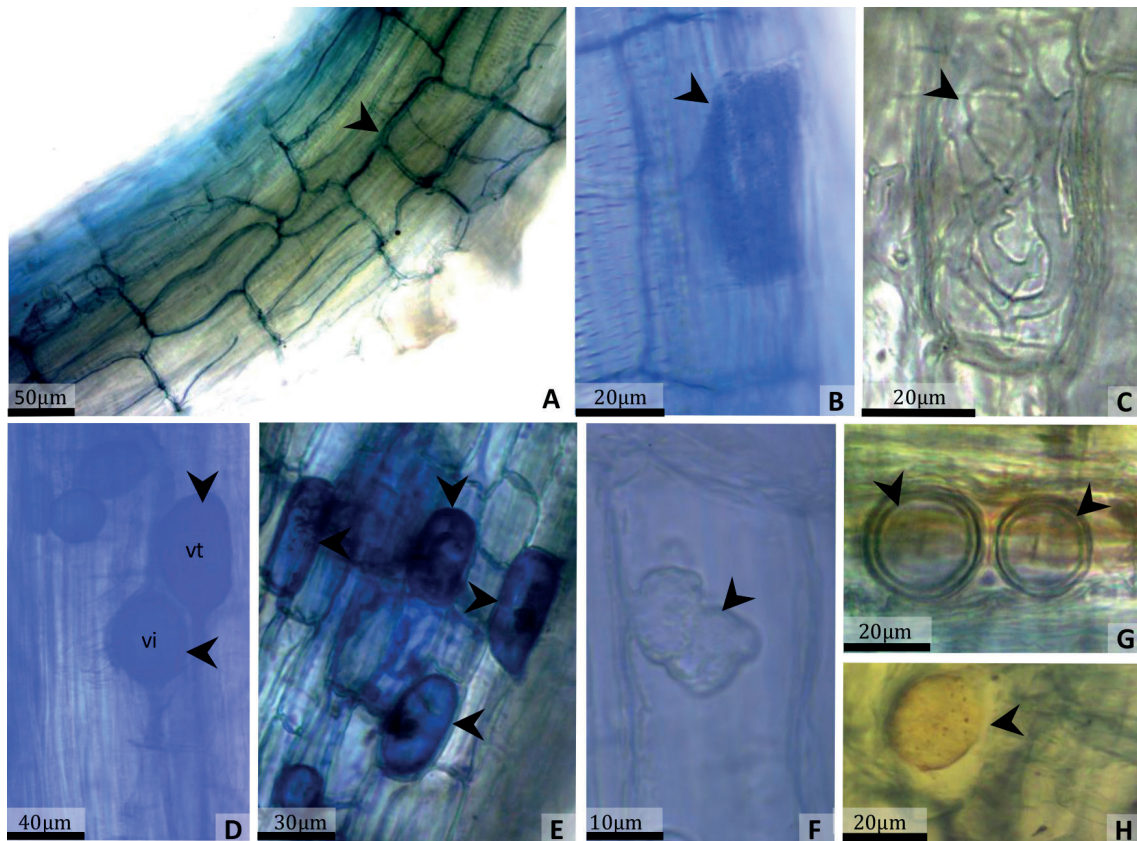


Fig. 2. Micorrizas arbusculares en la región del parenquima cortical de raíces clarificadas. A) Hifas intercelulares (flecha) en raíz de *Flourensia fiebrigii*. Aspecto general. B) Hongo micorrícico arbuscular, morfología tipo *Arum* (flecha) en *Z. peruviana*. C) Hongo micorrícico arbuscular, morfología tipo *Paris* (flecha) en *F. fiebrigii*. D) Vesículas intercalares y terminales en *Z. punctata*. E) Vesículas intracelulares (flecha) en *F. fiebrigii*. F) Células auxiliares intra celulares (flecha) en *Atriplex cordobensis*. G) Esporas intracelulares (flecha) en *F. fiebrigii*. H) Espora intracelular (flecha) en el parénquima cortical de *Z. peruviana*. Álvarez y Mercado S/N (LIL). Referencias: vi, vesícula intercalary; vt, vesícula terminal.

Fig. 2. Arbuscular mycorrhizae in the cortical parenchyma region of cleared roots. A) Intercellular hyphae (arrow) in the root of *Flourensia fiebrigii* root. General appearance. B) Arbuscular mycorrhizal fungus, *Arum*-type morphology (arrow) in *Z. peruviana*. C) Arbuscular mycorrhizal fungus, *Paris*-type morphology (arrow) in *F. fiebrigii*. D) Intercalary and terminal vesicles (arrows) in *Z. punctata*. E) Intracellular vesicles (arrow) in *F. fiebrigii*. F) Intracellular auxiliary cells (arrow) in *Atriplex cordobensis*. G) Intracellular spores (arrow) in *F. fiebrigii*. H) Intracellular spore (arrow) in the cortical parenchyma of *Z. peruviana*. Álvarez and Mercado S/N (LIL). References: vi, intercalary vesicle; vt, terminal vesicle.

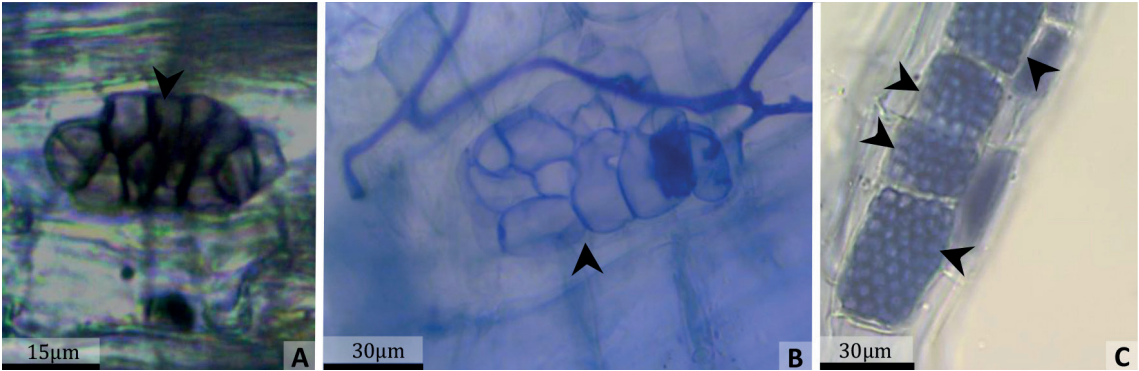


Fig. 3. Microesclerocios de hongos endófitos septados oscuros y desconocidos en células del parénquima cortical. A) *F. fiebrigii*. B) *Z. peruviana*. C) *P. grandiflora*. Álvarez y Mercado S/N (LIL).

Fig. 3. Microsclerotia of dark septate and unknown endophytic fungi in cortical parenchyma cells. A) *F. fiebrigii*. B) *Z. peruviana*. C) *P. grandiflora*. Álvarez and Mercado S/N (LIL).

Tabla 3. Características edáficas de los sitios muestreados en la provincia biogeográfica del Monte.
Table 3. Edaphic characteristics of the sampled sites in the Monte biogeographic province.

Sitio	1	2	3	4
pH	8,90	8,23	9,80	7,16
CE dS/m (mmhos/cm)	1,10	1,82	0,36	0,11
CO ₃ Ca	++	+++	++	-
MO (%)	0,83	1,16	0,23	0,67
N total % (ppm)	0,05	0,08	0,01	0,04
P (ppm)	5,80	9,70	15,60	11,50
TEXTURA	Areno limosa	Franca arenosa	Areno limosa	Areno limosa
ARCILLA (%)	9,99	4,99	3,74	2,49
LIMO (%)	20,00	26,25	21,25	22,50
ARENA (%)	70,01	68,76	75,01	75,01
CIC (meq/100g)	6,00	6,75	4,15	3,50
Na (meq/100g)	2,07	1,68	2,39	0,22
K (meq/100g)	0,38	1,09	0,61	0,29
Ca (meq/100g)	-	-	-	2,00
Mg (meq/100g)	1,33	1,58	2,08	1,83

CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; N: nitrógeno; P: fósforo; CIC: capacidad de intercambio catiónico; Na: sodio; K: potasio; Ca: calcio; Mg: magnesio.

CE: electrical conductivity; MO: organic matter; N: nitrogen; P: phosphorus; CIC: cation exchange capacity; Na: sodium; K: potassium; Ca: calcium; Mg: magnesium.

DISCUSIÓN

El presente estudio documenta la presencia de hongos endófitos radiculares en siete especies vegetales nativas de Argentina, pertenecientes a seis familias, que crecen en los Valles Calchaquíes, provincia biogeográfica del Monte. Entre estas especies, *L. cuneifolia* y *Z. punctata* se encuentran en la lista Roja preliminar de plantas endémicas de Argentina, en categorías 1 y 3 respectivamente (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable [SAyDS], 2010). La presencia de estos hongos es clave para la supervivencia de la vegetación en ecosistemas áridos, que se caracterizan por suelos con bajo contenido de materia orgánica, alta alcalinidad y disponibilidad limitada de nutrientes esenciales (Lugo *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2019). El análisis edáfico reveló que los sitios analizados presentan suelos alcalinos, predominantemente arenosos, con baja capacidad de intercambio catiónico, bajas concentraciones de materia orgánica, fósforo y nitrógeno respectivamente, lo que sugiere una limitada disponibilidad de nutrientes y agua. Características que según Bashan *et al.* (2007), Montaña Arias *et al.* (2008), García *et al.* (2012), Rincón *et al.* (2015), Lugo *et al.* (2018), Zuo *et al.* (2020), Hosseyni Moghaddam *et al.* (2021) favorecen la simbiosis con hongos micorrícicos y otros endófitos fúngicos ya que desempeñan un papel clave en la absorción de estos elementos.

Los sitios 1 y 2 se caracterizan por presentar los valores más bajos de materia orgánica, nitrógeno total y fósforo, además de una alta conductividad eléctrica; esto coincide con la coexistencia de EcM, MA y HESD en *P. grandiflora*, *Z. peruviana* y *Z. punctata*. La baja disponibilidad de fósforo, por debajo de 20 ppm en el suelo, constituye un umbral crítico que promueve la dependencia de las plantas a asociaciones micorrícicas para optimizar la adquisición de nutrientes. Sin embargo, cada especie vegetal puede tener un nivel óptimo de fósforo soluble a partir del cual se estimularía fuertemente la colonización (Hirata *et al.*, 1988).

La presencia de EcM en especies herbáceas como *P. grandiflora* y *Z. peruviana* es un hallazgo, ya que estas asociaciones son más frecuentes en plantas leñosas (Smith y Read, 2008; Tedersoo y Brundrett, 2017; Brundrett y Tedersoo, 2018). Sin embargo, existen reportes de la presencia de EcM en otras herbáceas como *Eriogonum* spp., *Salsola* spp. y *Cistanthe* spp. que respaldan este hallazgo (Allen *et al.*, 2003; Molina-Montenegro *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Pagano *et al.* (2012) citaron la presencia de MA y HESO para *Z. peruviana* de la región del Chaco, en este trabajo se reporta por primera vez, la presencia de EcM y HESD, además de caracterizar los tipos morfológicos *Arum* y *Paris* de MA.

