



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

INVASIONES SUBTERRÁNEAS
Co-invasión de pinos y sus hongos
ectomicorrícicos

Trabajo de Tesis para optar al Título de
Doctor en Biología

2019

Lic. Nahuel Policelli

Doctorando

Dr. Martín A. Nuñez

Director

Dr. Thomas Kitzberger

Codirector

"[...] Estamos hechos de historias"

Eduardo Galeano

Agradecimientos

A la Universidad pública, gratuita y de excelencia, de la que me gradué y en la que luego transité este camino como estudiante de doctorado. En especial, a la Universidad Nacional del Comahue, en la cual me hicieron sentir como en casa desde el primer día del doctorado. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca interna doctoral otorgada. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento (PICT 2014-0662, PICT 2016-1412, PICT 2018-0329) que permitió la realización de gran parte de esta tesis y de proyectos relacionados. Al Programa de Becas Fulbright y al Ministerio de Educación de la Nación por la beca para estancias cortas de investigación en Estados Unidos en el marco de esta tesis. A CONICYT, Chile, por el apoyo económico brindado (FONDECYT 2014-1140485). A la Administración de Parques Nacionales, con la que he trabajado en conjunto desde el primer momento, por el apoyo logístico y por darme la posibilidad de involucrarme en aspectos aplicados de mi tema de trabajo.

A mí director, Martín Nuñez. Gracias por abrirme las puertas de este maravilloso mundo académico. Gracias por el tiempo que le dedicas a formar gente, pero sobre todo gracias por tu calidad humana. Martín es, además de un referente en ecología de invasiones, una excelente persona, y eso facilita mucho el tránsito en este largo proceso del doctorado. Gracias por todas las oportunidades brindadas con absoluta generosidad y por haberme permitido trabajar con total libertad desde el inicio. Aún quedan muchas ideas para pensar juntos, sin duda. Extiendo el agradecimiento a mi codirector, Thomas Kitzberger, por recibir y responder aquel primer email de contacto y por acompañarme en mis primeras incursiones lacustres; lo que me he empapado en esa lancha será difícil de olvidar. Gracias por la paciencia y la buena predisposición.

A los profesionales que me han acompañado en algún momento de este proceso académico. Por las salidas de campo, los asados, las cervezas, los cumpleaños compartidos trabajando, los viajes, o las pasantías de investigación. En especial, a Tom Bruns y Tom Horton, dos referentes en mi

carrera a los cuales admiro por lo académico y por lo humano. Al grupo de Ecología de Invasiones, al que considero un hogar más. A los integrantes de la South American Mycorrhizal Research Network, en especial al Comité Organizador del II Simposio Internacional de Micorrizas en Bariloche, con el cual trabajamos incansablemente y formamos un hermoso grupo. A mis ayudantes de campo, por el trabajo desde muy temprano y por la predisposición y la generosidad. Me alegra pensar que muchos de esos ayudantes hoy están incluidos en un párrafo aparte de estos agradecimientos, porque se han convertido en grandes amigos.

A Bariloche. A su irrespetuosa majestuosidad. Vivir y trabajar en la exuberancia de la naturaleza es un regalo único. La Patagonia es definitivamente mi lugar, con su hostilidad y su belleza. Bariloche cumple un ciclo para mí, pero ha marcado sin duda una etapa inolvidable.

Al teatro, y a su magia. Por reconectarme conmigo y enseñarme el valor del oficio. Por abrir infinitas puertas y romper mis estructuras, aunque sea por un rato.

A mis amigos de toda la vida. Por enseñarme que la distancia es un factor que jamás va a quebrar la hermandad y la complicidad que nos tenemos. Porque es posible no verse por un año y llegar a hablar como si nos hubiéramos visto ayer. Crezco con y gracias a ustedes.

A mis nuevos amigos de toda la vida. Los que me acompañaron en vivo y en directo y en el día a día. Los que me tocaron la puerta a las 2 am para darme un abrazo. Los que compartieron cenas en casa, birras afuera, caminatas, o helados en el centro cívico. Gracias por soportar mi verborragia y mi locura. Y gracias por sostener mí día a día.

A papá, que trascendió, y que me dejó tranquilo con la idea de que no está arriba, ni abajo, ni acá, ni allá, que está genuinamente en mí, a partir de lo que fue. Termina una parte que viví sin él, y empieza otra en dónde estoy más con el que antes. Y porque tenías razón cuando me viste llegar cargado con kilos y kilos de suelo del campo... lo de las islitas iba a dar lo mismo si agarraba tierra del fondo de casa.

A mamá, por su fortaleza y su acompañamiento. Por ser mi modelo a seguir. Por visitarme estando lejos y por procurar estar cerca a la distancia. Descubrir nuevamente la relación madre hijo desde la vida adulta es un aprendizaje permanente, gracias por ayudarme a seguir creciendo.

A Oli, a quien amo desde el momento en que lo sostuve en brazos por primera vez. Gracias por conectarme con lo verdadero a lo largo de este camino. A mi hermano y a mi cuñada por darme la oportunidad de ser tío.

A mi amor. A la familia que elijo. A mi compañera de locuras. Por la paciencia, por la madurez, por entender y acompañar, por las despedidas eternas en las terminales, por los emoticones inventados de WhatsApp para engañar lo que nos extrañamos, pero también por los viajes, desayunos y risas juntos. Gracias amiga, gracias amor, ahora empezamos juntos una nueva etapa que seguro va a ser otra de nuestras anécdotas. Te amo Clara.

A todos ellos, GRACIAS.

Nahue.

Resumen

Las invasiones biológicas son un problema ecológico y económico a escala global. En el caso de las invasiones de plantas, uno de los aspectos menos explorados es el rol de las interacciones bióticas subterráneas en determinar el éxito o fracaso de la invasión. En este trabajo de tesis se estudian aspectos ecológicos de los hongos ectomicorrícicos (EM) que determinan el éxito de su co-invasión con especies de la familia Pinaceae. En particular, se plantea si la identidad de las especies de hongos EM no nativos es relevante para facilitar la invasión. Se estudia cómo la dispersión de hongos EM no nativos mediada por mamíferos no nativos puede facilitar la invasión de pinos. A su vez, se indaga en cómo afecta la invasión de hongos EM el crecimiento de hospedadores nativos, y en la posibilidad de que hospedadores nativos se asocien con hongos EM no nativos invasores y vice-versa. A partir de una revisión bibliográfica, ensayos en invernadero y cámara de cultivo, muestreos de raíces a campo, y análisis moleculares, los resultados obtenidos muestran que la presencia de un grupo particular de hongos EM, los hongos suilloides –nativos del hemisferio norte- es un factor determinante del éxito de invasión de pinos en ecosistemas aún no invadidos. Incluso en ausencia de ungulados no nativos, capaces de dispersar sus esporas, estos hongos están presentes en sitios lejanos de la fuente de inóculo y son capaces de colonizar nuevos hospedadores, facilitando su invasión. La asociación con hongos EM suilloides invasores también se da en pinos creciendo en suelo proveniente de sitios de bosque nativo no invadido por pinos, que desarrollan igual biomasa que los pinos creciendo en suelo proveniente de sitios invadidos. A su vez, los hospedadores nativos del género *Nothofagus* se asocian con hongos EM nativos tanto en sitios invadidos como no invadidos por pinos, no habiéndose encontrado colonización cruzada. Asimismo, se sugiere un plan de manejo adaptativo y se analizan medidas tendientes a prevenir, contener y/o mitigar la invasión de hongos EM, evaluando un caso de estudio llevado a cabo en forma conjunta con la Administración de Parques Nacionales a escala local. Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren que la invasión de algunas especies de plantas puede estar explicada en parte por los rasgos ecológicos de sus simbioses específicos.

Abstract

Biological invasions are an ecological and economic problem on a global scale. In the case of plant invasions, one of the least explored aspects is the role of belowground biotic interactions in conditioning the invasion success or failure. In this thesis I study the ecological aspects of ectomycorrhizal fungi (EMF) that determine their invasion success with species of the Pinaceae family. In particular, I studied whether the identity of the EMF species influences the success of co-invasion. I analyzed how the dispersion of non-native EMF mediated by non-native mammals can facilitate the invasion of pines. I investigated how the invasion of EMF affects the growth of native hosts and I addressed the possibility of native hosts being associated with invading non-native EMF and vice versa. Using a bibliographic review approach, greenhouse and growth chamber bioassays, field sampling, and molecular analysis, the results obtained show that the presence of a particular group of EMF, suilloid fungi - native to the northern hemisphere - is a key factor of the success of pine invasion in uninvaded ecosystems. Even in the absence of non-native ungulates, capable of dispersing their spores, these fungi are present at sites far from the inoculum source and are able to colonize new hosts, facilitating their invasion. The association with non-native invasive suilloid fungi also occur in pine trees growing in soil from uninvaded native forest sites, which have the same biomass than pine trees growing in soil from invaded sites. In turn, native *Nothofagus* hosts are associated with native EMF both in soil from pine invaded and uninvaded sites, with no cross colonization found. In addition, I suggest an adaptive management plan and I analyze management actions to prevent, contain and or mitigate the invasion of non-native EMF, in turn evaluating a local case study carried out jointly with the National Park Administration. The results obtained in this thesis suggest that the invasion of some plant species may be explained in part by the ecological traits of their specific symbionts.

Índice temático

Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Capítulo 1 – Introducción general.....	1
1.1 Las invasiones biológicas	1
1.2 El suelo como sistema complejo.....	3
1.4 Interacción planta – suelo	4
1.5 Hongos micorrícicos	5
1.6 Co-invasión.....	7
1.7 Co-invasión de pinos y hongos ectomicorrícicos	10
1.8 Objetivo general y estructura de la tesis.....	13
Capítulo 2 - Hongos suilloides como promotores de la invasión de pinos a escala global	15
2.1 Resumen	15
2.2 Introducción	15
2.3 ¿Puede un grupo particular de hongos ectomicorrícicos facilitar la invasión global de pinos?	18
2.4 ¿Qué factores pueden explicar el éxito de los hongos suilloides?.....	36
2.4.1 Dispersión abiótica a grandes distancias	36
2.4.2 Dispersión biótica mediada por mamíferos	38
2.4.3 Banco de esporas resistente.....	39
2.4.4 Esporas sensibles a la presencia del hospedador que garantizan una colonización rápida de la raíz.....	41
2.4.5 Tipo exploratorio a largas distancias	42
2.5 Preguntas a futuro	43
2.5.1 Causalidad	43
2.5.2 Diversidad	44

2.5.3 Liberación de enemigos naturales	44
2.5.4 Tiempo de retardo e invasiones fallidas	45
2.5.5 Efectos de legado de las invasiones de pinos.....	46
2.6 Conclusiones	46
Capítulo 3 – Dispersión de hongos ectomicorrícicos invasores mediada por ungulados no nativos	48
3.1 Resumen	48
3.2 Introducción	49
3.3 Metodología	51
3.3.1 Sitio de estudio.....	51
3.3.2 Elección de sitios de muestreo.....	52
3.3.3 Muestreos de vegetación	54
3.3.4 Muestreo de pellets fecales.....	54
3.3.5 Colecta de suelos.....	55
3.3.6 Ensayo de invernadero	56
3.3.7 Identificación de las especies de hongos EM.....	57
3.3.8 Análisis de datos	58
3.4 Resultados	60
3.4.1 Vegetación	60
3.4.2 Signos de presencia de herbívoros	63
3.4.3 Ensayo de invernadero – Biomasa y colonización por hongos EM..	64
3.5 Discusión	69
Capítulo 4 – Invasión de hongos EM en bosques nativos: tanto <i>Nothofagus</i> <i>antarctica</i> como <i>Pinus contorta</i> pueden encontrar simbiontes ectomicorrícicos compatibles en áreas cercanas dominadas por la otra especie	75
4.1 Resumen	75
4.2 Introducción	76
4.3 Metodología	77

4.3.1 Sitio de estudio.....	77
4.3.2 Colecta de muestras de suelo.....	78
4.3.3 Ensayo en cámara de cultivo	79
4.3.4 Muestreo de raíces in situ	81
4.3.5 Identificación de las especies de hongos EM.....	82
4.3.6 Análisis de datos	82
4.4 Resultados.....	83
4.5 Discusión	88
Capítulo 5 – Manejo adaptativo de hongos ectomicorrícicos invasores en bosques nativos – Lecciones de la experiencia en el Parque Nacional Lago Puelo	93
5.1 Resumen	93
5.2 Introducción	94
5.3 Una primera aproximación al manejo de hongos EM invasores – La experiencia en Lago Puelo	95
5.3.1 Sitio de estudio.....	96
5.3.2 Reportes de invasión y acciones de manejo	97
5.3.3 Identificación taxonómica	98
5.3.4 Resultados de la experiencia en Lago Puelo	99
5.3.5 Lecciones de la experiencia en el Parque Nacional Lago Puelo	100
5.4 ¿Cómo manejar la invasión de hongos ectomicorrícicos?	103
5.4.1 Prevención	103
5.4.2 Erradicación	106
5.4.3 Contención	107
5.4.4 Mitigación	107
5.4.5 Prioridades de manejo	109
5.5 Conclusiones	109
Capítulo 6 – Discusión general.....	111

Bibliografía	117
Material suplementario	137
Material suplementario del Capítulo 3.....	137
Material suplementario del Capítulo 4.....	145
Anexo – Artículo científico de respaldo	158

Capítulo 1 – Introducción general

1.1 Las invasiones biológicas

El mundo actual está caracterizado por una intensa actividad antrópica, la cual conlleva al constante movimiento de organismos que son introducidos en áreas que están por fuera de su rango natural de distribución. Ya sea intencional o accidental, este movimiento elude los mecanismos de dispersión natural de los organismos y las posibles barreras biogeográficas existentes (Mack et al. 2000, Richardson et al. 2008). De los organismos que son introducidos, sólo unos pocos logran establecerse, naturalizarse y eventualmente invadir en las regiones dónde son transportados (Blackburn et al. 2011, Jeschke y Pysek 2018). Sin embargo, las poblaciones que logran invadir constituyen un grave problema a escala global (Lockwood et al. 2007, Simberloff et al. 2013, Gallien y Carboni 2017). Luego de más de 60 años de la publicación de *The Ecology of Invasions by animals and plants* (Elton 1958), que inició el estudio sistemático de las invasiones biológicas, la invasión de especies no nativas (según Richardson et al. 2000) es en la actualidad reconocida como una de las principales causas de cambio global.

La invasión de especies no nativas tiene consecuencias ecológicas, económicas y socio-culturales. Las especies no nativas invasoras pueden reducir la diversidad de especies nativas (Vilà et al. 2011, Pyšek et al. 2012), influir en la variación genética de las poblaciones locales por hibridación (Vilà et al. 2000), o interferir en las redes de polinización, dispersión u otras asociaciones mutualistas de la comunidad nativa (Traveset y Richardson 2006, 2014). Las especies invasoras también pueden afectar los ciclos biogeoquímicos (Vilà et al. 2011), los regímenes de disturbio (Simberloff 2011), y la productividad de los ecosistemas (Vilà et al. 2011, Simberloff et al. 2013). Las alteraciones producidas por algunas invasiones biológicas pueden impactar negativamente sobre los servicios que provee el ecosistema (Ehrenfeld 2010) y provocar un efecto negativo sobre la salud y el bienestar humano (Pyšek y Richardson 2010). Las invasiones biológicas son, a su vez, económicamente costosas (Pimentel et al. 2005). Si bien la estimación de costos económicos es compleja y puede tomar en cuenta diversos factores, se han reportado,

producto de las invasiones biológicas, costos superiores a los 13 billones de dólares anuales en Australia (Hoffmann y Broadhurst 2016), 1.7 billones de Libras Esterlinas anuales en Inglaterra (Williams et al. 2010), llegando a 120 billones de dólares anuales en Estados Unidos (Pimentel et al. 2005). Además del costo ecológico y económico, la pérdida de diversidad local y el reemplazo de especies nativas conllevan en muchos casos a la pérdida de la identidad cultural de los sitios invadidos (Simberloff et al. 2013, Rozzi et al. 2018), el reemplazo de usos y costumbres de las comunidades, y el impacto sobre servicios ecosistémicos relacionados al turismo, la cultura, y el esparcimiento (Pejchar y Mooney 2009). Debido a estos impactos a nivel global, y a la importancia de los mecanismos ecológicos involucrados en la invasión, una de las principales preguntas de la ecología de invasiones como disciplina continúa siendo por qué algunas poblaciones de especies introducidas son exitosas en su invasión, mientras que otras no logran serlo (Kolar y Lodge 2001, Pyšek et al. 2008).

