

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

**El papel de mamíferos nativos y exóticos en la dispersión de hongos asociados a *Pinus
elliottii*, una especie de uso forestal, invasora en las Sierras Grandes del centro de
Argentina.**

Tesinista: Fabricio Aguirre

Director: Eduardo Nouhra

Codirector: Carlos Urcelay

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)
CONICET.

**El papel de mamíferos nativos y exóticos en la dispersión de hongos asociados a *Pinus
elliottii*, una especie de uso forestal, invasora en las Sierras Grandes del centro de
Argentina**

Tribunal examinador:

Ricardo Torres

Silvana Longo

Gabriela Bruno

Calificación:

Fecha:

INTRODUCCIÓN

Las invasiones biológicas constituyen uno de los principales cambios ambientales que afectan a la biodiversidad (Sala et al., 2000). Los mecanismos por los cuales las especies exóticas se expanden en un rango foráneo son complejos y variables entre los diferentes ecosistemas (Levine et al., 2003).

Uno de los factores clave en los procesos de invasión son las interacciones bióticas. Entre ellas, las interacciones planta–hongos micorrícicos han mostrado ser muy relevantes en la expansión de diversas especies vegetales (Callaway et al., 2004). Cuando estas establecen interacciones simbióticas obligadas y con cierta especificidad con hongos del suelo, como es el caso de las ectomicorrizas (Smith and Read, 2008), el proceso de expansión sólo es posible si ambos simbioses, la planta y los hongos, co-invaden el ecosistema foráneo (Nuñez & Dickie 2014).

En la simbiosis ectomicorrícica (EM), los hongos colonizan las raíces de las plantas, formando una interface fisiológicamente apta para el intercambio intercelular, donde las hifas del hongo transfieren nutrientes (por ej. nitrógeno) a la planta y ésta le provee carbohidratos provenientes de la fotosíntesis (Smith and Read, 2008).

Dentro de las plantas EM conocidas como simbioses obligados encontramos a los miembros de la familia Pinaceae, que requieren de la asociación con hongos del suelo para su subsistencia (Richardson et al., 2000). Las Pináceas son compatibles con una amplia variedad de hongos EM en sus rangos nativos (Molina et al., 1992), pero a menudo son incompatibles con otros hongos EM fuera de dichos rangos (Vellinga et al., 2009). De esta manera, una limitante para el desarrollo y la dispersión de los pinos en lugares donde no son nativos es la ausencia de hongos EM compatibles.

Los pinos han sido plantados por el hombre alrededor del mundo por sus características maderables y de aplicación en la industria (Richardson, 1998). En la actualidad se los considera invasores globalmente distribuidos (Richardson, 2006; Rejmánek and Richardson, 2013), que requieren de la simbiosis obligada con hongos EM ya que no sobreviven por largos periodos sin ellos (Allen, 1991). Tanto los pinos como los hongos EM se dispersan fuera de las plantaciones introducidas en diversas regiones y co-invaden lugares libres de pinos (por ej. Dickie et al., 2010; Hayward et al., 2015a, 2015b; Hynson et al., 2013; Nuñez et al., 2009, 2013; Salgado Salomón et al., 2011; Urcelay et al., 2017).

Los hongos EM y las semillas de pino se dispersan independientemente, por lo que los vectores de dispersión difieren (Buller et al., 1922; Allen et al., 1987). En el caso de las semillas, el viento es el principal medio de dispersión. En el caso de los propágulos de hongos EM, algunas especies se dispersan principalmente por viento (Peay et al., 2012), mientras que otras lo hacen a través de vectores animales, como los mamíferos (Ashkannejhad and Horton, 2006).

En el caso de los hongos cuyas esporas son dispersadas por el viento, el 95% de las esporas es depositado a no más de 1 metro de distancia del cuerpo de fructificación que las produjo (Galante et al., 2011). El resto de las esporas pueden ser dispersadas a grandes distancias, por ej. más de 6000 mts (Urcelay et al. 2017) y de modo difuso (Galante et al., 2011). No obstante, para que se forme el micelio micorrízico dicariótico, que constituye el talo perdurante en los Basidiomycota, en general es necesario que se pongan en contacto micelios primarios provenientes de dos esporas con distinta polaridad (i.e. sexo). La probabilidad de que dos esporas de distinta polaridad, transportadas por el viento a gran distancia, sean depositadas en el mismo espacio es evidentemente muy baja. Esta probabilidad puede incrementarse significativamente si la dispersión ocurre por otros medios. Cuando intervienen vectores como los mamíferos, y más precisamente aquellos de grandes proporciones como ciervos y jabalíes que poseen grandes rangos de acción, sus heces pueden concentrar grandes densidades de esporas y trasladarlas a largas distancias (Ashkannejhad and Horton, 2006; Cázares et al., 1994; Trappe and Claridge 2005). En esas masas de esporas están representadas ambas polaridades por lo que las posibilidades de formar micelio dicariótico aumentan sustantivamente cuando son dispersadas de este modo. La ingesta de los cuerpos de fructificación por parte de animales que se alimentan de ellos (Wallis et al., 2012) puede considerarse una forma eficiente de dispersión de las esporas fúngicas. Además el pasaje por el sistema digestivo de los animales micófagos puede estimular la germinación de esporas, aunque el efecto de la actividad metabólica sobre la espóra puede diferir entre especies de animales y hongos (Dighton et al. 2005; Trappe and Claridge, 2005).

En la Patagonia Argentina se ha observado que algunas especies de hongos EM exóticos son dispersadas por animales exóticos como el ciervo (*Cervus elaphus*) y el jabalí (*Sus scrofa*), (Nuñez et al., 2013, Soteras et al., 2016). Esto facilitaría la expansión de Pináceas

en la región (Nuñez et al., 2013). Sin embargo, esta dispersión y co-invasión de los pinos y sus simbiontes fúngicos EM se evidenció para distancias cortas (hasta 200 metros de las plantaciones) (Nuñez et al., 2013). Por otro lado se desconoce la potencial dispersión de hongos exóticos por parte de animales nativos.