La presencia de hongos MA en las siete especies estudiadas, junto con la coexistencia de los tipos morfológicos *Arum* y *Paris* en varias de ellas (*A. cordobensis*, *F. fiebrigii* y *L. turbinata*) sugiere una plasticidad en el establecimiento de la simbiosis, incluyendo la posibilidad del hongo de presentar diferentes morfotipos acorde a las especies vegetales y a las condiciones ambientales, lo que brindaría una ventaja en suelos con deficiencias minerales (Smith y Smith, 2011).

En cuanto al hallazgo de HESO en *F. fiebrigii*, *L. cuneifolia* y *L. turbinata*, es consistente con estudios previos que destacan el papel de estos endófitos en la tolerancia a condiciones de salinidad, estrés hídrico y deficiencia de nutrientes de ecosistemas áridos (Lugo *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2019; Zuo *et al.*, 2020), como los Valles Calchaquíes. *Atriplex cordobensis*, *F. fiebrigii*, *P. grandiflora*, *Z. peruviana* y *Z. punctata* presentaron HESD, que podrían desempeñar un rol similar.

Las asociaciones simbióticas con hongos MA y otros endófitos, serían particularmente importantes en especies anuales, como *Z. peruviana* y *P. grandiflora*, ya que permitirían maximizar la absorción de recursos en el corto período en el que transcurre su ciclo de vida (Allen *et al.*, 2003; Smith y Read, 2008; Rincón *et al.*, 2015; Lugo *et al.*, 2018; Steidinger *et al.*, 2019; Zuo *et al.*, 2020).

La presencia simultánea de hongos MA, EcM y HESO en plantas xerófitas y mesoxerófitas optimiza la absorción de nutrientes y agua, como demuestran estudios en ambientes áridos (Smith y Read, 2008; Zuo *et al.*, 2020; Lugo *et al.*, 2015).

Es interesante mencionar que las especies estudiadas presentan usos medicinales (Barboza *et al.*, 2009; Maroyi, 2023) y se encuentran amenazadas por la pérdida de hábitat, contaminación ambiental y la sobreexplotación debido a su creciente demanda farmacéutica (Porwal *et al.*, 2020; Mofokeng *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2023). En este sentido, Bothe *et al.* (2010), Chaudhary *et al.* (2022) y Alzarhani *et al.* (2024) enfatizan la falta de información sobre el rol ecológico de los hongos MA en la supervivencia de especies amenazadas, particularmente en ambientes hostiles con suelos degradados o en áreas impactadas por el cambio climático.

Futuras investigaciones deberían profundizar el papel funcional que cumplen las interacciones de hongos simbióticos, tanto MA como otros endófitos, en la supervivencia y desarrollo de estas plantas medicinales, endémicas y nativas, lo que permitirá tomar decisiones estratégicas para su uso y conservación.

CONCLUSIÓN

Esta investigación nos permitió explorar asociaciones fúngicas en un amplio espectro taxonómico vegetal con diferentes adaptaciones a condiciones extremas dentro de un mismo ambiente. Se demuestra la presencia de hongos micorrícicos y otros endófitos en siete especies de plantas nativas de los Valles Calchaquíes, donde los suelos alcalinos y pobres en nutrientes limitan el crecimiento vegetal. La presencia de EcM en las especies herbáceas *P. grandiflora* y *Z. peruviana* es un hallazgo, ya que este tipo de micorrizas es característica de plantas leñosas. La coexistencia de múltiples simbioses (MA, EcM, HESO, HESD) sugiere una estrategia en el ensamblaje funcional para maximizar la adquisición de recursos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por Fundación Miguel Lillo, proyecto FMLCAV-B-0002-1.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Albornoz, P. L., Catania, M. D. V. y Suárez, G. M. (2022). Presencia de micorrizas arbusculares y endófitos septados en *Plagiochasma rupestre* (Ayttoniaceae, Marchantiophyta) del Chaco Serrano (Tucumán, Argentina). *Lilloa* 59 (2) :189-197. <https://doi.org/10.30550/j.lil/2022.59.2/2022.08.10>
- Allen, M. F., Swenson, W., Querejeta, J. I., Egerton-Warburton, L. M. y Treseder, K. K. (2003). Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology* 41 (1): 271-303. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095518>
- Álvarez, J. A., Villagra, P. E., Cesca, E. M. y Easdale, T. A. (2021). Water dynamics at the soil-plant-atmosphere interface in the Monte Desert: Physiological and ecological adaptations. *Journal of Arid Environments* 184: 104312. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104312>
- Alzarhany, A. K., Clark, D. R. y van der Heijden, M. G. A. (2024). Mycorrhizal networks enhance resilience of endangered plants to climate stress. *Nature Plants* 10 (2): 123-135. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01595-7>
- Barboza, G. E., Cantero, J. J., Núñez, C. y Ariza Espinar, L. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34 (1-2): 7-365.
- Bashan, Y., Salazar, B. G., Moreno, M., Lopez, B. R. y Linderman, R. G. (2007). Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* 43 (1): 112-119. <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0082-9>
- Bianchi, A. R. y Cravero, S. C. (2010). *Atlas climático digital de la República Argentina*. INTA.
- Bianchi, A. R., Yañez, C. E. y Acuña, L. R. (2005). *Base de datos mensuales de precipitaciones del Noroeste Argentino*. INTA-CIRN.
- Bothe, H., Turnau, K. y Regvar, M. (2010). The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in protecting endangered plants and habitats. *Mycorrhiza* 20 (7): 445-457. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0332-4>

- Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal* 54 (5): 464-465. <https://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
- Bray, R. H. y Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59 (1): 39-45. <https://doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>
- Brundrett, M. C. y Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220 (4): 1108-1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Cabrera, A. L. (1976). Regiones fitogeográficas argentinas. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería* 2 (1): 1-85.
- Chaudhary, V. B., Akland, K. y Johnson, N. C. (2022). Do arbuscular mycorrhizal fungi act as ecosystem engineers in threatened plant habitats? *Frontiers in Ecology and Evolution* 10: 842134. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.842134>
- Cofré, M. N., Soteras, F., Iglesias, M. del R., Velázquez, S., Abarca, C., Risio, L., Ontivero, E., Cabello, M. N., Domínguez, L. S. y Lugo, M. A. (2019). Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in South America: A Review. En M. C. Pagano y M. A. Lugo (Eds.). *Mycorrhizal Fungi in South America* (pp. 49-76). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15228-4_3
- Duval, V. S., Benedetti, G. M., Campo, A. M., Duval, V. S., Benedetti, G. M. y Campo, A. M. (2015). Relación clima-vegetación: Adaptaciones de la comunidad del jarillal al clima semiárido, Parque Nacional Lihué Calel, provincia de La Pampa, Argentina. *Investigaciones geográficas* 88: 33-44.
- Eyherabide, M., Saínz Rozas, H. R., Echeverría, H. E. y Barbieri, P. A. (2014). Comparación de métodos para determinar carbono orgánico en suelos de la región pampeana argentina. *Ciencia del Suelo* 32 (1): 13-21.
- Fracchia, S., Krapovickas, L., Aranda-Rickert, A. y Valentinuzzi, V. S. (2011). Dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes by *Ctenomys cf. knighti* (Rodentia) in the northern Monte Desert of Argentina. *Journal of Arid Environments* 75 (11): 1016-1023. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.04.034>
- Gairola, S., Al Shaer, K. I., Al Harthi, E. K. y Mosa, K. A. (2018). Strengthening desert plant biotechnology research in the United Arab Emirates: A viewpoint. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24 (4): 521-533. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0551-2>
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A. y Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences* 93 (4): 855-863. <https://doi.org/10.17129/botsci.200>
- García, I., Mendoza, R. y Pomar, M. C. (2012). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes under contrasting grazing modes

- in the Magellanic steppe of Tierra del Fuego. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 155: 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.04.020>
- Glynou, K., Ali, T., Buch, A., Haghi Kia, S., Ploch, S., Xia, X., Çelik, A., Thines, M., y Maciá-Vicente, J. G. (2016). The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environmental Microbiology* 18 (8): 2418-2434. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13112>
- Grace, C. y Stribley, D. P. (1991). A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 95 (8): 1160-1162. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80005-1)
- Hirata, H., Masunaga, T. y Koiwa, H. (1988). Respose of chickpea grown on ando-soil to vesicular arbuscular mycorrhizal infection in relation to the level of phophorus application. *Soil Science and Plant Nutrition* 34: 441-449.
- Hosseyini Moghaddam, M. S., Safaie, N., Tedersoo, L. y Hagh-Doust, N. (2021). Diversity, community composition, and bioactivity of cultivable fungal endophytes in saline and dry soils in deserts. *Fungal Ecology* 49: 101019. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.101019>
- Huey, C. J., Gopinath, S. C., Uda, M. N. A., Zulhaimi, H. I., Jaafar, M. N., Kasim, F. H. y Yaakub, A. R. W. (2020). Mycorrhiza: A natural resource assists plant growth under varied soil conditions. *Biotech* 10 (5): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02188-3>
- Jumpponen, A., Herrera, J., Porras-Alfaro, A. y Rudgers, J. (2017). Biogeography of root-associated fungal endophytes. En: L. Tedersoo (Ed.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (pp. 195-222). https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_10
- Kuss, A. V., Kuss, V. V., Lovato, T. y Flores, J. P. C. (2007). Fixação biológica de nitrogênio e fertilização nitrogenada em soja no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 31 (5): 1055-1061. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832007000500018>
- Lizarraga, S. V., Perez, G. A., Ruiz, A. I., Salazar, S. M., Díaz Ricci, J. C. y Albornoz, P. L. (2018). Rendimiento frutal de tres variedades de *Fragaria ananassa* en relación con el grado de colonización por micorrizas arbusculares y otros endófitos fúngicos, Tucumán, Argentina. Respuesta histológica radical a la interacción. *Revista agronómica del noroeste argentino* 38 (2): 145-154.
- Lugo, M. A., Menoyo, E., Allione, L. R., Negritto, M. A., Henning, J. A. y Anton, A. M. (2018). Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes associated with grasses from the Argentine Puna. *Mycologia* 110 (4): 654-665. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1492846>
- Lugo, M. A., Ontivero, R. E., Iriarte, H. J., Yelikbayev, B. y Pagano, M. C. (2023). The Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Associations in South America: A Case Study of Argentinean and Brazilian Cattle Raising Productive Ecosystems: A Review. *Diversity* 15 (9): 1006. <https://doi.org/10.3390/d15091006>

