



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
Centro Regional Universitario Bariloche

El rol de tres especies de hongos ectomicorrícicos en la tolerancia a la sequía de plántulas de *Pinus ponderosa*

Trabajo final para optar a título de Licenciatura en Ciencias
Biológicas

Natalia Zoe Joelson

CCT CONICET Patagonia Norte, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina

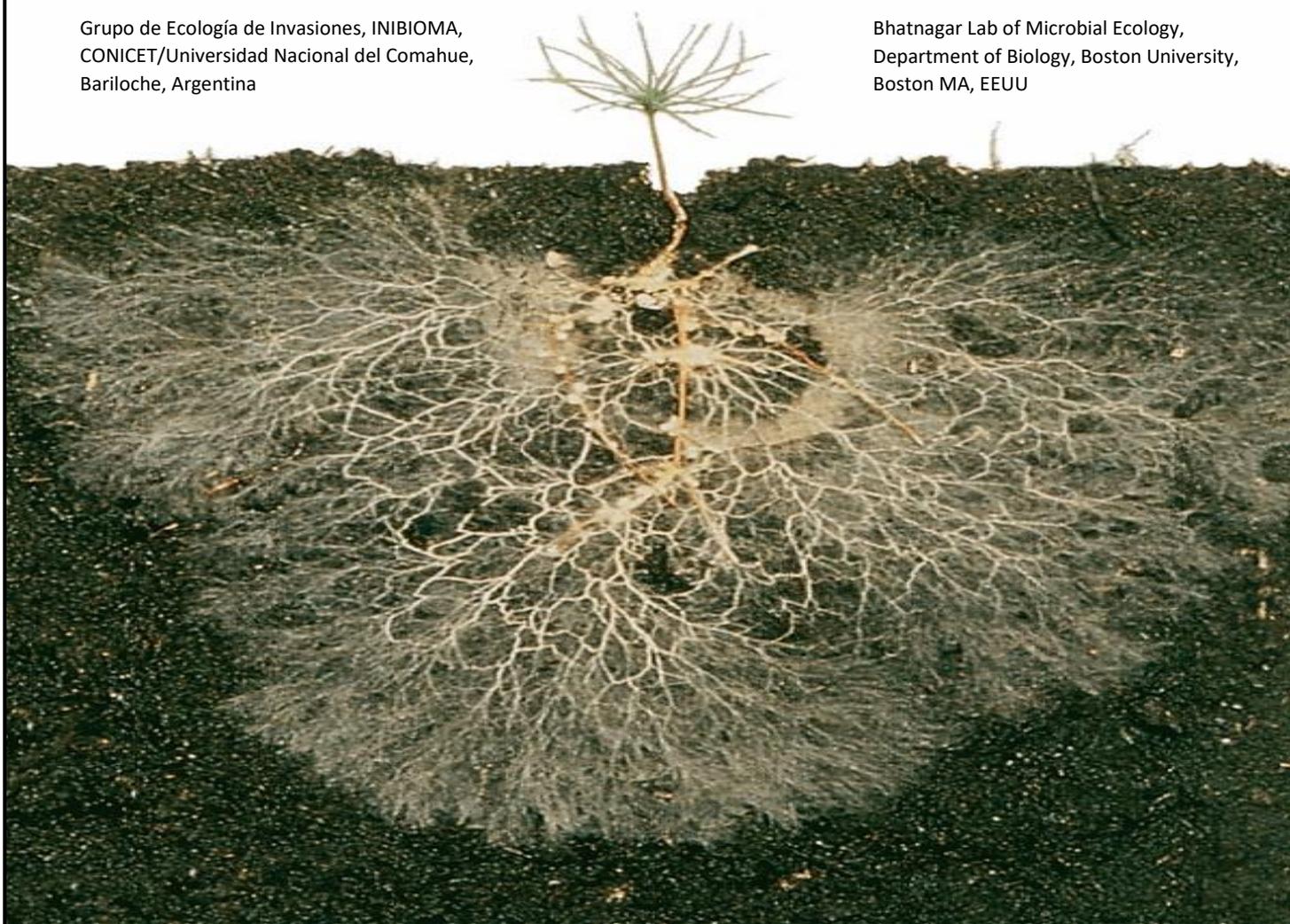
2021

Director: Martín A. Núñez

Grupo de Ecología de Invasiones, INIBIOMA,
CONICET/Universidad Nacional del Comahue,
Bariloche, Argentina

Codirector: Nahuel Policelli

Bhatnagar Lab of Microbial Ecology,
Department of Biology, Boston University,
Boston MA, EEUU



Agradecimientos

A la educación pública argentina, que permite que existan maravillas como el CRUB (Centro Regional Universitario Bariloche). Agradezco infinitamente a esta institución por su excelencia tanto académica como en valores humanos, por ser hogar y espacio de contención de tantos estudiantes.

Al programa Fulbright y al Ministerio de Educación de la Nación por darme la oportunidad de vivir y aprender por unos meses en el campus de UMASS Amherst durante la carrera.

A mis profesores y maestros, por mantener mi curiosidad despierta ante la vida siempre asombrosa. Especialmente a algunos de los excelentes docentes con los que me tocó compartir en el CRUB: Marina Stecconi, María Inés Messuti, Miriam Gobbi, Javier Grosfeld, Martín Moliné, Victor Cussac, Carlos Bertoli, Julio Andrade, Andrea Prémoli, Mariana Solans, Thomas Kitzberger, Cecilia Ezcurra y tantos otros que se destacan por su trabajo. Como alumna, me conmueve y me hace sentir muy afortunada ver la dedicación y entusiasmo que ponen en su trabajo. Deben saber que hacen el mundo un poco mejor en cada una de sus clases.

A mis directores, Nahuel y Martín, por su paciencia para acompañarme en estos tiempos complejos para llevar adelante una tesina, su calidez y por ser referentes excepcionales para introducirme al mundo académico.

A Marcela Ferreyra, por ser la primera profe que despertó mi amor por la tierra y por motivarme a dar los primeros pasos en biología.

A quienes me dieron una mano para poder realizar esta tesina en tiempos de pandemia, especialmente a Nati Fernández por su contención y por estar siempre atenta a mis consultas, a Noe Barrios, por su ayuda para procesar las muestras y a Mariana Reissig en la coordinación de la carrera, que gestionó rápidamente todas mis consultas.

A mis compañeres de cursada, que hoy son grandes amigos: Loli, Mica, Marquitos, Facu, Agus, Jose, Mati, Franco, Lihue, por esas largas horas compartidas en el laboratorio o en el patio de la universidad, los almuerzos apurados con estudio pre-parcialito, las risas y las caminatas nocturnas cuando salíamos de cursar.

A mamá, a papá, a mis hermanitos y a toda mi familia, por el amor incondicional, por seguir de cerca cada momento, por darme el apoyo que necesito y por todo lo que soy, ustedes ya saben.

A mi familia elegida, Lari, Loli, Fede, Maitu, Marian, Sofi y a todes mis amigas, por ser los mejores ayudantes de campo, asistentes de tesina y por hacer hermosos todo el resto de los días de la vida. A Nico, por tantas ricas comidas que me trajo al escritorio en horas de estudio sin pausa. A Juli, por mirar raíces durante muchas horas conmigo.

A Fede, mi ayudante de tesina y fan número uno, mi gran compañero de aventuras y mi amor.

A la tierra, a la vida en ella y a estas montañas sobre las que camino todos los días, por ser mi verdadero hogar y patria, por ser maestra, y por ser a quien decido entregar mi vida y mi tiempo.

RESÚMEN

Los pinos establecen simbiosis con hongos ectomicorrícicos (hongos EM) que facilitan su invasión en ecosistemas patagónicos, incluyendo estepas semiáridas donde el agua es un factor limitante. Los hongos micorrícicos tienen la capacidad de aliviar el estrés hídrico y podrían permitir a los pinos invadir ambientes áridos. A partir de un experimento factorial en cámara de cultivo, este trabajo estudió el efecto de la asociación con distintas especies de hongos EM en el crecimiento y la tolerancia al estrés hídrico de la especie no nativa invasora *Pinus ponderosa*. El experimento consistió en la inoculación de plántulas de *P. ponderosa* con tres especies diferentes de hongos EM: *Suillus luteus*, *Rhizopogon* sp. y *Boletus edulis*. También se incluyó en el diseño un control con sustrato estéril (sin inoculación fúngica). El tratamiento de inoculación se cruzó a su vez con dos regímenes de riego: riego frecuente e interrupción del riego (simulando condiciones de sequía) hasta registrar la muerte de las plántulas. Las plántulas inoculadas con *S. luteus* y *Rhizopogon* sp. presentaron mayor supervivencia a la sequía que las plántulas control. Bajo el régimen de sequía, no se observaron diferencias de biomasa entre las plántulas inoculadas con especies EM y el control. Bajo riego, las plántulas inoculadas con *S. luteus* y *Rhizopogon* sp. generalmente presentaron mayor biomasa que el control, el cual no presentó diferencias significativas respecto de las plántulas inoculadas con *B. edulis*. Estos resultados sugieren que los hongos suilloides (*S. luteus* y *Rhizopogon* sp.) son buenos promotores de la supervivencia en condiciones de sequía en pinos, pero su beneficio sobre el crecimiento estaría sujeto a un suficiente contenido de agua en el sustrato. Este trabajo evidencia que los hongos suilloides co-invasores podrían facilitar la supervivencia de pinos en condiciones de aridez extrema y aumentar el crecimiento del pino simbiote cuando el contenido de agua en el suelo no es limitante.

Palabras clave: ectomicorrizas, estrés hídrico, invasiones biológicas, pinos.

ABSTRACT

Pines are symbionts with ectomycorrhizal fungi (EMF) that facilitate their invasion in Patagonian ecosystems, including semiarid steppes where water is a limiting factor. Mycorrhizal fungi can alleviate water stress and may allow pine invasions in arid ecosystems. Using a growth chamber factorial bioassay, this work tested the effect of different EMF species on the growth and water stress tolerance of the non-native invasive species *Pinus ponderosa*. The bioassay consisted of an inoculation treatment with three EMF species: *Suillus luteus*, *Rhizopogon* sp. and *Boletus edulis*; and included a control with sterile soil (without fungal inoculation). The inoculation treatment was combined with two irrigation regimes: frequent irrigation and withheld irrigation (simulating drought) until plants were dead. Plants inoculated with *S. luteus* and *Rhizopogon* sp. had higher drought survival than control plants. No differences in biomass were observed between colonized and non-colonized plants under drought conditions. Plants inoculated with *S. luteus* and *Rhizopogon* sp. were bigger than control plants when frequent irrigation was applied and plants inoculated with *B. edulis* showed no significant differences with respect to control plants. These results suggest that suilloid fungi (*S. luteus* and *Rhizopogon* sp.) increase survival under water stress but their benefit on growth depends on an adequate soil water content. This work shows that co-invasive EMF as *S. luteus* and *Rhizopogon* sp. could facilitate pine survival in arid environments and may increase pine growth when soil water conditions are not limiting.

Keywords: biological invasions, ectomycorrhizae, pines, water stress

Índice de contenidos

AGRADECIMIENTOS	2
RESÚMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
LAS INVASIONES BIOLÓGICAS COMO FENÓMENOS COMPLEJOS	5
LA IMPORTANCIA DE LA SIMBIOSIS MICORRÍCICA	7
EL ROL DEL ESTRÉS HÍDRICO Y LAS MICORRIZAS EN LA CO-INVASIÓN.....	11
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	17
METODOLOGÍA	18
ELECCIÓN DE ESPECIES DE ESTUDIO	18
OBTENCIÓN DE BASIDIOMAS DE HONGOS EM	21
ELABORACIÓN DE INÓCULOS DE ESPORAS DE HONGOS EM.....	22
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL SUSTRATO	23
DISEÑO EXPERIMENTAL Y ENSAYO DE CRECIMIENTO EN CÁMARA DE CULTIVO	24
MEDICIONES DE VARIABLES RESPUESTA.....	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
RESULTADOS	29
SUPERVIVENCIA (TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA MUERTE)	29
LONGITUD	30
BIOMASA.....	31
CONTENIDO DE AGUA (%).....	34
DESCRIPCIÓN DE ECTOMORFOTIPOS	35
COLONIZACIÓN EFECTIVA Y PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN (%)	36
DISCUSIÓN	38
SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO BAJO DIFERENTES CONDICIONES HÍDRICAS.....	39
COLONIZACIÓN POR DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS EM	41
IMPLICANCIAS EN LOS PROCESOS DE INVASIÓN	42
HACIA PLANTACIONES SIN INVASIONES.....	43
LIMITACIONES DE ESTE TRABAJO	44
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46

INTRODUCCIÓN

Las invasiones biológicas como fenómenos complejos

Los seres humanos hemos causado un cambio sin precedentes en la distribución de los seres vivos que habitan la Tierra (Mack et al., 2000). En forma accidental o deliberada, la humanidad ha transportado un gran número de organismos fuera de su área de distribución natural (Lockwood et al., 2013). De la gran cantidad de especies transportadas a áreas nuevas, una fracción ha logrado naturalizarse (i.e. establecer una población autosuficiente de forma estable a lo largo del tiempo; Blackburn et al., 2011). A su vez, algunas especies no nativas naturalizadas han logrado invadir (i.e. dispersarse, sobrevivir y reproducirse en múltiples áreas por fuera de su sitio introducción original; Blackburn et al., 2011). La invasión de especies no nativas (i.e. especies transportadas fuera de su rango de distribución natural) causa severos daños ambientales, económicos y socio-culturales (Mack et al., 2000; Lockwood et al., 2013) y constituye una de las principales causas de cambio global (Richardson y Rejmánek, 2011; Simberloff et al., 2013; Castro-Díez et al., 2019).

Las invasiones biológicas afectan ecosistemas en todo el mundo, disminuyendo la biodiversidad (Richardson y Rejmánek, 2011; Simberloff et al., 2013; Castro-Díez et al., 2019). Las especies invasoras pueden afectar a las comunidades nativas a través de relaciones interespecíficas (e.g. predación, competencia, parasitismo e hibridación), alterando su abundancia (Mack et al., 2000), sus roles ecológicos (Levine et al., 2003; Vilà et al., 2011) y sus procesos evolutivos (Mooney y Cleland, 2001), pudiendo incluso provocar la extinción de especies (Clavero y Garcíaberthou, 2005; Vilà et al., 2011). Además, las especies invasoras pueden causar cambios drásticos en otras características fundamentales del ecosistema, como los regímenes de disturbios (Mandle et al., 2011; Castro-Díez et al., 2019; Fusco et al., 2019), las propiedades físicas del suelo (MacDicken, 2015), los ciclos de nutrientes (Liao et al., 2008) y del agua, y la productividad vegetal (Ehrenfeld, 2002; Levine et al., 2003; Vilà et al., 2011; Simberloff et al., 2013). Los impactos de las especies invasoras en los ecosistemas se traducen directamente en consecuencias ecológicas pero también económicas, tales como pérdidas de cosechas, bosques, pesquerías, y campos de pastoreo (Mack et al., 2000; Cardinale et al., 2012; MacDicken, 2015; Castro-Díez et al., 2019).

No obstante, muchas especies invasoras generan beneficios económicos directos (Richardson, 1998; Richardson y Rejmánek, 2011; Dickie et al., 2014). Por ejemplo, la mayoría de las especies leñosas invasoras fueron plantadas intencionalmente en sitios donde hoy causan

problemas y muchas son aun comercialmente importantes (Richardson, 1998; Richardson y Rejmánek, 2011). Las especies leñosas proveen productos como madera, leña, pulpa para papel, fibras, forrajes y alimentos (MacDicken, 2015). A su vez, muchas especies leñosas han sido introducidas debido a su valor ornamental y/o a la provisión de servicios ecosistémicos como el control de la erosión (Richardson y Rejmánek, 2011; MacDicken, 2015). La forestación con leñosas exóticas también se lleva a cabo en ecosistemas que carecen de árboles nativos, como estepas o matorrales, para mitigar el calentamiento global a través del secuestro de carbono (C) (Malpeli, 2006). Sin embargo, estas plantaciones conllevan un riesgo de invasión y, en general, no logran optimizar el secuestro de C en comparación con los ecosistemas nativos desplazados (Nuñez et al., 2021). La industria forestal es una de las principales fuentes de invasión de especies leñosas, debido a la acumulación de bancos de semillas masivos y a los rasgos ecológicos de las plantas que seleccionan para estos fines, como el crecimiento rápido y la tolerancia al estrés (Richardson, 1998; Grotkopp et al., 2010).

Al igual que con plantas y animales, los humanos también han facilitado las invasiones de hongos al dispersarlos hacia nuevas áreas (Mack et al., 2000; Dickie et al., 2016). Aunque la invasión por parte de hongos ha sido menos reportada y estudiada en comparación con la de plantas y animales (Dickie et al., 2016), hay un creciente consenso sobre la importancia de estos organismos como especies invasoras y sus impactos (Simberloff et al., 2013; Dickie et al., 2016). Presumiblemente, las primeras introducciones de hongos no fueron intencionales, ocurriendo, por ejemplo, con el transporte de plantas en contenedores junto a la biota del suelo contenido en los mismos (Jules et al., 2002; Liebhold et al., 2012; Vellinga et al., 2015). Luego, al reconocer su importancia en cultivos y forestaciones, los hongos han sido introducidos también en forma deliberada para control biológico (Ellison et al., 2008) y para promover el crecimiento en plantas (Schwartz et al., 2006; Vellinga et al., 2009). A pesar del esfuerzo de muchos países en controles fronterizos, actualmente las introducciones de hongos ocurren en forma frecuente a escala global (International Plant Protection Convention, 2020). Cuando estos hongos introducidos son mutualistas de plantas no nativas, pueden facilitar su invasión (Pringle et al., 2009; Nuñez y Dickie, 2014).

Los mutualismos entre plantas y hongos son importantes en los procesos de invasión (Pringle et al., 2009; Dickie et al., 2017). Ciertas especies de plantas no requieren de interacciones mutualistas para invadir (Brundrett, 2009), mientras que otras requieren de mutualistas para sobrevivir e invadir fuera de su rango de distribución nativo (Nuñez y Dickie, 2014; Dickie et al., 2017). Entre estas últimas, el éxito de invasión depende de establecer

interacciones ya sea con mutualistas nuevos (i.e. diferentes a los de su lugar de origen; Dickie et al., 2010), mutualistas cosmopolitas (i.e. que son nativos en diferentes regiones biogeográficas; Moora et al., 2011; Knapp et al., 2012) y/o con mutualistas de su distribución nativa que son transportados al rango invadido (Nuñez y Dickie, 2014). La co-invasión se caracteriza por la invasión de organismos junto a mutualistas de su rango nativo (Dickie et al., 2010; Nuñez y Dickie, 2014). Un ejemplo de co-invasión extendido a escala global es la invasión de plantas leñosas que establecen una simbiosis obligada con hongos micorrícicos (e.g. simbiosis ectomicorrícica en plantas de la familia Pinaceae, Nuñez et al., 2009; Dickie et al., 2010).