El problema global de las invasiones biológicas ha sido mayormente abordado desde los procesos que ocurren por encima del suelo (Bohlen 2006, Rundel et al. 2014, Wardle y Peltzer 2017). La invasión de animales y plantas ha recibido una gran atención por ser organismos conspicuos y tener impactos visibles (Brussaard 1997). Sin embargo, las invasiones bajo el suelo también ocurren y están al menos tan ampliamente distribuidas como las que ocurren sobre el suelo (Callaway et al. 2004, Simberloff et al. 2013). Lombrices, insectos, y hongos entre otros organismos que habitan el suelo son transportados por los humanos, la mayoría de las veces de forma inadvertida, se establecen en nuevos hábitats, se reproducen, y expanden su rango de distribución (Lockwood et al. 2007, Blackburn et al. 2011). Las especies invasoras que habitan el suelo pueden determinar el ensamble de las comunidades por encima del mismo e impactar en los procesos ecosistémicos (Wardle et al. 2004, Bohlen 2006, van der Putten et al. 2007, Suding et al. 2013, Wardle y Peltzer 2017, Peay 2018). Dada su naturaleza críptica y las dificultades metodológicas en su estudio, las invasiones subterráneas, los procesos involucrados, y su impacto, están escasamente reportados y estudiados en la literatura, con algunas excepciones en el caso de microbios patógenos (Reinhart y Callaway 2006, Inderjit y van der Putten 2010). En este

trabajo de tesis se indagará sobre aspectos subterráneos de las invasiones biológicas. En este primer capítulo se desarrollan conceptos esenciales para facilitar la comprensión del trabajo.

1.2 El suelo como sistema complejo

El suelo posee características únicas que lo convierten en un sistema diferente a cualquier otro encontrado en la biosfera, conteniendo una alta diversidad de organismos que es susceptible a los cambios producidos por el ser humano. El suelo es un ambiente altamente heterogéneo, que posee restricciones en cuanto a la disponibilidad de recursos alimenticios y limitantes espaciales al movimiento, la respiración y la alimentación (Wall et al. 2012). La estructura del suelo es un condicionante para los organismos que lo habitan, y es a su vez influenciada por ellos (Brussaard 1997). La heterogeneidad química, física y espacial del suelo como hábitat y las múltiples adaptaciones de los organismos a este ambiente complejo, probablemente sean la causa de su gran diversidad (Young y Crawford 2004, Wall et al. 2012). Sólo en términos de tamaños por ejemplo, el suelo es habitado por organismos de menos de 100 μm en el caso de los microbios (ej. bacterias, arqueas y hongos) y la microfauna (ej. protozoarios, nematodos), de entre 100 μm y 2 mm para la mesofauna (ej. colémbolos), de más de 2 mm para la macrofauna (ej. lombrices, miriápodos, e insectos) y tamaños superiores a los 2 cm para la megafauna (ej. pequeños mamíferos). Cambios inducidos por el ser humano, como la urbanización, la agricultura, la desertificación, la deforestación, o la invasión de especies no nativas afectan la diversidad de organismos que habitan el suelo, así como su estructura y función (Bardgett y van der Putten 2014).

Los organismos del suelo no tienen una distribución uniforme. Por muchos años, y en el caso particular de los microorganismos, la ecología del suelo se ha desarrollado bajo la premisa de que “todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona” (Baas-Becking 1934). En las últimas décadas, la evidencia ha demostrado que las bacterias, los protistas (Bates et al. 2013), los hongos micorrícicos (Öpik et al. 2006, Tedersoo et al. 2010, 2014), y la fauna del suelo (Wu et al. 2011) tienen distribuciones globales restringidas debido a variaciones climáticas, edáficas y de las comunidades de plantas. Ejemplo

claro de esto, son algunas especies de plantas no nativas que logran escapar de los patógenos del suelo en su rango introducido, o necesitan de sus mutualistas del suelo específicos para lograr establecerse y, en algunos casos invadir (Callaway et al. 2004, Maron et al. 2015, Dawson y Schrama 2016). Los patrones de distribución de las especies que habitan el suelo están determinados por factores ambientales, procesos poblacionales, disturbios y eventos de recolonización, que operan a diferentes escalas espaciales y temporales (Bardgett y van der Putten 2014). La escala espacial de estos procesos puede ir desde milímetros en la rizósfera o en los poros del suelo hasta cientos de metros a escala regional (Ettema y Wardle 2002). La escala temporal considera desde variaciones durante un mismo día hasta aquellas en las que están involucradas décadas o milenios (Bardgett y van der Putten 2014). Esta heterogeneidad espacial y temporal que presenta el suelo influye en el crecimiento y en la estructura de las comunidades de plantas que crecen sobre él.

1.4 Interacción planta – suelo

Las plantas influyen sobre la biota del suelo, y la biota del suelo afecta diferencialmente el desempeño de las plantas (Kulmatiski et al. 2008, Bever et al. 2010, van der Putten et al. 2013). Esta interacción puede resultar negativa o positiva para la planta, dependiendo del balance entre los efectos negativos de los patógenos, los herbívoros y los parásitos que habitan el suelo, y los efectos positivos de los organismos que resultan generalmente beneficiosos como los hongos micorrícicos y las bacterias fijadoras de nitrógeno (Klironomos 2002, Suding et al. 2013). A su vez, estos efectos pueden diferir en su intensidad entre distintas especies de plantas (Bever et al. 2009) y de acuerdo al contexto en el que ocurren (Hausmann y Hawkes 2009). Las interacciones planta-suelo tienen un papel clave en la dinámica de la comunidad de plantas, incluyendo procesos de sucesión (Kardol et al. 2006), restauración (Eviner y Hawkes 2008, Kardol y Wardle 2010), e invasión (Klironomos 2002, Callaway et al. 2004, Wolfe y Klironomos 2005). En el contexto de invasiones biológicas, las interacciones planta-suelo podrían beneficiar o perjudicar diferencialmente a las especies no nativas en comparación con las nativas, facilitando o dificultando su invasión respectivamente (Kulmatiski et al. 2008, Suding et al.

2013, van der Putten et al. 2013, Gundale et al. 2014a, Inderjit y Cahill 2015, Crawford et al. 2019).

1.5 Hongos micorrícicos

Las asociaciones micorrícicas son una de las interacciones simbióticas más generalizadas entre las plantas y diversos grupos de hongos que habitan el suelo. Esta interacción ocurre entre las hifas de ciertos hongos, denominados hongos micorrícicos, y los órganos subterráneos de los gametofitos de muchas briofitas y pteridiofitas, así como las raíces de la mayoría de las plantas con semilla, y los esporofitos de la mayoría de las pteridiofitas. Las asociaciones micorrícicas están involucradas principalmente en la absorción de nutrientes y agua del suelo que el hongo le provee a la planta a cambio de compuestos carbonados (Smith y Read 2008). La evidencia muestra que las micorrizas constituyen el principal medio de absorción para las plantas, estando presente incluso en las primeras plantas terrestres que no poseían raíces verdaderas (Strullu-Derrien et al. 2018). Los hongos micorrícicos son miembros de la vasta comunidad de organismos que colonizan la rizósfera, estableciendo una íntima asociación con la raíz. La condición micorrícica, a diferencia de las simbiosis con parásitos, es el estado normal de la mayoría de las plantas bajo la mayoría de las condiciones ecológicas (Smith y Read 2008). Descripta como una asociación simbiótica, la asociación micorrícica puede variar a lo largo de la ontogenia de una planta en un continuo entre el parasitismo y el mutualismo (Johnson et al. 1997).

Las micorrizas se clasifican de acuerdo al simbionte fúngico involucrado y al tipo de asociación que establecen con la planta, estando algunos grupos asociados a ciertos taxones particulares de plantas. La clasificación vigente separa a las micorrizas en: arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides, y orquideoides (Smith y Read 2008). Las micorrizas arbusculares son el tipo más común de micorrizas y se dan entre la gran mayoría de grupos de plantas, y hongos del *phylum* Glomeromycota (Schüßler et al. 2001). Los hongos micorrícicos arbusculares forman estructuras típicas (arbúsculos, vesículas, y/o *coils*) dentro y entre las células corticales de la raíz o del talo. A diferencia de las micorrizas arbusculares, las ectomicorrizas están caracterizadas por la presencia de tres estructuras

principales: un manto compuesto de hifas que rodea el ápice de raíz colonizado, una red de hifas que se desarrollan entre las células de la epidermis y de la corteza de la raíz denominada red de Hartig, y una porción de micelio extraradical que forma conexiones con el suelo y con los esporocarpos de los hongos ectomicorrícicos (Smith y Read 2008, Figura 1.1). Tanto el manto como el micelio extraradical son utilizados como una primera aproximación morfológica en la caracterización de la colonización de la raíz (Agerer 2001). Una gran diversidad de hongos forman ectomicorrizas, estando la mayoría agrupados dentro de los Basidiomycetes y de los Ascomycetes (Smith y Read 2008). Las plantas que se asocian a estos hongos son por lo general leñosas, que habitan altas latitudes y alturas, y si bien representan solo el 2 % de las especies de plantas aproximadamente (Brundrett y Tedersoo 2018), constituyen el 60% de los individuos arbóreos del planeta (Steidinger et al. 2019). Otros grupos de micorrizas (ectendomicorrizas, micorrizas arbutoides, monotropoides, ericoides, y orquideoides) también involucran Ascomycetes y/o Basidiomycetes, pero forman variantes de las estructuras mencionadas, y algunos grupos se asocian con plantas que son aclorófilas en parte o en la totalidad de su ciclo de vida (Smith y Read 2008). Una misma planta puede asociarse con más de un tipo de hongo micorrícico (McGuire et al. 2008, Adjoud-Sadadou y Halli-Hargas 2017), así como un mismo hongo puede formar diferentes tipos de asociación micorrícica dependiendo de la planta simbiote (Smith y Read 2008).

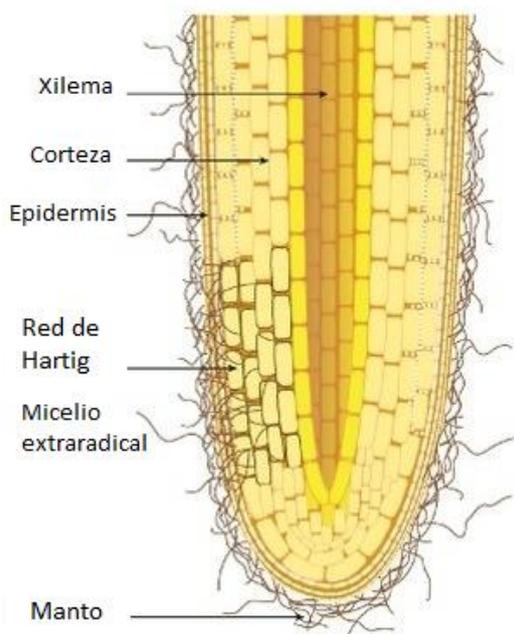


Figura 1.1 Esquema mostrando las estructuras fúngicas involucradas en una interacción ectomicorrícica: Red de Hartig intercelular, manto recubriendo la raíz, e hifas emergiendo del manto constituyendo parte del micelio extraradical. A su vez, se muestran las células de la epidermis, la corteza, y el haz vascular de la raíz. *Modificado de Bonfante y Genre 2008.*

Los hongos micorrícicos pueden ser fuertes condicionantes de los procesos de invasión de plantas. Existen diversos factores que pueden determinar el potencial de estos hongos para facilitar o dificultar la invasión de sus hospedadores (Pringle et al. 2009). Por ejemplo, el grado de dependencia de la planta por sus hongos simbiosntes puede variar desde aquellas plantas que no requieren establecer una asociación micorrícica, o las que son micorrícicas facultativas (que pueden asociarse a hongos micorrícicos pero no requieren de ellos para poder crecer y sobrevivir), hasta aquellas que establecen una simbiosis obligada, estando estas últimas mayormente condicionadas en su invasión (Pringle et al. 2009, Menzel et al. 2017). La presencia de los simbiosntes fúngicos en el nuevo hábitat y el momento en el que son introducidos (Vellinga et al. 2009), resultan factores decisivos en la invasión de sus hospedadores, dado que de estar ausentes puede darse lugar a invasiones fallidas, o condicionar tiempos de retardo en la invasión (Nuñez et al. 2009, Dickie et al. 2017, Sulzbacher et al. 2018). El grado de flexibilidad que las plantas no nativas invasoras tengan para asociarse con distintas especies de hongos micorrícicos, tanto nativos como no nativos, resulta también un factor condicionante de la invasión (Pringle et al. 2009), teniendo más probabilidades de una invasión exitosa aquellas plantas más generalistas en su asociación (Pringle et al. 2009, Menzel et al. 2017). Una vez establecidos ambos miembros de la simbiosis, los simbiosntes fúngicos no nativos, así como los de la comunidad nativa, pueden influir sobre las plantas no nativas invasoras y sobre las nativas (Pringle et al. 2009). Estos procesos pueden determinar el éxito de invasión y el ensamble de la comunidad de plantas (Kardol et al. 2007, Peay 2018) en el rango invadido.

1.6 Co-invasión

Mientras que la mayoría de las especies de árboles invasores requieren de simbiosntes mutualistas que habitan el suelo para poder invadir, existen especies de árboles que no los necesitan. Estas especies, no están limitadas en su invasión por la ausencia de mutualistas (Figura 1.2). Un ejemplo son las especies leñosas de la familia Proteaceae (Allsopp y Holmes 2001) que no se asocian con hongos micorrícicos o con bacterias fijadoras de nitrógeno para

colonizar nuevos sitios. La mayoría de estas plantas poseen mecanismos de absorción de nutrientes independientes de la presencia de simbioses, como el caso de las raíces proteoides (Watt y Evans 1999). En ocasiones, pueden invadir exitosamente a partir de la interrupción de las interacciones mutualistas existentes en la comunidad nativa, incrementando su habilidad competitiva (van der Putten et al. 2007, Callaway et al. 2008).



Figura 1.2 Diagrama de los posibles escenarios en los cuales la invasión de una planta no nativa está condicionada en relación a la presencia de mutualistas del suelo. Los recuadros verdes indican casos en los que se promueve la invasión y los recuadros rojos casos en los que la invasión se ve obstaculizada. Se mencionan ejemplos para cada uno de los escenarios. Modificado de: Nuñez MA, Policelli N, Dimarco R, 2016.

Dentro de las especies que requieren de simbiontes mutualistas del suelo para lograr invadir, se reconocen tres estrategias principales (Nuñez y Dickie 2014, Nuñez et al. 2016, Figura 1.3). En primer término, existen especies capaces de establecer asociaciones mutualistas con organismos del suelo que están presentes tanto en el rango de origen de la especie invasora como en el rango introducido, denominadas cosmopolitas (Moora et al. 2011). Una segunda estrategia involucra la formación de asociaciones nuevas con simbiontes del suelo que están ausentes en el rango nativo pero presentes en el rango invadido. Esto puede ocurrir tanto cuando un simbionte nativo se asocia con una especie hospedadora no nativa (Tedersoo et al. 2007), como cuando una especie hospedadora nativa se asocia a un simbionte mutualista

del suelo que ha sido introducido (Orlovich y Cairney 2004). La tercer estrategia es la co-invasión (Figuras 1.2, 1.3), que ocurre cuando un mutualista que está presente en el rango nativo de una especie introducida, es también introducido ya sea intencional o accidentalmente en forma conjunta con su hospedador (Dickie et al. 2010).

Los procesos de co-invasión pueden causar múltiples impactos sobre la comunidad nativa. Una de las principales consecuencias es la de permitir la invasión de árboles no nativos. Esto puede dar lugar a la conversión de ecosistemas previamente libres de especies leñosas en bosques dominados por una única especie (Richardson et al. 2000, Nuñez y Dickie 2014, Rundel et al. 2014, Nuñez et al. 2017). Los mutualistas co-invasores pueden, a su vez, presentar mecanismos enzimáticos nuevos para el ecosistema como la fijación de nitrógeno atmosférico (Vitousek et al. 1987), y la adquisición de nutrientes que no se encontraban disponibles. Por ejemplo, la co-invasión de hongos ectomicorrícicos y sus hospedadores en las islas de Hawai'i representan un factor completamente nuevo para el ecosistema, dado que no hay plantas nativas que interactúen con hongos ectomicorrícicos (Hynson et al. 2013). La evidencia muestra que la co-invasión no es un fenómeno raro, siendo común por ejemplo para ectomicorrizas y simbiosis fijadoras de nitrógeno (Nuñez y Dickie 2014). Un conocimiento más detallado del proceso de co-invasión es necesario para entender los procesos de invasión de muchas especies de plantas.