- Lugo, M. A., Reinhart, K. O., Menoyo, E., Crespo, E. M. y Urcelay, C. (2015). Plant functional traits and phylogenetic relatedness explain variation in associations with root fungal endophytes in an extreme arid environment. *Mycorrhiza* 25 (2): 85-95. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0592-5>
- Maroyi, A. (2023). Medicinal plants threatened by overharvesting for traditional medicine in Africa: A case study of Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology* 306: 116165. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116165>
- Mercado, M. I. y Ponessa, G. I. (2021). Nuevo soporte para obtención de cortes de material vegetal en micrótopo rotativo. *Dominguezia* 37 (1): 29-35.
- Miranda, V., Rothen, C., Yela, N., Aranda-Rickert, A., Barros, J., Calcagno, J. y Fracchia, S. (2019). Subterranean desert rodents (Genus *Ctenomys*) create soil patches enriched in root endophytic fungal propagules. *Microbial Ecology* 77 (2): 451-459. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1227-8>
- Mofokeng, M. M., Du Plooy, C. P., Araya, H. T., Amoo, S. O., Mokgehele, S. N., Pofu, K. M. y Mashela, P. W. (2022). Medicinal plant cultivation for sustainable use and commercialization of high-value crops. *South African Journal of Science* 118 (3-4): 12190. <https://doi.org/10.17159/sajs.2022/12190>
- Molina-Montenegro, M. A., Oses, R., Torres-Díaz, C., Atala, C. y Gianoli, E. (2016). Fungal endophytes associated with roots of nurse cushion species have positive effects on native and invasive beneficiary plants in an alpine system. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 21: 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2016.05.003>
- Montaño Arias, A. M. M., Camargo Ricalde, S. L., García Sánchez, R. y Monroy Ata, A. (2008). Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems. DF, México: Mundi-Prensa, INE-SEMARNAT, UAM-Iztapalapa, FES-Zaragoza-UNAM, 460.
- Nagaraj, K., Priyadharsini, P. y Muthukumar, T. (2015). Mycorrhizal and septate endophytic fungal associations in gymnosperms of southern India. *Anales de Biología* 37: 8. <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.37.8>
- Pagano, M. C., Lugo, M., Araújo, F., Ferrero, M., Menoyo, E. y Steinaker, D. (2012). Native species for restoration and conservation of biodiversity in South America. En: L. Marin y D. Kovac (Eds.), *Native species* (pp. 1-55). Nova Science Publishers.
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55 (1): 158-161.
- Porwal, O., Singh, S. K., Patel, D. K., Gupta, S. y Katekhaye, S. (2020). Cultivation, collection and processing of medicinal plants. En J. Ahmad (Ed.), *Bioactive phytochemicals: Drug discovery to product development* (pp. 14-30). Bentham Science Publishers.

- Rincón, A., Ruiz-Díez, B., Fernández-Pascual, M. y Probanza, A. (2015). Ectomycorrhizal fungi as biofertilizers in forestry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (11): 4651-4664. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6565-6>
- Romagnoli, G., Arana, M. D. y Albornoz, P. L. (2024). Micorrizas arbusculares y endófitos septados en tres especies de Thelypteridaceae de ambientes riparios de las Yungas (Tucumán, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 59 (3): 335-340. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v59.n3.44734>
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. (2010). *Resolución 84/2010: Flora y fauna silvestre*. Ecofield. Recuperado de https://www.ecofield.net/Legales/Florayfauna/res84-10_SAyDS.htm
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed.). Academic Press.
- Smith, S. E. y Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* 62: 227-250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Steidinger, B. S., Crowther, T. W., Liang, J., Van Nuland, M. E., Werner, G. D. A., Reich, P. B. y Peay, K. G. (2019). Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature* 569 (7756): 404-408. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1128-0>
- Sun, Y., Wang, Q., Lu, X., Okane, I. y Kakishima, M. (2012). Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. *Mycological Progress* 11 (3): 781-790. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0790-x>
- Tedersoo, L. y Brundrett, M. C. (2017). Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. En: Tedersoo, L. (Eds.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (pp. 407-467). https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_19
- Vandenkoornhuyse, P., Baldauf, S. L., Leyval, C., Straczek, J. y Young, J. P. W. (2002). Extensive fungal diversity in plant roots. *Science* 295 (5562): 2051. <https://doi.org/10.1126/science.295.5562.2051>
- Villagra, P. E., Giordano, C., Alvarez, J. A., Bruno Cavagnaro, J., Guevara, A., Sartor, C., Passera, C. B. y Greco, S. (2011). Ser planta en el desierto: Estrategias de uso de agua y resistencia al estrés hídrico en el Monte Central de Argentina. *Ecología Austral* 21 (1): 29-42.
- Walkley, A. y Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37 (1): 29-38.
- Yang, X., Chen, J. y Zhang, L. (2023). Pharmaceutical demand as a driver of plant extinction risk: A global assessment. *Biological Conservation* 280: 109975. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.109975>
- Zhang, Y., Li, X. y Chen, Y. (2018). Mycorrhizal associations in the desert: A review. *Journal of Arid Environments* 156: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2018.04.011>

- Zhou, H., Zhao, W., Zheng, X. y Li, S. (2015). Root distribution of *Nitraria sibirica* with seasonally varying water sources in a desert habitat. *Journal of Plant Research* 128 (4): 613-622. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0728-5>
- Zuo, Y., Su, F., He, X. y Li, M. (2020). Colonization by dark septate endophytes improves the growth of *Hedysarum scoparium* under multiple inoculum levels. *Symbiosis* 82 (3): 201-214. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00713-9>



Fundación
Miguel Lillo
Tucumán
Argentina

doi

Interacciones multitróficas en un humedal urbano artificial: La macrófita *Chara* sp. (Charophyta, Characeae) y su asociación con gasterópodos

Multitrophic interactions in an artificial urban wetland: The macrophyte *Chara* sp. (Charophyta, Characeae) and its association with gastropods

Miranda, María J.^{1*}; María de los Á. Taboada²; María S., Bustos²

¹ Facultad de Ciencias Naturales e IML, UNT. Instituto de Biodiversidad Neotropical (IBN, CONICET-UNT).

² Instituto de Ecosistemas de Aguas Continentales, Fundación Miguel Lillo (FML), Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

* Autor correspondiente: <mirandamjo@csnat.unt.edu.ar>

Resumen

El lago San Miguel es un humedal artificial ubicado en San Miguel de Tucumán. La macroalga *Chara* sp., es un componente importante entre las macrófitas de este cuerpo de agua. Su presencia aumenta la heterogeneidad del hábitat y repercute en la biodiversidad. Los moluscos utilizan a las algas como hábitat y se alimentan del perifiton asociado y *Chara* sp. se beneficia porque disminuye su competencia por la luz y nutrientes con el perifiton. Analizar esta relación contribuiría a comprender la dinámica ecosistémica del humedal. Los objetivos fueron determinar la riqueza perifítica y malacológica asociada a *Chara* sp., y establecer si existe interacción multitrófica entre ellos. Se recolectaron especímenes de *Chara* sp. en una transecta marginal, en aguas bajas y altas. Se identificaron las especies de microalgas y gasterópodos, determinándose que la composición fue similar entre estaciones. En asociación con *Chara* sp. se registraron 48 taxones algales, 4 especies de gasterópodos y masas de huevos. Entre los gasterópodos se identificó la especie exótica *Melanoides tuberculata*, predominante sobre las especies nativas,

► Ref. bibliográfica: Miranda, M.; Taboada, M. de los Á.; Bustos, M. S. 2025. Interacciones multitróficas en un humedal urbano artificial: La macrófita *Chara* sp. (Charophyta, Characeae) y su asociación con gasterópodos. *Lilloa* 62 – Suplemento N° 2: "Interacciones biológicas en un mundo cambiante": 295-315. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2145>

► Recibido: 17 de marzo 2025 – Aceptado: 19 de junio 2025 – Publicado: 27 de junio 2025.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



OPEN ACCESS

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

siendo este su primer registro para el NOA. No se observó variación en la riqueza del ficoperifiton debida a los moluscos, sin embargo, sería importante evaluar fluctuaciones poblacionales a lo largo del año. La observación de los especímenes recolectados reveló que existen signos de alimentación por raspado en la superficie de *Chara* sp. De forma coincidente, se detectaron restos del alga en el contenido estomacal de *M. tuberculata*. Comprender los cambios en la composición de especies en los ecosistemas es vital para entender cómo podrían verse afectados su funcionamiento y servicios ecosistémicos. Estos resultados revelan la necesidad de continuar los muestreos durante al menos un ciclo anual e incorporar la medición de nuevas variables bióticas y fisicoquímicas, para profundizar el conocimiento de las interacciones entre las comunidades acuáticas.

Palabras clave: Biodiversidad; funcionamiento de los ecosistemas; *Melanoides tuberculata*; perifiton.

Abstract

Lake San Miguel is an artificial wetland located in San Miguel de Tucumán. The macroalga *Chara* sp. constitutes a significant component among the macrophytes of this water body. Its presence increases habitat heterogeneity and impacts biodiversity. Mollusks use the algae as habitat and feed on the associated periphyton, and *Chara* sp. benefits because this reduces its competition for light and nutrients with the periphyton. Analyzing this relationship will contribute to understanding the ecosystem dynamics of this wetland. Our objectives were to determine the periphytic and malacological richness associated with *Chara* sp., and to establish the presence of multitrophic interactions between them. Specimens of *Chara* sp. were collected along a marginal transect during high and low water level periods. The species of microalgae and gastropods were identified, determining that the composition was similar between both sampling periods. In association with *Chara* sp., 48 algal taxa, 4 species of gastropods, and egg masses were recorded. Among the gastropods, the exotic species *Melanoides tuberculata* was identified, with a significant predominance over the native species. This is the first record for the NOA. No variation in the richness of the periphyton was observed due to the mollusks; however, it would be important to evaluate population fluctuations throughout the hydrological year. The observation of the collected specimens revealed that there are signs of scraping feeding on the surface of *Chara* sp. Coincidentally, remnants of the algae were detected in the stomach contents of *M. tuberculata*. Understanding changes in species composition in ecosystems is vital to comprehend how their functioning and ecosystem services might be affected. These results reveal the need to continue sampling for at least one annual cycle, along with the need to incorporate the measurement of new biotic and physicochemical variables, to increase the understanding of interactions between aquatic communities.

Keywords: Biodiversity; ecosystem functioning; *Melanoides tuberculata*; periphyton.

INTRODUCCIÓN

Los humedales son ecosistemas complejos, que incluyen una gran diversidad de formas y ambientes, y se encuentran entre los medios más productivos del mundo. Constituyen importantes reservorios de diversidad biológica y son fuente de agua y productividad primaria para la biota que los habita (Secretaría de la convención de Ramsar, 2006; Vizcardo y Gil-Kodaka, 2015). Los cuerpos de agua artificiales también se engloban dentro del concepto de humedales (Schnack *et al.*, 2000) y sus características de extensión, profundidad y ubicación, entre otras, los hacen vulnerables a las actividades antrópicas. Estas acciones provocan, con frecuencia, el crecimiento excesivo de plantas acuáticas y de algas que interfieren en el funcionamiento normal del ecosistema (Mancini *et al.*, 2012). Estos sistemas se desarrollan en suelos anegados, con el nivel freático en la superficie o cerca de ella, donde son comunes las macrófitas (Claverie *et al.*, 2021).