Si bien los ecosistemas montañosos suelen estar menos invadidos, se ha observado que la expansión de plantas exóticas en gradientes altitudinales puede ser importante (por ej. Pauchard et al., 2009; Tecco et al., 2016). En el centro de Argentina, las Sierras de Córdoba presentan un gradiente altitudinal importante (500 a 2790 msnm) que está siendo afectado por la invasión de numerosas especies vegetales exóticas que fueron introducidas en los valles circundantes (Giorgis et al., 2011). Allí, extensas plantaciones de *Pinus elliottii* fueron establecidas hasta los 1700 msnm, aunque en ciertas áreas se observan individuos hasta los 1850 msnm (Giorgis et al., 2011). La ausencia de *Pinus elliottii* en altitudes superiores podría revertirse con el tiempo, ya que se ha observado que incluso a grandes distancias de las plantaciones (6000 metros) y 2200 msnm se encuentran propágulos de hongos EM en el suelo, particularmente *Suillus granulatus* y *Rhizopogon pseudoroseolus*, capaces de establecer simbiosis con pinos (Urcelay et al., 2017). Lo que se desconoce es el mecanismo por el cual esos propágulos se dispersan hasta dichas altitudes. Por ejemplo, en el caso de *Suillus*, cuyos basidiomas (cuerpos de fructificación) son epígeos, los propágulos pueden ser dispersados tanto por el viento como por animales. En el caso de *Rhizopogon*, cuyos basidiomas son hipógeos (producen generalmente debajo de la superficie del suelo), la dispersión sería exclusivamente mediada por animales (Urcelay et al., 2017; Ashkannejhad and Horton, 2006).

En este estudio se pone a prueba la hipótesis de que la dispersión de hongos ectomicorrícicos está mediada por mamíferos nativos y exóticos presentes en la región. Para ello se examinó la presencia de esporas de hongos en heces de jabalí (*Sus scrofa*), liebre (*Lepus europaeus*), y zorros (*Lycalopex spp.*), exóticos los dos primeros y nativos los últimos. Luego se utilizaron dichas heces, que provinieron de diferentes altitudes y distancias de las plantaciones, como inóculo para evaluar la colonización por hongos micorrícicos en plantines de pino. Finalmente, se identificaron los hongos ectomicorrícicos que colonizan las raíces mediante el uso de técnicas moleculares. En el caso de los zorros, en la región de estudio habitan dos especies nativas: el zorro colorado de Achala

(*Lycalopex culpaeus smithersi*), y el zorro gris (*Lycalopex gymnocercus*). Si bien el zorro gris ocupa hasta los 1400 msnm mientras que el colorado habita entre los 1500 y 2200 msnm (R. Torres com. pers.), no se establecieron diferencias entre las heces de las mismas por razones prácticas, por lo que aquí haremos referencia a *Lycalopex* sp. La selección de los vectores surge de evidencia previa (Livne-Luzon et al., 2017; Wood et al 2015; Nuñez et al., 2013) y de un análisis preliminar de las muestras de heces provenientes de diversos mamíferos.

METODOLOGÍA

Sitio de estudio

El gradiente altitudinal de las Sierras Grandes de Córdoba en el centro de Argentina, se ubica entre los 900 y 2700 msnm. Dentro de este gradiente se seleccionaron dos transectas a fin de recolectar heces de mamíferos en tres altitudes en cada una. La primer transecta se ubicó a lo largo del camino de Linderos (32° 50'S, 64° 90'W), mientras que la segunda a lo largo del camino al cerro Champaquí, desde Villa Alpina (31° 57'S, 64 ° 48 O).

El gradiente mencionado abarca diferentes cinturones de vegetación, desde los 400 a los 1300 msnm se encuentra la parte superior del bosque chaqueño serrano, entre 1300 y 1700 msnm encontramos pastizales y arbustales de montaña. Por encima de los 1700 msnm hay grandes mosaicos de pastizales de alta montaña, roquedales y bosques de *Polylepis australis*. A lo largo del gradiente, las temperaturas varían de templado a templado-frío, las temperaturas medias anuales van desde 15,7 ° C en el extremo inferior (900 msnm), cayendo a 7,4 ° C cerca de la cumbre (2700 msnm) (Marcora et al., 2008). No hay período libre de heladas sobre los 1800 msnm. La precipitación media anual varía entre 750 y 970 mm, concentrándose en los meses más cálidos desde Octubre a Abril (Cabido, 1985; Colladon et al., 2010).

Especie en estudio

Pinus elliotii es una especie nativa del sureste de Estados Unidos. La temperatura media anual en esta región es de 17 ° C. Las precipitaciones en su habitat nativo varían en torno a

los 1270 mm, concentrándose principalmente en el periodo más cálido (Burns and Honkala, 1990).

Esta conífera se introdujo en Argentina en la década de 1960, junto con otras especies de *Pinus* (Ferchmin, 1969), donde ahora se reproduce y expande naturalmente (Giorgis y Tecco, 2014). En la región se han observado varios hongos EM que fructifican en las plantaciones de *Pinus elliottii*, tales como *Rhizopogon spp.*, *Scleroderma spp.*, *Suillus spp.*, entre otras (Nouhra, 1999; Nouhra et al., 2008, 2012).

Diseño experimental

El gradiente altitudinal se dividió en tres rangos de altura para la recolección en cada transecta, de 1350 a 1650 msnm será el rango más bajo, de 1651 a 1950 msnm el rango medio y de 1951 a 2250 msnm el rango de mayor altitud. Para la elección de estas franjas altitudinales se tuvieron en cuenta las utilizadas de acuerdo al diseño de un estudio previo relacionado con éste (Urcelay et al., 2017). Además el comienzo de la segunda franja (1650 msnm) coincide con el límite superior de las plantaciones en el área de estudio. De esta manera, la franja más baja comprende la altitud de las plantaciones (aunque el muestreo se realizó en sitios sin coníferas, próximos a las mismas) y otras dos franjas a mayor altitud. De esta forma se divide el gradiente en franjas de igual rango altitudinal. En dicho gradiente se establecieron dos transectas separadas por unos 15 km en línea recta, aproximadamente.

Recolección y análisis de muestras

La recolección de heces de mamíferos se llevó a cabo en otoño del año 2016, que resulta ser la época de mayor fructificación de hongos en la región. En cada transecta, se buscaron y recolectaron muestras de diferentes mamíferos, las cuales se etiquetaron (sitio, altura y fecha) y guardaron en bolsas individuales para evitar contaminaciones.