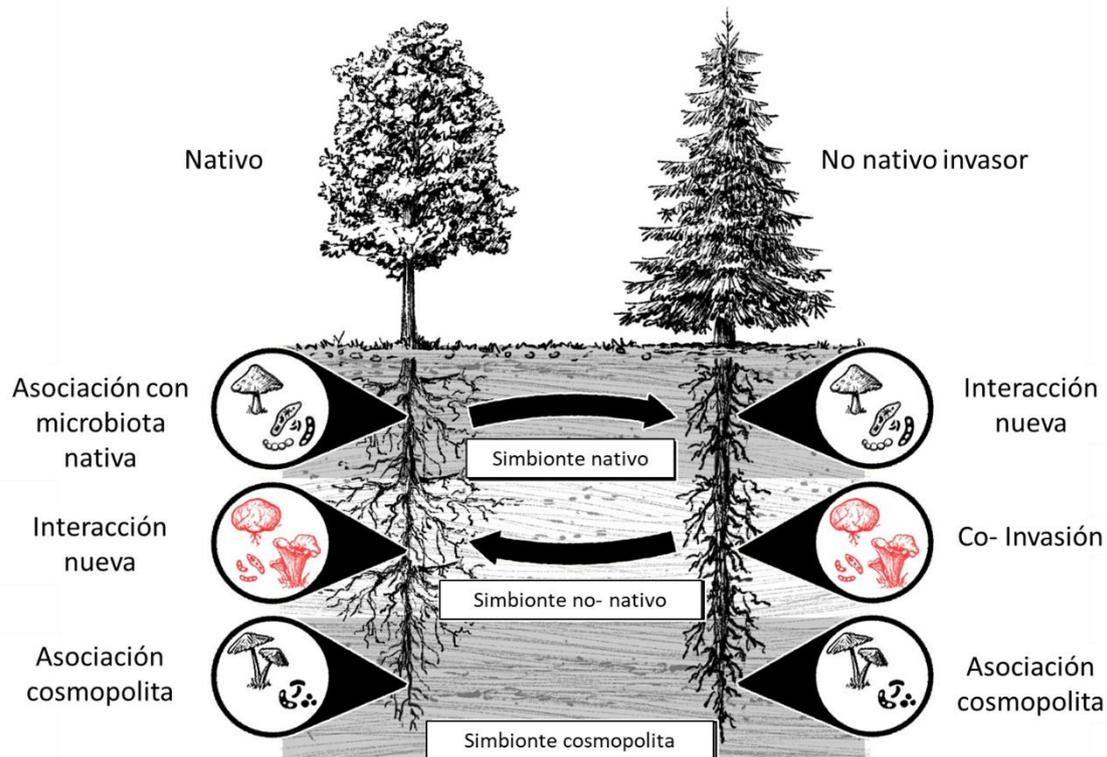


Figura 1.3 Diagrama de las posibles formas en las que hospedadores nativos y no nativos interactúan con simbiontes del suelo nativos, no nativos, y cosmopolitas. La co-invasión ocurre cuando ambos, la planta y el simbionte son no nativos. Las asociaciones nuevas pueden ocurrir entre una planta nativa y un simbionte no nativo, o entre simbiontes nativos y una planta no nativa. Un caso especial de asociación nueva, no representado en el diagrama, se puede dar cuando tanto la planta como el simbionte son no nativos pero originarios de rangos geográficos diferentes e interactúan en el rango introducido. *Modificado de: Nuñez MA, Policelli N, Dimarco R, 2016.*

1.7 Co-invasión de pinos y hongos ectomicorrícicos

Una gran cantidad de especies de la familia Pinaceae, nativas del hemisferio norte, han sido introducidas en múltiples regiones del hemisferio sur con fines productivos u ornamentales. Muchas de estas especies han logrado invadir (Richardson y Rejmánek 2004, Simberloff et al. 2010, Rundel et al. 2014, Nuñez et al. 2017). Actualmente, la familia Pinaceae está reconocida como uno de los taxones con más casos de invasión reportados en el mundo (Richardson y Rejmánek 2004, 2011). A escala regional, existe una creciente preocupación en la Patagonia argentina y chilena a partir del aumento en la superficie invadida (Figura 1.4), siendo necesarias medidas urgentes para

contener la invasión (Peña et al. 2008, Simberloff et al. 2010, Nuñez et al. 2017, Franzese et al. 2017).

Las invasiones de pinos pueden tener impactos severos en los procesos ecosistémicos del rango invadido. Los impactos, incluyen cambios en los regímenes hídricos y de disturbios como el fuego (Simberloff 2011, Simberloff et al. 2013, Cobar-Carranza et al. 2014), reducciones en la diversidad de plantas a escala local (Richardson y Williamst 2015, Franzese et al. 2017), homogeneización biótica (García et al. 2018), y pérdidas económicas (Nuñez et al. 2017). En períodos de tiempo cortos, menos de diez años por ejemplo para el caso de muchos sitios invadidos en Patagonia (Figura 1.4), puede ocurrir la transformación total de un ecosistema nativo a un bosque monoespecífico de una especie no nativa (García et al. 2018). Esta conversión se traduce en cambios en las condiciones microclimáticas y la disponibilidad de recursos, conlleva a la reducción de la riqueza y la abundancia de plantas nativas, y promueve la modificación de la biota del suelo y la alteración de las redes tróficas en los ecosistemas invadidos (van der Putten et al. 2007, Simberloff et al. 2010, Richardson y Williamst 2015). Para evitar estos impactos y con el objetivo de predecir la invasión, se han estudiado atributos biológicos de la familia Pinaceae que incrementan su potencial invasivo tales como su alta tasa de reproducción, su rápido crecimiento, y su capacidad de dispersión a grandes distancias (Rejmanek y Richardson 1996). Sin embargo, los impactos y la posibilidad de predecir la invasión de pinos en relación a las interacciones subterráneas que estas plantas establecen, han sido aspectos menos explorados.

Las especies de Pinaceae necesitan hongos ectomicorrícicos (de aquí en adelante, hongos EM) para lograr prosperar (Malloch et al. 1980, Hibbett et al. 2000, Singh et al. 2018). Dada la naturaleza obligada de esta simbiosis, si las especies de hongos EM no están presentes en el rango no nativo, la invasión se ve dificultada (Richardson et al. 2000, Nuñez et al. 2009). La evidencia sugiere que las especies de Pinaceae sortean este obstáculo a partir de la co-invasión con sus hongos EM (Dickie et al. 2010). Una vez presentes en el rango invadido, los pinos y los hongos EM se dispersan de manera independiente (Dickie et al. 2010, Nuñez y Dickie 2014, Horton 2017). Si bien hay evidencia de que los hongos EM condicionan la invasión de especies de

Pinaceae, poco se ha indagado acerca de las características ecológicas de estos microorganismos. Aspectos como la identidad (ej. qué especies de hongos EM logran co-invasir y que características ecológicas poseen), su capacidad de dispersión, o su capacidad de establecer interacciones con otras especies no nativas (ej. dispersores no nativos en el rango introducido) y nativas (ej. hospedadores nativos), han sido escasamente descritos en la bibliografía. A su vez, desde una perspectiva aplicada, se ha hecho mucho hincapié en el manejo de los pinos en sí mismos, pero se ha soslayado la posibilidad de manejar su interacción con hongos del suelo para contener su invasión. En este trabajo de tesis se hará especial énfasis en los aspectos asociados al simbionte fúngico y en cómo estos pueden influir en el proceso de co-invasión. Comprender los mecanismos por los cuales los mutualismos bajo el suelo influyen en la invasión, es un aspecto clave de la ecología y el manejo de especies invasoras, así como de la biología de la conservación de hábitats nativos (Dickie et al. 2016).

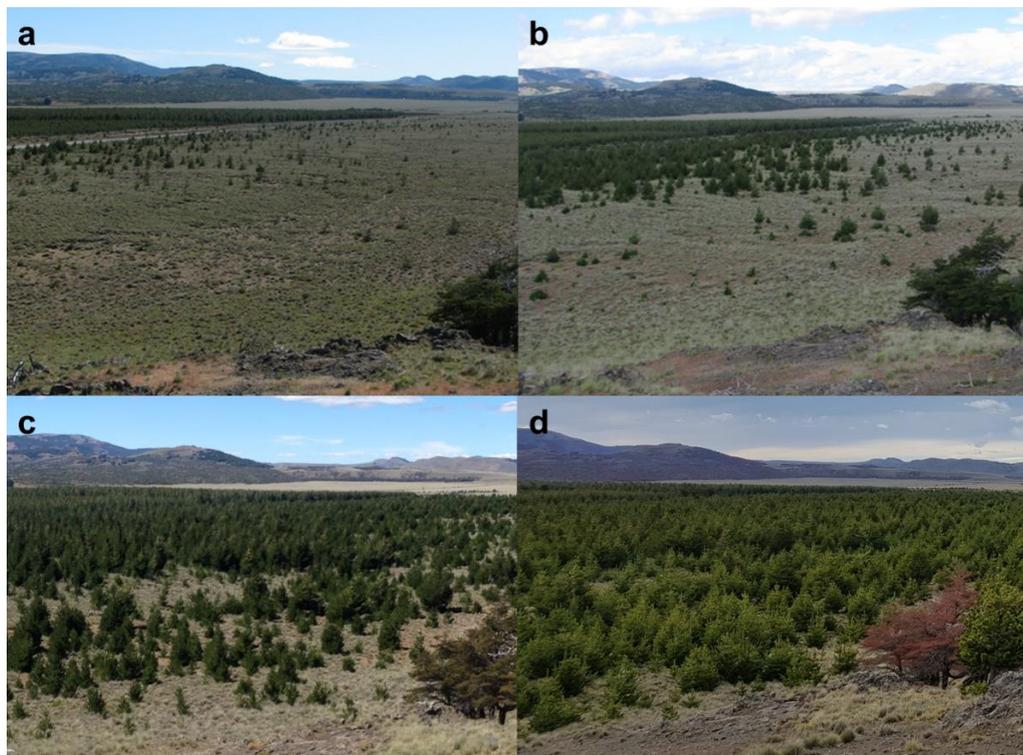


Figura 1.4 Ejemplo del avance de la invasión de pinos (*Pinus contorta*, en este ejemplo) en un ambiente de estepa de la Patagonia en 2007 (a), 2011 (b), 2015 (c), y 2017 (d). Las fotos pertenecen a Coyhaique Alto, Región de Aysén, Chile, uno de los sitios de estudio utilizados en el Capítulo 3 de esta tesis doctoral. Modificado de: García AR, Franzese J, Policelli N, et al. (2018).

1.8 Objetivo general y estructura de la tesis

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar las características ecológicas de los hongos EM determinantes de su co-invasión con especies de la familia Pinaceae. Considerando la invasión como un proceso que ocurre tanto por encima como por debajo del suelo, y tomando en cuenta a un grupo de especies de árboles altamente invasores a nivel mundial y su interacción con sus simbiontes fúngicos obligados, se plantea que la invasión de estas plantas está explicada, en parte, por las características ecológicas de sus simbiontes asociados.

Se abordarán de forma general cuatro aspectos de la ecología de hongos EM: Su identidad, su dispersión, su especificidad, y su posibilidad de manejo. Cada uno de estos aspectos está abordado a partir de una pregunta, y cada pregunta está desarrollada en un capítulo distinto (Figura 1.5). En el Capítulo 2, se plantea si la identidad de las especies de hongos EM es importante para que ocurra la co-invasión o si es indistinta la presencia de cualquier especie de hongo EM asociada a pinos invasores. En el Capítulo 3, se estudia cómo la dispersión de hongos EM no nativos mediada por mamíferos no nativos puede facilitar la invasión de pinos. En el Capítulo 4, se analiza qué ocurre en el bosque nativo cuándo co-invaden los hongos EM y sus hospedadores. Específicamente, se indaga en la posibilidad de que hospedadores nativos sean capaces de asociarse con hongos EM no nativos invasores y vice-versa, y en cómo la invasión afecta el crecimiento de estos hospedadores nativos. En el Capítulo 5, se presenta un plan de manejo adaptativo que considera las características desarrolladas en los capítulos anteriores y las distintas etapas de la invasión de hongos EM, para prevenir, contener o mitigar la invasión de estos mutualistas subterráneos. Se incluye, a su vez, el análisis de un caso de manejo llevado a la práctica en un área protegida de la Patagonia. Por último, el Capítulo 6 engloba en una discusión general los principales resultados obtenidos, analizando sus implicancias y sugiriendo nuevas preguntas para futuros estudios.

¿Qué características ecológicas de los hongos ectomicorrícicos son determinantes del proceso de co-invasión con pinos?

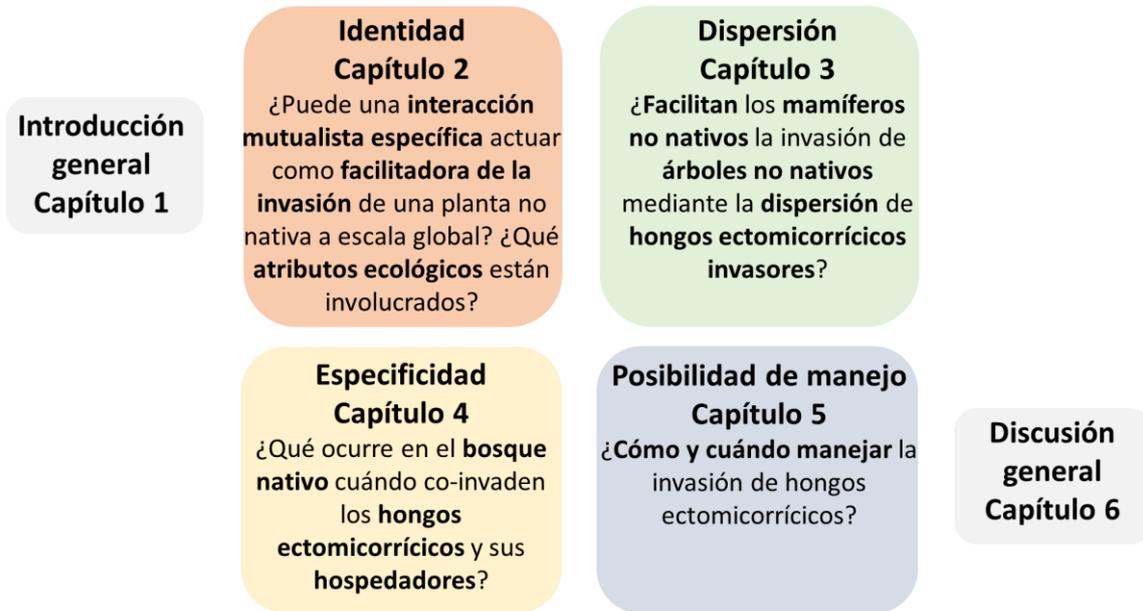


Figura 1.5 Diagrama de la estructura general de la tesis. Se abordan cuatro aspectos generales de la ecología de los hongos EM que co-invasen con especies de Pinaceae, cada uno a partir de una pregunta específica, estando cada pregunta desarrollada en un capítulo distinto.

Capítulo 2 - Hongos suilloides como promotores de la invasión de pinos a escala global

2.1 Resumen

La biota del suelo puede influir fuertemente en la invasión de plantas. La presencia de mutualistas en el suelo puede actuar como un agente facilitador que le permita a las plantas colonizar nuevos rangos. En este capítulo se realizó una revisión de las especies de hongos EM que facilitan el establecimiento de los pinos tanto en su rango nativo como no nativo, y que están asociados a su invasión en sistemas no forestales. Se encontró que un grupo particular de hongos EM, los hongos suilloides, actúan como factores determinantes de la invasión de pinos. Mientras que la asociación con otros hongos EM es variable, los hongos suilloides están siempre asociados con los pinos en contextos de invasión, particularmente en invasiones tempranas. Se identificaron cinco atributos ecológicos de los hongos suilloides que pueden explicar su rol clave en la invasión de pinos: su capacidad de dispersión a larga distancia, el establecimiento de interacciones bióticas positivas con mamíferos, su capacidad de generar un banco de esporas resistente, la rápida colonización de raíces, y su tipo exploratorio a largas distancias. Estos resultados sugieren que la identidad, más que la simple presencia de hongos compatibles, es clave para entender los procesos de invasión de plantas y su éxito o fracaso. En el caso particular de los pinos, la asociación con hongos suilloides se propone como un factor promotor de su invasión.

2.2 Introducción

Las invasiones biológicas, el proceso por el cual poblaciones de especies introducidas por el hombre se establecen, se reproducen, aumentan su rango de distribución y se mantienen sin intervención adicional (Blackburn et al. 2011), son altamente idiosincráticas y por lo tanto difíciles de predecir

(Richardson et al. 2000, Mitchell et al. 2006, Bradley et al. 2010). Tal como se expuso en el Capítulo 1, uno de los aspectos menos explorados de las invasiones de plantas es el rol de las interacciones bióticas subterráneas en condicionar el éxito o fracaso del proceso (Wardle et al. 2004, van der Putten et al. 2007, Simberloff et al. 2013). La microbiota del suelo incluye patógenos, herbívoros y mutualistas, y sus efectos negativos o positivos influyen fuertemente en la abundancia relativa y la composición de las especies de plantas en una comunidad (Klironomos 2002, Wardle et al. 2004), pudiendo ser cruciales en determinar el éxito o el fracaso de las plantas invasoras (Traveset y Richardson 2014, Dickie et al. 2017). Históricamente, el rol de las retroalimentaciones negativas en el sistema planta-suelo ha recibido mayor atención dada la capacidad de suprimir el reclutamiento, el crecimiento y la supervivencia de las plantas, mediar en trayectorias sucesionales y procesos de competencia, y ayudar a mantener la coexistencia de plantas a través de efectos de Janzen-Connell (Kulmatiski et al. 2008, Mordecai 2011, Maron et al. 2014). Sin embargo, las retroalimentaciones positivas planta-suelo también ocurren y pueden facilitar la invasión de especies de plantas no nativas en el rango introducido, incrementando su invasividad e impacto (Simberloff y Von Holle 1999, Simberloff 2006). Si bien las interacciones negativas y positivas no son mutuamente excluyentes y ocurren como parte del mismo proceso de invasión (Dickie et al. 2017), los efectos positivos de la biota del suelo y su rol en la invasión de plantas han recibido menos atención. La creciente evidencia sugiere que las retroalimentaciones positivas entre la planta y el suelo son al menos tan importantes como las negativas en mediar la invasión (Reinhart y Callaway 2006, Nuñez y Dickie 2014, Traveset y Richardson 2014) y, con respecto al establecimiento de algunas especies invasoras, pueden ser incluso más importantes que la competencia interespecífica en afectar el ensamble de la comunidad de plantas (Peay 2018).