La importancia de la simbiosis micorrícica

Las asociaciones micorrícicas son interacciones simbióticas que ocurren entre hongos del suelo y las raíces de las plantas vasculares terrestres (Smith y Read, 2009). Este tipo de simbiosis puede encontrarse en las raíces de casi todas las plantas, en la mayoría de las condiciones ecológicas. Aproximadamente el 95 % de las especies conocidas de plantas pertenecen a familias que forman asociaciones micorrícicas (Smith y Read, 2009; van der Heijden et al., 2015). A pesar de ser consideradas clásicos ejemplos de mutualismos, las simbiosis micorrícicas pueden ocurrir en un continuo desde el parasitismo al mutualismo (Jones y Smith, 2004). Este rol puede variar a lo largo de la ontogenia de los organismos y también de acuerdo a la identidad de los simbioses y las condiciones ambientales (Brundrett, 2004; Jones y Smith, 2004). En el extremo mutualista de la interacción, el hongo aumenta la capacidad de la planta para adquirir agua y nutrientes generalmente limitantes, y la planta provee compuestos carbonados producto de la fotosíntesis (Smith y Read, 2009). Otros beneficios de esta interacción para la planta son la protección contra patógenos del suelo (Borowicz, 2001) y una mayor tolerancia a situaciones de estrés, como el estrés hídrico (Augé, 2001; Kivlin et al., 2013; Mohan et al., 2014).

Según el tipo de estructura anatómica que forman en la raíz y el simbionte fúngico involucrado, las micorrizas se clasifican en diferentes tipos (Smith y Read, 2009). Las micorrizas arbusculares (endomycorrizas) y las ectomicorrizas son los tipos más extendidos y estudiados en plantas leñosas (Smith y Read, 2009). Las micorrizas arbusculares ocurren entre hongos simbioses obligados del Phylum Glomeromycota y la mayoría de los taxones de plantas (van der Heijden et al., 2015; Brundrett y Tedersoo, 2018). Los hongos micorrícicos

arbusculares se caracterizan por penetrar entre y dentro de las células corticales de la raíz (aunque siempre rodeados por la membrana plasmática de la célula vegetal) donde forman estructuras como arbusculos y vesículas (**Figura 1.1**). Por su parte, los hongos ectomicorrícicos (de aquí en adelante “hongos EM”) son basidiomicetes o ascomicetes y forman tres tipos de estructuras características: una red de hifas que se desarrolla entre las células epidérmicas y corticales denominada "red de Hartig", un manto formado por hifas que rodean de manera continua la rizodermis de los extremos distales de raíces colonizadas, y micelio extra radical que se prolonga desde la superficie del manto y forma conexiones con el suelo (**Figura 1.1**; Smith y Read, 2009), con otras plantas y con los esporocarpos de los hongos EM (van der Heijden et al., 2015; Brundrett y Tedersoo, 2018). Algunas especies de hongos EM pueden formar conjuntos de hifas exploratorias, denominadas rizomorfos, que logran recorrer grandes distancias en el suelo (Smith y Read, 2009). Las estructuras anatómicas y morfológicas formadas en la raíz colonizada por hongos EM, tanto en el manto como el micelio extra radical, se denominan ectomorfortipos, son generalmente estables al menos a nivel de género del hongo y se utilizan como una primera aproximación para la identificación (Agerer, 1990, 1991, 2001). Mientras que las micorrizas arbusculares son el tipo más extendido, las ectomicorrizas ocurren principalmente en especies leñosas de bosques templados (Smith y Read, 2009). Si bien estas representan aproximadamente el 2 % de las especies de plantas, constituyen el 60 % de los árboles y arbustos del planeta (Steidinger et al., 2019). Además, muchas de ellas son especies forestales de importancia económica que dependen de asociaciones micorrícicas para su desarrollo (Brundrett y Tedersoo, 2018)

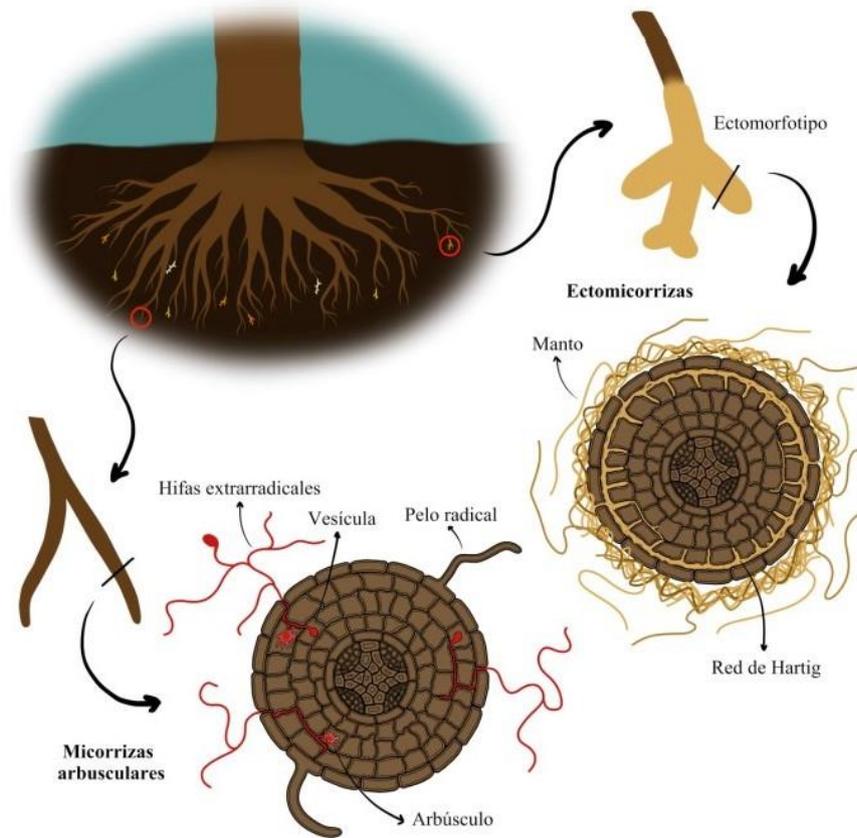


Figura 1.1. Esquema de estructuras morfológicas formadas a partir de la colonización de raíces por hongos EM y arbusculares junto a cortes transversales de la raíz señalando las estructuras anatómicas características de cada tipo de simbiosis. Esquema obtenido de Fioroni (2020).

Los hongos micorrízicos poseen rasgos fisiológicos, morfológicos y ecológicos que permiten una mayor capacidad para absorber nutrientes y agua en comparación con las raíces de las plantas terrestres (Smith y Read, 2009). Un ejemplo, es la capacidad de sintetizar ácidos orgánicos y otras sustancias que degradan compuestos orgánicos y solubilizan nutrientes minerales de diferentes fuentes no disponibles para las plantas (Smith y Read, 2009; van der Heijden et al., 2015). Además, las finas hifas de los hongos pueden acceder al agua de poros del suelo que resultan inaccesibles para las raíces de las plantas (Borjczyk et al., 2005), poseen una mayor superficie de contacto con el suelo, y acceden a sitios ubicados a mayor distancia (tanto vertical como horizontal) en comparación con los sitios accesibles para las raíces (Borjczyk et al., 2005; Allen, 2007). En el caso de las ectomicorrizas, el micelio extra radical transporta agua desde el suelo a la raíz (**Figura 1.2**, Duddridge et al., 1980; Lehto y Zwiazek, 2011), y este aporte hídrico puede ser suficiente para determinar la muerte o la supervivencia

de una plántula¹ (Lehto y Zwiazek, 2011). Las micorrizas también están involucradas en otros mecanismos que podrían mejorar el estado hídrico de la planta como la adquisición facilitada de nutrientes (Guehl y Garbaye, 1990; Lehto y Zwiazek, 2011), una regulación estomática que permite a su vez mayor fijación de C (Davies et al., 1996) y la mejora de las propiedades hídricas del suelo (Allen, 2007).

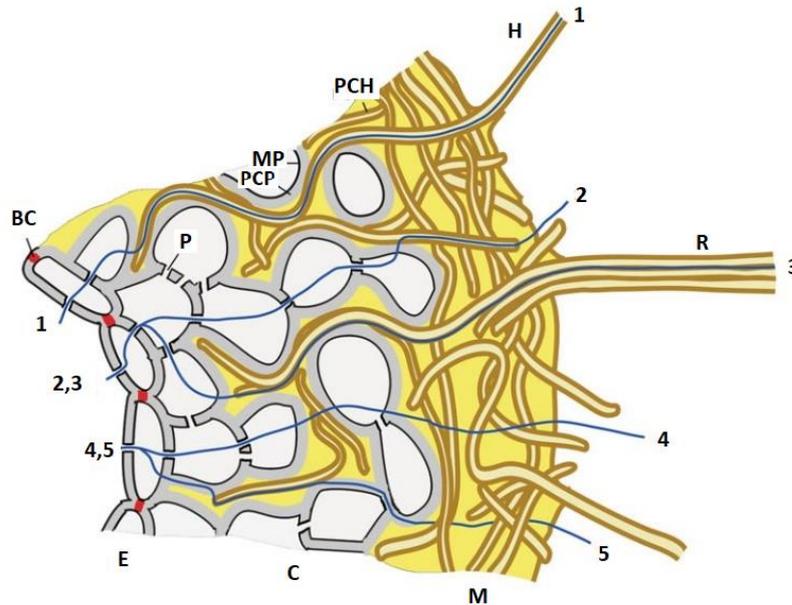


Figura 1.2. Diagrama de las posibles vías de absorción de agua en una raíz ectomicorrícica de una Gimnosperma. El agua ingresa a través de: (1) una hifa extra radical, (2) una hifa del manto y luego ingresa a las células de la raíz a través del apoplasto (matriz extracelular), (3) un rizomorfo y se transporta a través del apoplasto del hongo y de la planta, (4) las membranas de las células fúngicas y radicales (5) la matriz extracelular y las bandas de Caspary la fuerzan a ingresar al interior de la célula. PCH: pared celular del hongo, PCP: pared celular de la planta, MP: membrana plasmática, P: plasmodesmos, BC: banda de Caspary, E: endodermis, C: corteza y área de la red de Hartig, M: manto, R: rizomorfo, H: hifa. Diagrama modificado de Lehto y Zwiazek (2011).

La capacidad de los hongos micorrícicos para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de la planta puede depender de las condiciones de humedad del suelo y de las especies de plantas y hongos involucradas (Allen, 2007; Kennedy y Peay, 2007; Lehto y Zwiazek, 2011; Kivlin et al., 2013; Mohan et al., 2014). En las revisiones y meta-análisis realizados en el tema

¹ Plántula: f. Bot. Planta joven, al poco tiempo de brotar de la semilla. Definición tomada del diccionario de la Real Academia Española. Este trabajo se remite a la definición presentada para designar como estadio de plántula a plantas jóvenes durante su primer año de crecimiento. Esta definición puede diferir de la encontrada en diccionarios botánicos.

(Kivlin et al., 2013, Mohan et al., 2014), se ha encontrado que la sequía impuesta experimentalmente disminuye el crecimiento, la productividad y la supervivencia en plantas simbiotes, pero la inoculación con hongos micorrícicos contrarresta este efecto negativo. Sin embargo, la bibliografía disponible no es concluyente en este aspecto. En otros trabajos, los efectos de la colonización por hongos micorrícicos en condiciones de estrés hídrico fueron nulos (Bogeat-Triboulot et al., 2004; Kipfer et al., 2012) o incluso negativos para el crecimiento de la planta simbiote (Nardinia et al., 2000). En algunos casos, las ventajas que otorga la simbiosis en la adquisición de agua se hacen evidentes únicamente en situaciones de estrés hídrico (Allen, 2007; Kivlin et al., 2013; Mohan et al., 2014). Read y Boyd (1986) han sugerido que los beneficios hídricos de la colonización se manifiestan en plantas bajo condiciones de estrés, al igual que ocurre en la nutrición mineral. El aumento en la absorción de agua proporcionado por el micelio extra radical podría no manifestarse cuando el suelo se encuentra cercano a la saturación y todos los poros se encuentran llenos de agua, debido a que las raíces también tienen fácil acceso al agua. Sin embargo, cuando el suelo se seca y el agua es retenida en poros inaccesibles para las raíces, la absorción mediada por el hongo puede volverse más significativa para la supervivencia de la planta (Allen, 2007). Los resultados contrastantes en este tema sugieren que son necesarios estudios con diferentes especies de simbiotes y diferentes condiciones de humedad del suelo para explorar la capacidad de la simbiosis micorrícica en el alivio del estrés hídrico en diferentes contextos (Allen, 2007; Kivlin et al., 2013; Mohan et al., 2014).

El rol del estrés hídrico y las micorrizas en la co-invasión

La interacción con hongos micorrícicos que alivien el estrés hídrico en las plantas puede ser un factor decisivo en la invasión, especialmente en ecosistemas áridos. El reclutamiento de plántulas es uno de los filtros demográficos más importantes en especies leñosas (Higgins y Richardson, 1998). En pastizales y estepas semiáridos, el déficit hídrico es uno de los principales limitantes para el reclutamiento de plántulas (Wilson y Witkowski, 1998; Padilla y Pugnaire, 2007). En estos ecosistemas, la condición de déficit hídrico desfavorece el establecimiento de árboles y permite que la vegetación herbácea y arbustiva sea dominante (Rundel et al., 2014). En muchos casos, la invasión de árboles en ambientes áridos es resultado de cambios extrínsecos como alteraciones en el clima, en los regímenes de disturbios o en el uso del suelo, que generan nuevas condiciones que favorecen la invasión (Rundel et al., 2014). En contraparte, muchas plantas leñosas tienen rasgos intrínsecos de su ciclo biológico que le

permiten invadir y transformar estos ecosistemas (Rundel et al., 2014). En este aspecto, la asociación con hongos micorrícicos que aumenten el reclutamiento de plántulas aliviando el estrés hídrico podría ser un rasgo que facilite la invasión de estos ecosistemas.

Un caso ideal para ejemplificar y estudiar árboles micorrícicos invasores en ecosistemas sin árboles nativos es el de los pinos (i.e. especies del género *Pinus*, dentro de la familia Pinaceae) en el hemisferio sur (**Figura 1.3**). Introducidas con fines forestales, muchas especies de pinos han logrado invadir masivamente ecosistemas nativos provocando graves impactos ambientales (Richardson y Rejmánek, 2011; Nuñez et al., 2017; Paritsis et al., 2018). Los pinos son simbioses obligados de hongos EM, con los que co-invaden en el hemisferio sur, extendiéndose en Sudamérica, Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia (Richardson, 1998; Dickie et al., 2010; Richardson y Rejmánek, 2011; Nuñez et al., 2017). La familia Pinaceae es la familia de plantas leñosas más invasora, siendo *Pinus* el género con mayor número de especies reportadas como invasoras (Richardson y Rejmánek, 2011). Algunas consecuencias de la invasión por parte de estas especies forestales incluyen cambios en las características físicas, químicas y bióticas del suelo (Dickie et al., 2014), un mayor riesgo de daño extensivo por incendios (Paritsis et al., 2018) y pérdida de biodiversidad (Simberloff et al., 2010; Pauchard et al., 2016). Estos cambios en las propiedades ecosistémicas son particularmente problemáticos cuando se trata de estepas arbustivas o pastizales que carecen de árboles antes de la invasión (Rundel et al., 2014; Pauchard et al., 2016).



Figura 1.3. Fotografías de invasiones de pinos a partir de plantaciones en ecosistemas semiáridos de Mallín Verde (arriba) y Alicurá (abajo), en Neuquén, Argentina. Imágenes obtenidas de la página web Argentina Forestal (<https://www.argentinaforestal.com/>).

La presencia de simbiontes ectomicorrícicos compatibles condiciona el éxito de invasión de los pinos en su rango no-nativo (Richardson et al. 2000; Núñez et al. 2009; Dickie et al. 2010). A pesar de que las primeras plantaciones de pinos introducidos en el hemisferio sur no lograron prosperar debido a la falta de inóculo de hongos EM (Pringle et al., 2009), una vez que estos hongos fueron introducidos tanto los pinos como los hongos lograron invadir en forma masiva (Richardson et al., 2000; Vellinga et al., 2009). Actualmente, las plantaciones forestales en la estepa patagónica son una fuente de inóculo fúngico para las plantas jóvenes, generando frentes de invasión a partir de las mismas (i.e. área borde de una plantación caracterizada por una alta densidad de pinos que decrece rápidamente a medida que la distancia a la plantación aumenta; Langdon et al., 2010). En los bordes de estas plantaciones, se encontró

que la densidad de esporas decrece linealmente llegando hasta los 1000 m desde la plantación (Salgado Salomón et al., 2011; Hayward et al., 2015b), en lugar de decaer abruptamente como ocurre, por ejemplo, en bosques de Fagáceas (Dickie et al., 2012).

Un subconjunto de hongos EM simbioses de pino tienen un rol clave en facilitar la invasión (Dickie et al., 2010; Nuñez y Dickie, 2014; Policelli et al., 2019). Los hongos pertenecientes al clado filogenético Suilloide (Bruns et al., 1998; Nguyen et al., 2016) y específicamente los géneros *Suillus* y *Rhizopogon* (denominados de aquí en adelante “hongos suilloides”, **Figura 1.4**), tienen la capacidad de dispersarse a largas distancias a través del viento y animales micófagos (Ashkannejhad y Horton, 2006; Nuñez et al., 2013) y suelen dominar en raíces de pinos en sitios lejanos a la fuente de inóculo (Hayward et al., 2015a). En el caso de *Rhizopogon*, se determinó que domina en el banco de esporas, por tener esporas longevas y resistentes (Bruns et al., 2009). Además, se encuentra tanto en frentes de invasión como en plantaciones maduras y sitios con diferentes grados de disturbio (e.g. sitios post-fuego; Rincón et al., 2014; Glassman et al., 2016). Estos hongos son capaces de colonizar nuevos hospedadores y facilitar su invasión incluso en ausencia de otras especies de hongos EM simbioses (Hayward et al., 2015b; Policelli et al., 2019). Sin embargo, hasta el momento la evidencia indica que estas especies de hongos EM no serían buenas simbioses para el pino, invirtiendo más en su dispersión (e.g. cuerpos fructíferos) que en recursos para su planta simbiote (Kennedy et al., 2007; Nuñez et al., 2009; Kennedy et al., 2011; Smith et al., 2018; Nuske et al., 2021).

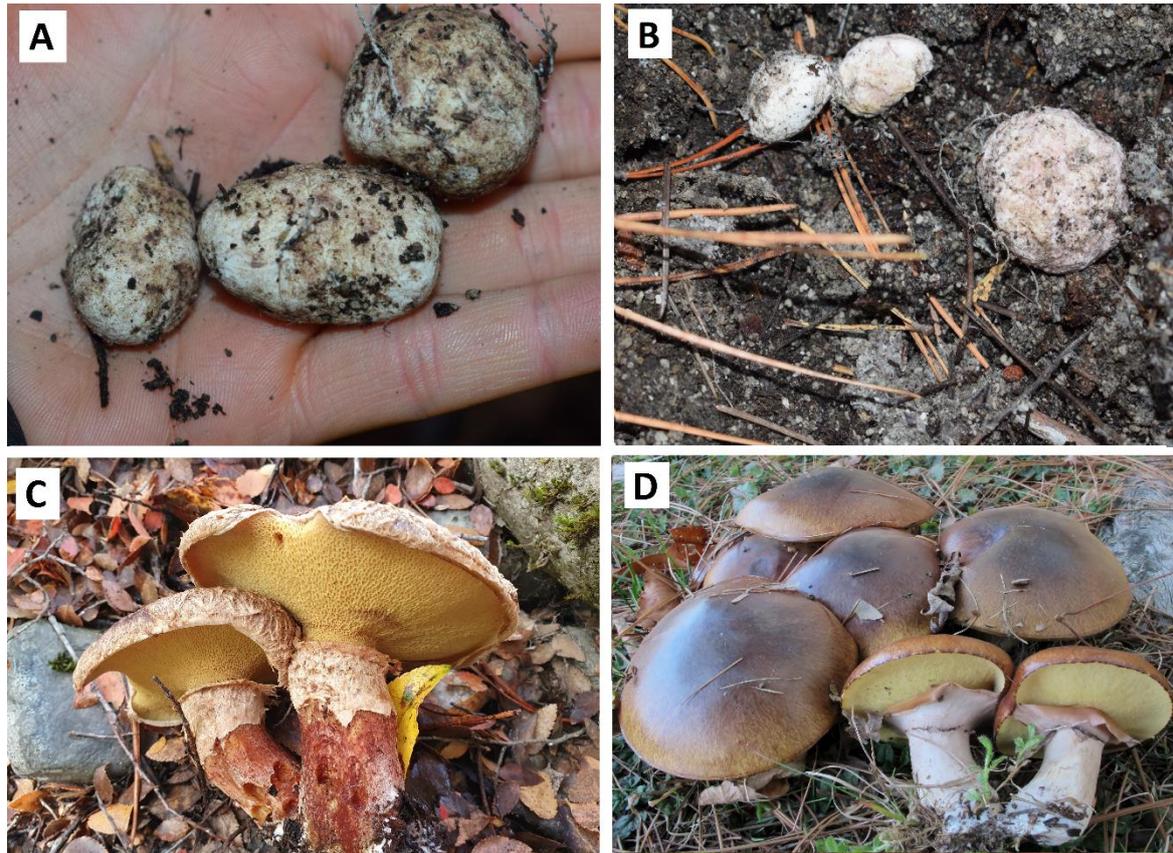


Figura 1.4. Fotografías de hongos suilloides en sitios de invasión de pinos en Patagonia Norte. **A-B)** Esporocarpos hipogeos de *Rhizopogon* sp. en plantaciones forestales de Isla Victoria, Parque Nacional Nahuel Huapi. **C)** Esporocarpos de *Suillus lakei* fotografiados en el Valle del Rio Manso inferior, Rio Negro. **D)** Esporocarpos de *S. luteus*, imagen tomada de Wikimedia Commons (<https://commons.wikimedia.org/>) libre de derechos de autor.