La identificación de las heces se realizó visualmente, con la colaboración de expertos y el auxilio de bases de datos específicas (por ej. Chame 2003).

Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente y posteriormente en estufa cuando fuese necesario. Para reducir las posibilidades de la presencia de hongos saprófitos u otros

contaminantes sobre las heces, la superficie de las mismas fue removida con papel de lija, según se indica en Nuñez et al. (2013).

A partir del análisis preliminar de esporas fúngicas en las muestras de heces provenientes de diversos mamíferos que habitan el área de estudio, se seleccionaron las heces de jabalí, liebre y zorro. Para esto se realizaron preparaciones histológicas donde se colocó una solución acuosa de las heces previamente homogeneizadas. Se utilizaron reactivos tales como Azul de algodón y reactivo de Melzer.

Experimento de invernadero

Las semillas fueron provistas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Montecarlo, en Misiones. Las mismas se esterilizaron superficialmente con una solución al 10% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos, luego se sumergieron en agua por 24 horas y por último se almacenaron a 4 °C durante 45 días. Las semillas se hicieron germinar en invernadero, en bandejas plásticas con arena esterilizada en autoclave. Luego de 20 días a partir de que las semillas germinaron, los plantines fueron trasplantados a macetas individuales de 500 cm³ de capacidad.

El sustrato usado en los recipientes fue constituido por una mezcla de arena y tierra estéril (125 °C durante una hora) en partes iguales.

Se utilizaron 5 ml de heces como inóculo para cada maceta. Para los controles el inóculo fue esterilizado al igual que el sustrato. Para obtener el inóculo se molieron y homogeneizaron las muestras secas de un mismo vector para cada altura y transecta. De la mezcla se sacaron 20 ml de inóculo que fue dividido para las cuatro réplicas de cada tratamiento (5 ml por cada plantín), totalizando así 72 plantines en los tratamientos y 18 controles.

Los plantines crecieron en invernadero, bajo un rango de temperatura aproximado de entre 15 °C a 30°C, con riego automático tres veces al día y suplementados con luz artificial. Los plantines fueron rotados cada 15 días para evitar efectos de posición.

Análisis de colonización ectomicorrícica

A los 7 meses se cosecharon los plantines para su análisis en laboratorio. Las raíces fueron separadas del tallo y lavadas cuidadosamente a fin de desprenderlas del suelo. Luego se

sometieron a análisis bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico a fin de determinar la presencia y nivel de colonización (porcentaje de extremos o ápices de la raíz colonizados con hongos EM) según las metodologías descritas en: Agerer, 1991; Gehring and Whitham, 1994; Helm et al., 1999.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza a tres factores: especies animales (tres niveles), franja altitudinal (tres niveles) y Transecta (dos niveles) mediante el uso del software estadístico Infostat (Di Rienzo et al. 2012).

Dado que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y/o heterocedasticidad de la Varianza se los transformó a rangos y se aplicó el mismo modelo. En este caso constituye un análisis no paramétrico (Zar 1999). Los controles no presentaron colonización micorrícica y no fueron considerados en los análisis.

Dado que se observó interacción entre los factores “especie animal” y “franja altitudinal”, también se analizaron los datos para cada una de la especies en particular.

Análisis moleculares

El ADN fue extraído de las ectomicorrizas presentes en las puntas radicales siguiendo el protocolo con CTAB modificado de (Gardes & Bruns 1993), o usando un kit de extracción y amplificación (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Una vez extraído se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la región ITS (ITS1.5.8-ITS2), utilizando los primers específicos ITS1F Y ITS4. Los ciclos de la PCR fueron de 94 C por 5 min seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 C, 1 min a 55 C y 2 min a 72 C, seguidos por 7 min a 72 C. Los productos de la PCR se visualizaron en gel con 1.0 gr de agarosa y 7 ul de SYBR Green. Las amplificaciones obtenidas fueron enviadas para su secuenciamiento en Sanger a Macrogen (Seoul, South Korea) para purificación y secuenciamiento en un equipo ABI 3730XL. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el software de edición de secuencias BioEdit v7.0.5., y los voucher de las EM serán depositadas en CORD. Las secuencias obtenidas fueron subidas a base de datos para su comparación con secuencias de taxas más similares mediante la herramienta de búsqueda “Megablast” en Genbank ([http:// www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)).

RESULTADOS

La colonización EM ocurrió en el 52% de plantines inoculados con heces de jabalí, zorro y liebre.

En relación a los factores, no se observaron diferencias significativas entre las “transectas” sobre la colonización EM en los plantines. Por el contrario, sí se observaron diferencias entre las especies animales y las franjas altitudinales (tabla 1). El porcentaje de plantines colonizados con hongos EM decreció al aumentar la altitud (75%, 62,5% y 16,7% respectivamente)(figura 1). Los plantines inoculados con heces de las franjas altitudinales baja y media mostraron porcentajes de colonización EM significativamente mayores ($p < 0,0001$) a los inoculados con heces de la franja altitudinal más alta (figura 3). Las heces de los tres vectores contenían esporas de hongos EM viables con capacidad de colonizar las raíces, aunque en diferentes magnitudes y dependiendo de la altitud de la que provino el inóculo. Al analizar todo el gradiente, se observó que las heces de jabalí derivaron en porcentajes de colonización EM significativamente mayores (27,03%), los zorros mostraron valores intermedios (22,48%), mientras que la liebre promovió los valores más bajos (14,35%) (figura 2).

La inoculación con heces de liebre mostró porcentajes de colonización EM significativamente más altos en la franja altitudinal más baja (tabla 2). Las especies de hongos que lograron formar EM en las raíces fueron *Rhizopogon pseudoroseolus* y *Suillus granulatus* (de aquí en adelante *Rhizopogon* y *Suillus*) para las dos franjas más bajas, aunque *Suillus* solo en intermedia (tabla 5).

En el caso de las heces de zorros, la colonización EM de las raíces fue significativamente mayor para altitudes bajas e intermedias (tabla 3). En la primer franja altitudinal se identificó *Rhizopogon*, en la segunda *Rhizopogon* y *Suillus*, mientras que en la más alta y alejada sólo *Suillus* (tabla 5).