La simbiosis entre plantas y hongos micorrízicos constituye un caso de retroalimentación positiva en el sistema planta-suelo que puede influenciar la trayectoria de la invasión de plantas (Capítulo 1). Un ejemplo bien descrito del rol de los hongos micorrízicos en la invasión de plantas es el caso de los pinos

y sus hongos EM. Si bien tanto la planta hospedadora como el hongo se dispersan independientemente, si los hongos EM están ausentes en el nuevo hábitat, los pinos no logran invadir dada la naturaleza obligada de esta simbiosis (Briscoe 1959, Nuñez et al. 2009, Dickie et al. 2010). Por este motivo, la co-introducción de hongos apropiados ha sido crucial para sobrepasar la barrera del establecimiento (Blackburn et al. 2011) y ha dado lugar a numerosos casos de invasión de pinos (Richardson et al. 2000). Unas pocas especies de hongos EM logran establecerse y co-invadir con los pinos en el rango introducido (Hayward et al. 2015a), si bien la evidencia muestra que la presencia de estos simbiontes fúngicos es necesaria para promover la invasión (Nuñez et al. 2009), poco se ha indagado hasta el momento acerca de la identidad de estos hongos co-introducidos. La presencia de cualquier especie de hongo EM podría facilitar la invasión, o bien ciertas especies de hongos EM podrían ser claves para que la misma ocurra.

Dado que las interacciones con mutualistas son necesarias para el éxito de la invasión de pinos, la principal pregunta que intenta responder este capítulo se relaciona con la identidad del mutualista. ¿Puede una interacción mutualista subterránea funcionar como determinante del proceso de invasión de una planta a nivel global? Para responder esta pregunta, se realizó una revisión bibliográfica de todos los casos en los que el rol de los hongos EM ha sido evaluado para la ampliamente distribuida y globalmente problemática invasión de pinos. Se compararon todos los estudios de caso disponibles en la bibliografía que evaluaban contextos de invasión de pinos, en busca de especies de hongos EM comúnmente asociadas con pinos invasores. Basándose en estos estudios, se intentó identificar los rasgos ecológicos de los mutualistas fúngicos que podrían estar involucrados en hacerlos determinantes en el proceso de invasión. Se espera que, a partir del estudio de la relación entre la invasión de pinos y hongos EM específicos, se logre proveer de aspectos clave que puedan predecir y evitar futuras invasiones, o bien puedan aportar al entendimiento de casos en los que la invasión no ha sido exitosa.

2.3 ¿Puede un grupo particular de hongos ectomicorrícicos facilitar la invasión global de pinos?

Se realizó una revisión sistemática global de la literatura, recopilando publicaciones que evaluaran el rol de los hongos EM en las invasiones de pinos. Se utilizó Scopus para realizar la búsqueda de las palabras clave “invas*” y “mycor*” y “Pinaceae” en todos los campos (título, resumen, palabras clave, y cuerpo del trabajo), resultando en un total de 351 documentos. Se repitió la búsqueda utilizando Google Scholar para comprobar la existencia de trabajos que pudieran no haber aparecido en la búsqueda con Scopus. Se consideraron los casos de invasión de especies de pinos (*Pinus* spp.), con evidencia proveniente de ensayos de invernadero, y muestreos a campo. Los trabajos que sólo evaluaron la interacción con hongos EM en plantaciones, sin estudiar contextos de invasión, fueron excluidos, así como también aquellos que no realizaron ningún análisis molecular que confirme la identidad de las especies de hongos EM y su asociación efectiva con las raíces de los hospedadores. Se excluyeron también, aquellos trabajos que evaluaron sólo muestras de suelo, sin analizar raíces. Se restringieron los parámetros de búsqueda al género *Pinus* por ser el género más representado en la mayoría de los estudios de caso (92%). De los trabajos obtenidos, 12 reunieron las características necesarias de acuerdo al criterio de selección utilizado. Estos trabajos evaluaron la invasión de pinos en seis países diferentes (Tabla 2.1).

Toda la evidencia reportada para pinos tanto en su ambiente nativo como no nativo muestra que un grupo particular de hongos EM, los hongos suilloides (específicamente los géneros *Suillus* y *Rhizopogon*, Figura 2.1), siempre están asociados a pinos invasores y son cruciales durante los primeros estadios de la invasión (Tabla 2.1). Las especies de *Suillus* y *Rhizopogon* están invariablemente entre los primeros hongos en ocurrir en pinos jóvenes de vivero y plantaciones (Chu-Chou y Grace 1988, Menkis et al. 2005), y son de importancia crítica durante el establecimiento temprano de pinos en contextos de invasión. Si bien otros hongos EM son también importantes a lo largo del crecimiento de los pinos en plantas adultas, los hongos suilloides están siempre asociados con plántulas jóvenes, y tienen un papel clave en permitir su

establecimiento y avance durante la invasión (Hayward et al. 2015b). Mientras que el resto de las especies de hongos EM co-invasivos es variable, todos los pinos en contexto de invasión están asociados con al menos una especie de hongo EM suilloide (Tabla 2.1).



Figura 2.1. Ejemplos de hongos suilloides en contextos de invasión de pinos. Esporocarpos de *Suillus luteus* (a) en área invadida por *Pinus contorta* (b) en Coyhaique Alto, Región de Aysén, Chile. Esporocarpos de *Rhizopogon* sp.(c) en invasión de *P. contorta* en Arroyo del Medio, Bariloche, Argentina. En la foto (d) se muestra el hábito hipógeo del género *Rhizopogon*.

Los hongos suilloides son el principal grupo de hongos EM asociados a los frentes de invasión de pinos (Figura 2.2). En Patagonia, por ejemplo, Nuñez *et al.* (2009) mostraron cómo bajos niveles de inóculo de hongos EM retardaban las invasiones de pinos. En ese estudio, para dos especies invasoras de pinos (*Pinus contorta* y *P. ponderosa*), los hongos suilloides fueron el grupo más abundante de hongos EM asociados lejos de la fuente de invasión. En el noroeste de la Patagonia, *Rhizopogon* sp, determinado a partir del morfotipado de raíces, ha sido reportado como la especie de hongo EM más común colonizando pinos a distancias crecientes de la fuente de invasión, y la única especie capaz de colonizar raíces a 400m de bordes de plantación de *P. ponderosa* (Salgado Salomón *et al.* 2011). En la Patagonia austral se encontró, a su vez, a *Suillus luteus* como la única especie presente a más de 750 metros de la fuente de invasión y se determinó que su presencia es suficiente para posibilitar la invasión de *P. contorta* (Hayward *et al.* 2015b). En un estudio más reciente los hongos suilloides han sido descritos como importantes condicionantes de la invasión de pinos en ambientes de alta montaña, siendo *S. granulatus* el único hongo EM asociado a *P. elliotti* invadiendo a 2200 metros sobre el nivel del mar y a más de 6 km de la plantación más cercana (Urcelay *et al.* 2017).

Tabla 2.1. Lista de estudios ordenados por año de publicación, evaluando el rol de los hongos EM en diferentes contextos de invasión de especies de *Pinus* en todo el mundo; considerando los diferentes abordajes metodológicos, las especies de hongos suilloides (resaltadas en negrita) están siempre asociadas con los pinos, siendo particularmente importantes en el frente de invasión y durante el establecimiento de las plántulas.

Cita	Lugar de invasión	Hospedador	Hongos EM en el frente de invasión	Hongos EM en zonas núcleo de invasión	Tipo de estudio	Principales conclusiones
Collier & Bidartondo 2009	Tierras bajas, Inglaterra	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Rhizopogon luteolus</i>, <i>Suillus bovinus</i>, <i>S. variegatus</i>	<i>Amanita rubescens</i> , Atheliaceae sp., <i>Cenococcum geophilum</i> , <i>Laccaria</i> spp., <i>Lactarius</i> spp., <i>R. luteolus</i> , <i>Russula emetica</i> , <i>Scleroderma citrinum</i> , <i>S. bovinus</i>, <i>S. variegatus</i> , <i>Thelephora terrestris</i> , <i>Tomentella</i> spp., <i>Xerocomus</i> sp.	Bioensayo con muestras de suelo y relevamiento <i>in situ</i> .	Unas pocas especies clave de hongos EM dispersadas por esporas pueden mediar la expansión de su hospedador

Nuñez et al. (2009)	Isla Victoria, Patagonia, Argentina	<i>P. contorta</i> <i>P. ponderosa</i>	<i>Cenococcum geophilum</i> , Cortinariaceae sp., S. luteus , <i>Hebeloma</i> sp., <i>Wilcoxina mikolae</i> S. luteus , <i>Thelephora terrestris</i> , <i>Wilcoxina mikolae</i>	Atheliaceae sp., <i>Cadophora findlandica</i> , <i>Cenococcum geophilum</i> , Cortinariaceae sp., <i>Hebeloma</i> sp., <i>Lactarius quieticolor</i> , S. luteus , Thelephoraceae spp., <i>Wilcoxina</i> spp. Atheliaceae sp., Cortinariaceae sp., <i>Hebeloma</i> sp., <i>L. quieticolor</i> , Sebacinaceae sp., Suillus luteus , Thelephoraceae spp., <i>W. mikolae</i>	Bioensayo con muestras de suelo y relevamiento <i>in situ</i> .	Bajos niveles de inóculo de hongos EM lejos de las plantaciones retardan la invasión de especies de pinos.
Dickie et al. (2010)	Canterbury, Nueva Zelanda	<i>P. contorta</i>	No evaluado (Pinos de 9 a 20 años de edad en contexto de invasión)	Atheliaceae (cf. <i>Tylospora</i>), <i>Amanita muscaria</i> , <i>Cantharellales</i> sp., <i>Cenococcum geophilum</i> , S. granulatus , S. luteus ,	Relevamiento <i>in situ</i> .	Para lograr superar la pérdida de mutualistas, los pinos co-invasen con sus hongos EM.

Tomentella sp., *Tricholoma*
sp., *Tylospora* sp.

Kohout et al. (2011)	Montañas de arenisca del Elba, República Checa	<i>P. strobilus</i>	No evaluado	<i>Cenococcum geophilum</i> , <i>Inocybe</i> sp., <i>Meliniomyces</i> <i>bicolor</i> , <i>Rhizopogon</i> <i>luteolus</i> , <i>R. roseolus</i> , <i>R.</i> <i>salebrosus</i> , <i>Suillus</i> <i>bovinus</i> , <i>S. granulatus</i> , <i>S.</i> <i>luteus</i> , <i>S. variegatus</i> , <i>Thelephora terrestris</i> , <i>Wilcoxina mikolae</i>	Bioensayo con muestras de suelo.	La identidad de la especie hospedadora y el entorno de la vegetación pueden influir los ensamblajes de hongos EM en las raíces de los pinos invasores.
----------------------------	--	---------------------	-------------	--	--	---

Salgado Salomón et al. (2011)	Noroeste de Patagonia, Argentina	<i>P. ponderosa</i>	<i>Rhizopogon sp.</i>	<i>Amphinema sp.</i> , <i>Rhizopogon sp.</i>	Bioensayo con muestras de suelo.	<i>Rhizopogon sp.</i> actúa como un taxón pionero en la colonización de plántulas, siendo el hongo EM más persistente y frecuentemente encontrado.
Hynson et al. (2013)	Maui y Hawai'i, EEUU	<i>P. patula</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. radiata</i> , <i>P. taeda</i>	Atheliaceae sp.1, <i>Cadophora</i> sp., <i>Suillus brevipes</i> , <i>S. luteus</i> (>250 m de distancia de la plantación)	Atheliaceae spp., <i>Cadophora</i> sp., <i>Cortinarius</i> sp., Hyaloscyphaceae sp., <i>Inocybe</i> sp., <i>Laccaria</i> sp., <i>Meliniomyces</i> sp., <i>Pseudotomentella</i> sp., Pyronemataceae sp., <i>Rhizopogon salebrosus</i> , <i>Suillus brevipes</i> , <i>S. luteus</i> , <i>S. pungens</i> , <i>Thelephora</i> sp., <i>Tuber</i> sp.,	Bioensayo con muestras de suelo y relevamiento <i>in situ</i> .	Una comunidad acotada de hongos EM son los que dominan la colonización de la raíz de pinos invasores.

Wilcoxina spp.

Pinus radiata (bioensayo)
(1000 m de distancia de la plantación)

***Rhizopogon rubescens*,
*Suillus luteus***

Atheliaceae sp. 1,
Descomyces sp., *Laccaria* sp., Pyronemataceae sp.,
R. rubescens*, *R. salebrosus, Sebacinaceae sp., ***Suillus brevipes*, *S. luteus*, *S. pungens***,
Thelephora sp., *Tomentella* spp., *Tuber* sp., *Wilcoxina* spp.

Núñez et al. (2013)	Isla Victoria, Patagonia, Argentina	<i>Pinus ponderosa</i>	<i>Amphinema</i> sp., <i>Hebeloma mesophaeum</i> , <i>Melanogaster</i> sp., <i>Rhizopogon cf. arctostaphyli</i>, <i>R. cf. rogersii</i> ,	No evaluado	Bioensayo con muestras de suelo inoculadas con pellets fecales de mamíferos no	Los mamíferos no nativos pueden ser dispersores importantes de hongos EM no nativos, lo que a su vez puede promover la invasión de pinos.
---------------------	-------------------------------------	------------------------	--	-------------	--	---

			R. roseolus, S. luteus		nativos.	
Hayward et al. (2015a)	Isla Victoria, Patagonia, Argentina	<i>P. ponderosa</i> , <i>P. monticola</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. contorta</i>	<i>Amphinema</i> sp., <i>Hebeloma</i> sp., <i>Inocybe</i> sp., <i>Lactarius quieticolor</i> , <i>Leotiomyces</i> sp., Rhizopogon spp., Suillus lakei , S. luteus	<i>Amphinema</i> sp., <i>Boletus edulis</i> , <i>Cortinarius</i> spp., <i>Hebeloma</i> spp., <i>Helotiales</i> sp 1, <i>Inocybe</i> spp., <i>Lactarius quieticolor</i> , <i>Leotiomyces</i> sp., <i>Melanogaster</i> sp., <i>Pseudotomentella tristis</i> , Pyronemataceae sp., Rhizopogon sp., <i>Russula</i> sp., Sebacinaceae sp. 1, Suillus lakei , S. luteus , <i>Thelephora terrestris</i> , <i>Tomentella</i> spp., <i>Tricholoma</i> sp.	Relevamiento <i>In situ</i>	Los hongos suilloides poseen un notable potencial para invadir y facilitar la invasión de pinos.

Hayward et al. (2015b)	Coyhaique, Chile	<i>P. contorta</i>	<i>S. luteus</i>	<i>Hebeloma mesophaeum</i> , Hydnaceae spp., <i>Tomentella cf. Sublilacina</i>	Relevamiento <i>In situ</i>	Comunidades de hongos EM de muy baja riqueza (incluso una sólo especie) pueden ser suficientes para facilitar una invasión de pinos fuera de su rango nativo.
------------------------------	---------------------	--------------------	-------------------------	--	--------------------------------	---

Wood et al. (2015)	Isla Sur de Nueva Zelanda	<i>P. contorta</i>	<i>Rhizopogon</i> spp., <i>S. luteus</i> (Dispersión a largas distancias por grandes mamíferos. Solo especies que colonizan de forma efectiva a partir de pellets fecales)	No se encontraron otros hongos EM que fueran capaces de colonizar a partir de pellets fecales a pesar de registrar evidencia del consumo de <i>Amanita muscaria</i> por parte de los mamíferos no nativos.	Relevamiento <i>in situ</i> . Bioensayo con muestras de suelo inoculadas con pellets fecales de mamíferos no nativos.	Los mamíferos introducidos de Australia y Europa facilitan la co-invasión de hospedadores norteamericanos y hongos EM del hemisferio norte en Nueva Zelanda, sin beneficio para hongos o árboles nativos.
Gundale et al. (2016)	Chile y Nueva Zelanda	<i>P. contorta</i>	<i>Atheliales</i> sp., <i>Sistotrema</i> sp., <i>Suillus luteus</i> , <i>Wilcoxina mikolae</i>	<i>Amanita muscaria</i> , <i>Atheliales</i> sp., <i>Cadophora finlandica</i> , <i>Rhizopogon ochraceorubens</i> , <i>Sistotrema</i> sp., <i>Suillus luteus</i> , <i>Wilcoxina mikolae</i>	Relevamiento <i>in situ</i>	Los pinos invasores se asocian a comunidades de hongos EM diferentes en los sitios dónde invaden en comparación con los sitios de origen. En ambientes con vegetación distante filogenéticamente, <i>P. contorta</i> se asocia a una comunidad

única de hongos EM que parece haberse formado a partir de múltiples eventos de co-introducción.