Las especies de hongos EM difieren en su capacidad de promover el crecimiento de su planta simbiote (Burgess et al., 1994). Por un lado, esto puede relacionarse con su capacidad de colonizar la raíz de la planta simbiote y con el desarrollo del micelio extra radical en el suelo (Colpaert et al., 1992; Thomson et al., 1994). Por otro lado, las especies de hongos EM pueden diferir en sus características ecológicas. Por ejemplo, del subconjunto de hongos EM que se asocian a pinos en el rango invadido, algunas especies de hongos EM han sido reconocidas como especies de sucesión temprana y otras como especies de sucesión tardía (Ishida et al., 2008; Hayward et al., 2015a). Las especies de sucesión temprana, como los suilloides, suelen encontrarse en frentes de invasión y se asocian a una serie de rasgos ecológicos como la alta capacidad de dispersión, alta tasa de germinación de sus esporas y gran capacidad de colonización de raíces (Agerer, 2001; Ishida et al., 2008; Bruns et al., 2009;

Policelli et al., 2019). En contraparte, las especies de sucesión tardía, suelen colonizar las raíces de sus plantas simbiotas a partir de redes miceliales y tienen bajas tasas de germinación de esporas (Ishida et al., 2008). Algunos ejemplos de géneros que pertenecen a este grupo son: *Boletus*, *Russula* y *Lactarius*. Estos últimos, debido a su escasa inversión de recursos en estructuras de reproducción podrían otorgar un mayor beneficio a la planta en términos de crecimiento (Kennedy et al., 2007; Kennedy et al., 2011; Moeller y Peay, 2016; Smith et al., 2018). Muchos trabajos estudian el efecto de los hongos EM a partir de la comparación entre plántulas inoculadas vs. no inoculadas (Lehto y Zwiazek, 2011; e.g. Parke et al., 1983; Nuñez et al., 2009). Sin embargo, la evidencia presentada sugiere que diferentes especies de hongos EM pueden tener efectos muy distintos en la planta simbiota, por lo que son necesarios estudios con un mayor número de especies para evaluar la importancia de este efecto más apropiadamente (Lehto y Zwiazek, 2011; Gehring et al., 2017).

Los hongos EM tienen un gran potencial como bioinoculantes en futuras plantaciones sustentables. La nula o escasa micorrización es un problema conocido en la producción forestal por generar plantines deficientes en nutrientes y con mal desarrollo (Trappe y Strand, 1969) y/o grandes pérdidas al momento del trasplante, sobre todo en áreas sin árboles o de condiciones adversas (Marx, 1980). En cambio, las plantas micorrizadas están mejor preparadas para explorar el suelo y tienen mayor probabilidad de supervivencia y crecimiento en las plantaciones (Kropp y Langlois, 1990). En Patagonia, la escasa a nula micorrización de pinos tanto en viveros como en plantaciones forestales iniciales y el uso de fertilizantes químicos para lograr niveles de producción rentables resalta la necesidad de programas de inoculación regulares que permitan un mejor rendimiento forestal (Barroetaveña y Rajchenberg, 2005; Nuñez et al., 2017). Por otro lado, la creciente aridez es uno de los principales limitantes en el prendimiento de plantines y el crecimiento inicial en plantaciones (Andenmatten y Letourneau, 2008). En este sentido, la capacidad de los hongos EM para aliviar el estrés hídrico y promover el crecimiento puede resultar en una herramienta biotecnológica crucial para el éxito de plantaciones en sitios áridos.

La forestación masiva con estas especies en Argentina y la creciente invasión de pinos requiere del desarrollo de estrategias que contribuyan a mejorar el rendimiento de estas plantaciones y no la invasión. A partir de la evaluación del efecto que tiene la asociación con diferentes especies de hongos EM en el crecimiento y la tolerancia a la sequía de plantas de pino, este trabajo pretende responder preguntas tanto en el campo aplicado como teórico de la ecología de invasiones. En primer lugar, se propone evaluar qué especies y qué condiciones

promueven un mayor crecimiento en pinos. Además, el trabajo contribuye a evaluar bajo qué circunstancias la interacción de pinos con sus hongos EM favorece la invasión, haciendo énfasis en las predicciones de aumento de aridez debido al cambio climático (IPCC AR6, 2021). Específicamente, se propone evaluar si los hongos suilloides contribuyen a la invasión de pinos bajo diferentes condiciones de humedad del suelo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto de la asociación con distintas especies de hongos EM en el crecimiento y la tolerancia al estrés hídrico de la especie no nativa invasora *Pinus ponderosa* Douglas ex C. Lawson (1836), la cual es la especie forestal más plantada en Patagonia.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de tres especies de hongos EM, *Boletus edulis* Bullard (1782), una especie del género *Rhizopogon* Fries y Nordholm (1817) y *Suillus luteus* (L.) Roussel (1796), de promover el crecimiento de *P. ponderosa* bajo riego normal vs. condiciones simuladas de sequía.
- Determinar la capacidad de tres especies de hongos EM (*Boletus edulis*, *Rhizopogon* sp. y *Suillus luteus*) de aumentar la supervivencia de *P. ponderosa* en condiciones de sequía.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

HIPÓTESIS 1: Diferentes especies de hongos EM difieren en su capacidad de aumentar la tolerancia a la sequía de la plántula simbiote.

PREDICCIÓN 1: Se espera que plántulas de *P. ponderosa* inoculadas y sometidas a un régimen de sequía presenten una supervivencia diferente de acuerdo con la especie de hongo EM inoculada.

HIPÓTESIS 2: Diferentes especies de hongos EM difieren en su capacidad de aumentar el crecimiento de la plántula simbiote y esta capacidad, a su vez, cambia según las condiciones de humedad del suelo.

PREDICCIÓN 2: Se espera que el efecto en el crecimiento (en términos de biomasa) de plántulas de *P. ponderosa* otorgado por la asociación con diferentes especies de hongos EM difiera entre especies inoculadas y, a su vez, sea diferente en condiciones de sequía que en condiciones de riego frecuente.

METODOLOGÍA

Elección de especies de estudio

La especie leñosa utilizada en este trabajo de tesis fue *Pinus ponderosa* (**Figura 2.1**), una de las especies forestales más extendidas en Argentina y particularmente en la Patagonia, conformando el 90 % de la superficie de forestaciones en Argentina (CIEFAP, 2017). El área de distribución natural de *P. ponderosa* se extiende desde Canadá hasta México, desde los 51° 30' hasta los 23° 30' de latitud norte (Steinauer y Bragg, 1987). Se desarrolla en un rango altitudinal que va desde el nivel del mar hasta los 3000 m s.n.m., con temperaturas medias de entre 5 °C y 10 °C y extremos anuales que varían entre -40 °C y 43 °C. En su rango natural de distribución, las precipitaciones, en forma de lluvia o nieve, llegan a los 1.700 mm anuales en la zona oeste, mientras que en el este son mucho menores, incluso en algunos casos cercanas a los 300 mm anuales. *Pinus ponderosa* se introdujo en la Patagonia Argentina en el comienzo del siglo XX, y las primeras plantaciones para la producción de madera se establecieron en la década de los 70. Se considera una especie invasora en Patagonia (Dezzotti et al., 2009), aunque con una baja tasa de reclutamiento en comparación a otras especies de Pináceas (Sarasola et al., 2006), estando su invasión limitada por la predación de sus semillas por parte de roedores generalistas (Moyano et al., 2019). Debido a que este trabajo se enmarca en el proyecto PICT-Start up 0329 de la convocatoria 2018 denominado “Desarrollo de un bioinoculante forestal: mayor productividad y menor daño ambiental para futuras plantaciones”, en el cual se evalúan especies de hongos EM con potencial como bioinoculantes forestales, esta especie leñosa se consideró la más apropiada para evaluar las hipótesis planteadas.



Figura 2.1. Plantación de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina, donde es la principal especie forestal (Fotografía: Patagonia Andina Forestal)

Como representantes del grupo de los suilloides que se asocian a *P. ponderosa* se utilizaron las especies *Suillus luteus* y *Rhizopogon* sp. (esta última fue identificada a nivel de género y utilizando basidiomas de un único punto de recolección para asegurar que se trate de una sola especie, ver pág. 21). *Rhizopogon* es un género de hongos basidiomicetes. Su rango nativo es Norte América y Europa, coincidiendo con sus hospedadores de la familia Pinaceae, particularmente el género *Pinus*, con los cuales tienen una simbiosis altamente específica. Sin embargo, se ha encontrado junto a pinos simbiosites en todos los continentes excepto Antártida. Sus esporocarpos son hipogeos, con un peridio simple o doble envolviendo una gleba loculada de columela ausente (Molina et al., 1999). *Suillus* es un género cercano a *Rhizopogon*. Son simbiosites altamente específicos de coníferas, su distribución se ubica en los bosques de coníferas de Norte América, Europa y Asia (Nguyen et al., 2016). En *S. luteus*, el píleo es viscido y de colores marrones. Los esporocarpos de *S. luteus* tienen forma de sombrero y tienen una distintiva forma cónica que se va aplanando en la maduración. Como la mayoría de los Boletales, posee un himenóforo tubular bajo el píleo de color amarillo y cubierto por un velo parcial cuando joven. El estípite es grueso y de colores blancos o pálidos, portando un anillo a la madurez formado por el velo parcial. La esporada es ocre o color arcilla con esporas elongadas a elípticas (Dahlberg y Finlay, 1999). Los pinos y los hongos suilloides representan un modelo de co-invasión con gran potencial para responder nuevas preguntas ecológicas (Policelli et al., 2019; Hoeksema et al., 2020). Las mismas características de los suilloides que facilitan la invasión de sus hospedadores, los convierte en especies de sencilla manipulación

para la experimentación. Además, el género *Rhizopogon* presenta rizomorfos, los cuales podrían tener un rol importante en la absorción de agua y en el aumento de la tolerancia a la sequía (Molina et al., 1999). En este sentido, es interesante la posibilidad de usar estas especies para inocular plántulas de pino y evaluar el impacto de diferentes condiciones controladas (Hayward et al., 2015b; Policelli et al., 2019).

También se utilizó como inóculo *Boletus edulis* (**Figura 2.2**), una especie emparentada a los hongos suilloides, perteneciente al orden Boletales (Nguyen et al. 2016). A diferencia de los anteriores, esta especie de hongo EM es considerada no invasora (Vlk et al., 2020). *Boletus edulis* tiene un alto valor gastronómico y su comercialización depende de la recolección en bosques naturales. Debido a su valor gastronómico que podría agregar valor económico a las plantaciones y a su bajo potencial invasor que no favorecería la invasión de pinos, esta especie tiene un gran potencial como bioinoculante forestal. Su distribución natural es en Europa, Norteamérica y Asia, donde se desarrolla en un amplio rango de hábitats (Hall et al., 1998). Se encuentra también en Nueva Zelanda, donde ha sido introducido en forma accidental. Ha sido escasamente reportado en Patagonia (e.g. Isla Victoria, Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina, ubicado a 50-750 m de plantaciones de pináceas antiguas; Hayward et al., 2015a). Se encuentra asociado a bosques maduros de Fagáceas, Pináceas y Betuláceas. En esta especie, el píleo es hemisférico cuando joven y convexo a la madurez, con aspecto finamente tomentoso. Sus colores varían del marrón claro cuando joven al marrón oscuro cuando maduro. Su carne es gruesa y firme cuando joven, de color blanco. Posee himenóforo tubular de color crema o blanco. El estípite es blanco, grueso en su base y angosto en la parte superior (Hall et al., 1998).



Figura 2.2. Fotografías de *Boletus edulis*. Izquierda: esporocarpo en un bosque cercano a Rambouillet, Francia (imagen libre de copyright tomada de la web). Derecha: esporocarpos secos sellados al vacío (Golden Tea Leaf Co, Origen: Canadá) utilizados en este trabajo para la elaboración de inóculos de esporas.

Obtención de basidiomas de hongos EM

Los basidiomas de *S. luteus* y *Rhizopogon* sp. se recolectaron a campo en sitios de plantaciones y de invasión de pinos en los alrededores de San Carlos de Bariloche y dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi (**Tabla 2.1**). Los basidiomas maduros se retiraron completos del sustrato excavando para no dañar su base. Se recolectaron en bolsas de papel basidiomas correspondientes a diferentes individuos de cada especie. Los sitios de recolección se encontraron separados entre sí por distancias mayores a 30 m. En cada caso se registró la fecha y sitio de recolección, especie, individuo, especie/s de Pináceas asociadas, características del sitio (invasión o plantación) y, en caso de ser necesario, se adjuntaron descripciones y observaciones adicionales (Gamundi y Horak, 1993). Luego de la recolección, los basidiomas fueron identificados utilizando guías de campo de hongos de la Patagonia (Gamundi y Horak, 1993; Furci, 2019) para confirmar que se trate de las especies mencionadas. En el caso de *Rhizopogon* sp., identificado a nivel de género debido a la dificultad en su identificación morfológica a nivel de especie, se utilizaron basidiomas de una única población correspondiente al sitio de recolección en Isla Victoria para disminuir las chances de inoculación con más de una especie del mismo género. Posteriormente, los basidiomas se limpiaron quitando el material adherido a los mismos (e.g. hojarasca, fragmentos de sustrato, etc.) y el estípite en el caso de *S. luteus*, y se deshidrataron a temperatura constante (40 °C). Para evitar la contaminación cruzada de esporas, se mantuvieron las muestras previamente identificadas separadas entre sí durante el secado. A su vez, las bandejas de secado se lavaron previamente con esponja y detergente y luego se rociaron con etanol 70 %. Los basidiomas secos se guardaron en bolsas de papel individuales junto a su identificación hasta el momento de su uso. Los basidiomas de *B. edulis* fueron adquiridos comercialmente, ya que no se lograron recolectar en el campo (**Figura 2.1**; Material seco sellado al vacío, Marca: Golden Tea Leaf Co., Origen: Canadá).

Tabla 2.1. Sitios de recolección de basidiomas para inóculos de esporas.

Sitio de Recolección	Coordenadas	Fecha	Especies halladas
Isla Victoria (Sector central)	40°57'53'' S; 71°31'26'' O	15-6-2019	<i>Rhizopogon sp.</i>
Colonia Suiza (Inicio de picada a Laguna Negra)	41°5'52'' S; 71°31'7'' O	5-6-2019	<i>Suillus luteus</i>
Valle del Rio Manso inferior	41°35'59'' S; 71°44'54'' O	17-5-2020	<i>Suillus luteus</i>

Elaboración de inóculos de esporas de hongos EM

Los inóculos se elaboraron en forma de suspensión de esporas en agua aplicando la técnica de *slurry* (Molina et al., 1999; Repác et al., 2011). Para el inóculo de *S. luteus* y *Rhizopogon sp.* se utilizaron los esporocarpos recolectados en otoño de 2019 en Colonia Suiza e Isla Victoria, respectivamente (**Tabla 2.1**). Los basidiomas secos de cada especie fueron macerados por separado durante 12 hs en agua destilada para la obtención de esporas. Posteriormente, el macerado se filtró utilizando una gaza doble. La suspensión obtenida de cada especie fue diluida con agua destilada a 1 L de volumen final (Quiroz et al., 2009; Repác et al., 2011).

Para asegurar la inoculación de una misma concentración de esporas de cada especie se realizó el conteo de las mismas en cámara de Neubauer (hemocitómetro), bajo microscopio óptico (Olympus BX51). Para el conteo se limpió previamente la cámara de Neubauer con etanol 70 % y se colocó el cobertor de vidrio sobre la cámara central. Las diluciones se colocaron en la cámara hasta llenar el volumen de la misma (aproximadamente 1 mL). Para el conteo sobre la grilla se utilizó un objetivo 10X y se consideraron solamente los cuadrantes de las esquinas externas (**Figura 2.3**). En caso de que las esporas se encontrasen tocando los bordes del cuadrante, se contaron únicamente aquellas ubicadas en el margen inferior y el margen izquierdo (Giri, 2020).

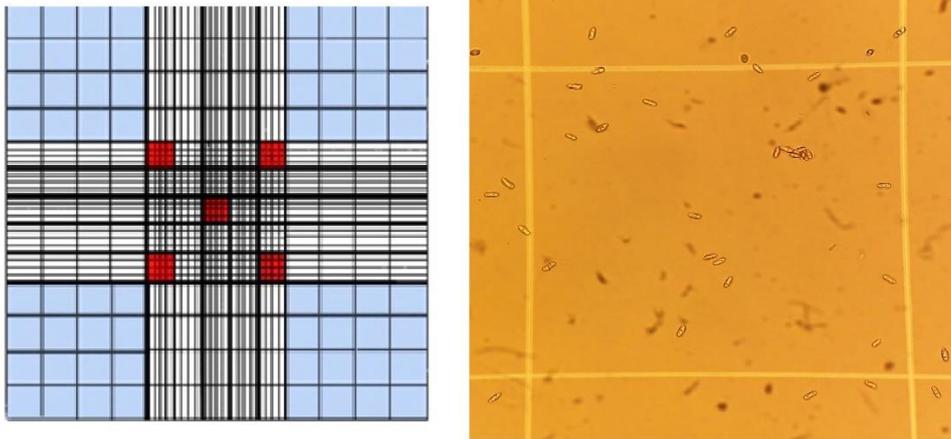


Figura 2.3. Esquema de la grilla de la cámara de Neubauer. Izquierda: los cuadrantes pintados de azul corresponden a los utilizados para el conteo de esporas (imagen tomada y modificada de Giri, 2020). Derecha: detalle en microscopio (100X) del cuadrante de menor tamaño de la cámara de Neubauer con esporas de *Suillus luteus* (derecha).