Los plantines inoculados con heces de jabalí mostraron un porcentaje de colonización EM mayor en la franja altitudinal intermedia, mientras que se observaron valores intermedios y bajos para las altitudes bajas y altas respectivamente (tabla 4). Las raíces fueron

colonizadas por *Suillus* y *Rhizopogon* en las franjas bajas e intermedias mientras que en la más alta también se observó solo *Suillus* (tabla 5).

Tabla 1: Análisis de la varianza para el porcentaje de colonización EM, en función de los factores transecta, vector y altura. En negrita valores de $p < 0,05$.

Factores	F	p-valor
Transecta	0,17	0,6815
Altura	23,48	<0,0001
Vector	4,26	0,0191
Transecta*Altura	0,45	0,6403
Transecta*Vector	1,14	0,3279
Altura*Vector	5,08	0,0015
Transecta*Altura*Vector	6,58	0,0002

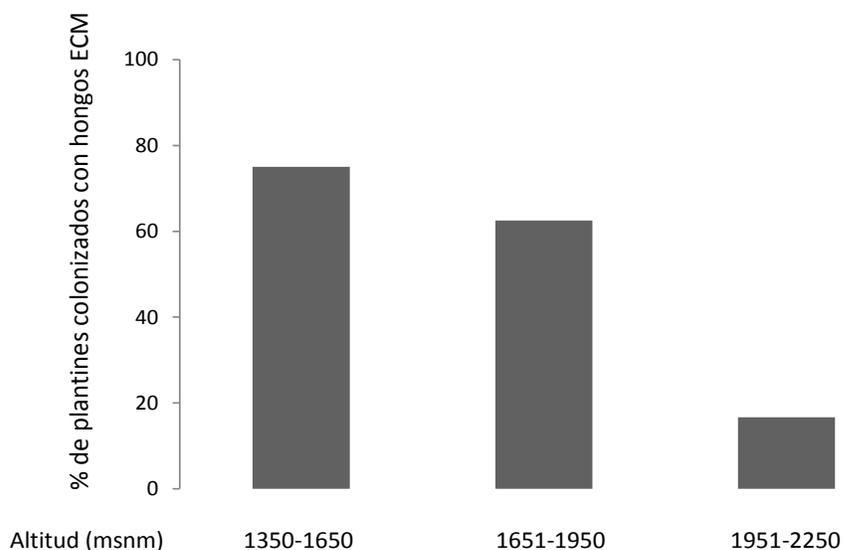


Figura 1: Porcentaje de plantines de pino que mostraron colonización EM en cada franja altitudinal.

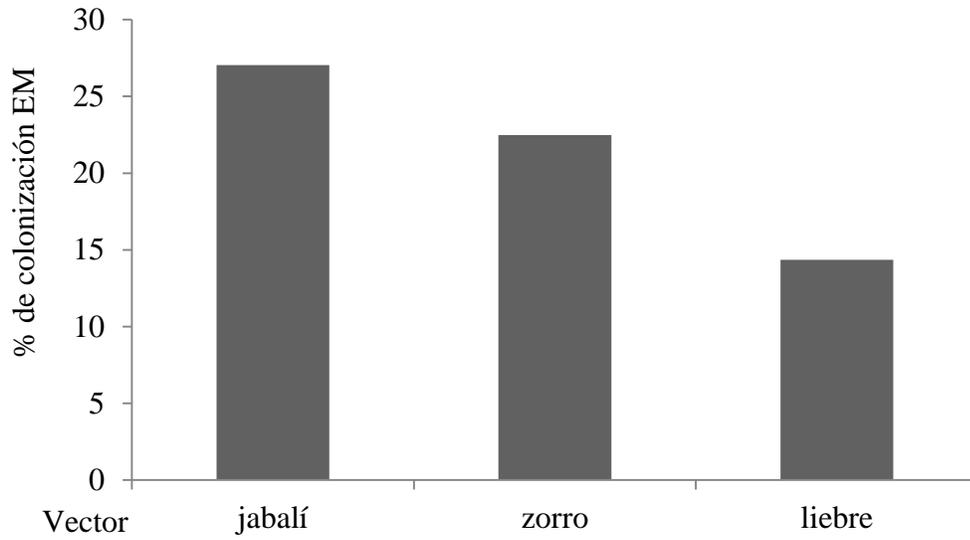


Figura 2: Porcentajes de colonización EM promedio según vector.

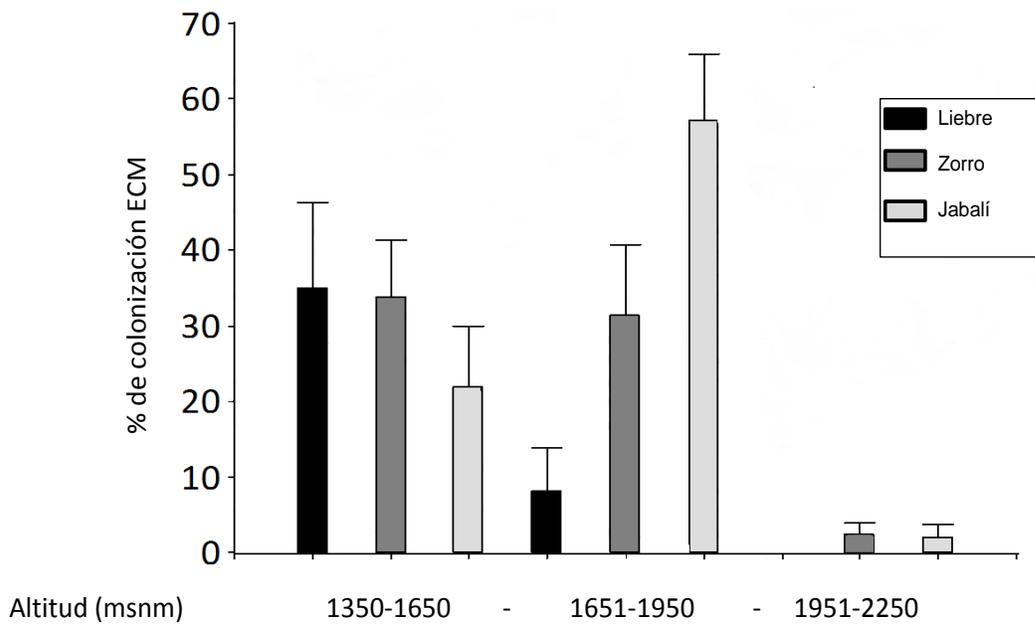


Figura 3: Porcentaje de colonización EM promedio en plantines de pino inoculados con heces de los diferentes vectores en cada franja altitudinal.