Las macrófitas incluyen comunidades de organismos fotosintéticos adaptados a ambientes húmedos, tales como plantas acuáticas y macroalgas, y junto a las microalgas son componentes importantes de los humedales y son responsables de la producción primaria (Medeiros y Henry-Silva, 2017; Claverie *et al.*, 2021). Asimismo, influyen en los ciclos de nutrientes, proporcionan estructura física y aumentan la complejidad y heterogeneidad del hábitat, generando la disponibilidad de refugios, sitios de alimentación y reproducción, lo cual repercute en la estructura de las poblaciones, la densidad, y composición de la biodiversidad de especies nativas y exóticas (Kraufvelin, 2009; Mormul *et al.*, 2010; Thomaz y Ribeiro da Cunha, 2010; Medeiros y Henry-Silva, 2017; Claverie *et al.*, 2021). Desempeñan además un rol clave en la composición del ecosistema al participar de las interacciones multitróficas.

Una macrófita importante en muchos ambientes es el alga *Chara* sp. (Charophyta, Characeae), que tiene una alta tasa de absorción de carbono, nitrógeno y fósforo, y ayuda a mantener las concentraciones de nutrientes en el agua en niveles bajos, evitando el crecimiento excesivo del fitoplancton (Albertoni, 1999). Las especies de *Chara* se encuentran enraizadas o ancladas en el sustrato y crecen por debajo de la superficie del agua (Denny, 1985; Chambers *et al.*, 2008). Presentan un talo rígido y áspero que se dispone en un eje dividido en nudos y entrenudos, con ramificaciones dispuestas en verticilos (Fig. 1). Dicha morfología, otorga una extensa superficie para la colonización de una gran comunidad perifítica, conformada por diversos organismos (algas, bacterias, hongos, protozoos y microcrustáceos) que constituyen un importante recurso alimentario para los invertebrados acuáticos (Albertoni, 1999; Guerrero Lizarazo *et al.*, 2021).

Según Mormul *et al.* (2010) existen importantes interacciones entre macrófitas, epífitas e invertebrados. Estas interacciones pueden estar mediadas por la quimiorrecepción ya que algunas especies de macrófitas liberan compuestos químicos que los caracoles detectan.



Fig. 1. Morfología del talo de *Chara*. A) Aspecto de la planta. B) Detalle de nudos, entrenudos y ramificación en verticilos. C) Detalle de estructura reproductiva. D) Epífitas filamentosas creciendo sobre el talo.

Fig. 1. Morphology of the thallus of *Chara*. A) Plant aspect. B) Detail of nodes, internodes, and verticillate ramification. C) Detail of reproductive structure. D) Filamentous epiphytes growing on the thallus.

Ciertas sustancias actúan como inhibidores para algunas especies, y como estimulantes o atrayentes para otras, por lo cual la interacción sería especie-específica. Esta relación beneficia tanto a las macrófitas como a los moluscos, ya que los caracoles se alimentan del perifiton asociado a la macroalga y también de tejidos de las macrófitas. Los caracoles también disponen de un sustrato para oviponer y protegerse de depredadores (Li *et al.*, 2009a). Las algas por su parte pueden beneficiarse del pastoreo realizado por los caracoles, porque eliminan la cubierta epifítica, lo que disminuye su competencia por la luz solar y los nutrientes con el perifiton (Li *et al.*, 2009b; Medeiros y Henry-Silva, 2017).

El patrón alimentario de los moluscos tiende a favorecer a ciertas microalgas perifíticas de *Chara* sp. ya que promueve la regeneración de la comunidad.

Los caracoles presentan herbivoría selectiva sobre el perifiton, prefiriendo ciertas especies, además de que pueden elegir el área o microhábitat donde se alimentan (Mormul *et al.*, 2010; Medeirosa y Henry-Silva, 2017; Loo, 2021). Así, la presión de depredación sobre la comunidad perifítica puede provocar la desaparición de algunas especies, haciendo que otras se vuelvan dominantes, y de esta manera alteran la dinámica trófica en los ecosistemas acuáticos (Vasconcelos *et al.*, 2013). El incremento de las densidades poblacionales de los gasterópodos puede afectar negativamente el crecimiento de las macrófitas, dado que son capaces de modificar sus hábitos alimentarios al reemplazar el consumo del perifiton por el tejido vegetal (Li *et al.*, 2009a; Medeirosa y Henry-Silva, 2017).

Los lagos urbanos son humedales artificiales de importancia como fuentes de biodiversidad, sumideros de carbono y por su valor paisajístico (World Water Quality Alliance [WWQA Ecosystems], 2023). Sufren el impacto del uso intensivo, el vertido de aguas residuales, la eutrofización, entre otros, que afectan su biodiversidad (Mancini *et al.*, 2012; Chaves Ramírez, 2022). Resulta necesario abordar el análisis de la biodiversidad de estos ambientes y de las interacciones multitróficas que en ellos se dan. El Lago San Miguel, en la provincia de Tucumán, es un ecosistema de origen antrópico, en el que estudios previos describieron su comunidad fitoplanctónica (Taboada y Bustos, 2021, 2022a, 2022b; Taboada *et al.*, 2021). Recientemente, se identificaron algunas especies de macrófitas y de moluscos asociadas a la macroalga *Chara* sp. en dicho cuerpo de agua (Miranda *et al.*, 2024; Taboada *et al.*, 2024). Analizar la relación entre *Chara* sp., el perifiton y los gasterópodos puede contribuir a comprender de qué manera esta macroalga influye en el establecimiento, diversidad y densidad poblacional de estos grupos lo que afectaría la dinámica ecosistémica de este humedal urbano.

Los objetivos de este estudio fueron determinar la composición en la riqueza perifítica y de moluscos asociada a *Chara* sp., y determinar si existe interacción multitrófica entre el alga y su biota asociada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El lago San Miguel es un humedal artificial ubicado a los 26° 49' 58,29" S y 65° 11' 20,80" W, en el Parque 9 de Julio de la ciudad de San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina (Fig. 2). Tiene una superficie aproximada de 3 hectáreas y una profundidad máxima de 1,5 m. El suministro de agua proviene de un sistema de bombeo de agua subterránea y drena hacia un canal urbano que aporta agua al río Salí. Su principal uso es recreativo y por estar inmerso en la ciudad, su presencia contribuye a disminuir contaminantes de la escorrentía a través de la sedimentación, la absorción biológica y la filtración por las macrófitas (Persson, 2012).

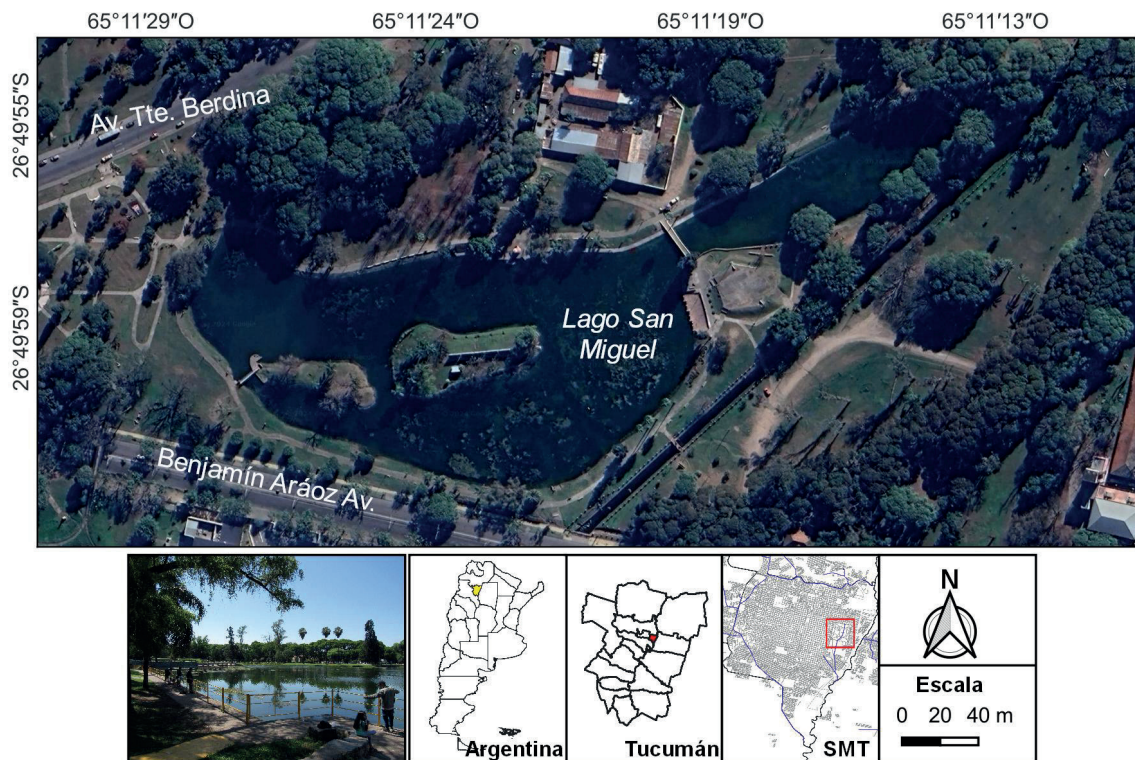


Fig. 2. Área de estudio. Ubicación del Lago San Miguel en el Parque 9 de Julio de la ciudad de San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Fuente: Google Earth.

Fig. 2. Study area. Location of San Miguel Lake in Parque 9 de Julio, San Miguel de Tucumán city, Tucumán, Argentina. Data source: Google Earth.

El clima regional es subtropical con estación seca en el período de marzo a octubre. Las temperaturas medias varían de 18 a 20 °C y la precipitación anual entre 900 y 1.000 mm (Guido y Sesma, 2014).

Se llevaron a cabo relevamientos en aguas altas (verano/2024), y aguas bajas (invierno/2024). Los muestreos de macrófitas se realizaron en el área litoral del cuerpo de agua, debido a la presencia de especies arraigadas y a la posibilidad de acceso. Se recolectaron muestras de 10 a 30 especímenes de *Chara* sp. en puntos distribuidos aleatoriamente a lo largo de una transecta marginal. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio en bolsas plásticas con agua destilada, para poder determinar la presencia de microalgas perifíticas como así también de gasterópodos.

Para la estimación de la abundancia-cobertura de *Chara* sp. se empleó el método de Braun-Blanquet que permite estimar la abundancia-cobertura de las especies.