Urcelay et al. (2017)	Sierras Grandes, Córdoba, Argentina	<i>P. ellioti</i>	<i>Suillus granulatus</i> (Especies de hongos EM a altas altitudes: 2700 msnm)	<i>Amanita muscaria</i> , <i>Cadophora finlandica</i> , <i>Clavulina</i> sp., <i>Endogone lactiflua</i> , <i>Inocybe curvipes</i> , <i>Inocybe jacobii</i> , <i>Inocybe sindonia</i> , <i>Laccaria</i> sp., <i>Meliniomyces bicolor</i> , <i>Paxillus involutus</i> , <i>Rhizopogon pseudoroseolus</i> , <i>Russula</i> sp., <i>Scleroderma areolaum</i> , <i>Scleroderma</i> sp., <i>Sebacina</i> sp., <i>Sebacinaceae</i> sp., <i>Sistotrema</i> sp., <i>Suillus granulatus</i> ,	Bioensayo con muestras de suelo y relevamiento <i>in situ</i> .	La disponibilidad de simbiontes fúngicos acordes puede restringir pero no impedir la expansión de <i>P. ellioti</i> a grandes distancias y zonas altas, que no poseen hongos EM nativos.
-----------------------	-------------------------------------	-------------------	--	---	---	--

Thelephoraceae sp.,
Thelephora terrestris,
Tomentella coerulea,
Tomentella sp., *Tuber* sp.,
Tylospora sp., *Wilcoxina*
mikolae, *Wilcoxina* sp.
(Hongos EM a bajas
altitudes: <2200 msnm)

Los pinos invaden típicamente sitios abiertos debido a su intolerancia a la sombra, y, cuando lo hacen, el establecimiento de las plántulas difiere entre los sitios núcleo de invasión –sitios cercanos a la fuente de invasión con una alta densidad de individuos adultos- y los frentes de invasión en dos aspectos principales. Primero, en los núcleos de invasión, en donde hay árboles adultos establecidos, hay también redes de micelio establecidas con las cuales las plántulas pueden interactuar. Esto implica que la colonización de hongos EM de plántulas nuevas puede ocurrir eficientemente sin la necesidad de que haya esporas (Peay et al. 2011). Por el contrario, en el frente de invasión las redes de micelio están ausentes, por lo que la colonización debe ocurrir por esporas. Segundo, las condiciones del hábitat suelen ser favorables para el crecimiento del micelio de los hongos EM en las zonas núcleo de invasión, dadas las temperaturas más bajas, el ambiente más húmedo en el suelo y la mayor densidad de raíces (Peay et al. 2011). Estas condiciones del micro-hábitat son también favorables para una mayor producción de esporocarpos de un mayor número de especies de hongos EM, lo que resulta en una mayor producción de esporas para estas especies en estas áreas. Lo opuesto ocurre en el frente de invasión, en donde sólo los hongos que se dispersan a grandes distancias, principalmente especies de *Suillus*, y aquellas especies que poseen esporas resistentes, *Suillus* y *Rhizopogon* spp., dominan el inóculo. A su vez, la producción de esporocarpos esta típicamente restringida a estas especies de hongos EM en o cerca al frente de invasión (Ashkannejhad y Horton 2006), con el agregado de especies del género *Thelephora* y *Laccaria* en el rango nativo (Peay et al. 2007, 2012).

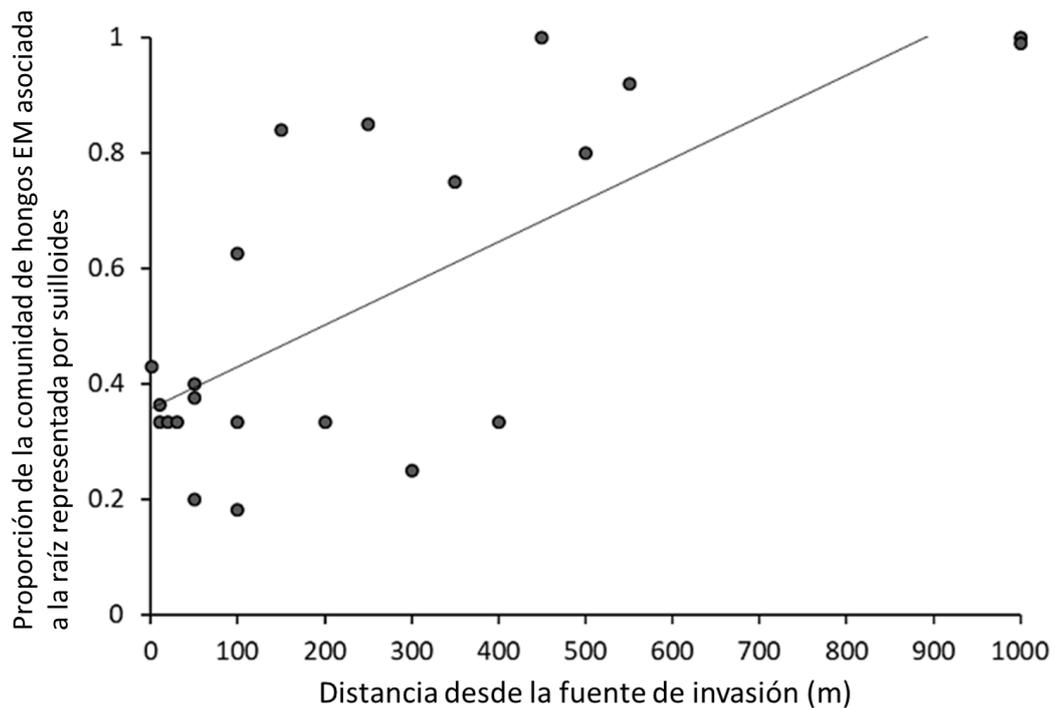


Figura 2.2. La proporción de hongos suilloides asociados a las raíces de los pinos se incrementa con la distancia a la fuente de invasión; a 1000 metros de la fuente de invasión, la comunidad está representada únicamente por hongos suilloides ($R^2 = 0.546$). Los datos fueron extraídos de los trabajos que evaluaron la comunidad de hongos EM a diferentes distancias de la fuente de invasión para plántulas de pino (Nuñez et al. 2009, Salgado Salomón et al. 2011, Hynson et al. 2013, Hayward et al. 2015b). En los casos en los se utilizó un rango de distancias, la proporción de la comunidad de hongos EM representada por hongos suilloides está graficada para la distancia media de ese rango. Los datos fueron analizados utilizando “proporción de la comunidad representada por hongos suilloides” como variable respuesta (número de especies de hongos suilloides/ total de especies de hongos EM asociadas a la raíz). Se asumió una distribución binomial de la variable utilizando modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) basados en la aproximación de Laplace una función *logit link* (paquete LME4, función GLMER) (Bates et al. 2015). Junto con la variable explicativa “distancia desde la fuente de invasión”, se incluyó un factor aleatorio a nivel de observación para modelar la sobre-dispersión (Harrison 2014). Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico R versión 3.4.0 (R Core Team, 2018).

Los hongos suilloides actúan como promotores de la expansión de los pinos también en su rango nativo (Tabla 2.1). Por ejemplo, unas pocas especies de hongos suilloides son capaces de mediar la expansión de la especie nativa *Pinus sylvestris* en hábitats de tierras bajas en Inglaterra (Collier y Bidartondo 2009). A pesar de que la riqueza de hongos EM y el porcentaje de

colonización decrecen a mayores distancias de la fuente inóculo, los hongos suilloides son el único grupo capaz de colonizar plántulas en suelo de zonas no invadidas (Collier y Bidartondo 2009). En las islas Hawaianas, dónde no hay especies de pino nativas ni otros árboles ectomicorrícicos nativos, los hongos suilloides son también el grupo de hongos EM dominante que colonizan pinos invasores (Hynson et al. 2013). En Europa, muchas especies de pinos no nativas han sido introducidas junto con sus hongos EM asociados, y muchas se han naturalizado (Vellinga et al. 2009, Richardson y Rejmánek 2011, Nuñez et al. 2017, Tedersoo 2017). Sin embargo, hay pocos reportes de invasiones de pinos (Engelmark et al. 2001) y aún menos que evalúen el rol de los hongos EM en el proceso de invasión (Kohout et al. 2011). Su expansión limitada, en comparación con lo que ocurre en el hemisferio sur, es probablemente el resultado de un menor esfuerzo de introducción y una mayor proximidad filogenética entre árboles no nativos y nativos y hongos EM no nativos y nativos (Nuñez et al. 2017).

Fuera del contexto de invasión, los hongos suilloides frecuentemente actúan como especies pioneras capaces de colonizar plántulas de pinos, que posteriormente son reemplazadas por otras especies de hongos EM, mayormente asociadas a árboles adultos (Peay et al. 2011). Como resultado, en bosques de pinos ya establecidos, los hongos suilloides son menos frecuentes y menos abundantes en relación a un grupo diverso de otras especies de hongos EM (Gardes y Bruns 1996a, Gehring et al. 1998, Taylor y Bruns 1999, Talbot et al. 2014, van der Linde et al. 2018). En contextos no invasivos, los hongos suilloides constituyen menos del 5% del total asociado a las raíces de los pinos (Danielson 1984, Gardes y Bruns 1996a), aunque suelen volverse dominantes en la comunidad luego de un disturbio.

Rhizopogon spp., por ejemplo, ha sido encontrado dominando la comunidad asociada a raíces de especies de pinos nativos en sitios post-fuego (Horton et al. 1998, Baar et al. 1999, Buscardo et al. 2010, Rincón et al. 2014).

Muchas especies de hongos suilloides han sido reportadas con pinos invasores (Figura 2.3). Estas especies de hongos EM fueron introducidas principalmente en el hemisferio sur, en donde se establecieron exitosamente asociados a pinos del hemisferio norte, y no fueron reemplazados por especies

de hongos locales (Vellinga et al. 2009). El éxito de invasión de los pinos podría entonces predecirse si una combinación particular ya reportada entre una especie de hongo suilloide y una especie de hospedador, está presente en el rango no nativo. Del total de trabajos que han evaluado la interacción de los hongos EM en un contexto de invasión de pinos (Tabla 2.1), hay muchos ejemplos de interacciones novedosas en el rango invadido entre hospedadores provenientes de América del Norte y hongos EM nativos de Europa (Figura 2.3). La interacción novedosa más reportada en la bibliografía es aquella entre *P. contorta*, una especie de pino nativa de Norteamérica, y *Suillus luteus*, un hongo europeo. *S. luteus* es a su vez la especie de hongo suilloide que ha sido reportada interactuando con el mayor número de especies de pinos hospedadores (Figura 2.3). El análisis de estos invasores más frecuentes, da indicio del grado de especificidad en la asociación entre distintas especies de huésped-hospedador en distintos escenarios de invasión, y da cuenta de una alta dependencia del contexto en términos del rol ecológico de estas especies de hongos. Es claro que especies de pinos norteamericanas y especies de hongos suilloides europeas están asociadas comúnmente en contextos no nativos y de invasión, y en este sentido una única combinación hongos suilloide- pino que esté presente podría ser suficiente para desencadenar una invasión, incluso cuando esta combinación sea novedosa para el sistema (por ejemplo *S. luteus* y *P. contorta*; Hayward et al. 2015b). Lo que es menos claro es si los pinos se asocian preferentemente con los hongos suilloides de su mismo rango de origen de darse la oportunidad. Hay indicios de que esta preferencia por suilloides nativos pueda ocurrir (McNabb 1968, T. D. Bruns, obs. pers.), pero el patrón necesita de mayor documentación y experimentación rigurosa.

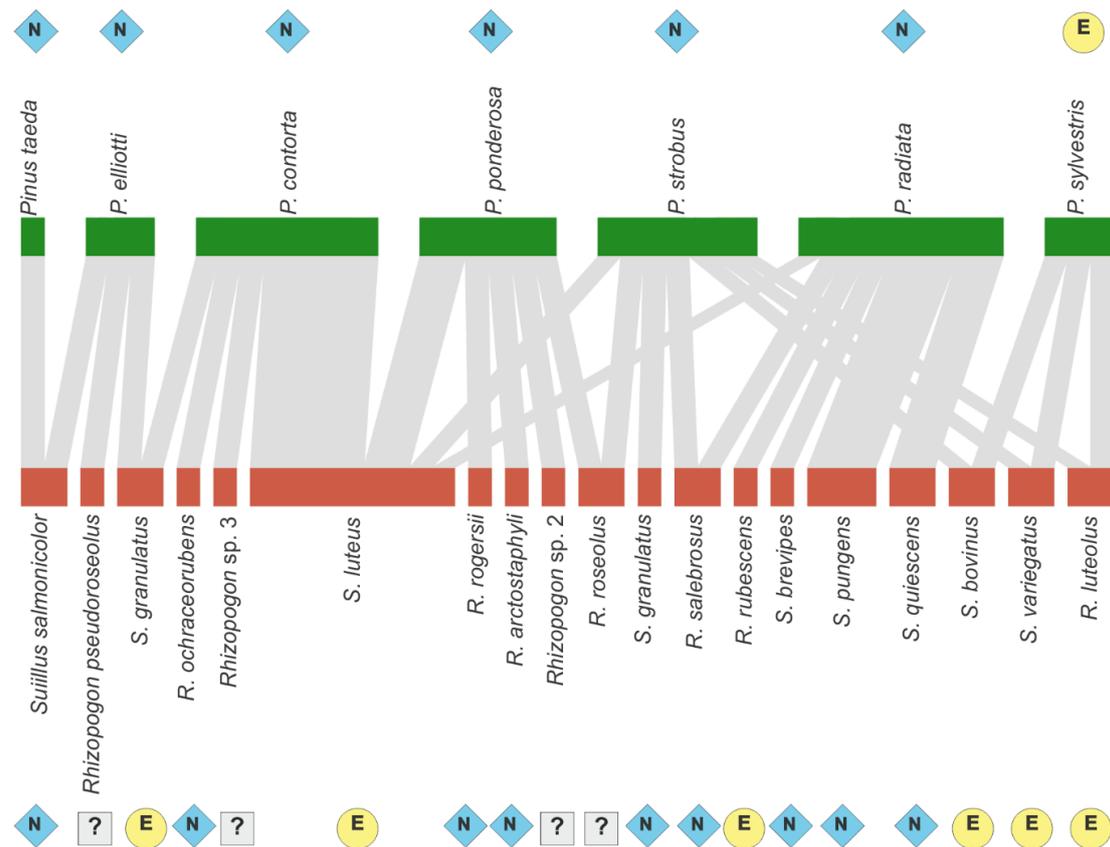


Figura 2.3. *Invasores frecuentes.* Un mapa de las interacciones reportadas entre hongos suilloides (cajas rojas) y especies de pinos hospedadoras (cajas verdes) en contexto de invasión. El tamaño de las cajas y el grosor de las conexiones son proporcionales al número de trabajos que encontraron la interacción. La conexión más gruesa (entre *Suillus luteus* y *Pinus contorta*) representa un total de cinco estudios. Los orígenes Europeo (círculos amarillos con la letra E) y Norteamericano (rombos celestes con la letra N) están indicados tanto para las especies de hongos suilloides como para las especies de pinos; los cuadrados grises con el signo de interrogación simbolizan un lugar de origen desconocido para esa especie. Para *S. granulatus* se indican tanto la especie Norteamericana (restringida a *P. strobus*) como la Europea (reportada asociada a *P. ellioti* y *P. contorta*).

Los hongos suilloides también contribuyen a la invasión de otras especies de la familia Pinaceae. El pino oregon (*Pseudotsuga menziesii*), por ejemplo, está ampliamente documentado como una especie invasora en bosques, por ser más tolerante a la sombra que los pinos (Simberloff et al. 2002, Nuñez et al. 2009). En un experimento a campo se encontró que *Rhizopogon* sp. fue el único hongo EM que colonizó plántulas de *P. menziesii* inoculadas con suelo de áreas lejanas a la fuente de invasión (Nuñez et al. 2009), y también la única especie en plántulas de *P. menziesii* inoculadas con

fecas de mamíferos (Wood et al. 2015). *Suillus lakei* también ha sido reportado como un factor determinante de invasión de pino oregon en Sudamérica (Nuñez et al. 2009, Hayward et al. 2015b) y Nueva Zelanda (Moeller et al. 2015).