Tabla 2: Análisis de la varianza para el porcentaje de colonización EM, del vector liebre. En negrita valores de $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Factores	F	p-valor	
Transecta	3,07	0,0969	
Altura	20,71	<0,0001	
Altura	Medias	n	
1951-2250 msnm	18,00	8	A
1651-1950 msnm	26,00	8	A
1350-1650 msnm	47,38	8	B

Tabla 3: Análisis de la varianza para el porcentaje de colonización EM, del vector zorro. En negrita valores de $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Factores	F	p-valor	
Transecta	0,10	0,7552	
Altura	6,96	0,0058	
Altura	Medias	n	
1951-2250 msnm	23,13	8	A
1651-1950 msnm	44,88	8	B
1350-1650 msnm	45,13	8	B

Tabla 4: Análisis de la varianza para el porcentaje de colonización EM, del vector jabalí. En negrita valores de $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Factores	F	p-valor	
Transecta	0,53	0,4750	
Altura	10,95	0,0008	
Altura	Medias	n	
1951-2250 msnm	23,38	8	A
1350-1650 msnm	40,63	8	A B
1651-1950 msnm	60,00	8	B

Tabla 5: Taxa EM identificada a partir de los análisis moleculares de ápices radicales en plantines, según vector de inoculación y franja altitudinal de origen.

* Porcentajes menores a 90 corresponden a secuencias amplificadas de baja calidad y en general menores a 700 pb. de longitud.

Vector	Altura	Taxa EM	% similitud	Numero de acceso	
Liebre	1350-1650	<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	92	AB839391	
		<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	99	MG773823	
		<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	83*	AB839391	
	1651-1950	<i>Suillus granulatus</i>	77*	HM347656	
		<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	97	MG773821	
	1951-2250	-	-	-	
	Zorro	1350-1650	<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	91	MG773823
			<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	99	MG773823
		1651-1950	<i>Suillus granulatus</i>	99	AJ272409
<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>			93	MG773823	
<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>			90	MF773618	
1951-2250		<i>Suillus granulatus</i>	99	LT174719	
Jabalí		1350-1650	<i>Suillus granulatus</i>	100	HM036650
	<i>Suillus granulatus</i>		100	KU721246	
	<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>		99	FMG773823	
	1651-1950	<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	99	GQ267483	
		<i>Suillus granulatus</i>	99	AJ272409	
		<i>Rhizopogon pseudoroseolus</i>	99	MG773823	

	<i>Suillus granulatus</i>	98	KU721245
	<i>Suillus granulatus</i>	99	KU721244
1951-2250	<i>Suillus granulatus</i>	99	AJ272409

DISCUSIÓN

La potencial coinvasión de pinos y simbiontes fúngicos ha sido documentada en diversos trabajos previos (Nuñez et al., 2013; Nuñez et al., 2009; Dickie et al., 2010; Salgado Salomon et al., 2011; Hynson et al., 2013; Hayward et al., 2015). No obstante, la mayoría de esos estudios evidencian la dispersión de hongos EM a distancias cortas de las plantaciones (≤ 200 mts.) (Nuñez et al., 2013).

Recientemente, en montañas del centro de Argentina, se ha mostrado que hongos EM exóticos se dispersan hasta las franjas altas (por ej. 2200 msnm) y mayores distancias de las plantaciones (por ej. 6000 mts.) por lo que el inóculo fúngico no sería limitante para el establecimiento de nuevos plantines de pinos (Urcelay et al., 2017).

En esta tesina se muestra que las heces de mamíferos exóticos (jabalí y liebre) y nativos (zorro) contienen esporas de hongos ectomicorrícicos exóticos. Más aún, los inóculos con heces provenientes de hasta 5,2 km de las plantaciones en la transecta de Villa Alpina, y 8,8 km en la de Linderos (segunda franja altitudinal), pueden colonizar exitosamente y en altos porcentajes a los plantines inoculados. Incluso a distancias mayores que estas, la colonización ectomicorrícica siguió siendo efectiva, aunque significativamente más baja. Este estudio constituye el primero que pone en evidencia el papel de mamíferos nativos en la dispersión de hongos exóticos, y su potencial en la dispersión de árboles exóticos como los pinos.

La micofagia en mamíferos ha sido evidenciada en numerosos estudios (Cázares & Trappe 1994; Claridge & May 1994; Nouhra et al. 2005). Todo indica que esta asociación entre hongos y mamíferos trae beneficios para ambos, ya que las especies fúngicas logran dispersar sus esporas en grandes cantidades, mientras que el animal obtiene una fuente nutritiva de alimento (Wallis et al. 2012), en un periodo del año en el que otros ítems de su dieta pueden estar escaseando.

Estudios previos han reportado que algunos mamíferos que habitan regiones forestadas con pináceas, consumen habitualmente y dispersan hongos EM a zonas no forestadas y que sus heces funcionan como inóculo efectivo para formar asociaciones ectomicorrícicas (Nuñez et al., 2013; Livne-Luzon et al., 2017; Wood et al., 2015). En Nueva Zelanda, se ha observado un patrón similar. Esto es, algunos mamíferos exóticos provenientes de Europa o Asia contribuyen a la invasión de pinos exóticos, en una interacción novedosa entre plantas, hongos y mamíferos (Wood et al., 2015).

Nuestros resultados a partir de las heces de jabalí son consistentes con los obtenidos en Patagonia por Nuñez et al., (2013). Estos autores observaron que las heces de este animal funcionan exitosamente como inóculo ectomicorrícico a distancias cortas. Sin embargo, nuestras observaciones indican que este tipo de dispersión puede ocurrir a distancias mayores de las plantaciones. Las heces recolectadas en la franja altitudinal intermedia fueron las que derivaron en un mayor porcentaje de colonización EM. Esto podría relacionarse con el comportamiento del vector, su tamaño corporal y movimientos diarios entre 1 y 12 km, en rangos nativos (Dardaillon, 1986; Sodeikat & Pohlmeier, 2002) y no nativos (Caley, 1997; Singer et al., 1981).