Luego se calculó la **concentración de esporas** para cada uno de los *slurries* utilizando la siguiente fórmula (Giri, 2020):

$$\text{ESPORAS}/\mu\text{L} = \text{N}^{\circ} \text{ esporas contadas} / \text{Superficie de conteo (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad de cámara (mm)}$$

Se realizaron las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de esporas similares para todas las especies. Se procuró obtener *slurries* con una concentración elevada de esporas para asegurar una inoculación eficaz. La dilución de esporas de *S. luteus* ($C_{\text{inicial}} = 2699 \text{ esp}/\mu\text{L}$; $C_{\text{final}} = 543,1 \text{ esp}/\mu\text{L}$) se llevó a la concentración del *slurry* de *B. edulis* ($C_{\text{inicial/final}} = 543,1 \text{ esp}/\mu\text{L}$) para que ambos inóculos tuvieran la misma concentración (Quiroz et al., 2009; Repác et al., 2011). El inóculo de *Rhizopogon* sp. tuvo una menor concentración de esporas ($C_{\text{inicial/final}} = 293,1 \text{ esp}/\mu\text{L}$) debido a que se encontraron escasos basidiomas durante la recolección y estos contenían pocas esporas. Esta diferencia de concentración se tuvo en cuenta posteriormente en la discusión de los resultados.

Obtención y preparación del sustrato

Se utilizó un sustrato estéril mezclando suelo y arena en proporción 1:2. El suelo utilizado fue recolectado en un sitio en la estepa patagónica, ubicado en cercanías de la ruta

nacional N° 23 (41°04'29'' S; 71°06'46'' O). El pinar más cercano a este sitio se encuentra a una distancia mayor a 2 km, por lo cual es poco probable la presencia de esporas de hongos EM de pino en alta densidad. Se realizó una mezcla manual con arena hasta obtener un sustrato homogéneo. Previamente a la esterilización, el sustrato se tamizó con un tamiz de 8 pulgadas previo a la esterilización. Las muestras de sustrato fueron pre-incubadas durante tres días a temperatura ambiente para estimular el crecimiento microbiano. Posteriormente, fueron esterilizadas por doble autoclavado, ambas veces a 0.10 MPa y 121 °C por 1 h y con una incubación intermedia de dos días a temperatura ambiente. Para asegurar que el calor alcance de forma homogénea todo el sustrato y que el proceso de esterilización sea efectivo, el autoclavado y la incubación se llevaron a cabo en bolsas dobles individuales de forma tal que el sustrato no alcance un espesor superior a los 5 cm (Parladé et al., 1996).

Diseño experimental y ensayo de crecimiento en cámara de cultivo

Se examinaron los efectos de la humedad del sustrato y la asociación con diferentes especies de hongos EM en el crecimiento y la supervivencia de *P. ponderosa* utilizando un diseño experimental factorial y completamente aleatorizado (**Figura 2.4**). El experimento consistió en la inoculación de plántulas de *P. ponderosa* con tres especies diferentes de hongos EM en forma individual; más un control con sustrato estéril inoculado con agua destilada. Los niveles del tratamiento de inóculo, nombrados según la especie de hongo EM inoculada, fueron: (1) *S. luteus*; (2) *Rhizopogon* sp.; (3) *B. edulis*; (4) Control con sustrato estéril (agua destilada). El tratamiento de inóculo fue cruzado con dos regímenes de riego diferentes: (1) Riego frecuente (de aquí en más “riego”), que consistió en un riego de 20 mL por plántula cada tres días; (2) Interrupción de riego (de aquí en más “sequía”), que consistió en la interrupción del riego a partir de los diez meses de iniciado el ensayo y hasta registrar la muerte de todas las plántulas. Cada combinación de tratamientos contó con un total de 18 réplicas (4 inóculos x 2 riegos x 18 réplicas = 144 plántulas totales).

Las semillas utilizadas en el ensayo fueron de la especie *P. ponderosa* variedad borravino, huerto semillero clonal INTA Bariloche, cosechadas en 2019, con 79 % viabilidad por tetrazolio. Estas semillas fueron esterilizadas en superficie sumergiéndolas en una dilución al 1% de hipoclorito de sodio en agua por 24 hs para evitar posibles contaminaciones a partir de propágulos fúngicos presentes sobre las mismas (Reddy y Natarajan, 1997). Se eliminaron semillas vanas por flotabilidad. Las semillas fueron estratificadas en frío durante 28 días a 3-5 °C (Varela y Arana, 2011). El sustrato estéril se colocó en tubetes individuales de 5 x 18 cm y

éstos fueron ubicados en cuatro bandejas de 36 tubetes cada una. Los tubetes fueron asignados de forma aleatoria a cada bandeja. En cada uno de los tubetes se colocó algodón y un vaso plástico adherido con cinta para cerrar su base. Los tubetes asignados a cada nivel del tratamiento fúngico fueron inoculados con su respectiva suspensión de esporas y el control con sustrato estéril fue inoculado con agua destilada ($n = 36$ para cada tratamiento de inóculo). Se homogeneizó la suspensión de esporas y la inoculación se realizó con jeringas de 10 mL para inocular 6 mL en cada tubete. Se distribuyó el volumen total inoculado en alícuotas de 2 mL hundiendo la jeringa a tres profundidades diferentes (5 cm, 10 cm y 15 cm) (Repác et al., 2011). Posteriormente a la inoculación, se colocaron cuatro semillas por tubete. En los casos en los que no se registró germinación, se realizó una resiembra luego de dos semanas. Luego del primer mes de crecimiento, se dejó sólo la plántula de mayor tamaño en cada tubete y se eliminó el resto cortando su tallo al nivel del suelo. De esta forma, se consideró a cada plántula contenida en un tubete como unidad experimental. El experimento se llevó a cabo en cámara de cultivo a temperatura controlada ($10\text{ }^{\circ}\text{C}$ mín. – $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ máx.) y un ciclo de luz oscuridad de 16:8 hs con una intensidad de luz de $200\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se rotó la posición y orientación de cada bandeja dentro de la cámara en cada riego para evitar posibles diferencias en el crecimiento de las plántulas por efectos de su ubicación con respecto a las fuentes de luz y reguladores de temperatura.

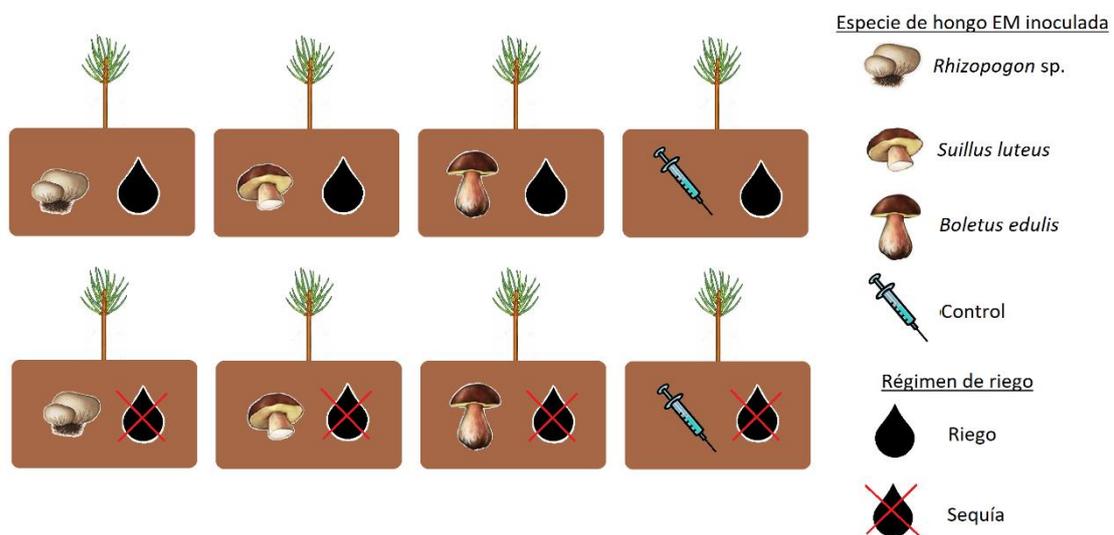


Figura 2.4. Esquema del diseño experimental factorial utilizado para el ensayo en cámara de cultivo. Se detallan los inóculos y regímenes de riego aplicados a las unidades experimentales.

Luego de cuatro meses se extrajeron dos ejemplares de cada nivel de inóculo para comprobar que la colonización de raíces haya sido efectiva y que el control sin inocular no estuviera micorrizado. Tras verificar ausencia de colonización en *B. edulis* y *S. luteus*, se realizó una re-inoculación repitiendo el procedimiento mencionado anteriormente y utilizando los esporocarpos comprados para *B. edulis* y los recolectados en el Valle del Rio Manso en otoño de 2020 para *S. luteus* (**Tabla 2.1**).

Desde la siembra de semillas se registraron diez meses y diez días de riego *ad libitum* para todas las plántulas (volumen aproximado: 20 mL, frecuencia: una vez cada tres días). Transcurrido este tiempo, se extrajeron nuevamente dos ejemplares por tipo de inóculo para comprobar que la colonización de raíces haya sido efectiva ($n = 32$ para cada tratamiento de inóculo). Al registrar colonización efectiva para todos los inóculos fúngicos, se suspendió el riego de la mitad de las plántulas de cada tipo de inóculo ($n=16$) hasta detectar la muerte de las mismas (Engelbrecht et al., 2007; O'Brien et al., 2014; Garcia-Forner et al., 2016). El ensayo de sequía tuvo una duración de 72 días, momento en el que se registró la muerte de la última plántula bajo régimen de sequía. El ensayo tuvo una duración total de 12 meses y 21 días, sumando 10 meses y 10 días de riego *ad libitum* y 72 días de ensayo de sequía.

La condición de cada plántula fue evaluada visualmente cada tres días. Para determinar precisamente cuándo una plántula se consideró muerta, se definieron estados de acuerdo al color y turgencia de las acículas (**Tabla 2.2**; Engelbrecht et al., 2007; Garcia-Forner et al., 2016). El *Estado 1* corresponde a una plántula sana con acículas verdes y turgentes y el *Estado 3* corresponde a una plántula considerada muerta, con la totalidad de sus acículas marrones (sin tejido verde). El *Estado 2* corresponde a una plántula con una porción de su follaje marchito y se incluye con el fin de diferenciarla de una plántula considerada muerta.

Tabla 2.2. Estados de marchitez de plántulas de pino designados para evaluar visualmente a las plántulas en el ensayo de sequía.

Categoría	Estado de marchitez	Caracterización visual	Fotografía ilustrativa
1	Normal (no marchita)	Acículas verdes. Sin signos de marchitez. Pueden presentar cotiledones secos.	
2	Marchita	Presenta una porción del follaje necrótico o clorótico.	
3	Muerta	Todas las acículas necróticas, sin turgencia y con color marrón o rojizo.	

Mediciones de variables respuesta

Luego de registrarse el tiempo transcurrido hasta la muerte del último individuo se cosecharon todas las plántulas. Éstas fueron extraídas del tubete junto al suelo circundante a las raíces. Se quitó cuidadosamente el suelo adherido a la raíz en forma manual, utilizando pincel y agua. Se midió en todas las plántulas: longitud de tallo (cm), longitud de raíz (cm) y porcentaje de micorrización (%) a fin de comparar entre los inóculos con hongos EM de diferentes especies y entre los distintos tratamientos de riego. Para determinar el porcentaje de micorrización (%) se examinó bajo lupa Bausch & Lomb 312684-119 el sistema radicular de cada plántula colocándolo extendido en una caja de Petri y se realizó un conteo de la cantidad de extremos distales colonizados y no colonizados de un total de 50 extremos distales, recorriendo fracciones de raíz seleccionadas de forma aleatoria. Se calculó el porcentaje de micorrización (%) dividiendo la cantidad de extremos distales colonizados por EM por el total de 50 contabilizados y multiplicando por 100. En esta instancia también se caracterizaron y fotografiaron los diferentes ectomorfortipos. Estos fueron caracterizados según su tipo de ramificación, la forma de sus extremos distales, color y presencia de rizomorfos (Agerer, 1991). La caracterización morfológica de ectomorfortipos se utilizó como una forma rápida y poco costosa de confirmación de la identificación de especies.

Luego, las plántulas fueron separadas en parte aérea (tallos y acículas) y radical (raíces) realizando el corte al nivel donde llegaba el suelo. Se guardaron las fracciones aérea y radical de las plántulas en sobres y se colocaron en horno de secado a 40 °C por 48 horas. Se pesó cada fracción antes y después del proceso de secado en una balanza electrónica de precisión de 0,1 mg, para obtener su biomasa seca y contenido de agua en tejidos (%). Finalmente, una fracción del sustrato de cada tubete también se pesó en la balanza electrónica de precisión y luego se secó a 40 °C hasta peso constante para poder estimar así el contenido de humedad del mismo (%). El porcentaje de agua en sustrato y tejidos se calculó como $[(\text{peso húmedo} - \text{peso seco}) * 100 / \text{peso húmedo}]$.

Análisis estadístico

Para analizar el desempeño de *P. ponderosa* en relación a los tratamientos de inóculo y riego, se utilizaron una serie de modelos estadísticos teniendo en cuenta un factor (inóculo) o dos factores (inóculo y riego). Las variables categóricas (factores) fueron el régimen de riego (riego vs. sequía) y la especie de hongo EM inoculada (*Rhizopogon* sp., *S. luteus*, *B. edulis* y control con sustrato estéril). Las variables respuesta fueron: porcentaje de micorrización (%), tiempo transcurrido hasta la muerte, longitud de tallo, longitud de raíz, biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical, relación de biomasa tallo/raíz, contenido de agua en sustrato (%), contenido de agua en biomasa aérea (%) y contenido de agua en raíz (%). En las variables respuesta de longitud y biomasa radical se utilizaron modelos de análisis de la varianza con distribución normal, verificando gráficamente el cumplimiento de la homocedasticidad (predichos vs. residuos estandarizados) y utilizando el test de Levene (Levene, 1960). También se verificó el cumplimiento de la normalidad a través del test de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). En el caso de la biomasa aérea, biomasa total y el contenido de agua de sustrato (%) y de la biomasa aérea, se obtuvieron varianzas desiguales entre niveles y se realizó un modelado de la varianza independiente utilizando una estimación de parámetros de mínimos cuadrados generalizados (GLS). Para el porcentaje de micorrización (%) se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) asumiendo una distribución binomial para la variable respuesta. En el caso del tiempo transcurrido hasta la muerte, se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución Gamma. En ambos casos se comprobó ausencia de sobre dispersión utilizando el paquete “blmeco” (Korner et al., 2015) y se obtuvieron las medias y resultados de los contrastes (Tukey) en la escala de la variable respuesta. Para los análisis GLM se utilizó el paquete “lme4” (Bates et al., 2015) y para GLS el paquete “nlme” (Pinheiro et al., 2021). En

el caso de encontrar diferencias significativas entre grupos (asumiendo $\alpha = 0,05$), se realizaron análisis Post Hoc utilizando test de Tukey HSD para evaluar diferencias entre las medias. Previo al análisis estadístico para todas las variables respuesta, se eliminaron las observaciones correspondientes a réplicas inoculadas sin colonización efectiva y a dos réplicas del control no inoculadas originalmente que presentaron indicios de colonización por hongos EM (**Tabla 3.2**). Todos los análisis fueron realizados en RStudio (R versión 4.1.0 2021-05-18 "Camp Pontanezen" Copyright (C) 2021) y considerados significativos a un valor de $P < 0,05$.

Resultados

Supervivencia (tiempo transcurrido hasta la muerte)

Las plántulas de *Pinus ponderosa* inoculadas con hongos suilloides (*Rhizopogon* sp. y *Suillus luteus*) presentaron mayor supervivencia a la sequía en comparación a las plántulas control (**Figura 3.1**; LR Chisq=14,82; $P < 0,001$; $df=3$), registrando en algunos casos una supervivencia máxima de 72 días. Las plántulas inoculadas con *Boletus edulis* no presentaron diferencias de supervivencia con el control ni con los otros inóculos.

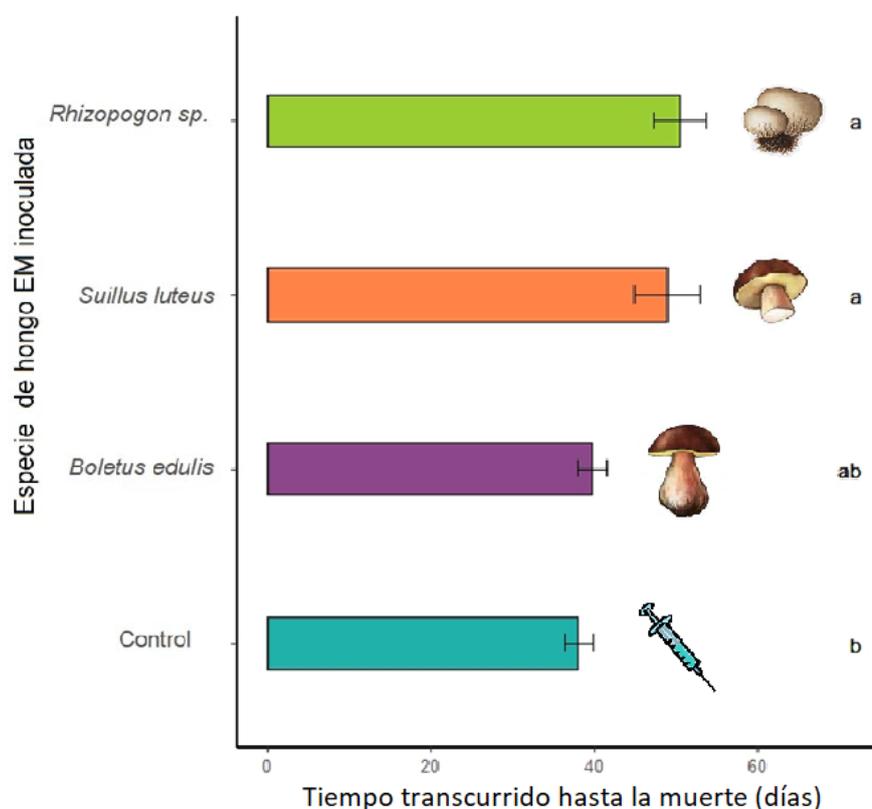


Figura 3.1. Efecto de la interrupción de riego en la supervivencia (medida como tiempo transcurrido hasta la muerte) de los ejemplares de *Pinus ponderosa* inoculados con diferentes especies de hongos EM. Diferentes colores corresponden a diferentes especies inoculadas y al control. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medias de los grupos.

Longitud

No hubo diferencias para la longitud de tallo (**Figura 3.2;** longitud tallo:inóculo $F=1,57$; $P>0,05$; $df=3$; riego $F=1,27$; $P>0,05$; $df=1$) ni para la longitud de raíz (**Figura 3.2;** longitud raíz: inóculo $F=0,87$; $P>0,05$; $df=3$; riego $F=0,93$; $P>0,05$; $df=1$) entre los diferentes inóculos o regímenes de riego.