Es probable que, además de los hongos suilloides, otras especies de hongos EM colonicen los pinos a medida que avanza el proceso de invasión, siendo de especial interés para el problema global de las invasiones de pinos (Nara 2006a, Bahram et al. 2013). *Amanita muscaria*, por ejemplo, ha sido ampliamente introducida en el hemisferio sur y esta reportada como una especie altamente invasora (Pringle et al. 2009) en lugares como Australia y Nueva Zelanda (Dickie et al. 2010, Walbert et al. 2010). *Amanita muscaria* es a su vez capaz de formar nuevas asociaciones con diferentes especies de árboles nativos (Pringle et al. 2009, Nuñez y Dickie 2014, Capítulo 5 de esta tesis), lo cual puede tener severas implicancias en el desplazamiento de especies nativas de hongos (Orlovich y Cairney 2004). A diferencia de los hongos suilloides, *A. muscaria* es considerado un hongo asociado a hospedadores en estadios de vida tardíos (Peay et al. 2011) y se dispersa a una escala y a una tasa menor (Dickie et al. 2016). Si bien es posible que otras especies de hongos EM sean necesarias para los pinos a lo largo de su crecimiento, la evidencia actual muestra que los pinos son capaces de invadir asociados sólo a hongos suilloides.

2.4 ¿Qué factores pueden explicar el éxito de los hongos suilloides?

En esta sección se proponen cinco características ecológicas de los hongos suilloides como responsables de su éxito en colonizar hospedadores jóvenes y en facilitar la invasión de pinos. En combinación, estos cinco factores aseguran que las plántulas sean colonizadas con una alta frecuencia principalmente en el frente de invasión.

2.4.1 Dispersión abiótica a grandes distancias

Las especies de *Suillus* son muy efectivas en dispersarse por viento, y son cuantitativamente mejores en esto que cualquier otro hongo encontrado en los márgenes de los sitios dominados por pinos. Este rasgo general puede ser

visto como una consecuencia de numerosas características: la producción de un gran número de esporocarpos en las cercanías de árboles jóvenes (Figura 2.1b), junto a su tamaño, altura y relativa durabilidad (Peay et al. 2012). A una escala pequeña, las especies de hongos cuyos esporocarpos producen un pie de mayor longitud y esporas más pequeñas se dispersan más lejos que aquellas especies con esporocarpos más cercanos al suelo y esporas de mayor tamaño (Galante et al. 2011). La presencia de poros en *Suillus* permite una mayor superficie de esporulación por unidad de área que aquella presente en hongos con laminillas de tamaño similar (Ingold 1971). A su vez, la mayor biomasa de los esporocarpos probablemente los haga más resistentes a la desecación y prolongue la esporulación en climas más secos. A pesar de que la mayoría de las esporas para cualquier especie fúngica caen cerca del esporocarpo dónde fueron producidas -siguiendo el decaimiento en la cantidad de esporas una función leptocúrtica (Peay et al. 2012, Horton 2017) -, el número total de esporas producidas es relevante. A mayor número de esporas producidas, mayor probabilidad de que estas sean dispersadas a grandes distancias por viento (Horton 2017). Mientras que muy pocas esporas fúngicas son capaces de ser dispersadas por el viento a la escala de kilómetros desde la fuente inicial, *Suillus* es ampliamente exitoso en la dispersión a grandes distancias (Peay et al. 2012, Horton 2017). *Suillus luteus*, por ejemplo, dispersa esporas hasta al menos 1000 m desde los bordes de plantaciones de pinos y al menos 500 m desde pinos aislados por fuera de las plantaciones (Nuñez et al. 2009, Hynson et al. 2013). De forma similar, en su rango nativo, *S. pungens* está reportado como la única especie capaz de colonizar plántulas de pino a más de 1 km de bosques de pino nativos, y presenta una producción de esporas de 8×10^{12} esporas km^{-2} (Peay et al. 2012). Otras especies de hongos EM en esos sistemas producen esporas en rangos de varios órdenes de magnitud menores, resultando en una dispersión a una escala más local (esto es, menor a unos pocos metros del cuerpo fructífero).

Una vez ocurrida la dispersión a grandes distancias, encontrar un tipo compatible en el sitio al que llegan las esporas es una de las restricciones más importantes para el establecimiento exitoso de los hongos EM. La mayoría de las especies de hongos EM pueden establecer una simbiosis micorrícica

funcional solo cuando se forma un micelio dicarionte, si bien algunos basidiomicetes pueden formar micorrizas funcionales incluso como monocariontes (Kropp y Fortin 1988). A medida que la distancia de la fuente de esporas crece, la probabilidad de encontrar cepas compatibles y formar dicariontes decrece (Horton 2017). Sin embargo, las chances de encontrar un tipo compatible a grandes distancias se incrementa para hongos con un sistema de compatibilidad bipolar (por ejemplo *Rhizopogon rubescens*, Kawai et al. 2008) comparados con un sistema de compatibilidad tetrapolar (por ejemplo *Laccaria* spp., Kropp y Fortin 1988, Horton 2017). A su vez, el homotalismo secundario, un proceso de autofecundación que produce esporas binucleadas (Horton 2006), ha sido reportado para algunas especies de *Suillus* así como también para otros hongos EM (Horton 2006, 2017). Aquellos hongos EM con mayores chances de encontrar un tipo compatible por su sistema de compatibilidad, o capaces de producir esporas binucleadas por homotalismo secundario, podrían estar favorecidas en contextos de invasión. Los mecanismos por los cuales los hongos EM son capaces de prosperar lejos de la fuente de inóculo en términos de su sistema de compatibilidad aún requieren ser dilucidados (Kawai et al. 2008, Horton 2017).

2.4.2 Dispersión biótica mediada por mamíferos

La micofagia por mamíferos es un segundo proceso clave de dispersión de propágulos viables de hongos EM. Los hongos que asemejan trufas, como *Rhizopogon*, dependen casi exclusivamente de la dispersión por animales. Las esporas de estos hongos no son activamente descargadas en el viento. En cambio, los mamíferos consumen los esporocarpos y con ellos es ingerida una gran masa de esporas, que es luego transportada y regresa al suelo en las fecas (Johnson 1996). Los mamíferos también consumen basidiomas agaricoides, especialmente durante los picos estacionales (Piattoni et al. 2012). Los ciervos, por ejemplo, pueden dispersar en forma efectiva *Suillus brevipes* a través de micofagia en hábitats nativos (Ashkannejhad y Horton 2006). Sin embargo, como se discutió anteriormente, las especies de *Suillus* son también dispersadas de forma efectiva por el viento. Para poder ser dispersadas por mamíferos, los esporocarpos de los hongos deben resultar atractivos y no ser

tóxicos para el vector animal, y las esporas deben ser resistentes al tracto digestivo y permanecer viables una vez en las heces. Tanto *Suillus* como *Rhizopogon* cumplen con estas características. Además de ser dispersados en las fecas, los hongos suilloides son capaces de resistir la posible desecación por al menos 1 año y permanecer viables (Ashkannejhad y Horton 2006). Muchos otros hongos EM tienen el potencial de ser consumidos por grandes mamíferos, pero sus esporas pueden carecer de la capacidad de sobrevivir y colonizar raíces rápidamente.

Los mamíferos dispersores de hongos suilloides pueden establecer interacciones novedosas entre tres actores diferentes en el rango no nativo. Los ciervos y jabalíes no nativos comen esporocarpos de hongos EM no nativos, principalmente *Rhizopogon* spp., y las esporas presentes en sus fecas son capaces de sobrevivir, germinar y colonizar plántulas de pinos no nativas, mejorando su crecimiento y supervivencia (Nuñez et al. 2013). Hay evidencia experimental de una interacción triple similar en Nueva Zelanda, en donde zarigüeyas australianas no nativas, dispersan hongos suilloides no nativos provenientes de Norteamérica y Europa (especies de *Suillus* y *Rhizopogon*), facilitando el establecimiento de pinos provenientes de América del Norte (Wood et al. 2015). Los hongos EM nativos también pueden ser consumidos por mamíferos no nativos invasores, pero la evidencia muestra que no serían capaces de colonizar hospedadores nativos o no nativos (Wood et al. 2015). Curiosamente, estudios en Sudamérica muestran que ciertos mamíferos nativos (*Pudu pudu* y especies de roedores) no poseen un papel relevante en la dispersión de los hongos EM nativos dada su escasa abundancia (Nuñez et al. 2013). Se profundizará acerca de la relación entre la dispersión de hongos EM mediada por mamíferos no nativos y la facilitación de la invasión de pinos en el Capítulo 3 de esta tesis.

2.4.3 Banco de esporas resistente

De forma análoga a los bancos de semillas, los bancos de esporas juegan un papel clave en los ecosistemas terrestres como fuentes de propágulo fúngico. No todas las especies de hongos EM son capaces de producir un banco de esporas duradero en el tiempo, por lo que las especies que se

mantienen viables en el suelo pueden actuar como pioneras en la colonización. Aún más importante, estas especies pueden pre-condicionar el sitio para permitir el crecimiento de sus hospedadores, facilitando el establecimiento y, eventualmente, la invasión. Los bancos de esporas de algunas especies, en particular de los géneros *Rhizopogon* y *Suillus*, son capaces de permanecer viables por décadas (Bruns et al. 2009, Nguyen et al. 2012), haciendo posible la colonización de los hospedadores a largo plazo y pre-condicionando el sitio. Al contrario de lo que ocurre con los hongos suilloides, la longevidad de las esporas de la mayoría de los hongos EM es corta e insuficiente para acumular un número efectivo de esporas viables (Nara 2006a).

Tanto en el rango nativo como en el no nativo, los hongos suilloides son el grupo predominante de hongos EM en el banco de esporas para los pinos. En el rango nativo, los bancos de esporas de hongos EM están predominantemente compuestos de especies con basidiomas gasteroides, dentro de los cuales *Rhizopogon* es el que se encuentra más comúnmente (Glassman et al. 2015). El género *Wilcoxina* puede también estar bien representado en bancos de esporas en el rango nativo de los pinos, pero, a diferencia de lo que ocurre con los suilloides, las esporas de *Wilcoxina* no son dispersadas de forma efectiva por aire o por mamíferos. La mayoría de los propágulos de *Wilcoxina* son clamidosporas que son producidas en el mismo sitio, siendo depositadas en el suelo y dispersadas a través del movimiento del mismo. Dentro de las especies que generan esporocarpos epígeos, *Suillus* es el género más común capaz de colonizar especies de *Pinus* a partir de propágulos presentes en el banco de esporas, si no se toman en cuenta aquellas especies que forman costras resupinadas sobre el sustrato (por ejemplo *Thelephora* spp., *Amphinema* spp., *Piloderma* sp., Marx y Ross 1970, Glassman et al. 2015). El hecho de que los hongos suilloides duren por años en el suelo los hacen particularmente importantes en áreas sucesionalmente primarias (Ashkannejhad y Horton 2006) y son cruciales en los frentes de invasión de pinos (Collier y Bidartondo 2009). En un contexto de invasión, la capacidad de formar un banco de esporas resistentes facilita la introducción de hongos suilloides en cualquier momento en el que el suelo sea transportado junto a plántulas de pinos.

Diversos mecanismos podrían explicar la alta resistencia de las esporas de los hongos suilloides. La deposición de un número mayor de esporas que permanecen a mayores profundidades en el suelo a medida que el esporocarpo se descompone (Miller et al. 1993) podría ser una de las principales razones que permite que especies de *Rhizopogon* dominen los bancos de esporas. A su vez, la dependencia de *Rhizopogon* del consumo de herbívoros de los esporocarpos, podría parcialmente explicar su capacidad de permanecer viable en el suelo por mucho tiempo (Bruns et al. 2009). Dado que las esporas deben estar adaptadas para resistir la degradación enzimática y la degradación microbiana en el sistema digestivo de los mamíferos, podrían tener también una resistencia mayor a la degradación microbiana en el suelo. La dispersión por mamíferos podría a su vez evitar la pérdida de viabilidad por la radiación UV o la desecación que ocurriría en el caso de la dispersión aérea. Los rasgos morfológicos y fisiológicos que podrían estar actuando en la resistencia y la longevidad de las esporas, como el grosor de su pared celular o sus rasgos bioquímicos, están aún poco estudiados.

2.4.4 Esporas sensibles a la presencia del hospedador que garantizan una colonización rápida de la raíz

La colonización rápida de las raíces de las plántulas de pino a partir de las esporas de los hongos suilloides es una característica crítica de su biología que les permite facilitar el establecimiento de los pinos (Ashkannejhad y Horton 2006, Hayward et al. 2015b). Se podría asumir que la mayoría de los hongos EM poseen un comportamiento similar en cuanto a la respuesta de sus esporas, sin embargo esto no es así. En realidad, lo contrario es correcto: las esporas de la gran mayoría de los hongos EM no germinan ni colonizan plántulas fácilmente bajo circunstancias que puedan ser reproducidas en el laboratorio, el invernadero o en la naturaleza (Fries 1987, Nara 2009). Los estudios que han analizado los procesos de sucesión fúngica, describen a los hongos suilloides como sucesionalmente tempranos, reaccionando rápidamente a la presencia de sus hospedadores (Ishida et al. 2008, Peay et al. 2011). Las esporas de la mayoría de las especies de *Suillus* y *Rhizopogon* germinan fácilmente, a diferencia de lo que ocurre con otras especies de

hongos EM, especialmente cuando son estimuladas por raíces de hospedadores compatibles (Fries 1987, Liao et al. 2016). La colonización temprana de raíces puede, a su vez, proveer de una ventaja competitiva a los hongos suilloides en comparación con otros hongos EM debido a fuertes efectos del orden y momento de llegada (Kennedy y Bruns 2005, Kennedy et al. 2009). La cantidad de esporas contribuye a la predictibilidad del proceso en la naturaleza, dado que se necesita una densidad considerablemente alta de esporas para garantizar que todas las plántulas sean colonizadas (Bruns et al. 2009). Sin embargo, es probablemente más importante el hecho de que señales químicas específicas generadas por los hospedadores estimulen la germinación de esporas (Fries 1987). Esto implicaría que las esporas de los hongos suilloides puedan permanecer quiescentes en el suelo hasta ser estimuladas por raíces no colonizadas de pinos. Esta característica, acoplada con la longevidad de las esporas, le permite al banco de esporas incrementar su densidad y permanecer sensible a la presencia del hospedador a lo largo del tiempo.

2.4.5 Tipo exploratorio a largas distancias

Los hongos suilloides son un ejemplo de tipo exploratorio a largas distancias (Agerer 2001), caracterizado por la formación de rizomorfos largos, capaces de colonizar zonas alejadas y transportar nutrientes de forma efectiva. En un contexto de invasión de pinos, estos rizomorfos largos podrían ser capaces de conectar de forma más efectiva plántulas que actúen como “sumidero” a la red de hifas, que sean soportadas por hospedadores adultos que actúen como “fuente” (Selosse et al. 2006, F. Kuhar com. pers.). La formación de las redes de micelio capaces de mediar en el transporte de agua y nutrientes entre plantas a grandes distancias, e incluso mediar sus interacciones (Selosse et al. 2006), podrían ser fundamentales para los pinos para prosperar lejos de los hospedadores adultos (Teste y Simard 2008). La formación de micelio distribuido tanto a grandes distancias horizontales como verticales asegura a las especies de hongos suilloides el acceso a fuentes de agua durante la formación de esporocarpos (Lilleskov et al. 2009) y puede ser fundamental para la supervivencia de los pinos durante períodos secos (Pickles

y Simard 2017). La pregunta acerca de si el abastecimiento de nutrientes y agua como resultado de estas redes de micelio puede explicar parte del éxito de invasión de los pinos sigue estando abierta.

2.5 Preguntas a futuro

Muchos aspectos de la interacción entre especies de la familia Pinaceae y sus simbiosis suilloides permanecen completamente inexplorados o se basan en evidencia proveniente sólo de su rango nativo. En esta sección, se identifican algunos vacíos en el conocimiento de acuerdo a la literatura vigente.

2.5.1 Causalidad

La literatura muestra que los hongos suilloides siempre están presentes en casos de invasión de pinos y están asociados al frente de invasión. Este fuerte patrón, junto con los rasgos ecológicos desarrollados en este capítulo, dan lugar a la hipótesis de que son componentes necesarios para una invasión de pinos exitosa. Sin embargo, la evidencia experimental directa sobre esta hipótesis no está disponible y esto representa un desafío para futuras investigaciones. La presencia de los hongos suilloides son evidencia necesaria pero no suficiente para demostrar la hipótesis propuesta en este capítulo, siendo necesaria evidencia experimental para descartar una mera coincidencia en el patrón reportado a escala global. A pesar de esto, aún no hay casos reportados en los que las especies de hongos suilloides estén presentes, pero los pinos no logren invadir. Experimentos futuros debieran abordar este problema evaluando el establecimiento, el crecimiento, y la supervivencia de plántulas de pino creciendo en presencia y en ausencia de hongos suilloides. A su vez, se podrían evaluar un cierto rango de circunstancias bajo las cuales los hongos suilloides contribuyen a la invasión de pinos, examinando como esta contribución podría variar de acuerdo por ejemplo a diferentes tipos de suelo y condiciones climáticas.