Los valores de la escala de Braun-Blanquet (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974) son los siguientes:

- r* uno a tres individuos con cobertura menor a 5 %
- +* pocos individuos con cobertura menor a 5 %
- 1* abundantes individuos con cobertura menor a 5 %
- 2* cobertura del 5 al 25 %
- 3* cobertura del 25 al 50 %
- 4* cobertura del 50 al 75 %
- 5* cobertura del 75 al 100 %

De los ejemplares recolectados se seleccionaron aleatoriamente 15 que fueron seccionados en varias partes de entre 5-7 cm y se procedió a lavarlos y agitarlos (aproximadamente 2 minutos) en un vaso de precipitado con agua destilada, para extraer la taxocenosis perifítica. Otra técnica empleada fue el raspado con pincel, cepillo y bisturí para remover las microalgas. El material extraído fue conservado en agua destilada y fijado con solución de formaldehído al 4%, en frascos herméticos. Para el análisis cualitativo de los taxones algales se realizaron preparados mediante alícuotas de las muestras. Para la identificación de las especies se utilizó un microscopio binocular Zeiss, los taxones fueron medidos y fotografiados con un software incorporado al microscopio. Los géneros y especies se determinaron según bibliografía específica y se actualizaron con la base de datos AlgaeBase (Guiry y Guiry, 2025). De esta manera se obtuvo la información para la lista de riqueza. El resto de los ejemplares de *Chara* sp., fueron inspeccionados minuciosamente bajo lupa estereoscópica Nikon SMZ745, para detectar y separar manualmente los especímenes de gasterópodos. Las conchillas vacías obtenidas fueron fotografiadas en vistas dorsal, ventral y lateral y conservadas en seco, mientras que los especímenes vivos fueron fotografiados a fin de conservar registros de la coloración natural del cuerpo y posteriormente conservados en alcohol absoluto. La identificación taxonómica de los moluscos se llevó a cabo sobre la base de caracteres conquiológicos. Se seleccionaron especímenes de *Melanoides tuberculata* Müller, por ser la especie más abundante y de mayor tamaño, para la realización de disecciones anatómicas a fin de constatar la presencia de restos de algas en su interior. Una vez identificados todos los especímenes registrados, se elaboró un listado taxonómico y se realizó el conteo de los mismos, a fin de determinar su abundancia.

RESULTADOS

Según la escala de Braun-Blanquet el porcentaje abundancia/cobertura de *Chara* sp. en el lago fue del 50-55% (nivel 3 de cobertura) en ambos periodos de estudio.

En la superficie de *Chara* sp. se determinaron un total de 48 especies de microalgas: Heterokontophyta-Bacillariophyceae (17), Charophyta (12), Cyanobacteria (10) y Chlorophyta (9). Algunos ejemplos de las especies identificadas se muestran en las figuras 3 y 4.

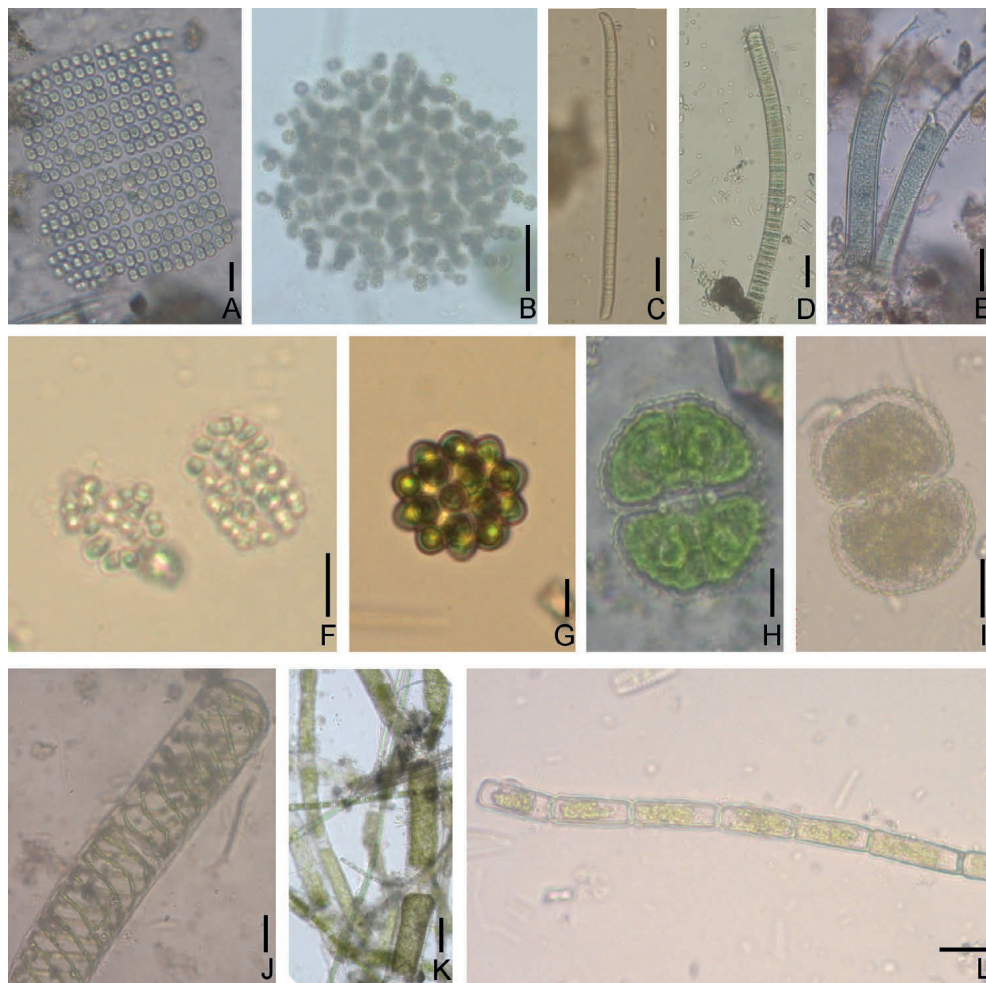


Fig. 3. Algunas especies de Cyanobacteria, Charophyta y Chlorophyta presentes en el lago San Miguel. A) *Merismopedia* sp. B) *Microcystis* sp. C) *Oscillatoria jasorvensis*. D) *O. limosa*. E) *Planktolyngbya* sp. F) *Gomphosphaeria* sp. G) *Coelastrum* sp. H) *Cosmarium* sp. 1. I) *Cosmarium* sp. 2. J) *Spirogyra* sp. 3. K) *Cladophora* sp. L) *Oedogonium* sp. 1. Escala: 10 μ m (A, B, C, D, E, H, L); 2 μ m (F, G); 5 μ m (I); 20 μ m (J); 50 μ m (K).

Fig. 3. Some species of Cyanobacteria, Charophyta and Chlorophyta present in Lake San Miguel. A) *Merismopedia* sp. B) *Microcystis* sp. C) *Oscillatoria jasorvensis*. D) *O. limosa*. E) *Planktolyngbya* sp. F) *Gomphosphaeria* sp. G) *Coelastrum* sp. H) *Cosmarium* sp. 1. I) *Cosmarium* sp. 2. J) *Spirogyra* sp. 3. K) *Cladophora* sp. L) *Oedogonium* sp. 1. Scale: 10 μ m (A, B, C, D, E, H, L); 2 μ m (F, G); 5 μ m (I); 20 μ m (J); 50 μ m (K).

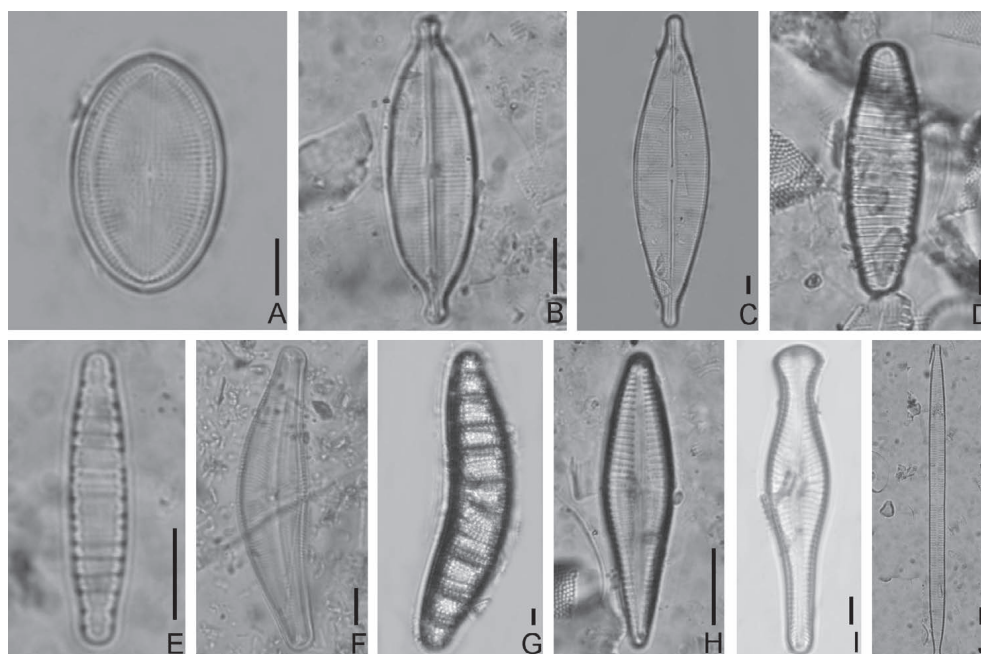


Fig. 4. Algunas especies de Heterokontophyta (Bacillariophyceae) identificadas en el lago San Miguel. A) *Cocconeis placentula*. B) *Craticula ambigua*. C) *Craticula cuspidata*. D) *Diatoma vulgaris*. E) *Diatoma* sp. F) *Ephitemia* sp. G) *Encyonema silesiacum*. H) *Gomphonema affine*. I) *Gomphonema capitatum*. J) *Ulnaria ulna*. Escala 10 µm.

Fig. 4. Some species of Heterokontophyta (Bacillariophyceae) identified in Lake San Miguel. A) *Cocconeis placentula*. B) *Craticula ambigua*. C) *Craticula cuspidata*. D) *Diatoma vulgaris*. E) *Diatoma* sp. F) *Ephitemia* sp. G) *Encyonema silesiacum*. H) *Gomphonema affine*. I) *Gomphonema capitatum*. J) *Ulnaria ulna*. Scale 10 µm.

La riqueza específica por grupo algal, en las diferentes épocas se representa en la Fig. 5. En relación al hábito, las formas unicelulares (22 especies) predominaron sobre las filamentosas (14 especies) y las coloniales (12 especies). Algunas de las especies de diatomeas identificadas (*Gomphonema* sp., *Cocconeis* sp., *Encyonema* sp. y *Diatoma* sp.) se caracterizan por la producción de mucílago que les permite la fijación al talo de *Chara* sp.

En asociación con *Chara* sp. se registraron un total de 233 especímenes de gasterópodos en el invierno de 2024, identificados como *Melanoides tuberculata* (115 especímenes), *Heleobia* sp. (99), Physidae (10) y *Biomphalaria* sp. (9) (Fig. 6). En verano se registraron 177 especímenes de las mismas especies con los siguientes valores de abundancia: *M. tuberculata* (110), *Heleobia* sp. (60), Physidae (2) y *Biomphalaria* sp. (5). Cabe destacar que este es el primer registro de *M. tuberculata* para el Noroeste Argentino.

La mayor parte de los especímenes de gasterópodos recolectados en ambas estaciones corresponden a conchillas vacías, a excepción de *M. tuberculata*, especie en la cual se registraron todos los especímenes vivos y en diferentes etapas de desarrollo (Fig. 7). Asimismo, se registraron masas de huevos, no identificadas (Fig. 8).