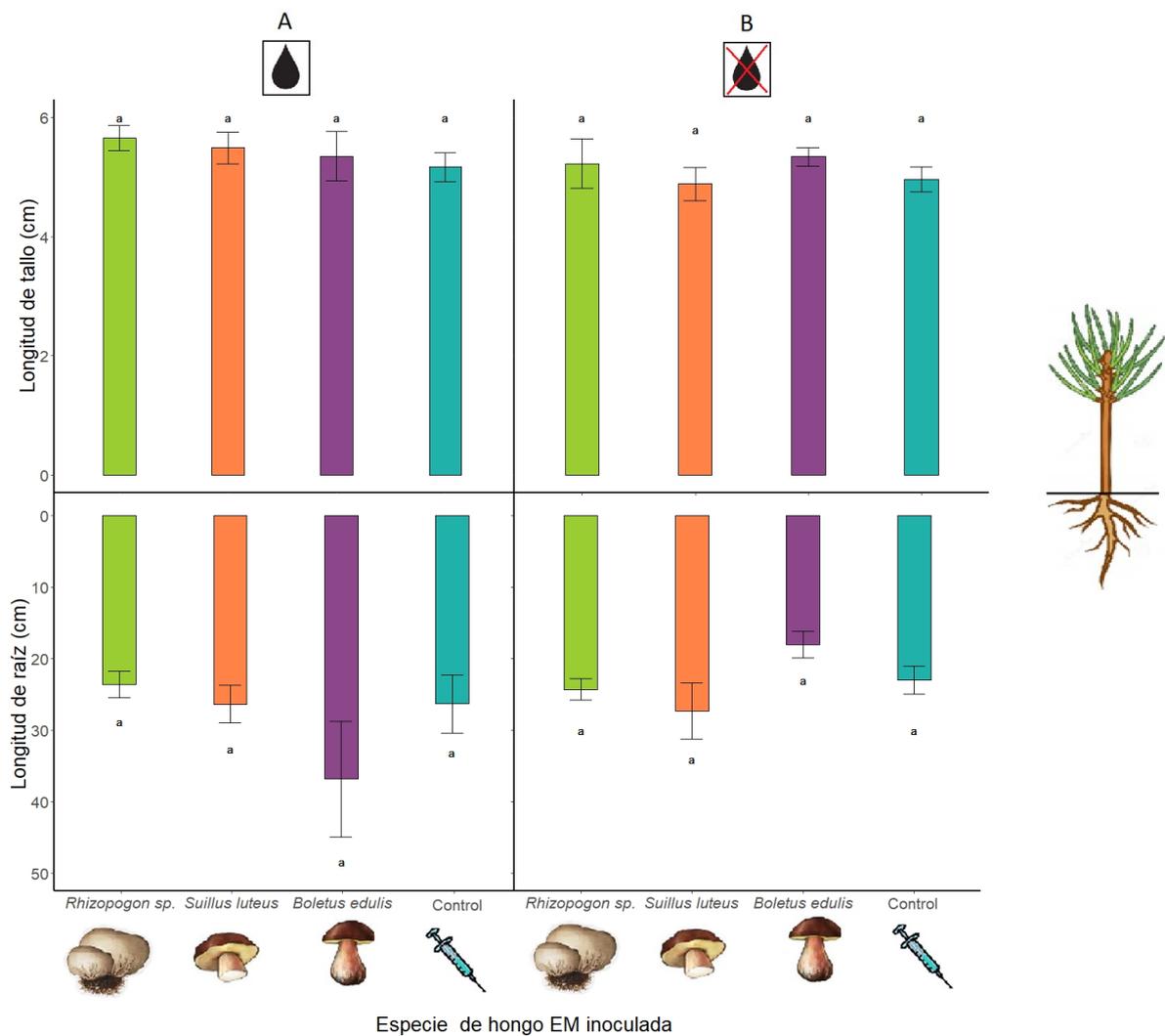


Figura 3.2. A-B. Efecto de diferentes inóculos de hongos EM y control en la longitud de *Pinus ponderosa*. **A)** Longitud de tallo (arriba) y de raíz (abajo) bajo riego. **B)** Longitud de tallo (arriba) y de raíz (abajo) en sequía. Diferentes colores corresponden a diferentes especies de hongos EM inoculadas y al control con

sustrato estéril. Se muestran las medias de los grupos \pm SE. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medias de los grupos para cada variable respuesta.

Biomasa

Bajo el régimen de riego, las plántulas inoculadas con hongos suilloides tuvieron una biomasa aérea mayor al control (**Figura 3.3.A**; interacción inóculo x régimen de riego $F= 5,33$; $P= 0,0019$; $df= 3$). Por su parte, la biomasa radical fue mayor en el régimen de riego que en el de sequía ($F=28,3$; $P<0,0001$; $df=1$), y fue superior al control sólo en las plántulas inoculadas con *Rhizopogon* sp. en el régimen de riego (TukeyHSD, $P=0,0038$). En contraste, bajo el régimen de sequía no se observaron diferencias de biomasa aérea o radical entre las plántulas inoculadas con diferentes especies de hongos EM y el control (**Figura 3.3.B**). La biomasa total también fue mayor respecto al control en el régimen de riego normal, pero únicamente para las plántulas inoculadas con *Rhizopogon* sp. (**Figura 3.4**; TukeyHSD, $P=0,0005$). La relación de biomasa tallo/raíz no presentó diferencias entre los diferentes inóculos (**Figura 3.5**; $F=1,70$; $P>0,05$; $df=3$) ni entre los regímenes de riego ($F=1,07$; $P>0,05$; $df=1$).

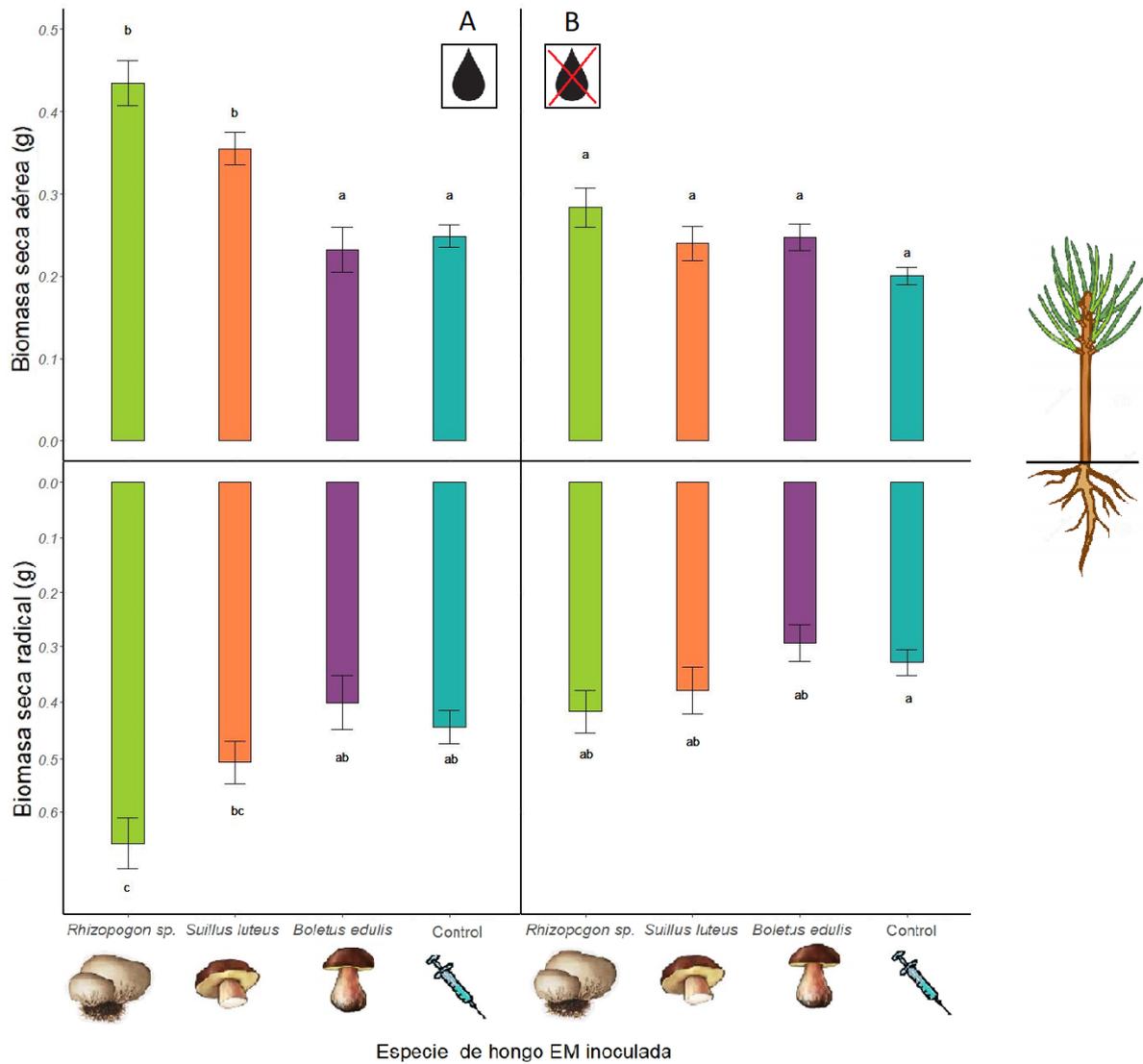


Figura 3.3.A-B. Efectos de diferentes inóculos de hongos EM y regímenes de riego sobre la biomasa de *Pinus ponderosa*. **A)** Biomasa aérea (arriba) y radical (abajo) bajo riego. **B)** Biomasa aérea (arriba) y radical (abajo) en sequía. Diferentes colores corresponden a diferentes especies de hongos EM inoculadas y al control con sustrato estéril. Se muestran las medias de los grupos \pm SE. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medias de los grupos para cada variable respuesta.

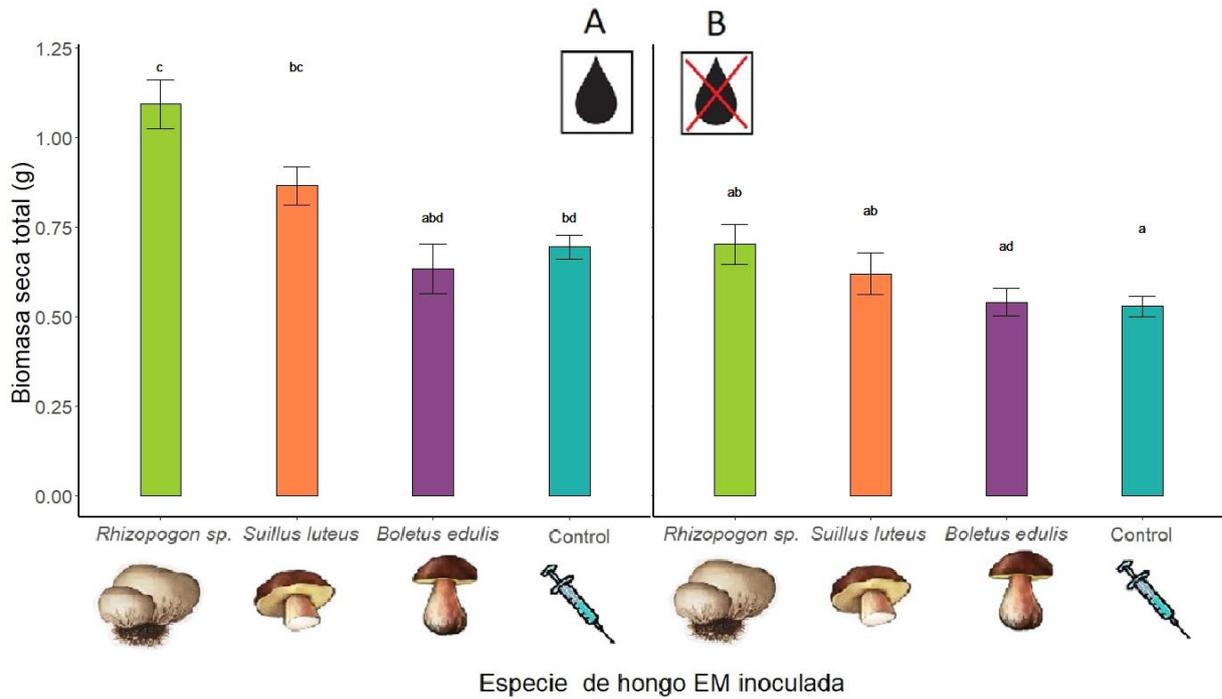


Figura 3.4.A-B. Efectos de diferentes inóculos de hongos EM y regímenes de riego sobre la biomasa de *Pinus ponderosa*. **A)** Biomasa total bajo riego. **B)** Biomasa total en sequía. Diferentes colores corresponden a diferentes especies de hongos EM inoculadas y al control con sustrato estéril. Se muestran las medias de los grupos \pm SE. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medias de los grupos para cada variable respuesta.

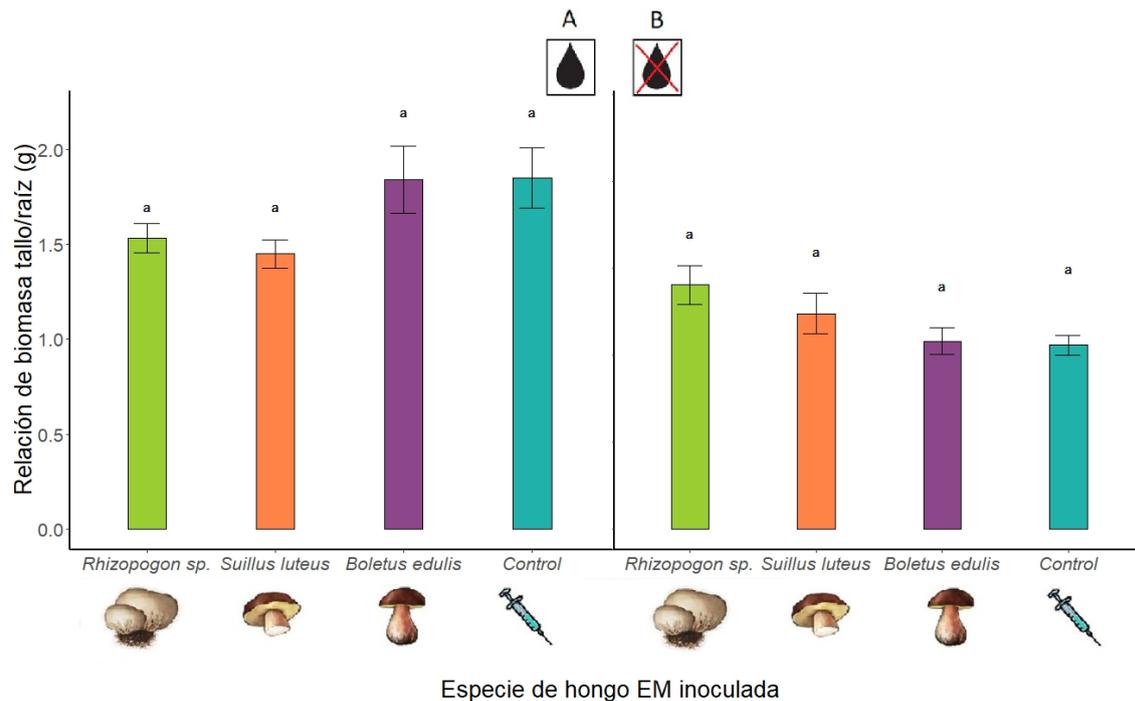


Figura 3.5.A-B. Efectos de diferentes inóculos de hongos EM y regímenes de riego sobre la relación de biomasa tallo/raíz de *Pinus ponderosa*. **A)** Relación de biomasa tallo/raíz bajo riego. **B)** Relación de biomasa tallo/raíz en sequía. Diferentes colores corresponden a diferentes especies de hongos EM inoculadas y al control con sustrato estéril. Se muestran las medias de los grupos \pm SE. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medias de los grupos para cada variable respuesta.

Contenido de agua (%)

Consistentemente con el tratamiento de riego aplicado, hubo mayor contenido de agua en los sustratos regados que en los que se interrumpió el riego ($F= 453,8$; $P < 0,0001$; $df=1$). El contenido de agua en la biomasa aérea y radical también fue mayor en las plántulas regadas frecuentemente respecto de las sujetas a sequía ($F=211,8$; $P < 2,2e^{-16}$; $df=1$ y $F=59,9$; $P < 0,0001$; $df=1$, respectivamente). En el régimen de riego frecuente, las plántulas inoculadas con hongos suilloides tuvieron mayor contenido de agua en sus tejidos aéreos que las plántulas control (**Tabla 3.1**; $F= 10,51$; $P < 0,0001$; $df= 3$).

Tabla 3.1. Efecto de los diferentes inóculos de hongos EM y regímenes de riego en el contenido de agua (%) en parte aérea, radical y sustrato.

Regímen de riego	Hongo EM inoculado	Contenido de agua (%)		
		Fracción aérea	Fracción radical	Sustrato
Riego	<i>Rhizopogon</i> sp.	53,21 ± (3,69) d	38,4 ± (2,35) bd	3,37 ± (0,20) b
	<i>Suillus luteus</i>	48,40 ± (3,13) cd	42,1 ± (2,41) b	3,99 ± (0,33) bc
	<i>Boletus edulis</i>	33,78 ± (3,45) bc	41,4 ± (3,09) b	5,08 ± (0,26) c
	Control	31,23 ± (2,70) b	39,9 ± (2,84) bc	4,54 ± (0,41) bc
Sequía	<i>Rhizopogon</i> sp.	9,65 ± (1,46) a	27,6 ± (2,84) ac	0,88 ± (0,05) a
	<i>Suillus. luteus</i>	8,64 ± (1,60) a	25,9 ± (2,96) ad	0,98 ± (0,08) a
	<i>Boletus edulis</i>	10,43 ± (1,48) a	23,4 ± (4,58) ac	0,93 ± (0,08) a
	Control	13,52 ± (2,54) a	27,9 ± (2,35) ad	1,78 ± (0,37) a

*Se muestran las medias de los grupos ± SE entre paréntesis. Diferentes letras indican diferencias significativas (P < 0,05) entre las medias de los grupos para cada variable respuesta.

Descripción de ectomorfitipos

Rhizopogon sp.: los ectomorfitipos observados coincidieron con los reportados en la bibliografía para este género (Agerer, 1987-1993, 2001; Molina et al., 1999). Presentaron ramificación dicotómica repetidas veces, agrupadas, formando sistemas coraloides densos. En muchos casos, los sistemas coraloides o ramificaciones dicotómicas individuales se encontraban rodeados por rizomorfos abundantes de color blanco. Los ectomorfitipos presentaron coloraciones marrones a amarillentas y blancas (**Figura 3.6.A**).

Suillus luteus: los ectomorfitipos observados coincidieron con los reportados en la bibliografía para esta especie (Agerer, 1987-1993, 2001; Dahlberg y Finlay, 1999). Se observaron ramificaciones dicotómicas o tuberculosas, raramente agrupadas formando sistemas pequeños. Los ectomorfitipos presentaron colores marrones claros y oscuros, con presencia de hifas extra radicales formando un manto blanco traslúcido sobre los extremos distales o sobre toda la ramificación. Los morfotipos presentaron rizomorfos finos de color blanco amarillento (**Figura 3.6.B**).

Boletus edulis: los ectomorfitipos observados coincidieron con el tipo boletoide marrón, reportado en la bibliografía para esta especie (Agerer, 1987-1993; Albarracín et al., 2013). Se presentaron en ramificaciones dicotómicas individuales o agrupadas en pocos casos.

Ectomorfitipos de color marrón oscuro, con marrones claros a naranjas o blanquecinos en extremos distales anchos y redondeados. Sin presencia de rizomorfos (**Figura 3.6.C**).