En cuanto al segundo vector de origen exótico, la liebre, la micofagia ha sido escasamente documentada (Fogel y Trappe, 1978). Sin embargo, sus heces también fueron un inóculo efectivo para el desarrollo de EM, principalmente en la franja altitudinal más cercana a las plantaciones de pinos, superando incluso al Jabalí. Este potencial disminuye con la distancia, siendo nulo en la franja altitudinal más alejada. Esto podría explicarse por el menor tamaño corporal del vector como a su menor capacidad de trasladar las esporas en sus movimientos diarios (Rühe & Hohmann, 2004; Ferretti et al., 2010).

En el caso de los zorros, es probable que a altitudes bajas donde se solapan los rangos de distribución de las dos especies registradas en la región, los porcentajes de colonización EM observados sean producto de la dispersión de ambas especies. En la segunda y tercer franja altitudinal es más factible que se trate del zorro colorado de Achala (*Lycalopex culpaeus smithersi*) que se distribuye desde los 1500 a 2200 msnm, mientras que el zorro gris (*Lycalopex gymnocercus*) llega como máximo a los 1400 msnm según se ha observado en la región (R. Torres com. pers.). A su vez esta dispersión a grandes distancias de las

plantaciones puede relacionarse con el comportamiento del vector, para el cual hay registros de rangos de acción diarios entre 7,7 y 9,8 km² (Novaro 1997).

A pesar que no hay registro previo del consumo de hongos por parte de ninguna de las dos especies, se especulaba con que formarían parte de su dieta debido a sus hábitos omnívoros y oportunistas (Medel & Jaksic, 1988; Núñez & Bozzolo, 2006; Romo, 1995; Beltrán-Ortiz et al., 2017). Es importante destacar que los zorros son mamíferos nativos que no han coexistido históricamente con estos hongos, pero que muestran similares potenciales de dispersión a los del jabalí, particularmente el zorro colorado. Sin embargo, no debería descartarse que los zorros estén actuando como dispersores secundarios, y que las esporas encontradas en sus heces hayan sido en realidad consumidas por algún otro animal, como pueden ser roedores o las mismas liebres, que se alimentaron de los hongos EM previamente a ser predados por el zorro.

A pesar de la variedad de hongos EM que existen dentro de las plantaciones (Urcelay et al., 2017), solamente dos especies formaron exitosamente ectomicorrizas luego de ser consumidas e inoculadas a través de las heces de los diferentes vectores. Tanto *Suillus granulatus* como *Rhizopogon pseudoroseolus* son especies comestibles, pertenecientes a géneros reportados como colonizadores tempranos (Chu-Chow, 1979), y asociados frecuentemente a procesos de coinvasión de pinos (Hayward et al., 2015b). Estas especies exhiben diferentes estrategias de vida. Por ejemplo, *Suillus granulatus* posee basidiomas epigeos, puede presentar una dispersión mediada tanto por viento como por vectores animales como los mamíferos (Ashkannejhad and Horton, 2006). Cuando actúan los mamíferos, mediante el consumo de los basidiomas, estos concentran una gran cantidad de esporas en sus heces aumentando notablemente la probabilidad que dos esporas de diferente polaridad se encuentren en el sustrato y formen el micelio dicariótico necesario para la simbiosis EM. Además tienen la capacidad de trasladar las esporas a grandes distancias como hemos observado en este estudio. Cabe destacar que del inóculo proveniente de la franja altitudinal más elevada, solo *Suillus granulatus* logro formar EM, dato coincidente con los resultados de análisis metabarcoding de suelo reportados para la región por Urcelay et al., (2017).

En el caso de *Rhizopogon pseudoroseolus*, presenta un cuerpo de fructificación hipogeo a sub-hipogeo y su dispersión se lleva a cabo por animales principalmente (Ashkannejhad

and Horton, 2006). En este estudio las heces de los tres vectores muestran ser un inóculo viable para esta especie, pero sin alcanzar la franja altitudinal superior. Una ventaja aparente de *Rhizopogon* es la capacidad de las esporas para sobrevivir por varios años en el sustrato sin perder viabilidad (Bruns et al., 2009).

CONCLUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES

Este estudio indica que tanto mamíferos exóticos como nativos estarían contribuyendo a la dispersión del inóculo fúngico y formación de ectomicorrizas en las raíces de pinos en el gradiente de las Sierras Grandes de Córdoba.

Esta interacción entre mamíferos, hongos EM y pinos ejemplifica un caso de invasión en cascada con efectos sinérgicos en la cual la presencia de una especie exótica (liebre o jabalí), potencia las capacidades de invasión de las otras especies (hongos EM y pinos). Es de destacar la capacidad de los zorros para adaptar sus hábitos alimenticios en relación a los cambios del paisaje y disponibilidad de alimentos a los que están sometidos.

Teniendo en cuenta el potencial invasivo de los pinos, y sus impactos ambientales negativos como la alteración del régimen hídrico (Le Maitre et al., 2002; Jobbágy et al., 2013), los resultados de estudio son relevantes para el establecimiento de estrategias de manejo de los ambientes montañosos; en particular, el manejo de la vegetación y hongos exóticos y los mamíferos dispersores de hongos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, R., (1991). Characterization of ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology*. 23, 25-73.
- Allen, M. F., (1991). *The Ecology of Mycorrhizae*. Cambridge University Press (Cambridge Studies in Ecology series).
- Allen, M. F., (1987). Re-establishment of mycorrhizas on Mount St. Helens: migration vectors. *Transactions of the British Mycological Society*, 88: 413–417.