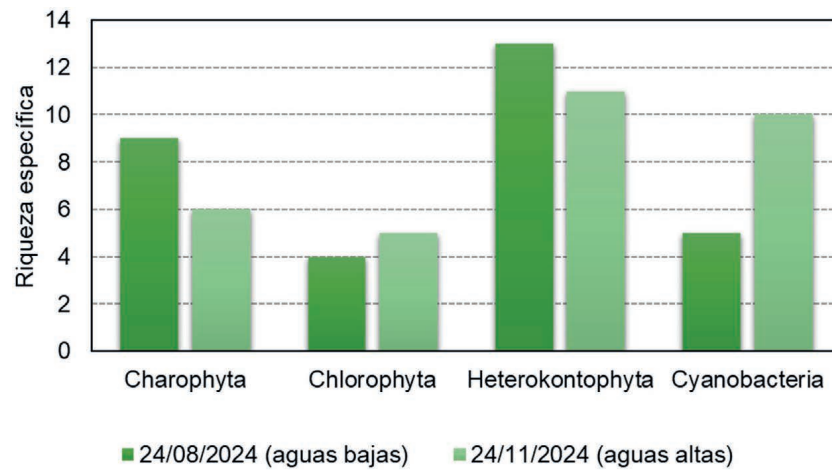


Fig. 5. Riqueza específica por grupo algal para las dos épocas de muestreo.

Fig. 5. Specific richness for each algal group in both sampling periods.

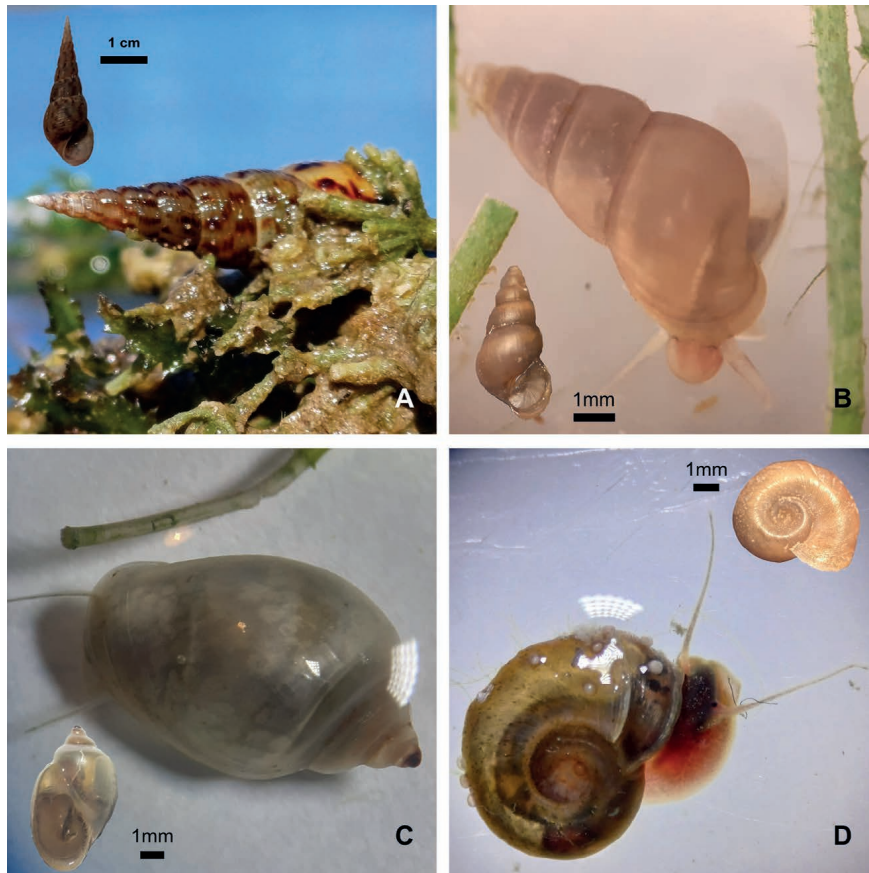


Fig. 6. Gasterópodos asociados a *Chara* sp. A) *Melanoides tuberculata*. B) *Heleobia* sp. C) Physidae. D) *Biomphalaria* sp. Cada espécimen vivo se acompaña de una imagen correspondiente a su conchilla en vista ventral.

Fig. 6. Gastropods associated with *Chara* sp. A) *Melanoides tuberculata*. B) *Heleobia* sp. C) Physidae. D) *Biomphalaria* sp. Each live specimen is accompanied by an image of its shell in ventral view.



Fig. 7. Especímenes de *Melanoides tuberculata* hallados en asociación con *Chara* sp.

Fig. 7. Specimens of *Melanoides tuberculata* found in association with *Chara* sp.

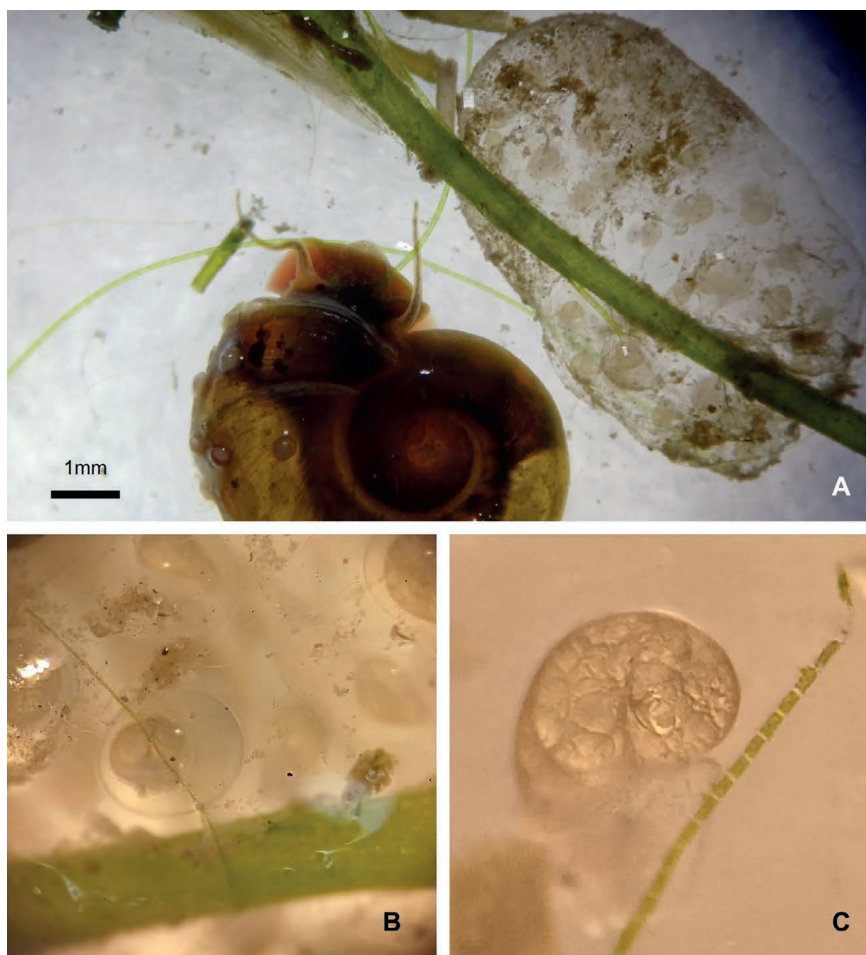


Fig. 8. Masa de huevos registrada junto a *Chara* sp. A) Masa de huevos completa con un espécimen de *Biomphalaria* sp. como referencia de tamaño (diámetro de conchilla de 4 mm). B) Detalle del embrión contenido en uno de los huevos. C) Especimen juvenil de gasterópodo.

Fig. 8. Egg mass observed with *Chara* sp. A) Egg mass with a specimen of *Biomphalaria* sp. as size reference (shell diameter 4 mm). B) Detail of the embryo contained in one of the eggs. C) Juvenile gastropod specimen.



Fig. 9. A-C) Diferentes segmentos del talo de *Chara* sp. con evidentes signos de raspado y consumo de tejido vegetal. D) Restos de *Chara* sp. hallados durante las disecciones de *Melanoides tuberculata*.

Fig. 9. A-C) Different segments of the *Chara* sp. thallus with evident signs of scraping and consumption of plant tissue are shown. D) Remains of *Chara* sp. found during the dissections of *Melanoides tuberculata*.

La observación bajo microscopio estereoscópico indicó que existen signos de raspado y alimentación en la superficie de *Chara* sp. (Fig. 9). En concordancia con esto, las disecciones de los especímenes de *M. tuberculata* revelaron que también presentaban restos del alga.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los cuerpos lénticos suelen presentar un mosaico estructural determinado principalmente por macrófitas acuáticas que, según su morfología, presentan diferencias en la composición y abundancia de perifiton y macroinvertebrados asociados, debido a las distintas opciones de refugio y alimento que ofrecen a estos (Oertli, 1995).

El porcentaje de cobertura de *Chara* sp. registrado para ambas estaciones fue similar, lo que estaría asociado al nivel hidrométrico constante del lago ocasionado por su suministro mediante el bombeo de agua subterránea. Asimismo, el perilago no presenta árboles que ocasionen sombreado, lo que favorece el ingreso de energía lumínica continua facilitando el desarrollo óptimo de las macrófitas y del perifiton.

Las microalgas del perifiton se encuentran en una posición estratégica para asimilar los nutrientes disponibles en la columna de agua, así como los liberados por el macrófito (Burkholder, 1996). Debido a que *Chara* sp. puede capturar y almacenar grandes cantidades de fósforo disponible en la columna de agua, estos macrófitos pueden favorecer el aumento de la biomasa y riqueza epifítica a través del intercambio de nutrientes, lo que da soporte a la notable interacción entre ellas (Blindow *et al.*, 2014).

El ficoperifiton estuvo representado por taxones cosmopolitas y de alta frecuencia en aguas continentales los que fueron mencionados para otros lagos urbanos del país (Ehrenhaus y Vigna, 2006; Daga y Pierotto, 2011; Mancini *et al.*, 2012; Cano *et al.*, 2012, 2013; Leyes *et al.*, 2018; Borja *et al.*, 2023). Entre las especies identificadas se encuentran mejor representadas las formas unicelulares y las filamentosas, y en menor medida las formas coloniales. Estudios previos revelaron la predominancia de estos tipos morfológicos en lagos tropicales, y reconocen que características como la presencia de mucílago resultan ventajosas para las algas al favorecer la fijación al sustrato (ej. cianobacterias). Además, se ha reconocido que algas filamentosas (como *Oedogonium*) poseen mejores capacidades para el aprovechamiento de la luz, el espacio y altas concentraciones de nutrientes. Grupos de carófitas presentes en el lago, como *Cosmarium*, también fueron reconocidas por ser típicamente perifíticas y representativas en el perifiton de lagos tropicales. Especies de diatomeas de los géneros *Encyonema*, *Gomphonema* y *Navicula* también fueron registradas como abundantes en el perifiton de lagos y otros cuerpos de agua (Moreno y Aguirre, 2013).