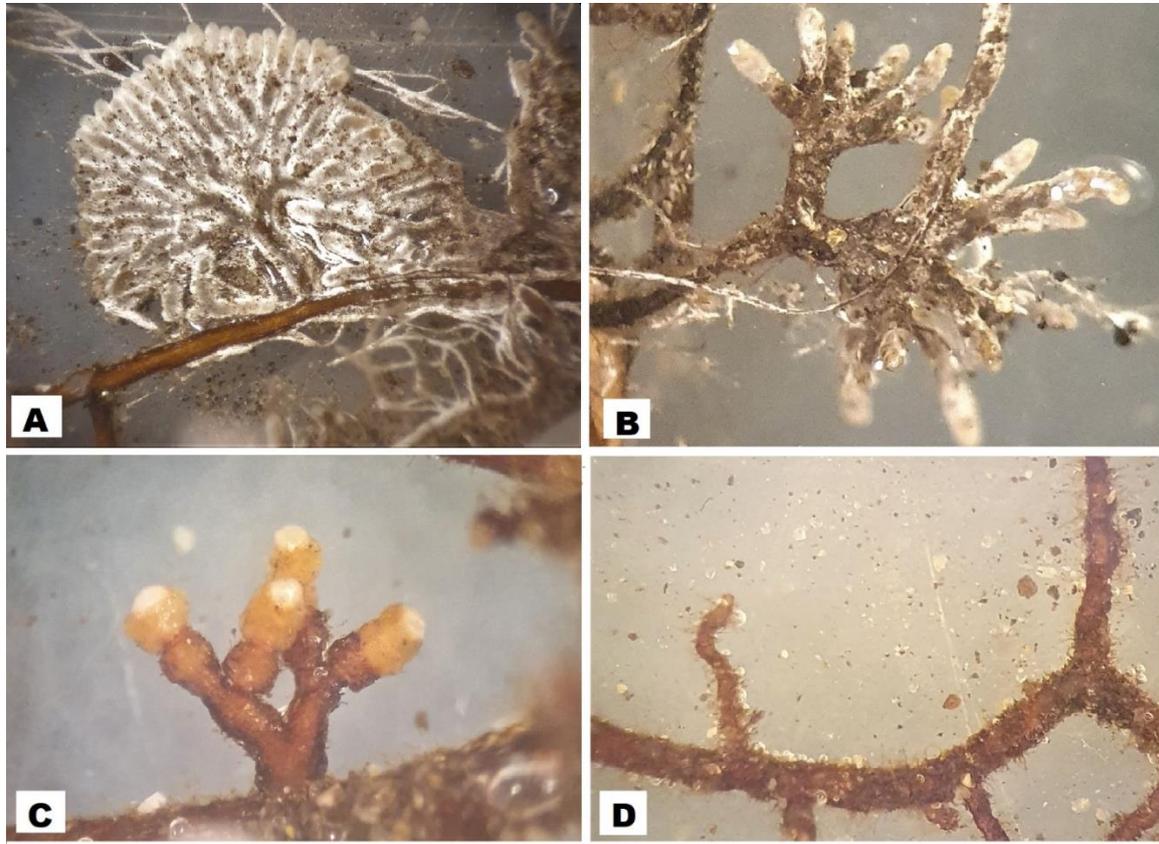


Figura 3.6.A-D. Extremo distal de raíces observados en lupa (20X), correspondientes a ejemplares de *Pinus ponderosa* inoculados con diferentes especies de hongos EM y el control. **A)** *Rhizopogon* sp., **B)** *Suillus luteus*, **C)** *Boletus edulis*, **D)** extremo distal sin colonizar.

Colonización efectiva y porcentaje de micorrización (%)

La inoculación fue efectiva para todas las especies de hongos EM utilizadas. El número de plántulas colonizadas fue mayor en los tratamientos inoculados con especies suilloides respecto de aquellos inoculados con *B. edulis* (**Tabla 3.2**). El control con sustrato estéril presentó indicios de colonización en sólo dos réplicas, con un porcentaje de micorrización (%) menor a 4% y morfitipos suilloides. No se observó contaminación cruzada entre las plántulas inoculadas con diferentes especies de hongos EM, ni ectomorfitipos correspondientes a especies no inoculadas. Como se mencionó anteriormente (sección Materiales y métodos), para el análisis de todas las variables respuesta consideradas en este estudio se tuvieron en cuenta

estos resultados de colonización, eliminando réplicas inoculadas sin colonización efectiva (11 para *B. edulis*, 4 para *S. luteus* y 1 para *Rhizopogon* sp. en tratamientos de sequía y 5 para *B. edulis* de tratamientos con riego normal) y réplicas con indicios de colonización en el control con sustrato estéril (sólo dos, una por cada tratamiento control) (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Los valores indican el número de plántulas colonizadas / *n* total en cada nivel de inóculo.

Régimen de riego	Hongo EM inoculado	n colonizadas / n total
Riego	<i>Rhizopogon</i> sp.	16/16
	<i>Suillus luteus</i>	16/16
	<i>Boletus edulis</i>	11/16
	Control	1/16
Sequía	<i>Rhizopogon</i> sp.	15/16
	<i>Suillus luteus</i>	12/16
	<i>Boletus edulis</i>	5/16
	Control	1/16

El porcentaje de micorrización (%) fue igual entre diferentes regímenes de riego (LR Chisq= 2,291; P = 0,13; df=3). Bajo riego, las plántulas inoculadas con hongos suilloides tuvieron mayor porcentaje de micorrización (%) que las inoculadas con *B. edulis* y las plántulas control (**Figura 3.7.A**; LR Chisq= 82,78; P < 2e⁻¹⁶ ;df=3). Bajo el régimen de sequía, las plántulas inoculadas con todas las especies de hongos EM tuvieron un porcentaje de micorrización (%) mayor al control (**Figura 3.7.B**; LR Chisq= 83,44; P < 2e⁻¹⁶ ;df=3). Los ectomorfotipos pudieron observarse de igual forma en ambos regímenes de riego, en algunos casos presentando un color oscuro y aspecto deshidratado en plántulas bajo sequía.

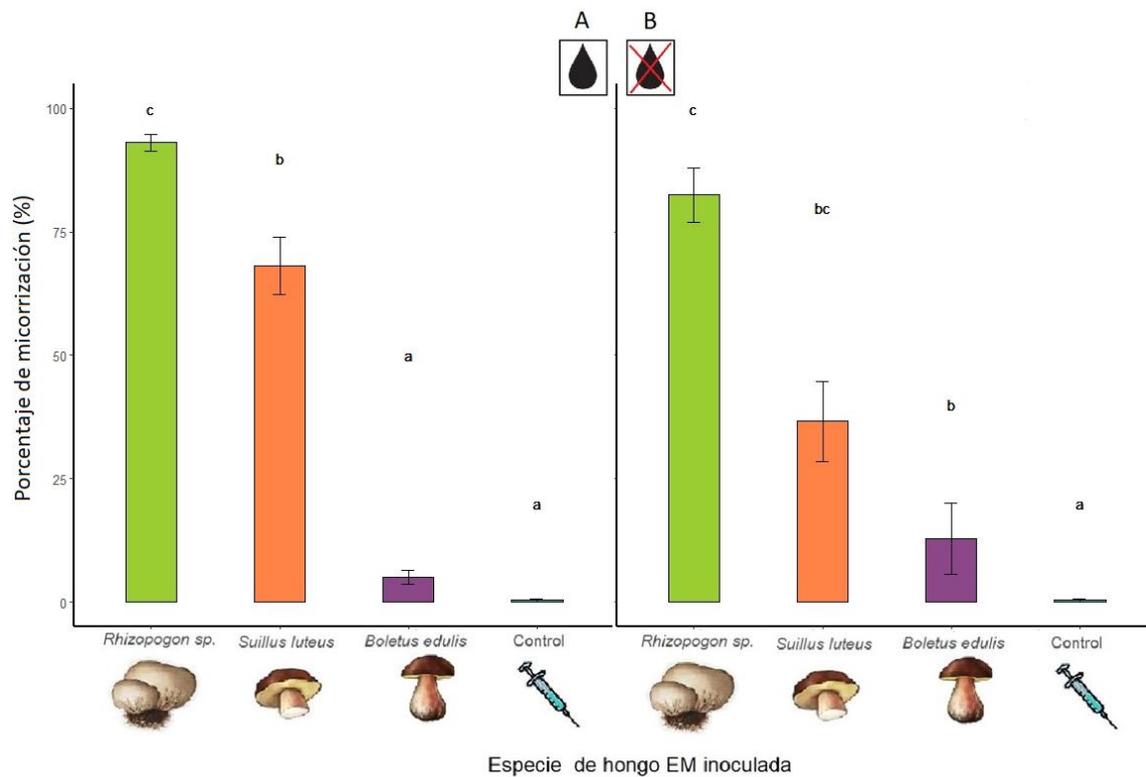


Figura 3.7. A) Porcentaje de micorrización (%) de cada especie de hongo EM inoculada y del control bajo riego, B) Porcentaje de micorrización (%) de cada especie de hongo EM inoculada y del control en sequía. Diferentes colores corresponden a diferentes especies de hongos EM inoculadas y al control con sustrato estéril. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medias de los grupos.

DISCUSIÓN

A partir de un experimento factorial en cámara de cultivo, en este trabajo se encontró que distintas especies de hongos EM tienen diferentes efectos en el crecimiento de plántulas de *Pinus ponderosa*, y que este efecto depende, a su vez, de las condiciones de humedad del sustrato. En este aspecto, se evidenció que la asociación con hongos suilloides aumenta el crecimiento de las plántulas inoculadas sólo en situaciones de alta disponibilidad de agua en el sustrato. Además, se observó que si bien estos hongos EM co-invasores no incrementan el crecimiento de las plántulas en condiciones de sequía, si aumentan su supervivencia. Estos resultados sugieren que los hongos suilloides son buenos promotores de la supervivencia de pinos en condiciones de sequía, pero su beneficio sobre el crecimiento estaría sujeto a un suficiente contenido de agua en el suelo.

Supervivencia y crecimiento bajo diferentes condiciones hídricas

En este trabajo se encontró que algunas especies de hongos EM promueven más la tolerancia a la sequía en plántulas de *P. ponderosa* que otras. Se observó, además, que los hongos suilloides (*Rhizopogon* sp. y *Suillus luteus*) aumentan la supervivencia de esta especie forestal en condiciones de estrés hídrico. Consistentemente, otros trabajos han demostrado un aumento en la tolerancia a la sequía en pinos otorgada por hongos suilloides (Li et al., 2021). Por ejemplo, la inoculación de *Suillus placidus* (Bonord.) Singer (1945) ha mostrado mejorar la tolerancia a la sequía en *Pinus massoniana* (Lamb.) Opiz (1839) mediante un aumento de la actividad enzimática antioxidante, una mayor eficiencia en el uso del agua y mayores tasas fotosintéticas (Li et al., 2021). En forma similar, Parke y colaboradores (1983) evidenciaron la capacidad de *Rhizopogon vinicolor* A.H. Sm. (1966) de aliviar los efectos de la sequía en el pino Oregón (*Pseudotsuga menziesii* Franco, 1950) mediante una menor reducción de la tasa fotosintética y una recuperación más rápida al retomar el riego en comparación a plántulas no inoculadas. Sin embargo, estos trabajos evalúan el efecto de la sequía induciendo menor contenido de agua en el sustrato, sin medir la supervivencia en condiciones de estrés hídrico letales como las generadas por la interrupción del riego. Un trabajo que evalúa la supervivencia, indicó que plantines de *P. ponderosa* de invernadero inoculados con la especie *R. rubescens* Tul. y C. Tul. (1844), trasplantados en sitios áridos sobreviven 30 % más que plantines no inoculados (Steinfeld et al., 2003). Por otro lado, es importante mencionar que el efecto observado en los resultados del presente trabajo en la supervivencia de *P. ponderosa* podría deberse a el porcentaje de micorrización (%) registrado en cada especie de hongo y no debe atribuirse a otras características de las especies más que a su capacidad de colonización. Se observó, además, que las especies que presentaron mayor porcentaje de micorrización (%), también presentaron mayores efectos en la supervivencia y el crecimiento. De esta forma, *Rhizopogon* sp. y *S. luteus* presentaron no sólo las mayores porcentajes de micorrización (%), sino también los mayores valores de supervivencia. En contraste, *B. edulis* presentó bajo porcentaje de micorrización (%), lo cual explicaría en gran medida la ausencia de efecto significativo en la supervivencia.

Con respecto al crecimiento de *P. ponderosa* en términos de biomasa, los resultados obtenidos indican que el beneficio otorgado por la simbiosis depende del contenido de agua del sustrato y de la especie de hongo EM inoculada. Se encontró que los hongos suilloides aumentan el crecimiento de la planta simbiote en condiciones de riego, pero no lo hacen en condiciones de estrés hídrico. Estos patrones de crecimiento se observaron con mayor claridad

en la biomasa aérea que en la radical, lo cual podría deberse a que las plantas colonizadas logran un sistema radical más eficiente sin aumentar su tamaño y pueden alocar mayor proporción de C a su parte aérea gracias a los hongos simbioses presentes en sus raíces (Parke et al., 1983). En contraste a estos resultados, estudios anteriores han encontrado que pinos invasores como *Pseudotsuga menziesii*, *P. contorta* y *P. ponderosa* inoculados en ensayos de vivero con suelo lejano a plantaciones y de frentes de invasión, donde abundan las especies de hongos suilloides, tienen menor biomasa y supervivencia en comparación con plantaciones (Nuñez et al., 2009) o con su rango nativo (Nuske et al., 2021). Esto es de gran importancia ya que las diferencias observadas en el crecimiento y la supervivencia de pinos entre frentes de invasión y plantaciones podría explicarse por diferencias en la abundancia y riqueza de especies entre ambos sitios y no por características intrínsecas de las especies de hongos EM presentes en sus raíces. Los resultados de esta investigación también aportan evidencia en contra de la simplificación frecuentemente mencionada en la bibliografía, que afirma que los hongos EM mejoran el desempeño de la planta simbiote en condiciones de estrés hídrico (Lehto y Zwiazek, 2011; Rapparini y Peñuelas, 2014; Gehring et al., 2017). Otros trabajos han reportado resultados similares a los observados en este estudio. Por ejemplo, Parlade y colaboradores (2001) y Kennedy y Peay (2007) encontraron que no había diferencias de biomasa entre plántulas *Pinus muricata* no colonizadas y colonizadas en un sustrato con contenido de humedad del 5-7%, pero si encontraron un crecimiento significativamente mayor en plántulas colonizadas en condiciones de mayor humedad del sustrato. Con resultados semejantes, Theodorou (1978) y Dosskey y colaboradores (1991) observaron que las plántulas de pino respondían mejor a la colonización en condiciones de humedad del sustrato intermedias que en condiciones de humedad bajas. El hecho de que el resultado de la simbiosis sobre la aptitud vegetal dependa del contenido de agua en el sustrato acuerda con trabajos previos que han reportado que los beneficios aportados por esta simbiosis pueden ser dependientes del contexto en el que se desarrolle la planta, lo que incluye diversas variables ambientales además la disponibilidad de agua, como el contenido de nutrientes (Jonsson et al., 2001; Treseder, 2004; Smith y Read, 2008) o la presencia de otras especies vegetales en su entorno (Gorzalak et al., 2015; Knoblochova et al., 2017).

Las especies de hongos EM difieren en su capacidad de promover el crecimiento y la supervivencia en sus plantas simbioses (Burgess et al., 1994) y esto se relaciona tanto con su capacidad de colonización de raíces como del desarrollo de sus hifas en el suelo (Thomson et al., 1994). Particularmente, las especies de hongos EM capaces de formar rizomorfos muestran

un gran potencial para aliviar los efectos de la sequía y promover el crecimiento. Esto se debe a que los rizomorfos tienen un rol importante en la absorción y transporte de agua hacia la planta (Duddridge et al., 1980; Brownlee et al., 1983; Read y Boyd, 1986). A su vez, el micelio extra radical tiene la capacidad de retener mayor cantidad de agua por más tiempo (Molina y Trappe, 1994; Agerer, 2001). En este trabajo, las plántulas de *P. ponderosa* inoculadas con *Rhizopogon* sp., que se caracteriza por presentar gran cantidad de rizomorfos, fueron las que presentaron mayor supervivencia y crecimiento. Además, se observó un mayor contenido de agua en la biomasa aérea de las plántulas inoculadas con esta especie de hongo EM. En *Rhizopogon*, la presencia de rizomorfos se ha correlacionado con un aumento en el crecimiento (Amaranthus y Perry, 1989) y con una mejora en la tolerancia a la sequía de sus plantas simbiotes (Parke et al., 1983; Dosskey et al., 1990). Además, se ha detectado que en sitios áridos hay una mayor proporción de especies de hongos EM con rizomorfos (Agerer, 2001) que en sitios húmedos (Bakker et al., 2006), y que su presencia favorece la supervivencia de las plantas simbiotes (Gehring et al., 2017; Jalón et al., 2020). Aunque las ventajas de inocular *Rhizopogon* son evidentes, es importante tener en cuenta que este género facilita la invasión de pinos y se deberían evaluar las relaciones costo-beneficio a la hora de utilizarlos como bioinoculantes. De todas formas, las diferencias evidenciadas entre especies de hongos EM con y sin rizomorfos en promover el desempeño de la plántula simbiote indican que seleccionar especies con rizomorfos para la inoculación forestal puede ser más apropiado para mejorar el rendimiento (Duddridge et al., 1980; Steinfeld et al., 2003).

Colonización por diferentes especies de hongos EM

La colonización observada en las diferentes especies de hongos EM concuerda con el comportamiento reportado en la bibliografía (Ishida et al., 2008; Nara et al., 2009). El porcentaje de micorrización (%) obtenido en los tratamientos inoculados con hongos suilloides coincide con otros trabajos realizados inoculando estos hongos ya sea a partir de bancos de esporas resistentes al fuego (Baar et al., 1999) o de pellets fecales de mamíferos que dispersan estos géneros (Ashkannejhad y Horton, 2006). Las basidiosporas de los hongos suilloides germinan rápidamente cuando están estimuladas por la presencia de raíces del pino simbiote (Liao et al., 2016). Esta colonización rápida es característica de los suilloides y les permite facilitar las invasiones de pino (Ashkannejhad y Horton, 2006; Hayward et al., 2015b). Por su parte, la escasa colonización en las plántulas inoculadas con *B. edulis* también acuerda con la bibliografía (Ishida et al., 2008). Aunque la colonización a través de esporas no se restringe

únicamente a los hongos suilloides, la gran mayoría de los hongos EM no germinan ni colonizan plántulas en condiciones reproducibles en bioensayos (Ishida et al., 2008; Nara, 2009). En general, las esporas de los hongos de sucesión tardía, como *B. edulis*, no germinan ni colonizan sus plantas simbionte tan rápidamente ni tan efectivamente en comparación con las especies de sucesión temprana, como los suilloides (Ishida et al., 2008; Nara, 2009).

La ausencia de diferencias en la supervivencia y crecimiento entre las plántulas inoculadas con *B. edulis* y las no inoculadas, podría estar explicada por los bajos niveles de colonización de esta especie. Son escasos los ensayos en los cuales se ha logrado colonización efectiva de raíces con esta especie, especialmente con pino como planta simbionte (Águeda et al., 2008). Sin embargo, cuando se lograron inoculaciones efectivas, también se verificó un aumento en el crecimiento del pino simbionte (Águeda et al., 2008; Wu et al., 2011). Uno de los casos de mayor éxito de colonización, y aumento en el crecimiento, fue un experimento de co-inoculación con *B. edulis* y bacterias promotoras de la micorrización como *Bacillus cereus* *HB12* y *HB59* (Wu et al., 2011). Es por esto que, a pesar de la dificultad que constituye el cultivo y la síntesis de micorrizas *in vitro* de especies de hongos EM de sucesión tardía (Nara, 2009; Ishida et al., 2008; Águeda et al., 2008), no se debe desestimar su potencial para la elaboración de bioinoculantes que aumenten el rendimiento forestal, menos aún si estas especies forman cuerpos fructíferos comestibles que pueden aumentar el rédito económico obtenido a partir de la plantación. En este sentido, sería interesante la exploración de técnicas, como la mencionada anteriormente o la inoculación a partir de micelio, que permitan una mayor efectividad en la colonización.