2.5.2 *Diversidad*

Contrariamente a lo que ocurre en el rango nativo de las plantas hospedadoras, en el rango no nativo la comunidad de mutualistas fúngicos asociadas a la raíz está compuesta por muy pocas especies. El caso de los hongos suilloides como factores determinantes de la invasión global de pinos es un ejemplo de como una baja diversidad de mutualistas, en este caso representada incluso por una sola especie, puede desencadenar un proceso ecológico, como es la invasión de su hospedador. En términos generales, parece intuitivo asumir que un gran número de especies de hongos EM son mejores para el hospedador, pero no hay evidencia fuerte que soporte esta idea ni del rango nativo ni del rango no nativo. En lugar de esto, el patrón sugiere que la identidad de las especies de hongos EM y sus rasgos ecológicos son más importantes que la diversidad en los sitios de invasión. En este contexto, se podría aprovechar el escaso número de especies de hongos EM presentes en el rango no nativo, y usarlo para testear los efectos de diferentes especies de hongos EM y de la diversidad de estos hongos en el establecimiento y el crecimiento de sus hospedadores. Puede ser posible también, establecer plantaciones de pinos con menor riesgo de invasión seleccionando especies de hongos no suilloides como simbiosistas inoculados (Hayward et al. 2015a, Dickie et al. 2016, Policelli y Nuñez en prep.).

2.5.3 *Liberación de enemigos naturales*

La liberación de enemigos naturales es un mecanismo comúnmente propuesto para explicar las invasiones exitosas (Keane et al. 2002, Agrawal et al. 2005, Stricker et al. 2016, Policelli et al. 2018). Aún no existe evidencia de que una carga menor de enemigos naturales de los hongos EM facilite su invasión e indirectamente la invasión de sus hospedadores. Ciertamente, el éxito de los hongos suilloides en el rango no nativo podría estar parcialmente incrementado por la ausencia de patógenos u organismos que consuman estos hongos, normalmente presentes en su rango nativo. Por ejemplo, la ausencia de insectos micófagos (Hiol Hiol et al. 1994) o de micoparásitos (e.g. *Hypomyces*, miembros de la familia Gomphidiaceae) podría incrementar el

número de esporocarpos o aumentar su longevidad, lo que implicaría un incremento en la producción de esporas. El escape de enemigos naturales que podrían afectar a los hongos suilloides durante su estadio no reproductivo, representaría a su vez una posible ventaja en el rango invadido en comparación con el rango nativo.

La carga reducida de enemigos naturales sobre el hospedador también podría beneficiar indirectamente a los hongos EM. Por ejemplo, luego de un brote epidémico en el oeste de Norteamérica, el escarabajo del pino de montaña (*Dendroctonus ponderosae*), que está actualmente ausente en el hemisferio sur, afectó tanto la proporción de especies de hongos EM como la longitud de las hifas en el suelo (Treu et al. 2014). Los hongos EM que son altamente específicos, como en el caso de *Suillus*, estarían más fuertemente afectados por la reducción del número de hospedadores en comparación con aquellas especies de hongos EM que son capaces de establecer asociaciones simbióticas con otras especies de plantas. Comunidades más ricas de hongos EM en el rango nativo, podrían actuar como un mecanismo de protección contra patógenos de la raíz (Bennett et al. 2017). Sin embargo, los árboles como *P. contorta* son colonizadores agresivos de ambientes disturbados, incluso en su rango nativo, dónde la presencia de un mayor número de patógenos es habitual.

2.5.4 Tiempo de retardo e invasiones fallidas

Como resultado de su capacidad dispersiva y de la longevidad de sus esporas, los hongos suilloides son capaces de permanecer viables en el suelo de áreas dónde sus hospedadores están ausentes, y al llegar colonizar rápidamente sus raíces facilitando la invasión. Por el contrario, ¿pueden la ausencia de inóculo fúngico adecuado y la baja reactividad de las esporas explicar la falta de establecimiento de hospedadores por fuera de las áreas de introducción inicial? Los pinos podrían no ser invasores hasta que su simbionte suilloide arribe, o hasta que exista un banco de esporas que sea suficiente para iniciar una invasión. Esto podría explicar los tiempos de retardo observados en las invasiones de pinos (Simberloff et al. 2002, Hallett 2006, Nuñez et al. 2009). Son escasos los reportes de invasiones fallidas de hongos EM (Vellinga et al.

2009), pero sería útil determinar si los casos reportados son coincidentes con invasiones fallidas de sus hospedadores. En este aspecto, el rol de los hongos suilloides en las invasiones de pinos puede ser potencialmente puesto a prueba. Si experimentalmente a campo se recrean áreas pequeñas y aisladas en donde haya pinos previamente inoculados con hongos EM no invasivos, y estas áreas son comparadas con sitios en donde haya pinos previamente inoculados sólo con hongos suilloides, se podría predecir que sólo aquellos pinos con acceso a los hongos suilloides lograrán invadir.

2.5.5 Efectos de legado de las invasiones de pinos

Las esporas de los hongos suilloides pueden persistir en el suelo incluso luego de que sus hospedadores hayan sido removidos. Su alta especificidad, su abundancia y su longevidad podrían dificultar estrategias de restauración a largo plazo siempre que puedan llegar propágulos de pinos desde áreas cercanas. Las oportunidades de restauración en áreas en las que los pinos invasores hayan sido removidos pueden ser obstaculizadas por la presencia de hongos suilloides que permanezcan en el suelo y permitan el re-establecimiento de los pinos por largos períodos de tiempo (Dickie et al. 2014). Las posibles estrategias de manejo para hongos EM están comenzando a ser consideradas (Dickie et al. 2016 y Capítulo 5 de esta tesis), junto con el creciente reconocimiento de algunas especies de hongos EM como especies invasoras.

2.6 Conclusiones

El estudio de la ecología de las comunidades fúngicas del suelo está acrecentando el entendimiento de los procesos ecológicos que ocurren por encima del suelo. Particularmente para la ecología de invasiones, un creciente número de estudios evidencian que las interacciones planta-hongo pueden actuar como un mecanismo que explique el éxito o fracaso de las invasiones. En este capítulo, se ha revisado la evidencia que muestra que, de todas las especies de hongos co-invasoras, un grupo particular es clave como desencadenante de la invasión de pinos. Toda la evidencia disponible del rango nativo y no nativo sugiere fuertemente que, sin los hongos suilloides, la

invasión de pinos no ocurriría y que este grupo de hongos está facilitando la invasión de pinos a nivel global. El conjunto de rasgos ecológicos clave de los hongos suilloides, asociados a su efectiva y abundante dispersión y la reactividad de su banco de esporas, los convierte en un factor promotor de la invasión de uno de los grupos más problemáticos de plantas a nivel global. Esto constituye un ejemplo de cómo la identidad, más que sólo la presencia de un mutualista del suelo puede determinar el éxito de la invasión de plantas.

Capítulo 3 – Dispersión de hongos ectomicorrícicos invasores mediada por ungulados no nativos

3.1 Resumen

Las interacciones positivas entre dos o más especies no nativas pueden potenciar sus posibles impactos sobre el ecosistema y acelerar su invasión. Un ejemplo que involucra mecanismos de facilitación bajo el suelo es el de los ungulados no nativos que dispersan hongos EM no nativos, facilitando la invasión de plantas no nativas. En este capítulo se evalúa si sitios en donde los ungulados no nativos han estado históricamente ausentes (islas lacustres de la Patagonia andina) resultan sub-óptimos para el crecimiento de la conífera no nativa invasora *Pseudotsuga menziesii*, dada la ausencia de los hongos EM no nativos dispersados por estos animales. Se caracteriza la vegetación de sitios en donde los ungulados están presentes (sitios continentales) y sitios donde los ungulados están ausentes (sitios insulares), se registran signos de su presencia, y se compara el crecimiento y la colonización por hongos EM de plántulas de *P. menziesii*, y la identidad de estos hongos, entre ambos tipos de sitios. Los resultados obtenidos muestran que si bien los ungulados no nativos producen cambios por encima del suelo en la comunidad vegetal, su presencia no es condición necesaria para que simbiontes específicos de *P. menziesii* puedan dispersarse y colonizar nuevas plántulas. Particularmente, los ejemplares de *P. menziesii* creciendo en suelo proveniente de las islas fueron colonizados por dos especies de hongos suilloides nativos del hemisferio norte (*Suillus lakei* y *Rhizopogon rogersii*), alcanzando valores de colonización y biomasa iguales a los obtenidos para aquellas plantas creciendo en suelo proveniente de sitios continentales. Estas últimas se asociaron con un mayor número de especies de hongos EM. Los resultados sugieren que la ausencia de uno de los tres integrantes de la interacción involucrada en este proceso de facilitación sinérgica no imposibilita la invasión de *P. menziesii* y sus hongos EM asociados. Futuros estudios debieran indagar en otros mecanismos de dispersión involucrados en la llegada de estos simbiontes fúngicos a las islas.

3.2 Introducción

Las interacciones positivas entre especies no nativas invasoras pueden ser centrales para garantizar el éxito de invasión. En su rango invasor, dos o más especies no nativas pueden interactuar entre sí de forma sinérgica, potenciando y acelerando su supervivencia, su invasión, y sus posibles impactos. Este proceso fue denominado “colapso por invasión” o “reacción en cadena de invasoras”, de aquí en adelante *invasional meltdown* por su nombre original según Simberloff & Von Holle (1999). Los ejemplos de *invasional meltdown* abarcan interacciones que involucran polinizadores (Morales y Aizen 2002), dispersores de semillas (Bourgeois et al. 2005), y microorganismos mutualistas (Nuñez et al. 2013), entre otros (Richardson et al. 2000, Simberloff 2006). Sin embargo, en el contexto de invasiones biológicas, las interacciones negativas como la competencia, la herbivoría, o la predación han recibido mayor atención que las interacciones que involucran procesos de facilitación.

Dentro de las interacciones facilitadoras que involucran animales no nativos invasores y plantas no nativas invasoras, la evidencia muestra que la introducción de ungulados no nativos puede favorecer el establecimiento de plantas no nativas (Wardle et al. 2001, Relva et al. 2010, Barrios-García y Ballari 2012). Se han estudiado diversos mecanismos, tanto directos como indirectos por lo que esto podría ocurrir (Hobbs 1996). Los ungulados no nativos generan cambios en la estructura y cobertura de la vegetación nativa (Relva et al. 2010, Barrios-García et al. 2014), principalmente a partir del consumo de especies del sotobosque (Martin et al. 2010). El consumo selectivo de ciertas especies de plantas nativas (Nuñez et al. 2008), puede llevar a la dominancia de especies no nativas menos palatables y/o más tolerantes a la herbivoría (Gill 2001). A su vez, los ungulados no nativos pueden generar cambios en las características físico-químicas del suelo, afectando negativamente el crecimiento de plantas nativas (Gass y Binkley 2011, Kardol et al. 2014). El disturbio del suelo generado por estos mamíferos también puede facilitar el establecimiento de especies no nativas (Barrios-García y Ballari 2012), así como el transporte de semillas viables de especies no nativas a zonas dominadas por vegetación nativa (Malo et al. 2000). En comparación con los procesos que ocurren en la comunidad aérea, son pocos los estudios

que abordan los mecanismos de facilitación entre ungulados no nativos y plantas no nativas que pudieran ocurrir por debajo del suelo.

Un caso de *invasional meltdown* que involucra mecanismos de facilitación bajo el suelo es el de los ungulados no nativos que dispersan hongos EM no nativos, facilitando la invasión de plantas no nativas. Tal como se desarrolló en el Capítulo 2, los esporocarpos de ciertas especies de hongos EM son consumidos por los ungulados no nativos y las esporas son capaces de sobrevivir al tracto digestivo y son depositadas en la fecas (Ashkannejhad y Horton 2006, Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015, Livne-Luzon et al. 2017, Soteras et al. 2017). Las distancias que pueden alcanzar las esporas por esta vía de dispersión superan ampliamente a las que logran alcanzar a partir del viento (Horton 2017, Livne-Luzon et al. 2017). Si bien no todas las especies de hongos EM no nativos son dispersados de esta manera y/o logran sobrevivir a esta forma de dispersión, aquellas que lo hacen son las que están mayormente reportadas como facilitadoras de la invasión de sus hospedadores (Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015, Policelli et al. 2019). Muchas especies de hongos EM que producen esporocarpos hipógeos dependen principalmente, tanto en su rango nativo como no nativo, de los ungulados para su dispersión (Ashkannejhad y Horton 2006, Galante et al. 2011, Soteras et al. 2017). A partir de esta triple interacción hongo-ungulado-planta, todos organismos no nativos, los ungulados son capaces de facilitar la invasión de especies de Pinaceae por un mecanismo indirecto que involucra la dispersión de esporas de sus simbiontes fúngicos (Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015). La ausencia de mutualistas fúngicos puede ser un factor que dificulte la invasión de los hospedadores (Nuñez et al. 2009, Capítulo 1) o extienda el tiempo de retardo entre la introducción de una especie hospedadora y su invasión (Hallett 2006). Es esperable entonces, que sitios que carecen de ungulados no nativos sean sub-óptimos para el establecimiento y la invasión de los pinos dada la ausencia de sus simbiontes fúngicos dispersados por estos animales, en comparación con sitios en donde los ungulados están presentes.

Una de las formas más frecuentes de abordar el estudio de los efectos de la introducción de ungulados no nativos sobre la comunidad nativa es el uso de clausuras. Las clausuras permiten excluir artificialmente a los ungulados y comparar, luego de un tiempo, los lugares con y sin herbívoros. De esta forma,

se ha podido obtener evidencia acerca de los patrones de preferencia y susceptibilidad de diferentes especies a herbivoría, y de cambios composicionales y funcionales de corto plazo, entre otros (Relva et al. 2010, Barrios-García et al. 2014). A pesar de esto, el uso de clausuras tiene una limitante importante. El tratamiento en sí mismo no puede considerarse como de "ausencia de herbívoros" sino que constituye un tratamiento de "recuperación post-herbivoría". Esta diferencia puede no ser relevante para algunas variables, pero al incorporar la comunidad de simbioses ectomicorrícicas se debe considerar que algunas esporas de estos organismos son capaces de sobrevivir por décadas en el suelo (Bruns et al. 2009). Para ser efectiva en el caso de evaluar aspectos asociados a hongos EM, una clausura debiera entonces superar en tiempo a la viabilidad de las esporas de estos hongos. Por este motivo, la utilización de zonas aisladas geográficamente de los sitios con presencia de ungulados surgen como el mejor control posible de ausencia histórica de herbivoría, y permiten contar con controles más estrictos en relación a los efectos de los ungulados que perduran en el tiempo como el transporte de esporas de hongos EM.

En este capítulo se pondrá a prueba la hipótesis de que la ausencia histórica de ungulados no nativos invasores funciona como un obstáculo para la invasión de pinos, debido a la ausencia de los simbioses fúngicos específicos que dispersan los ungulados. En un sistema de islas lacustres y zonas continentales aledañas, en donde no hay ungulados nativos que reemplacen el rol de los no nativos, se estudiará cómo la ausencia de ungulados no nativos afecta la interacción entre una especie de Pinaceae no nativa invasora y hongos EM no nativos.

3.3 Metodología

3.3.1 Sitio de estudio

El estudio se realizó en zonas lacustres de la Patagonia andina, en Argentina. Específicamente, se trabajó en el lago Nahuel Huapi y en el lago Lácar. Ambos lagos se encuentran dentro de áreas protegidas por la Administración de Parques Nacionales: El lago Nahuel Huapi dentro del Parque Nacional homónimo, y el Lago Lácar dentro del Parque Nacional Lanín. En el

sitio de estudio, la precipitación promedio anual es de 1800 mm, y la temperatura media anual es de 8°C. El suelo predominante es del tipo andisol (Ayesa et al. 2002). La vegetación nativa está caracterizada por bosques mixtos de *Nothofagus dombeyi* y *Austrocedrus chilensis*, con presencia de otras especies como *Lomatia hirsuta* y *Maytenus boaria*. El sotobosque está generalmente dominado por ejemplares de *Schinus patagonicus* y arbustos de menor porte como *Berberis darwinii*, junto con especies herbáceas y gramínoideas (Veblen et al. 1996).

Tanto el lago Nahuel Huapi como el lago Lacar, presentan islotes rocosos dominados por bosque nativo (Tabla S3.1). Las zonas continentales cercanas a la costa del lago también están dominadas por bosque nativo pero tienen una alta presencia de ungulados no nativos (Simberloff et al. 2003, Gantchoff et al. 2013, Barrios-García et al. 2014) principalmente jabalí (*Sus scrofa*), ciervos (*Cervus elaphus* y *Dama dama*), vacas y caballos, estos dos últimos asociados a asentamientos de pobladores que son previos a la creación de las áreas protegidas (Administración de Parques Nacionales, comunicación personal). A su vez, las áreas continentales presentan plantaciones de especies no nativas, originalmente utilizadas para fines forestales, y actualmente la mayoría de ellas abandonadas (Simberloff et al. 2002, 2010, Nuñez et al. 2017).

La especie mayormente plantada en las zonas continentales es *Pseudotsuga menziesii* (pino oregon). Esta especie está reportada como invasora en varias regiones del mundo en donde ha sido introducida (Simberloff et al. 2002, Richardson et al. 2014). En el sitio de estudio, ha logrado establecerse e invadir fuera de los sitios donde fue plantada originalmente, creciendo en zonas de bosque nativo (Peña et al. 2008, Orellana y Raffaele 2012).