La escasa profundidad del lago favorece la mezcla permanente entre comunidades, ya que los organismos fitoplanctónicos pueden ocupar zonas subsuperficiales con adecuadas condiciones lumínicas (Martínez Martínez *et al.*, 2018).

La composición de especies de algas entre estaciones fue similar, en aguas bajas se registraron 31 taxones y en aguas altas 35. Lo que podría relacionarse con la poca variabilidad hidrométrica del lago, lo que otorga cierta estabilidad en la columna de agua y tiende a favorecer una comunidad perifítica constante entre estaciones.

Respecto a los gasterópodos identificados, *Melanoides tuberculata* y *Heleobia* sp., fueron las dos especies más importantes en cuanto a abundancia de especímenes registrados, en ambas estaciones, indicando una estrecha relación con el alga. Existe escasa información disponible sobre las estrategias alimenticias del género *Heleobia* siendo básicamente detritívoros (Pereira *et al.*, 2011).

Albertoni (1999) sugiere que las mayores densidades de las comunidades de raspadores y detritívoros, como algunas especies de *Heleobia*, se relacionan con una mayor abundancia de perifiton (cianobacterias filamentosas) sobre *Chara* sp., en algunas épocas del año. El hábitat provisto por *Chara* sp. es favorable para el desarrollo de los gasterópodos especialmente de *Heleobia*. Relevamientos previos realizados en el lago registraron cinco especies de gasterópodos (Taboada *et al.*, 2024) de los cuales únicamente *Pomacea canaliculata* Lamarck no fue encontrada asociada a *Chara* sp. Esto puede deberse a que, si bien la especie suele alimentarse de macrófitas o de material adherido a sustratos duros sumergidos, tiene otras estrategias alimenticias, como la recolección de materiales en la superficie del agua (Martín *et al.*, 2017). Asimismo, las hembras suelen depositar masas de huevos sobre cualquier sustrato firme, por encima del nivel del agua, donde pueden recibir humedad.

Entre los principales factores que regulan la fauna malacológica dulceacuícola pueden mencionarse, el sustrato, el movimiento de las aguas, la temperatura, el contenido de carbonato de calcio, la disponibilidad de nutrientes y otras variables físicoquímicas (Darrigran *et al.*, 2014). Según Vázquez Perera y Gutiérrez Amador (2007) tanto la presencia de plantas acuáticas como las relaciones interespecíficas entre poblaciones de moluscos constituyen los principales factores bióticos que afectan a estos organismos. Las carofitas tienen una alta capacidad de asimilar bicarbonato para la fotosíntesis lo que se traduce en la producción de incrustaciones de carbonato de calcio (calcita) en la superficie de sus talos. Estas incrustaciones pueden representar el 86% del peso seco de la masa algal (McCourt *et al.*, 2017; Strzałek *et al.*, 2024). Este podría ser uno de los factores que determinan la preferencia alimenticia por los moluscos, que requieren del calcio para la elaboración de sus conchillas. Además, las carofitas proporcionan una densa cobertura que redunda en gran disponibilidad de perifiton para alimento y de refugio contra predadores para los gasterópodos (van den Berg *et al.*, 1997). Esto pudo constatararse a través de la presencia de masas de huevos en desarrollo sobre el alga.

Es importante destacar la presencia de *M. tuberculata*, una especie exótica, nativa de Asia y África oriental que ha invadido las áreas tropicales y subtropicales del mundo, con pocos registros actuales en Argentina desde 1999, cuya introducción en el país podría haber ocurrido por transporte a través de vegetación flotante (Peso y Quintana, 1999; Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2007; Peso *et al.*, 2011). A partir de este nuevo registro se amplía el área de distribución conocida para esta especie en el país. Se pudo observar que la población de *M. tuberculata*, se encuentra bien establecida en el lago San Miguel, ya que todos los especímenes fueron recolectados vivos y es evidente el predominio de ejemplares juveniles en diferentes etapas de desarrollo, sobre los adultos, demostrando su reproducción exitosa. *M. tuberculata* posee características que la convierten en una invasora exitosa, como ser su reproducción por partenogénesis, su rápido crecimiento y baja

tasa de mortalidad, lo que le permite mantener densidades poblacionales altas (Vasconcelos *et al.*, 2013; Raw *et al.*, 2016). Asimismo, respecto a sus características ecológicas, toleran altas amplitudes de temperatura, salinidad y pH (Hiba y Zainab, 2022). En cuanto a la alimentación, es un depredador generalista que consume indiscriminadamente microalgas, perifiton y detritos finos de superficies sólidas, bacterias, partículas orgánicas depositadas en el sedimento y plantas en descomposición (Vogler *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2013; Vizcardo y Gil-Kodaka, 2015). De acuerdo a Oliveira y Oliveira (2019), la presencia y abundancia de esta especie está asociada con la presencia de macrófitas acuáticas. Vasconcelos *et al.* (2013) demostraron que existe una disminución de la diversidad y riqueza del perifiton dada por la presión de depredación ejercida por esta especie, lo que sugiere que, en el medio natural, la presencia de *M. tuberculata* disminuye la calidad ecológica, por la desaparición de algunas especies y el fomento de la dominancia de otras. Estos resultados no son coincidentes con lo registrado en el lago San Miguel donde no se ha observado una variación en la riqueza del ficope-rifiton atribuible al molusco, sin embargo, sería importante incluir datos de abundancia en trabajos posteriores a fin de evaluar el efecto de posibles fluctuaciones poblacionales.

Los resultados obtenidos permitieron detectar el amplio predominio en cuanto a abundancia de especímenes de *M. tuberculata* sobre las especies nativas de gasterópodos. En concordancia con nuestros resultados, varios estudios demuestran que en los lugares donde esta especie exótica se ha establecido y se ha vuelto abundante, se registró una disminución significativa de la densidad de gasterópodos nativos (Peso *et al.*, 2011; Vasconcelos *et al.*, 2013; Vizcardo y Gil-Kodaka, 2015; Barros *et al.*, 2020). De acuerdo a este estudio, por cada espécimen de *Biomphalaria* sp. pueden hallarse aproximadamente catorce de *M. tuberculata*, en coincidencia con Pointier (1993) quien indicó que cuando existen densas poblaciones de la especie exótica, las poblaciones de *Biomphalaria* sp. se ven afectadas reduciendo drásticamente su número quedando restringido su hábitat a refugios sumergidos, como el representado por *Chara* sp. Las especies exóticas invasoras son consideradas a nivel global como una de las principales amenazas a la biodiversidad (Pyšek *et al.*, 2020). Esto repercute en las poblaciones de niveles tróficos superiores, como ser crustáceos y peces, que dependen de ellos para su alimentación.

Dadas las amenazas a la biodiversidad, impulsadas por los cambios antropogénicos, comprender los cambios en la composición de las especies en los ecosistemas es vital para entender cómo podrían verse afectados el funcionamiento y los servicios ecosistémicos futuros (Loo, 2021; Santamarina *et al.*, 2023). Los resultados obtenidos en este trabajo revelan la necesidad de continuar los muestreos sistemáticos en este humedal urbano, junto con la medición de variables fisicoquímicas y ambientales para profundizar el conocimiento de las interacciones entre las comunidades acuáticas.

Asimismo, resulta relevante el monitoreo de *M. tuberculata* en este y otros ambientes acuáticos de la provincia, aún no detectada, ya que este lago drena hacia un canal que aporta agua al río Salí y dadas las características reproductivas y la alta adaptabilidad ecológica de esta especie, podría representar un severo problema en un futuro próximo. Esto permitirá tener una visión holística de la dinámica ecológica de este lago urbano.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al Sr. Rodrigo Delgado, Técnico del Instituto de Ecología, Comportamiento y Ambiente del Área de Biología Integrativa de la Fundación Lillo por su colaboración en los muestreos del lago. A las autoridades del Municipio de San Miguel de Tucumán por su autorización para la realización de este trabajo. A los revisores anónimos que con sus aportes enriquecieron este trabajo.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Las autoras declaran que no existen conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertoni, E. F. (1999). Aspectos de Crescimento, Reprodução e Alimentação de Peneídeos e Paleomonídeos em Lagoas Costeiras do Norte do Estado do Rio de Janeiro. (Tesis doctoral) UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. 200 pp.
- Barros, M. R. F., Chagas, R. A., Herrmann, M. y Bezerra, A. M. (2020). New record of the invasive snail *Melanooides tuberculata* (Gastropoda, Thiariidae) - Ceará State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 80 (2): 368-372.
- Blindow, I., Hargeby, A. y Hilt, S. (2014). Facilitation of clear-water conditions in shallow lakes by macrophytes: differences between charophyte and angiosperm dominance. *Hydrobiologia* 737 (1): 99-110.
- Borja, C. N., Alvarez Dalinger, F., Lozano, V., Muñoz, C. y Moraña, L. (2023). Calidad de agua y fitoplancton del lago del Parque San Martín (Salta, Argentina). *Lhawet* 9 (9): 35-43. Recuperado a partir de <https://portalderevistas.unsa.edu.ar/index.php/Lhawet/article/view/4726>
- Burkholder, J. M. (1996). Interactions of benthic algae with their substrata. En: R. J. Stevenson, M. L. Bothwell, R. L. Lowe (Eds.), *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems* (pp. 253-297). San Diego (CA): Academic Press.

- Cano, M. G., Casco, M. A. y Claps, M. C. (2012). Effect of environmental variables on epiphyton in a pampean lake with stable turbid- and clear-water states. *Aquatic Biology* 15: 47-59. <https://doi.org/10.3354/ab00409>
- Cano, M. G., Casco, M. A. y Claps, M. C. (2013). Vertical distribution of epiphyton biomass and diversity in a shallow lake during contrasting ecosystem regimes. *Aquatic Botany* 110: 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.05.007>
- Chambers, P. A., Lacoul, P., Murphy, K. J. y Thomaz, S. M. (2008). Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 9-26.
- Chaves Ramírez, C. (2022). Evaluación del estado ambiental del lago en el Parque Metropolitano La Sabana, San José, Costa Rica, para la implementación de medidas de rehabilitación ecológica. *Biocenosis* 33(2): 35-42.
- Claverie, A. Ñ., Epele, L., Kutschker, A., Grech, M., Manzo, L. y Miserendino, L. (2021). Variabilidad estructural de la comunidad de macrófitas en un gradiente pluviométrico en la provincia de Chubut. *Ecología Austral* 31 (3): 431-443. <https://doi.org/10.25260/EA.21.31.3.0.1217>
- Daga, I. C. y Pierotto, M. J. (2011). Cianobacterias del embalse San Roque (Córdoba, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46 (3-4): 227-234.
- Darrigran, G., Nuñez, V. y Torres, S. (2014). Los moluscos del Delta Bonaerense. En: J. Athor (Ed.), *El Delta Bonaerense y su Conservación* (pp. 230-245). Buenos Aires: Fundación de Historia Natural Félix de Azara.
- Denny, P. (1985). *The Ecology and Management of African Wetland Vegetation*. Dr WJunk Publishers.
- Ehrenhaus, C. y Vigna, M. S. (2006). Changes in the phytoplankton of Lake Planetario after a restoration process. *Darwiniana* 44 (2): 319-328.
- Guerrero Lizarazo, M. C., Pinilla-Agudelo, G. y Estrada Galindo, I. J. (2021). Ecología funcional de las algas perifíticas en el Chocó colombiano: limitación de recursos, competencia y variables ambientales. *Revista de Biología Tropical* 69 (1): 331-351. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v69i1.42042>
- Guido E. Y. y Sesma, P. J. (2014). Geografía física. En: Moyano, S., Puchulu, M. E., Fernández, D., Aceñolaza, G., Vides, M. E., Nieva, S. (Eds.), *Geología de Tucumán*. Colegio de Graduados en Ciencias Geológicas de Tucumán, pp. 29-48.
- Guiry, M. D. y Guiry, G. M. (2025). AlgaeBase. World-wide electronic publication, University of Galway. Recuperado de <https://www.algaebase.org>
- Gutiérrez Gregoric, D. E., Núñez, V., Ferrando, N. S. y Rumi, A. (2007). First record of invasive snail *Melanoides tuberculatus* (Müller) (Gastropoda: Prosobranchia: Thiariidae) for the Iguazú River basin, Argentina – Brazil. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 9: 109-112.