Implicancias en los procesos de invasión

Los hongos suilloides podrían facilitar la invasión de pinos en condiciones de aridez y sequía. La aridez producida por sequías es una de las mayores limitaciones en el establecimiento de plántulas y se espera que este fenómeno aumente con el cambio climático (IPCC AR6, 2021). En este escenario, la facilitación que brinda el mutualismo con hongos EM podría permitir altas tasas de supervivencia incluso en condiciones de mayor aridez (Rapparini y Peñuelas, 2014). Como consecuencia de este aumento de la supervivencia, los pinos podrían mantener la tasa de reclutamiento de plántulas en ecosistemas áridos e incluso tener ventajas competitivas frente a especies nativas. Los hongos suilloides también contribuyen a la invasión de otras especies de la familia Pinaceae, algunas de las cuales resisten menos la aridez que *P.*

ponderosa. Por ejemplo, el pino Oregón o abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) es una especie altamente invasora (Simberloff et al. 2002, Núñez et al. 2009) con menor tolerancia a la aridez que suele encontrarse asociada a especies de *Rhizopogon* en áreas lejanas al frente de invasión (Núñez et al., 2009), y esta asociación contribuye a aumentar su crecimiento y supervivencia (Castellano, 1996). Para esta especie forestal, la presencia de hongos co-invasores que alivien el estrés hídrico podría ser incluso de mayor importancia que para *P. ponderosa*, que es resistente a la aridez, facilitando así la invasión de ecosistemas áridos. De esta forma, el aumento en la supervivencia de pinos debido a la asociación con hongos suilloides podría tener importantes consecuencias para los procesos de invasión en un contexto de cambio climático.

Aunque los resultados de este trabajo indican que, en algunos casos, los hongos suilloides no proveen beneficios en el crecimiento, también muestran que esta asociación no suele ser detrimental para la plántula. Esto es importante en la estabilidad de la simbiosis a largo plazo (Kennedy y Peay, 2007; Gehring et al., 2017). Podría ocurrir que, en años de pocas precipitaciones, los hongos no provean beneficios en el crecimiento y solamente reduzcan la mortalidad, pero en años con mayor disponibilidad de agua, podrían brindar ventajas considerables en el crecimiento. Se ha observado que cuando la dispersión de hongos está limitada, las plántulas de pino pueden sobrevivir, pero no es hasta la llegada de inóculo de hongos EM que pueden incrementar su crecimiento (Collier y Bidartondo, 2009). Del mismo modo, los pinos en condiciones de sequía que estén micorrizados con hongos suilloides podrían sobrevivir mejor hasta la llegada de una temporada con mayores precipitaciones, en la cual los hongos suilloides beneficiarían su crecimiento, o de propágulos de otras especies de hongos simbioses que le aporten mayores beneficios. Debido a esta variación temporal, las plantas tendrían un balance positivo a largo plazo si se asocian a hongos suilloides.

Hacia plantaciones sin invasiones

Entender la dinámica de las interacciones en los procesos de invasión es una gran herramienta para evitar la degradación de ecosistemas en regiones de uso forestal (Núñez et al. 2017). La utilización de Pináceas como principales especies forestales en Argentina ha provocado invasiones en la mayoría de los sitios donde hay forestaciones y los esfuerzos por controlarlas son muy limitados (Simberloff et al., 2002; Sarasola et al., 2006; Zalba et al., 2008). Recientemente, se ha limitado la plantación de especies más invasoras, como *Pinus*

contorta Dougl. ex. Loud., y se incentiva la plantación de *P. ponderosa*, que es considerada de bajo potencial invasor. Sin embargo, aún son necesarios mayores esfuerzos para disminuir las invasiones a partir de plantaciones (CIEFAP, 2017). En este contexto, la utilización de hongos de bajo potencial invasor como inoculantes en plantaciones, que podrían aumentar el crecimiento sin favorecer las invasiones (Núñez et al., 2017), es una herramienta de bajo costo que daría lugar a una posibilidad de manejo temprana y enfocada en la prevención de la invasión. Asimismo, en Patagonia Norte el estrés hídrico es uno de los principales factores limitantes para la supervivencia y crecimiento inicial de plantaciones. En este aspecto, la inoculación con hongos EM capaces de aliviar el estrés hídrico es de gran relevancia para el desarrollo forestal. De esta forma se lograrían plantaciones sustentables, que logren compatibilizar la conservación de los ecosistemas nativos con una producción rentable y eficiente (Núñez y Dickie, 2014; Hayward et al., 2015b). Además, la utilización de especies de alto valor gastronómico como *B. edulis* resalta el potencial beneficio de implementar hongos micorrícicos comestibles como inoculantes forestales que podrían constituir productos forestales no maderables incrementando el rendimiento económico de las plantaciones, a la vez que se disminuye la presión de recolección de estas especies en ecosistemas nativos (Hall et al., 1998).

Limitaciones de este trabajo

La cantidad de especies de hongos utilizadas es escasa para concluir más allá del efecto individual de cada especie. En este trabajo se evaluó el efecto de sólo tres especies de hongos EM debido al reducido número de especies que se pudo obtener en el campo. A su vez, sólo se logró obtener una especie considerada no invasora (*B. edulis*). Esto limita posibles conclusiones generales sobre las especies de hongos EM no invasoras. Ya que, además de ser no invasora, *B. edulis* puede tener muchas otras características como especie que influyan en el efecto sobre su planta simbiote. Sin embargo, la utilización de *B. edulis* resultó en una comparación interesante como una especie de características ecológicas diferentes a las de los hongos suilloides, incluso cuando están cercanamente emparentadas a nivel filogenético (Nguyen et al. 2016). En este aspecto, este trabajo resalta posibles diferencias entre hongos considerados invasores vs. no invasores, aunque es necesario trabajar con un mayor número de especies para obtener conclusiones generalizables sobre estas diferencias. Por otro lado, la utilización de *P. ponderosa* como única especie forestal también limita la generalización de los efectos observados a otras especies leñosas forestales.

Además, la extrapolación a partir de ensayos en cámara de cultivo presenta limitaciones y debe realizarse con precaución. Por una parte, los ensayos de crecimiento en cámara permiten ventajas en cuanto a la manipulación experimental, como mayor control sobre las variables que afectan el crecimiento (ej. humedad) y la contaminación cruzada. Sin embargo, las condiciones impuestas experimentalmente se alejan mucho de las que se dan en el campo. En particular, las limitaciones físicas provocadas por el crecimiento en contenedores pequeños, podría ocasionar que, tanto la plántula como el hongo no exploren el volumen de suelo que explorarían en un ambiente natural (Kennedy y Peay, 2007; Lehto y Zwiazek, 2011). Esta circunstancia podría tener como consecuencia la disminución de capacidad de los hongos EM de brindar un beneficio a la plántula en el régimen de sequía. Además, este experimento estudió solamente un estadio de crecimiento de *P. ponderosa* (i.e. primer año de crecimiento). Sin embargo, es de destacar que los patrones de crecimiento en el estadio de plántula son muy buenos predictores de los patrones de crecimiento en la madurez para las especies leñosas (Cornelissen et al., 1998). A esto se le suma que el estadio de plántula es el estadio más vulnerable en el ciclo de vida y por lo tanto determinante de la supervivencia (Fenner y Thompson, 2005). Particularmente, las especies de *Pinus* varían muchísimo en cuanto a su respuesta de crecimiento a la colonización de hongos EM en el estadio de plántula (Karst et al., 2018). Sin embargo, estos resultados no pueden extrapolarse a árboles maduros, lo cuales podrían ser menos sensibles a condiciones de humedad del suelo limitantes debido a su sistema radicular extenso y profundo (Pickles y Simard, 2017).

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo evidencian la importancia de tener en cuenta la interacción de los procesos de invasión con condiciones ambientales cambiantes. Muchas invasiones biológicas ocurren en diferentes condiciones abióticas y todas ocurren y son parte de un contexto de cambio global. Particularmente, el aumento de la aridez y del estrés hídrico es una de las principales predicciones de los modelos de cambio climático. A su vez, la aridez es una de las principales limitantes de reclutamiento de plántulas. Actualmente, la mayoría de las evaluaciones de riesgos se realizan bajo la premisa de que los rasgos de los organismos invasores y el resultado de sus interacciones son estáticos. En este sentido, se podría pensar que la capacidad invasora de pinos en condiciones de aridez se vería reducida. Sin embargo, los resultados de este trabajo revelan que hongos co-invasores podrían aliviar el estrés hídrico

y mantener una tasa de reclutamiento alta en pinos, incluso en escenarios de mayor aridez. Por otro lado, se encontró que los efectos positivos que brindan los hongos EM pueden no ser tales en condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, al tener un beneficio en condiciones favorables y permitir su supervivencia, las plantas tendrían un balance positivo a largo plazo si se asocian a hongos suilloides.

En conjunto, estos resultados no sólo son relevantes para evaluar riesgos de invasión, sino también para considerar el uso de hongos EM como bioinoculantes. En este sentido, los resultados contribuyen tener un mayor conocimiento de cuándo, bajo qué condiciones y con qué especies la aplicación de bioinoculantes micorrícicos puede ser rentable y sustentable. En este caso, la inoculación con hongos suilloides, y especialmente con *Rhizopogon* sp., podría aumentar la tasa de supervivencia en el trasplante a campo de plantines de vivero. No obstante, teniendo en cuenta las proyecciones de aridez a futuro y que las plantaciones se realizan mayoritariamente en ecosistemas semiáridos, los resultados obtenidos sugieren que no sería apropiado su uso para un aumento en el rendimiento forestal, al menos en estadios iniciales de crecimiento. Además, su capacidad de facilitar la invasión debe tenerse en cuenta como un potencial costo ambiental y económico a futuro. En síntesis, los resultados muestran que un mayor entendimiento de la dinámica de las relaciones simbióticas en diferentes condiciones ambientales, proporcionará mejores herramientas para evaluar los riesgos de invasión y mitigar sus impactos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, R. y Gronbach, E. 1990. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn Verlag, Munich, Alemania.
- Agerer, R. 1991. 2 Characterization of Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* 23, 25-73.
- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11 (2), 107-114.
- Albarracín, M.V., Six, J., Houlton, B.Z. y Bledsoe, C.S. 2013. A nitrogen fertilization field study of carbon-13 and nitrogen-15 transfers in ectomycorrhizas of *Pinus sabiniana*. *Oecologia* 173, 1439-1450.
- Allen, M.F. 2007. Mycorrhizal Fungi: Highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone Journal* 6, 291-297.
- Amaranthus, M.P. y Perry, D.A. 1989. Interaction effects of vegetation type and Pacific madrone soil inocula on survival, growth, and mycorrhiza formation of Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 19, 550-556.
- Andenmatten, E. y Letourneau, F. 2008. Mejora del crecimiento inicial de Pino ponderosa, por efecto del manejo de la vegetación en el sitio de plantación. *Presencia* 52, 8-11.
- Ashkannejhad, S. y Horton, T.R., 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist*. 169, 345-354.

- Augé, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42.
- Baar, J., Horton, T.R., Kretzer, A.M. y Bruns, T.D. 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist* 143, 409–418.
- Bakker, M. R., Augusto, L., y Achat, D. L. 2006. Fine root distribution of trees and understorey in mature stands of maritime pine *Pinus pinaster* on dry and humid sites. *Plant and Soil* 286 (1), 37-51.
- Barroetaveña, C. y Rajchenberg, M.C., 2005. Mycorrhizal fungi in *P. ponderosa* introduced in Central Patagonia (Argentina). *Nova Hedwig* 80, 453–464.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. y Walker, S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48.
- Blackburn, T.M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarošík, V., Wilson, J.R.U. y Richardson, D.M. 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*. 26, 333–339.
- Bogeat-Triboulot, M.B., Bartoli, F., Garbaye, J., Marmeisse, R. y Tagu, D. 2004. Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. *Plant and Soil* 267, 213–223.
- Bornyas, M.A., Graham, R.C. y Allen, M.F. 2005. Ectomycorrhizae in a soil-weathered granitic bedrock regolith: linking matrix resources to plants. *Geoderma* 126, 141–160.
- Borowicz, V. 2001. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations?. *Ecology* 82, 3057–3068.
- Brownlee, C.J., Duddridge, A. Malibari, A., y Read, D.J. 1983. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant and Soil* 71, 433–443.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79, 473–495.
- Brundrett, M.C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320, 37–77.
- Brundrett, M.C. y Tedersoo, L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*. 220, 1108–1115.
- Bruns, T.D., Peay, K.G., Boynton, P.J., Grubisha, L.C., Hynson, N.A., Nguyen, N.H. y Rosenstock, N.P. 2009. Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment. *New Phytologist* 181, 463–470.
- Bruns, T. D., Szaro, T. M., Gardes, M., Cullings, K. W., Pan, J. J., Taylor, D. L., ... & Li, Y. 1998. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology*, 7(3), 257-272.
- Burgess, T.I., Dell, B. y Malajczuk, N. 1994. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* 127, 731–739.
- Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., Kinzig, A.P., Daily, G.C., Loreau, M., Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D.S. y Naeem, S. 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486, 59–67.
- Castellano, M.A. 1996. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings (pp 223–301). En: Mukerji KG Ed. *Concepts in mycorrhizal research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos.
- Castro-Díez, P., Vaz, A.S., Silva, J.S., Loo, M., Alonso, Á., Aponte, C., Bayón, Á., Bellingham, P.J., Chiuffo, M.C., DiManno, N., Julian, K., Kandert, S., La Porta, N., Marchante, H., Maule, H.G., Mayfield, M.M., Metcalfe, D., Monteverdi, M.C., Núñez, M.A., Ostertag, R., Parker, I.M., Peltzer, D.A., Potgieter, L.J., Raymundo, M., Rayome, D., Reisman-Berman, O., Richardson, D.M., Roos, R.E., Saldaña, A., Shackleton, R.T., Torres, A., Trudgen, M., Urban, J., Vicente, J.R., Vilà, M., Ylloja, T., Zenni, R.D. y Godoy, O. 2019. Global effects of non-native tree species on multiple ecosystem services. *Biological Reviews* 94, 1477–1501.

- CIEFAP, 2017: Inventario nacional de plantaciones forestales: Región Patagónica. Ministerio de Agroindustria. Argentina.
- Clavero, M. y Garcíaberthou, E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 110–110.
- Collier, F.A. y Bidartondo, M.I. 2009. Waiting for fungi: the ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal of Ecology* 97, 950–963.
- Colpaert, J.V., van Assche, J.A. y Luijstens, K. 1992. The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris*. *New Phytologist* 120, 127–135
- Cornelissen, J., P. Castro-Diez, P. y Carnelli, A. 1998. Variation in relative growth rate among woody species (pp. 363– 392). En: H. Lambers, H. Poorter, and M. M. I. van Vuuren, Ed. *Inherent variation in plant growth: Physiological mechanisms and ecological consequences*. Backhuys, Leiden, Netherlands.
- Dahlberg, A. y Finlay, R.D. 1999. *Suillus* (pp. 33–64). En: Cairney, J.W.G. y Chambers, S.M., Ed. *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile*. Springer, Berlin, Alemania.
- Davies, F.T., Svenson, S.E., Cole, J.C., Phavaphutanon, L., Duray, S.A., Olalde-Portugal, V., Meier, C.E. y Bo, S.H. 1996. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology* 16, 985–993.
- Dezzotti, A., Sbrancia, R., Mortoro, A. y Monte, C. 2009. Biological invasion of *P. ponderosa* and *Pinus contorta*: case study of a forest plantation in Northwestern Patagonia. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* 18(2), 181-191.
- Dezzotti, A. 2020 Las plantaciones mediterráneas de *Pinus* en Argentina y España: características y debates ambientales. Página Web Argentina Forestal. URL: <https://www.argentinaforestal.com> Consultado en la fecha 3/9/2021.
- Dickie, I., Davis, M. y Carswell, F. 2012. Quantification of mycorrhizal limitation in beech spread. *New Zealand Journal of Ecology* 36, 210–215.
- Dickie, I.A., Bennett, B.M., Burrows, L.E., Nuñez, M.A., Peltzer, D.A., Porté, A., Richardson, D.M., Rejmánek, M., Rundel, P.W. y van Wilgen, B.W. 2014. Conflicting values: ecosystem services and invasive tree management. *Biological Invasions* 16, 705–719.
- Dickie, I.A., Bolstridge, N., Cooper, J.A. y Peltzer, D.A. 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187, 475–484.
- Dickie, I.A., Bufford, J.L., Cobb, R.C., Desprez-Loustau, M.-L., Grelet, G., Hulme, P.E., Klironomos, J., Makiola, A., Nuñez, M.A., Pringle, A., Thrall, P.H., Tourtellot, S.G., Waller, L. y Williams, N.M. 2017. The emerging science of linked plant–fungal invasions. *New Phytologist* 215, 1314–1332.
- Dickie, I.A., Nuñez, M.A., Pringle, A., Lebel, T., Tourtellot, S.G. y Johnston, P.R., 2016. Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biological Invasions* 18, 3383–3395.
- Dosskey, M.G., Boersma, L. y Linderman, R.G. 1991 Role for the photosynthate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas fir seedlings to drying soil. *New Phytologist* 117:327–334
- Duddridge, J.A., Malibari, A. y Read, D.J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287:834–836.
- Ehrenfeld, J. 2002. Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems* 6, 503-523
- Ellison, C.A., Evans, H.C., Djeddour, D.H. y Thomas, S.E. 2008. Biology and host range of the rust fungus *Puccinia spegazzinii*: A new classical biological control agent for the invasive, alien weed *Mikania micrantha* in Asia. *Biological Control* 45, 133–145.
- Engelbrecht, B.M.J., Tyree, M.T. y Kursar, T.A. 2007. Visual assessment of wilting as a measure of leaf water potential and seedling drought survival. *Journal of Tropical Ecology* 23, 497–500.
- Fenner, M., y Thompson, K. 2005. *The ecology of seeds*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Fioroni, F. 2020. Efecto de distintas estrategias de cultivo sobre las comunidades fúngicas radicales y el desarrollo vegetal de *Nothofagus obliqua* y *P. ponderosa*. Trabajo final para optar al título de Licenciado en Ciencias biológicas. Universidad Nacional del Comahue.