- Ashkannejhad, S., 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.
- Beltrán-Ortiz, E. P., Cadena-Ortiz, H., & Brito, J., (2017). Dieta del zorro de páramo *Lycalopex culpaeus* (MOLINA 1782) en un bosque seco interandino del norte de Ecuador.
- Buller, A. H. R., (1922). *Researches on Fungi* (vol.2). Longmans, Green and Company, London-New York.
- Burns, R. M., & Honkala, B. H., (1990). *Silvics of North America*. (Vol.1). Conifers Agriculture Handbook (*Washington*), (654).
- Bruns, T. D., Peay, K. G., Boynton, P. J., Grubisha, L. C., Hynson, N. A., Nguyen, N. H., & 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(2), 463-470.
- Cabido, M., (1985). Las comunidades vegetales de la Pampa de Achala, Sierras de Córdoba, Argentina. *Documents phytosociologiques*, 9: 431-443.
- Caley, P., (1997). Movements, activity patterns and habitat use of feral pigs (*Sus scrofa*) in a tropical habitat. *Wildlife Research*, 24(1), 77-87.
- Callaway, R. M., Thelen, G. C., Rodriguez, A., Holben, W. E., (2004). Soil biota and exotic plant invasion. *Nature*, 427: 731–733.
- Cázares, E., Trappe, J. M., (1994). Spore dispersal of ectomycorrhizal fungi on a glacier forefront by mammal mycophagy. *Mycologia*, 507–510.
- Chame, M.,(2003). Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98:71-94.
- Chu-Chow, M., (1979). Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *Soil biology and biochemistry*, 11(6), 557-562.
- Claridge, A. W., & May, T. W., (1994). Mycophagy among Australian mammals. *Austral Ecology*, 19(3), 251-275.
- Colladon, L., Felici, G. S., Pazos, I., (2010). Anuario pluviométrico 2005-2010. Cuenca del Río San Antonio. Sistema del Río Suquía - Provincia de Córdoba. Instituto Nacional

del Agua y del Ambiente (INA) y Centro de Investigaciones de la Región Semiárida (CIRSA), Córdoba, Argentina.

- Dardaillon, M., (1986). Seasonal variations in habitat selection and spatial distribution of wild boar (*Sus scrofa*) in the Camargue, Southern France. *Behavioural Processes*, 13(3), 251-268.
- Dickie, I. A., Bolstridge, N., Cooper, J. A., Peltzer, D. A., (2010). Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 187, 475-484.
- Dighton, J., White, J. F., White, J., Oudemans, P., (2005). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 3rd edn. CRC, Taylor & Francis, New York.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W., (2012). *InfoStat* version 2012, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat.
- Ferchmin, B., (1969). Forestaciones artificiales de pinos en el Valle de Calamuchita (Córdoba). Universidad Nacional de Córdoba.
- Ferretti, M., Paci, G., Porrini, S., Galardi, L., & Bagliacca, M. (2010). Habitat use and home range traits of resident and relocated hares (*Lepus europaeus*, Pallas). *Italian Journal of Animal Science*, 9(3), e54.
- Fogel, R., & Trappe, J. M., (1978). Fungus consumption (mycophagy) by small animals. *Northwest Science*, 52(1), 1-31.
- Galante, T. E., Horton, T. R., Swaney, D. P., (2011). 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field- and modeling-based study. *Mycologia*, 103: 1175–1183.
- Gardes, M., & Bruns, T. D., (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.
- Gehring, C. A., Whitham, T. G., (1994). Comparisons of ectomycorrhizae in Pinyon Pines (*Pinus edulis*; Pinaceae) across extremes of soil type and herbivory. *American Journal of Botany*, 81: 1509-1516.
- Giorgis, M. A., Tecco, P. A., Cingolani, A. M., Renison, D., Marcora, P., Paiaro, V., (2011). Factors associated with woody alien species distribution in a newly invaded mountain system of central Argentina. *Biological Invasions*, 13: 1423-1434.

- Giorgis, M. A., Tecco, P. A., (2014). Invasive alien trees and shrubs in Cordoba Province (Argentina): a contribution to the systematization of global bases. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49: 581-603.
- Handbook 654. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC.
- Hayward, J., Horton, T. R., Pauchard, A., Nuñez, M. A., (2015a). A single ectomycorrhizal fungal species can enable a *Pinus* invasion. *Ecology* 96: 1438-1444.
- Hayward, J., Horton, T. R., Nuñez, M. A., (2015b). Ectomycorrhizal fungal communities co-invading with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytologist*, 208: 497-506.
- Helm, D. J., Allen, E. B., Trappe, J. M., (1999). Plant growth and ectomycorrhiza formation by transplants on deglaciated land near Exit Glacier, Alaska. *Mycorrhiza*, 8: 297-304.
- Hynson, N. A., Merckx, V. S. F. T., Perry, B. A., Treseder, K. K., (2013). Identities and distributions of the co-invading ectomycorrhizal fungal symbionts of exotic pines in the Hawaiian Islands. *Biological Invasions*, 15: 2373-2385.
- Jobbágy, E.G., Acosta, A.M., Noretto, M.D., (2013). Rendimiento hídrico en cuencas primarias bajo pastizales y plantaciones de pino de las sierras de Córdoba (Argentina). *Ecología Austral*, 23, 87-96.
- Le Maitre, D.C., van Wilgen, B.W., Gelderblom, C.M., Bailey, C., Chapman, R.A., Nel, J.A., (2002). Invasive alien trees and water resources in South Africa: case studies of the costs and benefits of management. *Forest Ecology and Management*, 160, 143-159.
- Levine, J. M., Vila, M., Antonio, C. M., Dukes, J. S., Grigulis, K., & Lavorel, S., (2003). Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: 775-781.
- Livne-Luzon, S., Avidan, Y., Weber, G., Migael, H., Bruns, T., Ovadia, O., & Shemesh, H., (2017). Wild boars as spore dispersal agents of ectomycorrhizal fungi: consequences for community composition at different habitat types. *Mycorrhiza*, 27(3), 165-174