- Hiba, M. J. y Zainab, A. M. (2022). Review of the freshwater snail *Melanooides tuberculata* (O. F. Müller, 1774) (Gastropoda, Thiaridae). *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* 20: 336-339. 10.30574/gsc-cbps.2022.20.1.0303.
- Kraufvelin, P. (2009). Responses to nutrient enrichment, wave action and disturbance in rocky shore communities. *Aquatic Botany* 87: 262-274.
- Leyes, C., Falco, C. P. y Daga, C. (2018). Aporte al conocimiento de la fitoflora del lago del Parque Sarmiento (Córdoba, Argentina). *Revista Facultad De Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 5 (1): 45-50.
- Li, K. Y., Liu, Z. W., Hu, Y. H. y Yang, H. W. (2009a). Snail herbivory on submerged macrophytes and nutrient release: Implications for macrophyte management. *Ecological Engineering* 35 (11): 1664-1667. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.05.009>
- Li, K. Y., Liu, Z. y Gu, B. (2009b). Density-Dependent Effects of Snail Grazing on the Growth of a Submerged Macrophyte, *Vallisneria spiralis*. *Ecological Complexity* 6: 438-442. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2009.08.001>
- Loo, J. W. (2021). Does rocky shore macro algal diversity affect grazing gastropod diversity: an observational study on Mount Batten rocky shore. (BSc Thesis), Imperial College London, UK.
- Mancini, M., Crichigno, S., Ortiz, M. y Haro, J. G. (2012) Lagos urbanos: importancia, dinamismo y multiplicidad de usos. El caso del lago Villa Dalcar. (Córdoba, Argentina). *Biología Acuática* 27: 175-189.
- Martín, P. R., Seuffert, M. E., Tambur, N. E., Burela, S. y Saveanu, L. (2017). Behaviour and ecology of *Pomacea canaliculata* from Southern Pampas (Argentina), En: R.C. Joshi, R.H. Cowie y L. S. Sebastian (Eds). *Biology and management of invasive apple snails*. (pp 406). Muñoz: Philippine Rice Research Institute.
- Martínez Martínez, M., Medina Nava, M. y Hernández Morales, R. (2018). Interacciones ecológicas entre el fitoplancton y el perifiton en el Lago de Cuitzeo. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* 9 (21): 757-773.
- McCourt, R. M., Karol, K. G., Hall, J. D., Casanova, M. T. y Grant, M. C. (2017). Charophyceae (Charales). En: J. M. Archibald et al. (Eds.), *Handbook of the Protists* (pp 165-179). Springer Cham.
- Medeiros, E. L. y Henry Silva, G. G. (2017). Evaluation of the feeding preference between the aquatic macrophytes *Egeria densa* and *Chara indica* by the invasive mollusk *Melanooides tuberculata*. *Braz. J. Biol.* 77 (2): 234-239: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08415>
- Miranda, M. J., Taboada, M. de los Á. y Bustos, M. S. (2024). Presencia de un gasterópodo exótico invasor en asociación estrecha con una carofita en un lago urbano artificial (Tucumán, Argentina). VIII Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida.
- Moreno, Y. M. y Aguirre, N. (2013). Estado del arte del conocimiento sobre perifiton en Colombia. *Gestión y ambiente* 16 (3): 91-117.

- Mormul, R. P., Thomaz, S. M., da Silveira M. J. y Rodrigues, L. (2010). Epiphyton or macrophyte: Which primary producer attracts the snail *Hebetancylus moricandi*? *American Malacological Bulletin* 28: 127-133.
- Mueller-Dombois, D. y Ellenberg, H. (1974). Aims and methods of vegetation ecology. New York: John Wiley.
- Oertli, B. (1995). Spatial and temporal distribution of the zoobenthos community in a woodland pond (Switzerland). *Hydrobiologia* 300/301: 195-204.
- Oliveira, C. D. L. y Oliveira, C. Y. B. (2019). Growth parameters of the invasive gastropod *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiaridae) in a semi-arid region, Northeastern Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 41 (1): e45720. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v41i1.45720>
- Pereira, D., Oliveira Arruda, J., Menegat, R. Porto, M. L., Schwarzbald, A. y Hartz, S. M. (2011). Guildas tróficas, composição e distribuição de espécies de moluscos límnicos no gradiente fluvial de um riacho subtropical brasileiro. *Biotemas* 24 (1): 21-36.
- Persson, J. (2012). Urban Lakes And Ponds. En: L. Bengtsson, R. W. Herschy, R. W. Fairbridge, (Eds.) *Encyclopedia of Lakes and Reservoirs. Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6_15
- Peso, J. G. y Quintana, M. G. (1999). Otro molusco de origen asiático introducido en la Cuenca del Plata: *Melanoides tuberculata* en el embalse de Yacyretá, Argentina/Paraguay (Prosobranchiata: Thiaridae). IV Congreso Latinoamericano Malacología, Coquimbo, Chile.
- Peso, J. G., Pérez, D. C. y Vogler R. E. (2011). The invasive snail *Melanoides tuberculata* in Argentina and Paraguay. *Limnologia* 41 (4): 281-284.
- Pointier, J. P. (1993). The introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 54: 13-18.
- Pyšek, P., Hulme P. E., Simberloff, D., Bacher, S., Blackburn, T. M., Carlton, J. T., Dawson, W., Essl, F., Foxcroft, L. C., Genovesi, P., Jeschke, J. M., Kühn, I., Liebhold, A. M., Mandrak, N. E., Meyerson, L. A., Pauchard, A., Pergl, J., Roy, H. E., Seebens, H., van Kleunen, M., Vilà, M., Wingfield, M. J. y Richardson, D. M. (2020). Scientists' warning on invasive alien species. *Biological Reviews* 95 (6): 1511-1534. <https://doi.org/10.1111/brv.12627>
- Raw, J. L., Perissinotto, R., Miranda, N. A. F. y Peer, N. (2016). Diet of *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) from subtropical coastal lakes: Evidence from stable isotope (^{13}C and ^{15}N) analyses. *Limnologia* 59: 116-123.
- Santamarina, S., Mateo, R. G., Alfaro-Saiz, E. y Acedo, C. (2023). On the importance of invasive species niche dynamics in plant conservation management at large and local scale. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10: 1049142.

- Schnack, J. A., De Francesco, F. O., Colado, U. R., Novoa, M. L. y Schnack, E. J. (2000). Humedales antrópicos: su contribución para la conservación de la biodiversidad en los dominios subtropical y pampásico de la Argentina. *Ecología Austral* 10 (1): 63-80. Recuperado a partir de https://ojs.ecologiaaustral.com.ar/index.php/Ecologia_Austral/article/view/1599
- Secretaría de la Convención de Ramsar. (2006). Manual de la Convención de Ramsar: Guía a la Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán, 1971). 4° edición. Secretaría de la Convención de Ramsar. Gland, Suiza.
- Strzałek, M., Kufel, L., Apolinarska, K., Becher, M., Biardzka, E., Brzozowski, M., Kielczewski, R., Kowalewski, G., Pukacz, A., Woszczyk, M. y Pelechaty, M. (2024). Recycling and deposition of inorganic carbon from calcium carbonate encrustations of charophytes. *Limnology and Oceanography* 69: 279-289. <https://doi.org/10.1002/lno.12479>
- Taboada, M. de los Á., Bustos, M. S., Martínez De Marco, S. N. y Mirande, V. (2021). *Informe: Fitoplancton del Lago San Miguel - Otoño 2021*. 15 pp.
- Taboada, M. de los Á. y Bustos, M. S. (2021). *Informe: Fitoplancton del Lago San Miguel - Primavera 2021*. 9 pp.
- Taboada, M. de los Á. y Bustos, M. S. (2022a). *Fitoplancton del Lago San Miguel - Verano 2022*. 8 pp.
- Taboada, M. de los Á. y Bustos, M. S. (2022b). *Fitoplancton del Lago San Miguel - Informe final*. 16 pp.
- Taboada, M. de los Á., Miranda, M. J., Bustos, M. S. (2024). *Chara* sp. un alga verde con un importante rol como soporte de la biodiversidad de un lago urbano artificial. XLI Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. 32 pp.
- Thomaz, S. M. y Ribeiro da Cunha, E. (2010). The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages' composition and biodiversity. *Acta Limnologica Brasiliensia* 22 (2): 218-236.
- van den Berg, M.S., Coops, H., Noordhuis, R., van Schie, J. y Simon, J. (1997). Macroinvertebrate communities in relation to submerged vegetation in two *Chara*-dominated lakes. *Hydrobiologia* 342: 143-150.
- Vasconcelos, J. F., de Lucena Barbosa, J. E., de Lira Azevêdo, E., da Silva Azevêdo D. J. y Pinheiro Anacleto, M. J. (2013). Predation effects of *Melanoides tuberculatus* (Müller 1774) on periphytic biofilm colonization: an experimental approach. *Biota Neotropica* 13 (2): 96-101. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000200010>
- Vázquez Perera, A. A. y Gutiérrez Amador, A. (2007). Ecología de moluscos fluviales de importancia médica y veterinaria en 3 localidades de La Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 59 (2): 149-53.
- Vizcardo, C. y Gil-Kodaka, P. (2015). Estructura de las comunidades macrozoobentónicas de los humedales de Ventanilla, Callao, Perú. *Anales Científicos* 76 (1): 1-11.

- Vogler, R. E., Núñez, V., Gutiérrez Gregoric, D. E., Beltramino A. A. y Peso J. G. (2012). *Melanoides tuberculata*: The History of an Invader. En: E. M. Hämäläinen y S. Järvinen (Eds.) *Snails: Biology, Ecology and Conservation Chapter: Melanoides tuberculata: The history of an invader*. Nueva York: Nova Science Publishers.
- World Water Quality Alliance [WWQA Ecosystems]. (22nd March 2023). *White Paper – Embedding Lakes into the Global Sustainability Agenda*. ISBN: 978-1-906698-82-9. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7752982>