- Furci, G. 2018. Guía de campo Hongos de Chile Vol. I y II. Ed. Fundación Fungi, Santiago, Chile.
- Fusco, E.J., Finn, J.T., Balch, J.K., Nagy, R.C. y Bradley, B.A. 2019. Invasive grasses increase fire occurrence and frequency across US ecoregions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 23594–23599.
- Gamundi, I. y Horak, E. 1993. Hongos de los bosques Andino-Patagónicos. Ed. Vazquez Mazzini, Buenos Aires, Argentina.
- García-Fórner, N., Sala, A., Biel, C., Savé, R. y Martínez-Vilalta, J. 2016. Individual traits as determinants of time to death under extreme drought in *Pinus sylvestris*. *Tree Physiology* 36, 1196–1209.
- Gehring, C.A., Swaty, R.L. y Deckert, R.J. 2017. Chapter 16: Mycorrhizas, Drought, and Host-Plant Mortality (pp. 279–298). En: Johnson, N.C., Gehring, C., Jansa, J. Eds. *Mycorrhizal Mediation of Soil*. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.
- Giri, D. 2020 Manual cell counting with Neubauer chamber. Página Web Laboratory Info. URL: <https://laboratoryinfo.com/> . Consultado en la fecha 13/9/2020.
- 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. *ISME Journal* 10, 1228–1239.
- Grotkopp, E., Erskine-Ogden, J. y Rejmánek, M. 2010. Assessing potential invasiveness of woody horticultural plant species using seedling growth rate traits. *Journal of Applied Ecology* 47, 1320–1328.
- Guehl, J. y Garbaye, J. 1990. The effects of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water-use efficiency and response to transplanting in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. *Annals of Forest Science* 47, 551–563.
- Hall, I.R., Lyon, A.J.E., Wang, Y. y Sinclair, L. 1998. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 2. *B. edulis*. *Economic Botany*. 52 (1), 44–56.
- Hayward, J., Horton, T.R. y Nuñez, M.A. 2015a. Ectomycorrhizal fungal communities coinventing with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytologist* 208, 497–506.
- Hayward, J., Horton, T.R., Pauchard, A. y Nuñez, M.A., 2015b. A single ectomycorrhizal fungal species can enable a *Pinus* invasion. *Ecology* 96, 1438–1444.
- Higgins, S.I. y Richardson, D.M., 1998. Pine invasions in the Southern Hemisphere: modelling interactions between organisms, environment and disturbance. *Plant Ecology* 135, 79–93.
- Hoeksema, J., Averill, C., Talbot, J., Brzostek, E., Buscardo, E., Chen, K.-H., Liao, H.-L., Nagy, L., Policelli, N., Ridgeway, J., Rojas, J. y Vilgalys, R. 2020. Ectomycorrhizal plant-fungal co-invasions as natural experiments for connecting plant and fungal traits to their ecosystem consequences. *Frontiers in Forests and Global Change*, 3, 84.
- IPCC, 2021: Climate Change 2021: The physical science basis. Contribution of working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change: Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J. B. R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu and B. Zhou Eds. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- IPCC Secretariat. 2021. 2020 IPCC Annual Report - Protecting the world's plant resources from pests. FAO on behalf of the Secretariat of the International Plant Protection Convention. Roma, Italia.
- Ishida, T.A., Nara, K., Tanaka, M., Kinoshita, A., y Hogetsu, T. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180, 491–500.
- Jalón, L.G., Limousin, J.-M., Richard, F., Gessler, A., Peter, M., Hättenschwiler, S. y Milcu, A. 2020. Microhabitat and ectomycorrhizal effects on the establishment, growth and survival of *Quercus ilex* L. seedlings under drought. *Plos one* 15, e0229807.
- Jones, M. y Smith, S. 2004. Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? *Canadian Journal of Botany* 82, 1089–1109.
- Jonsson, L.M., Marie-Charlotte, N., Wardle DA, Zackrisson O 2001 Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* 93, 353–364

- Jules, E.S., Kauffman, M.J., Ritts, W.D. y Carroll, A.L. 2002. Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: A nonnative root rot on Port Orford Cedar. *Ecology* 83, 3167–3181.
- Karst, J., et al. 2018. Tree species with limited geographical ranges show extreme responses to ectomycorrhizas. *Global Ecology and Biogeography* 27, 839–84
- Kennedy, P. G., Higgins, L. M., Rogers, R. H., y Weber, M. G. 2011. Colonization-competition tradeoffs as a mechanism driving successional dynamics in ectomycorrhizal fungal communities. *Plos one*, 69, e25126.
- Kennedy, P. G., Hortal, S., Bergemann, S. E., y Bruns, T. D. 2007. Competitive interactions among three ectomycorrhizal fungi and their relation to host plant performance. *Journal of Ecology*, 956, 1338-1345.
- Kennedy, P.G. y Peay, K.G. 2007. Different soil moisture conditions change the outcome of the ectomycorrhizal symbiosis between *Rhizopogon* species and *Pinus muricata*. *Plant and Soil* 291, 155–165.
- Kipfer, T., Wohlgemuth, T., van der Heijden, M.G.A., Ghazoul, J. y Egli, S. 2012. Growth response of drought-stressed *Pinus sylvestris* seedlings to single and multi-species inoculation with ectomycorrhizal fungi. *Plos one* 7, e35275.
- Kivlin, S.N., Emery, S.M. y Rudgers, J.A. 2013. Fungal symbionts alter plant responses to global change. *American Journal of Botany* 100, 1445–1457.
- Knapp, D.G., Pintye, A. y Kovács, G.M. 2012. The dark side is not fastidious – dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *Plos one* 7, e32570.
- Korner-Nievergelt, F., Roth, T., von Felten, S., Guelat, J., Almasi, B. y Korner-Nievergelt, P. 2015. *Bayesian Data Analysis in Ecology using Linear Models with R, BUGS and Stan*. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.
- Kropp, B.R. y Langlois, C.G. 1990. Ectomycorrhizas in reforestation. *Canadian Journal of Forest Research* 20, 438–451
- Langdon, B., Pauchard, A. y Aguayo, M. 2010. *Pinus contorta* invasion in the Chilean Patagonia: Local patterns in a global context. *Biological Invasions* 12, 3961–3971.
- Lehto, T. y Zwiazek, J.J. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21, 71–90.
- Levene, H. 1960. *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press, Palo Alto, Estados Unidos. pp. 278-292.
- Levine, J.M., Vilà, M., Antonio, C.M.D., Dukes, J.S., Grigulis, K. y Lavorel, S. 2003. Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences* 270, 775–781.
- Li, M., Wang, H., Zhao, X., Lu, Z., Sun, X. y Ding, G. 2021. Role of *Suillus placidus* in improving the drought tolerance of Masson Pine (*Pinus massoniana* Lamb.) seedlings. *Forests* 12, 332.
- Liao, H.L., Chen, Y. y Vilgalys, R. 2016. Metatranscriptomic study of common and host-specific patterns of gene expression between pines and their symbiotic ectomycorrhizal fungi in the genus *Suillus*. *Plos genetics* 12, 1– 24.
- Liao, C., Peng, R., Luo, Y., Zhou, X., Wu, X., Fang, C., Chen, J. y Li, B., 2008. Altered ecosystem carbon and nitrogen cycles by plant invasion: a meta-analysis. *New Phytologist* 177, 706–714.
- Liebhold, A.M., Brockerhoff, E.G., Garrett, L.J., Parke, J.L. y Britton, K.O. 2012. Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10, 135–143.
- Lockwood, J.L., Hoopes, M.F. y Marchetti, M.P. 2013. *Invasion Ecology*. John Wiley & Sons, Nueva York, Estados Unidos.
- MacDicken, K.G. 2015. *Global Forest Resources Assessment 2015: What, why and how?* *Forest Ecology and Management*, 352, 3-8.
- Mack, R.N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M. y Bazzaz, F.A. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10, 689–710.
- Malpeli, L. 2006. *El mecanismo de Desarrollo Limpio provisto en el Protocolo de Kyoto: la situación actual en Argentina*. Tesis doctoral. Universidad del Salvador.

Mandle, L., Bufford, J., Schmidt, I.B. y Daehler, C. 2011. Woody exotic plant invasions and fire: reciprocal impacts and consequences for native ecosystems. *Biological Invasions*, 13(8), 1815–1827.

Marx, D.H. 1980. Ectomycorrhiza fungus inoculations: a tool for improving forestation practices (pp 13–71). En: Mikola P Ed. *Tropical mycorrhiza research*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.

Moeller, H. V. y Peay, K. G. 2016. Competition-function tradeoffs in ectomycorrhizal fungi. *PeerJ*, 4, e2270.

Mohan, J.E., Cowden, C.C., Baas, P., Dawadi, A., Frankson, P.T., Helmick, K., Hughes, E., Khan, S., Lang, A., Machmuller, M., Taylor, M. y Witt, C.A. 2014. Mycorrhizal fungi mediation of terrestrial ecosystem responses to global change: mini-review. *Fungal Ecology* 10, 3–19.

Molina, R., y Trappe, J.M. 1994. Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon* I. Host associations, host-specificity and pure culture syntheses. *New Phytologist* 125, 653–675.

Molina, R., Trappe, J.M., Grubisha, L.C. y Spatafora, J.W. 1999. *Rhizopogon* (pp 129–161). En: Cairney, J.W.G. y Chambers, S.M., Ed. *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile*. Springer, Berlin, Alemania.

Mooney, H.A. y Cleland, E.E. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5446–5451.

Moora, M., Berger, S., Davison, J., Öpik, M., Bommarco, R., Bruelheide, H., Kühn, I., Kunin, W.E., Metsis, M., Rortais, A., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Stout, J.C., Truusa, M., Westphal, C., Zobel, M. y Walther, G.R. 2011. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing: Invasive plants associate with ubiquitous arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Biogeography* 38, 1305–1317.

Moyano, J., Chiuffo, M.C., Policelli, N., Nuñez, M.A. y Rodríguez-Cabal, M.A. 2019. The interplay between propagule pressure, seed predation and ectomycorrhizal fungi in plant invasion. *NeoBiota* 42, 45–58.

Nara, K. 2009. Spores of ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytologist* 181: 245–248.

Nardinia, A., Salleo, S., Tyree, M. y Vertovec, M. 2000. Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Annals of Forest Science* 57, 305–312.

Nguyen, N., Vellinga, E., Bruns, T. y Kennedy, P. 2016. Phylogenetic assessment of global *Suillus* ITS sequences supports morphologically defined species and reveals synonymous and undescribed taxa. *Mycologia* 108(6), 1216–1228.

Nuñez, M.A., Chiuffo, M.C., Torres, A., Paul, T., Dimarco, R.D., Raal, P., Policelli, N., Moyano, J., García, R.A., van Wilgen, B.W., Pauchard, A. y Richardson, D.M. 2017. Ecology and management of invasive Pinaceae around the world: progress and challenges. *Biological Invasions* 19, 3099–3120.

Nuñez, M.A., Davis, K.T., Dimarco, R.D., Peltzer, D.A., Paritsis, J., Maxwell, B.D. y Pauchard, A. 2021. Should tree invasions be used in treeless ecosystems to mitigate climate change? *Frontiers in Ecology and the Environment* 19 (6), 334–341

Nuñez, M.A. y Dickie, I.A. 2014. Invasive belowground mutualists of woody plants. *Biological Invasions* 16, 645–661.

Nuñez, M.A., Hayward, J., Horton, T.R., Amico, G.C., Dimarco, R.D., Barrios-García, M.N. y Simberloff, D. 2013. Exotic mammals disperse exotic fungi that promote invasion by exotic trees. *Plos one* 8, e66832.

Nuñez, M.A., Horton, T.R. y Simberloff, D. 2009. Lack of belowground mutualisms hinders Pinaceae invasions. *Ecology* 90, 2352–2359.

Nuske, S.J., Fajardo, A., Nuñez, M.A., Pauchard, A., Wardle, D.A., Nilsson, M.C., Kardol, P., Smith, J.E., Peltzer, D.A., Moyano, J. y Gundale, M.J. 2021. Soil biotic and abiotic effects on seedling growth exhibit context dependent interactions: evidence from a multi-country experiment on *Pinus contorta* invasion. *New Phytologist* 232(1), 303–317.

O'Brien, M.J., Leuzinger, S., Philipson, C.D., Tay, J. y Hector, A. 2014. Drought survival of tropical tree seedlings enhanced by non-structural carbohydrate levels. *Nature Climate Change* 4, 710–714.

Padilla, F.M. y Pugnaire, F.I. 2007. Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. *Functional Ecology*, 21, 489–495.

Paritsis, J., Landesmann, J., Kitzberger, T., Tiribelli, F., Sasal, Y., Quintero, C., Dimarco, R., Barrios-García, M.N., Iglesias, A., Diez, J., Sarasola, M. y Nuñez, M. 2018. Pine plantations and invasion alter fuel structure and potential fire behavior in a Patagonian forest-steppe ecotone. *Forests* 9(3), 117.

Parke, E.L., Linderman, R.G. y Black, C.H. 1983. The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings. *New Phytologist* 95, 83–95.

Parladé, J., Cohen, M., Doltra, J., Luque, J. y Pera, J. 2001 Continuous measurement of stem-diameter growth response of *Pinus pinea* seedlings mycorrhizal with *Rhizopogon roseolus* and submitted to two water regimes. *Mycorrhiza* 11, 129–136

Parladé, J., Pera, J., y Alvarez, I. F. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 64, 237-245.

Pauchard, A., García, R., Zalba, S., Sarasola, M., Zenni, R., Ziller, S. y Nuñez, M. 2016. Pine invasions in South America: reducing their ecological impacts through active management (pp. 318–342) En: *Biological Invasions in Changing Ecosystems*. De Gruyter, Polonia.

Peay, K.G., Schubert, M.G., Nguyen, N.H. y Bruns, T.D. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* 21, 4122–4136.

Pickles, B. J., y Simard, S. W. 2017. Mycorrhizal networks and forest resilience to drought (pp. 319-339) . En: Johnson, N.C., Gehring, C., Jansa, J. Eds. *Mycorrhizal mediation of soil* . Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.

Pinheiro, J., Bates, D., Debroy, S., Sarkar, D y R Core Team. 2021. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-153

Policelli, N., Bruns, T., Vilgalys, R. y Nuñez, M. 2019. Suiloid fungi as global drivers of pine invasions. *New Phytologist*, 222(2), 714-725.

Pringle, A., Bever, J.D., Gardes, M., Parrent, J.L., Rillig, M.C. y Klironomos, J.N. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 699–715.

Quiroz Marchant, I., Chung Guin-po, P., García Rivas, E., González Ortega, M. P., y Soto Guevara, H. 2009. Vivero forestal: producción de plantas nativas a raíz cubierta. Colecciones: *Silvicultura y Manejo de Ecosistemas Forestales Nativos y Exóticos*. Instituto Forestal, Chile.

Rapparini, F. y Peñuelas, J. 2014. Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth (pp. 21–42). En: Miransari, M. Ed. *Use of microbes for the alleviation of soil stresses*, Volume 1. Springer, Nueva York, Estados Unidos.

Read, D.J., y Boyd., R. 1986. Water relations of mycorrhizal fungi and their host plants (pp 287–303). En: Ayres, P.G., y Boddy, L. Ed. *Water, fungi, and plants*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

Reddy, M. S., y Natarajan, K. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza*, 7(3), 133-138.

Repáč, I. 2011. Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques (pp. 43-63). En: *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae*. Springer, Berlin, Alemania.

Richardson, D.M., 1998. Forestry trees as invasive aliens. *Conservation Biology* 12, 18–26.

Richardson, D.M., Allsopp, N., D'antonio, C.M., Milton, S.J. y Rejmánek, M., 2000. Plant invasions — the role of mutualisms. *Biological Reviews* 75, 65–93.

Richardson, D.M. y Rejmánek, M. 2011. Trees and shrubs as invasive alien species - a global review: Global review of invasive trees & shrubs. *Diversity and Distributions* 17, 788–809.

Rincón, A., Santamaría, B.P., Ocaña, L. y Verdú, M. 2014. Structure and phylogenetic diversity of post-fire ectomycorrhizal communities of maritime pine. *Mycorrhiza* 24, 131–141.

Rundel, P.W., Dickie, I.A. y Richardson, D.M. 2014. Tree invasions into treeless areas: mechanisms and ecosystem processes. *Biological Invasions* 16, 663–675.

Salgado Salomón, M.E., Barroetaveña, C. y Rajchenberg, M. 2011. Do pine plantations provide mycorrhizal inocula for seedlings establishment in grasslands from Patagonia, Argentina? *New Forests* 41, 191–205.

Sarasola, M.M., Rusch, V.E., Schlichter, T.M. y Ghersa, C.M. 2006. Invasión de coníferas forestales en áreas de estepa y bosques de ciprés de la cordillera en la Región Andino Patagónica. *Ecología Austral* 16(2), 143-156.

Schwartz, M.W., Hoeksema, J.D., Gehring, C.A., Johnson, N.C., Klironomos, J.N., Abbott, L.K. y Pringle, A. 2006. The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecology Letters* 9, 501–515.

Shapiro, S. S. y Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3–4), 591–611.

Simberloff, D., Relva, M.A. y Nuñez, M.A. 2002. Gringos en el bosque: introduced tree invasion in a native *Nothofagus/Austrocedrus* forest. *Biological Invasions* 4: 35– 53.

Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E. y Vilà, M. 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution* 28, 58–66.

Simberloff, D., Nuñez, M.A., Ledgard, N.J., Pauchard, A., Richardson, D.M., Sarasola, M., Wilgen, B.W.V., Zalba, S.M., Zenni, R.D., Bustamante, R., Peña, E. y Ziller, S.R. 2010. Spread and impact of introduced conifers in South America: Lessons from other southern hemisphere regions. *Austral Ecology* 35, 489–504.

Smith, G. R., Steidinger, B. S., Bruns, T. D. y Peay K. G. 2018. Competition–colonization tradeoffs structure fungal diversity. *The ISME Journal* 12(7), 1758-1767.

Smith, S.E. y Read, D.J. 2009. *Mycorrhizal symbiosis*, 3. ed., Repr. ed. Elsevier/Acad. Press, Amsterdam, Países Bajos.

Steidinger, B. S., Crowther, T. W., Liang, J., Van Nuland, M. E., Werner, G. D., 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.

Steinauer, E.M., Bragg, T.B., 1987. Ponderosa Pine (*P. ponderosa*) Invasion of Nebraska Sandhills Prairie. *American Midland Naturalist* 118, 358.

Steinfeld, D., Amaranthus, M. y Cazares, E. 2003. Survival of ponderosa pine (*P. ponderosa* dougl. ex laws.) seedlings outplanted with *Rhizopogon* mycorrhizae inoculated with spores at the nursery. *Journal of Arboriculture*, 29(4), 197-208.

Theodorou, C. 1978. Soil-moisture and mycorrhizal association of *Pinus radiata* D. Don. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 33–37.

Thomson, B.D., Grove, T.S., Malajczuk, N. y Hardy, G.E.S. 1994 The effectiveness of ectomycorrhizal fungi increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytologist* 126, 517–524.

Trappe, J.M. y Strand, R.F. 1969. Mycorrhizal deficiency in a Douglas-fir region nursery. *Forest Science* 15, 381–389.

Treseder, K.K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist* 164, 347–355.

van der Heijden, M.G.A., 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, 1406–1423.

Varela, S. A., y Arana, V. 2011. Latencia y germinación de semillas. *Tratamientos pregerminativos. Sistemas Forestales Integrados* 3, 1-10.

Vellinga, E., Kuyper, T., Ammirati, J., Desjardin, D., Halling, R., Justo, A., Læssøe, T., Lebel, T., Lodge, D., Matheny, P., Methven, A., Moreau, P.-A., Mueller, G., Noordeloos, M., Nuytinck, J., Ovrebo, C. y Verbeke, M. 2015. Six simple guidelines for introducing new genera of fungi. *IMA Fungus* 6, 65-68.

Vellinga, E.C., Wolfe, B.E. y Pringle, A. 2009. Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181, 960–973.

Vilà, M., Espinar, J.L., Hejda, M., Hulme, P.E., Jarošík, V., Maron, J.L., Pergl, J., Schaffner, U., Sun, Y. y Pyšek, P. 2011. Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology Letters* 14, 702–708.

Vlk, L., Tedersoo, L., Antl, T., Větrovský, T., Abarenkov, K., Pergl, J., Albrechtová, J., Vosátka, M., Baldrian, P., Pyšek, P. y Kohout, P. 2020. Early successional ectomycorrhizal fungi are more likely to naturalize outside their native range than other ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 227, 1289–1293.

Wilson, T.B. y Witkowski, E.T.F. 1998. Water requirements for germination and early seedling establishment in four African savanna woody plant species. *Journal of Arid Environments* 38, 541–550.

Wu, X.-Q., Hou, L.-L., Sheng, J.-M., Ren, J.-H., Zheng, L., Chen, D., Ye, J.-R., 2011. Effects of ectomycorrhizal fungus *B. edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biology and Fertility of Soils*, 48(4), 385-391.

Zalba, S. M., Cuevas, Y. A., y Boó, R. M. 2008. Invasion of *Pinus halepensis* Mill. following a wildfire in an Argentine grassland nature reserve. *Journal of Environmental Management*, 883, 539-546.