- Marcora, P., Hensen, I., Renison, D., Seltsmann, P., Wesche, K., (2008). The performance of *Polylepis australis* trees along their entire altitudinal range: implications of climate change for their conservation. *Diversity & Distributions*, 14: 630-636.
- Medel, R. G., & Jaksic, F. M., (1988). Ecología de los cánidos sudamericanos: una revisión. *Revista chilena de historia natural*, 61(1), 67-79.
- Molina R., Massicotte H., Trappe J. M., (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community- ecological consequences and practical implications. *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*, 357– 423.
- Nouhra, E., (1999). Novedades en Boletaceas de la Argentina. *Kurtziana*, 27: 403-423.
- Nouhra, E., Dominguez, L., Daniele, G., Longo, S., Trappe, J., Claridge, A., (2008). Occurrence of exotic ectomycorrhizal hypogeous fungi in Central Argentina. *Mycologia*, 100: 746-753.
- Nouhra, E.R., Domínguez, L.S., Becerra, A.G., Trappe, J.M., (2005). Morphological, molecular and ecological aspects of the South American hypogeous fungus *Alpova austroalnicola* sp. nov. *Mycologia* 97, 598e604.
- Nouhra, E., Hernández, L., Pastor, N., Crespo, E., (2012). The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus* forest. *Mycologia*, 104: 488-495.
- Novaro, A. J., (1997). *Pseudalopex culpaeus*. *Mammalian species*, (558), 1-8.
- Núñez, M. A., Horton, T. R., Simberloff, D., (2009). Lack of belowground mutualisms hinders *Pinaceae* invasions. *Ecology*, 90: 2352-2359.
- Núñez, M. A., Hayward, J., Horton, T. R., Amico, G. C., Dimarco, R. D., Barrios- Garcia, M. N., Simberloff, D., (2013). Exotic mammals disperse exotic fungi that promote invasion by exotic trees. *PLoS One*, 8(6), e66832.
- Núñez, M. A., Dickie, I. A., (2014). Invasive belowground mutualists of woody plants. *Biological Invasions*, 16: 645-661.
- Núñez, M. B., & Bozzolo, L., (2006). Descripción de la dieta del zorro gris, *Pseudalopex griseus* (Canidae) (Gray, 1869), en el Parque Nacional Sierra de las Quijadas, San Luis, Argentina. *Gayana (Concepción)*, 70(2), 163-167.
- Pauchard, A., Kueffer, C., Dietz, H., Daehler, C., Alexander, J. M., Edwards, P. J., Arévalo, J. R., Cavieres, L. A., Guisan, A., Haider, S., et al., (2009). Ain't no mountain high

- enough: plant invasions reaching new elevations? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7: 479-486.
- Peay, K. G., Schubert, M. G., Nguyen, N. H., Bruns, T. D., (2012). Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology*, 16: 4122-4136.
- Rejmánek, M., Richardson, D. M., (2013). Trees and shrubs as invasive alien species e update of the global database. *Diversity and Distributions*, 19(8): 1093-1094.
- Richardson, D. M., (1998). Forestry trees as invasive aliens. *Conservation Biology*, 12: 18-26.
- Richardson, D. M., Allsopp N, D'Antonio CM, Milton SJ, Rejmánek M., (2000). Plant invasions - the role of mutualisms. *Biological Reviews*, 75: 65-93.
- Richardson, D. M., (2006). *Pinus*: a model group for unlocking the secrets of alien plant invasions? *Preslia* 78, 375-388.
- Romo, M. C., (1995). Food habits of the Andean fox (*Pseudalopex culpaeus*) and notes on the mountain cat (*Felis colocolo*) and puma (*Felis concolor*) in the Rio Abiseo National Park, Peru. *Mammalia*, 59(3), 335-344.
- Rühe, F., & Hohmann, U., (2004). Seasonal locomotion and home-range characteristics of European hares (*Lepus europaeus*) in an arable region in central Germany. *European Journal of Wildlife Research*, 50(3), 101-111.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sannwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., et al., (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.
- Salgado Salomón, M. E., Barroetaveña, C., Rajchenberg, M., (2011). Do pine plantations provide mycorrhizal inocula for seedlings establishment in grasslands from Patagonia, Argentina? *New Forests*, 41: 191-205.
- Singer, F. J., Otto, D. K., Tipton, A. R., & Hable, C. P., (1981). Home ranges, movements, and habitat use of European wild boar in Tennessee. *The Journal of Wildlife Management*, 343-353
- Smith, S. E., Read, D., (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, third ed. Academic Press, Cambridge, UK.

- Sodeikat, G., & Pohlmeyer, K., (2002). Temporary home range modifications of wild boar family groups (*Sus scrofa L.*) caused by drive hunts in Lower Saxony (Germany). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 48(1), 161-166.
- Soteras, F., Ibarra, C., Geml, J., Barrios-García, M. N., Domínguez, L. S., & Nouhra, E. R., (2016). Mycophagy by invasive wild boar (*Sus scrofa*) facilitates dispersal of native and introduced mycorrhizal fungi in Patagonia, Argentina. *Fungal Ecology*, 26, 51-58.
- Tecco, P. A., Pais-Bosch, A. I., Funes, G., Marcora, P., Zeballos, S. R., Cabido, M., Urcelay, C., (2016). Mountain invasions on the way: are there climatic constraints for the expansion of alien woody species along an elevation gradient in Argentina? *Journal of Plant Ecology*,9(4), 380-392
- Trappe, J. M., Claridge, A. W., (2005). Hypogeous fungi: evolution of reproductive and dispersal strategies through interactions with animals and mycorrhizal plants. In: Dighton J, White JF, Oudemans P (eds) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 3rd edn. CRC, Taylor & Francis, New York, pp 613–626.
- Urcelay, C., Longo, S., Geml, J., Tecco, P. A., & Nouhra, E., (2017). Co-invasive exotic pines and their ectomycorrhizal symbionts show capabilities for wide distance and altitudinal range expansion. *Fungal Ecology*,25: 50-58.
- Vellinga, E. C., Wolfe, B. E., Pringle, A., (2009) Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181: 960–973.
- Wallis, I. R., Claridge, A. W., & Trappe, J. M. (2012). Nitrogen content, amino acid composition and digestibility of fungi from a nutritional perspective in animal mycophagy. *Fungal biology*, 116(5), 590-602.
- Wood, J. R., Dickie, I. A., Moeller, H. V., Peltzer, D. A., Bonner, K. I., Rattray, G., & Wilmshurst, J. M., (2015). Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. *Journal of Ecology*, 103(1), 121-129.
- Zar, J. H., (1999). *Biostatistical analysis*. Pearson Education India.