3.3.2 Elección de sitios de muestreo

Se eligieron tres tipos de sitios para el muestreo, los dos primeros con presencia de ungulados no nativos: 1. Sitios en el continente cercanos a plantaciones (a 200 m del límite de las mismas), dominados por bosque nativo pero con invasión de *P. menziesii* (de aquí en más denominados “continente cercano a plantación”). La invasión se evidencia por la presencia de plántulas

de 1, 2 y 3 años de edad, individuos jóvenes de menos de 1 m de altura y adultos que presentan conos; 2. Sitios en el continente lejanos a plantaciones (a más de 1.5 km de las mismas, Tabla S3.1) dominados por bosque nativo, sin presencia de individuos de *P. menziesii* (de aquí en más denominados “continente”); 3. Sitios en los islotes lacustres (de aquí en más denominados “islas”), dominados por bosque nativo, sin presencia histórica de ungulados no nativos, distantes en el rango de 1.5 km hasta 6.5 km (Tabla S3.1) a los sitios de continente cercanos a plantación y a los sitios de continente. Dos de estas islas presentaron escasos y aislados individuos adultos de *P. menziesii* siempre cercanos a la costa (Tabla S3.1).

Se generaron bloques constituidos por cada uno de los tres sitios (continente, continente cercano a plantación, e islas), tomando en cuenta que las distancias que separen los sitios dentro de un bloque sean similares (Tabla S3.1). Un total de siete bloques reunieron las características buscadas considerando la isla con sus dos zonas continentales aledañas. La Isla Victoria, en el lago Nahuel Huapi, fue utilizada para el establecimiento de sitios cercanos a plantación y continentales debido a sus dimensiones (20 km de largo, 3710 ha en superficie) en comparación con los islotes, la presencia de plantaciones e invasión de *P. menziesii*, y la gran abundancia de ungulados no nativos invasores presentes (Simberloff et al. 2002, Nuñez et al. 2013).

La mayoría de los ungulados son buenos nadadores (Morelle y Lejeune 2015), y si bien se puede intuir que las dimensiones, temperaturas, profundidades y el oleaje de los lagos estudiados desalentarían el recorrido a nado de las distancias que separan los islotes de las zonas continentales, la llegada ocasional de estos debió ser considerada en el diseño. Por este motivo aquellos sitios insulares para los que se obtuvo una sospecha de presencia histórica de ungulados (por comunicación personal de pobladores, guardaparques, guías de turismo, y /o personal técnico de la Administración de Parques Nacionales) fueron descartados como sitios de estudio. A su vez, se relevó la vegetación de los sitios y la presencia de fecas y osadas, para descartar la ocasional llegada de ungulados.

3.3.3 Muestreos de vegetación

Los cambios en la estructura y composición de la vegetación son uno de los principales efectos de la presencia de ungulados no nativos. Para caracterizar la composición y cobertura de las especies de plantas en los sitios con presencia y ausencia de estos mamíferos, se realizó un muestreo de vegetación durante fines de la primavera y principios del verano del 2017. En cada sitio se establecieron cuatro parcelas cuadradas de 2 m x 2 m para la vegetación herbácea y de 10 m x 10 m para la vegetación del estrato arbustivo y arbóreo. Las parcelas para el relevamiento de la vegetación herbácea estuvieron incluidas dentro de las parcelas para el relevamiento de la vegetación arbustiva y arbórea. Las parcelas se dispusieron a 20 m entre sí y, para el caso de las islas, se dispusieron en la zona central de las mismas para evitar posibles efectos de borde en las cercanías a la costa. En cada una de las parcelas se midió la abundancia- cobertura de cada especie vegetal presente utilizando categorías según el método de Braun-Blanquet (1: <5 %; 2: 5–25 %, 3: 25–50 %, 4: 50–75 %, y 5: 75–100 %, Braun-Blanquet et al. 1932). A su vez, se registró el porcentaje de suelo desnudo y broza. Las especies fueron categorizadas en: nativa, nativa endémica del bosque andino patagónico, y no nativa, siguiendo el Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur (Zuloaga y Belgrano 2015).

3.3.4 Muestreo de pellets fecales

En cada uno de los tres tipos de sitios (isla, continente, continente cercano a plantación) se establecieron cuatro parcelas de 10 x 10 m en los mismos puntos utilizados para el muestreo de vegetación. Se realizó un recorrido exhaustivo de cada área de 100 m², registrando el número de pellets fecales. Se registró de acuerdo al pellet fecal, la presencia de ciervo, jabalí, caballo, y/o vaca, siendo los pellets claramente distinguibles entre estos ungulados. Se estimó a su vez visualmente la superficie osada por jabalí, en caso de estar presente dentro del área de 100 m².

3.3.5 *Colecta de suelos*

Para llevar a cabo un ensayo en invernadero con suelo proveniente de los tres tipos de sitios (isla, continente, continente cercano a plantación), se realizó una colecta de muestras de suelo durante el otoño de 2017, justo después del período de mayor producción de esporocarpos de los hongos. En cada uno de los sitios de muestreo (isla, continente, continente cercano a plantación) se dispuso una parcela cuadrada de 20 m x 20 m en los mismos puntos utilizados para los ítems 3.3.3 y 3.3.4. En cada uno de los cuatro vértices de la parcela se extrajeron un total de cuatro muestras de suelo, resultando en un total de 336 muestras (4 muestras x 4 puntos de colecta por sitio x 3 tipos de sitios –isla, cercano a plantación y continente – x 7 bloques). Las muestras se extrajeron utilizando tubos de PVC de 1 litro (10 cm de diámetro x 12 cm de profundidad) previamente lavados con agua lavandina y esterilizados con etanol antes de salir al campo y en el momento previo a ser utilizados. Se minimizó el disturbio del suelo dentro y fuera del tubo de PVC al momento de la colecta. Luego de colectar la muestra, cada tubo de PVC se cubrió con dos tapas de PVC esterilizadas con etanol y se envolvió en papel film. Para evitar la contaminación cruzada entre los puntos de colecta, se utilizaron guantes estériles y se lavaron todos los instrumentos con etanol antes y después de manipular cada muestra. Las muestras fueron trasladadas a un invernadero, y una vez allí se retiró la tapa superior para asemejar cada tubo de PVC a una maceta.

Para comparar las condiciones fisicoquímicas del suelo de los sitios, se midieron las siguientes variables: pH, materia orgánica, fósforo extractable, nitrógeno de amonio, nitrógeno total, carbono total, y materia orgánica. Las muestras de suelo para tal fin fueron colectadas en bolsas herméticas en los mismos cuatro puntos de colecta por sitio y se mantuvieron en forma independiente. Las muestras fueron luego analizadas en el Laboratorio de Servicios Analíticos de Suelos, Plantas y Ambiente CERZOS - CONICET de la Universidad Nacional del Sur.

3.3.6 Ensayo de invernadero

Dos de las cuatro muestras por punto de colecta fueron esterilizadas individualmente y utilizadas como control por posibles contaminaciones con hongos EM durante el experimento. Se pre-incubaron las muestras a ser esterilizadas por 3 días a temperatura ambiente para estimular el crecimiento microbiano. Luego, se autoclavó el suelo individualmente, dos veces a 0.10 MPa y 121 °C por 1 hora cada vez y con una incubación de 2 días a temperatura ambiente entre cada autoclavado. Se aseguró una distribución uniforme del calor expandiendo la muestra de suelo a una profundidad menor a 2.5 cm para las incubaciones y las esterilizaciones (Wolf y Skipper 1994).

En el ensayo se sembraron semillas de dos especies de árboles: la especie ectomicorrícica no nativa invasora *Pseudotsuga menziesii*, y la especie micorrícica nativa *Embothrium coccineum* (Proteaceae) como control por posibles cambios bióticos y abióticos en el suelo entre tratamientos (Koide y Li 1989, Kahiluoto et al. 2000). Las semillas de *P. menziesii* se adquirieron en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), proviniendo todas de un mismo lote colectado en el sitio de estudio en 2010 y con un poder germinativo del 77 % (INTA, Campo Forestal Gral. San Martín). Las semillas de *E. coccineum* se colectaron en el sitio de estudio. Las semillas fueron previamente estratificadas (Arana 2011) y esterilizadas superficialmente (Sudhakara Reddy y Natarajan 1997) para evitar la posible contaminación debido a propágulos fúngicos presentes en la superficie de las mismas. Se sembraron seis semillas por maceta. De las cuatro macetas obtenidas por punto de colecta dos se destinaron a *P. menziesii* (una con suelo del punto y otra con suelo del mismo punto pero esterilizado), y otras dos se destinaron a *E. coccineum*, siguiendo el mismo diseño. Luego de un mes de haber germinado, sólo se dejó crecer la plántula más alta, siendo el resto cortadas al nivel del suelo, para evitar efectos de la competencia intra-específica en el crecimiento. Durante toda la experiencia, se regó a capacidad de campo, y no se le agregaron nutrientes a las macetas. Se mantuvo un ciclo de luz oscuridad de 12 horas. La temperatura se mantuvo en un rango de 25 °C durante las horas de luz y de 10 °C durante las horas de oscuridad.

Luego de 12 meses de crecimiento, se cosecharon las plantas. Se limpió cuidadosamente las raíces del suelo adherido, se separó la planta en raíz y tallo, y ambas fracciones se colocaron en un sobre para ser secado en estufa a 65 °C por dos días. Se midió biomasa seca de cada fracción utilizando una balanza con precisión de 0.1 mg. Antes de ser secadas, las raíces de *P. menziesii* se examinaron cuidadosamente bajo lupa para determinar el porcentaje de colonización micorrícica (basado en características morfológicas). Para examinarlas se utilizó una lupa Nikon SMZ645 y microscopios Nikon E600 DIC y Nikon E200. Las raíces fueron ubicadas en una caja de Petri, y se registró el número de ápices de raíz colonizados y no colonizados por hongos EM.

3.3.7 Identificación de las especies de hongos EM

A partir de las raíces de las plantas de *P. menziesii* del ensayo de invernadero, se colectó una muestra representativa de cada tipo morfológico (morfortipo) de ápice radical colonizado por hongos EM (Agerer 1987). Inmediatamente después de ser removido de la plántula, los ápices radicales fueron almacenados en solución buffer 2 % CTAB (100 mmol/l Tris-HCl [pH 8.0], 1.4 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA, 2 % CTAB) (Gardes y Bruns 1993). Se extrajo ADN de cada morfortipo presente en cada plántula. En los casos en que dos o más morfortipos fueron observados, los ápices fueron analizados en forma separada para determinar su identidad genética. Se separaron los morfortipos sólo dentro de cada muestra, sin agrupar entre muestras. Se extrajo ADN de los ápices de raíces colonizados siguiendo el protocolo de Gardes y Bruns (1993). Se amplificó la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) de los hongos a partir de extractos de ADN usando combinaciones de los cebadores ITS1f (Gardes y Bruns 1996b) e ITS4 (White et al. 1990). Las condiciones de PCR siguieron el protocolo de Gardes & Bruns 1993: 3 min a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 35 s a 94 °C, 55 s a 53 °C, y 45 s a 72 °C, adicionando 2 s por ciclo al tiempo de elongación, con un período final de elongación de 10 min a 72 °C. Se generaron patrones de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) utilizando las enzimas de restricción Hinf I y Dpn II (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) siguiendo los protocolos del fabricante. Se visualizaron los

patrones en geles de agarosa 3 % (Gardes y Bruns 1993). Se secuenció la región ITS de al menos tres ejemplares de cada patrón de RFLP, excepto cuando se obtuvieron menos de tres, en cuyo caso se secuenciaron todas las muestras disponibles. La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI3750XL en los laboratorios de Operon, inc. (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, EEUU). Para algunas muestras no se logró obtener secuencias claras de ITS debido a baja calidad y/o concentración de los productos de PCR. Las secuencias resultantes se sometieron a una búsqueda en GenBank utilizando la herramienta de búsqueda por alineamiento básico local (BLAST, por sus siglas en inglés). Se nombraron unidades taxonómicas operativas (OTUs) basadas en las comparaciones BLAST con GenBank: se consideró una secuencia conespecífica con otra nombrada en GenBank cuando la similitud era del 97 % o superior, si al menos el 60% de la región ITS resultaba alineada.

3.3.8 *Análisis de datos*

Para explorar y visualizar las similitudes entre los tres tipos de sitios (islas, continente, y sitios continentales cercanos a la plantación) en el porcentaje de cobertura por especie vegetal, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (*Principal Coordinates Analysis, PCoA*). De forma similar a un Análisis de Componentes Principales (*Principal Component Analysis, PCA*), el PCoA ordena los objetos (sitios) en ejes de coordenadas principales, de forma tal de explicar la varianza en la matriz de datos original. Sin embargo, a diferencia del PCA, el PCoA puede ser aplicado a cualquier medida de distancia (disimilitud) (Paliy y Shankar 2016). Sobre la matriz de valores de cobertura obtenidos por especie para cada sitio se aplicó, previo al análisis, una transformación mediante raíz cuadrada para restarle influencia a las especies dominantes (Clarke y Warwick 1994). Se utilizó la distancia de Bray-Curtis como medida de disimilitud, dado que no es afectada por el número de valores nulos entre muestras (Bray y Curtis 1957). El porcentaje de suelo desnudo y de broza fueron incluidos en el análisis. Se incluyó a su vez la categorización de las especies en nativas y no nativas. Se graficó en forma separada la proporción de especies nativas endémicas, nativas y no nativas para cada tipo de sitio (isla, continente, y continente cercano a plantación).

Para analizar las diferencias en el número de fecas entre los distintos sitios (islas, cercanos a plantación, y continente) se asumió una distribución Poisson de la variable respuesta “número de fecas en 100 m²”. Se utilizó un modelo Hurdle Poisson que considera los valores cero como una categoría separada al resto de los valores, para datos inflados en cero (paquete y función `glmmTMB`, Brooks et al. 2017). Se incluyó el tipo de suelo como un factor fijo y el “bloque” como un factor aleatorio en el modelo. Para analizar las diferencias en las variables fisicoquímicas del suelo se realizaron análisis de la varianza para cada variable incorporando como factor fijo el tipo de suelo con tres niveles: continente, isla, y continente cercano a la plantación.

Para analizar el cambio de la biomasa seca de la porción aérea de las diferentes especies según el tipo de suelo (isla, continente, continente cercano a la plantación) se asumió una distribución normal de la variable respuesta “biomasa”, y se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos ajustado por residuos de máxima probabilidad (REML, paquete `nlme`, función `lme`, Pinheiro et al. 2007). Se analizó cada especie en forma separada. Se incluyeron las variables “tipo de suelo” como un factor fijo con tres niveles (suelo de isla, suelo continente, suelo de continente cercano a la plantación), “control estéril” como un factor fijo con dos niveles (sí, no) y “bloque” como factor aleatorio en el modelo. Se validó el modelo utilizando el test de Shapiro-Wilk como test de normalidad, testeando a su vez homocedasticidad. Ante la falta de homocedasticidad, se modeló la estructura de varianzas utilizando la función de identidad (`varIdent`), estimando una varianza distinta para cada nivel de la variable “tipo de suelo” (Pinheiro y Bates 2000).

Para analizar la colonización de raíz por hongos EM en el caso de *P. menziesii* en los diferentes tipos de suelo, se asumió una distribución binomial de la variable respuesta “colonización de raíz” calculada como el número de ápices colonizados / número total de ápices, y se utilizó un modelo lineal generalizado mixto basado en la aproximación de Laplace y la función de enlace logit (GLMM, paquete `lme4`, función `glmer`, Bates et al. 2018). En todos los casos, se utilizó el test de Tukey para analizar las diferencias entre los tratamientos (a un $\alpha = 0.05$). Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico R 3.4.1 (R Core Team 2018).

Para los datos moleculares, la asignación a nivel de especie fue realizada cuando la disimilitud de las secuencias de ITS fue menor al 3 % y no hubo conflictos evidentes en la asignación en los primeros 25 resultados del BLAST (unos pocos casos de datos incorrectos en el Genbank fueron ignorados, Bidartondo 2008); siguiendo los mismos criterios, para la asignación a nivel de género se tomó una disimilitud de ITS entre 3 % y 10 %, sin conflictos evidentes en la asignación en los primeros 25 resultados de BLAST; para la asignación a nivel de familia se tomó una disimilitud de ITS entre 10 % y 20 %. En los casos en los que no se obtuvo una secuencia clara, se identificó al patrón de RFLP obtenido con un número y fue tratado como un OTU diferente. Se comparó luego la frecuencia de hospedadores colonizados por cada OTU encontrado.

3.4 Resultados

3.4.1 Vegetación

Las islas presentaron una composición y cobertura de especies distinguible de los sitios continentales, tanto los cercanos como los lejanos a las plantaciones (Figura 3.1). Especies palatables como el maqui (*Aristotelia chilensis*), estuvieron asociadas a los sitios insulares con ausencia de ungulados, mientras que especies no palatables como el radal (*Lomatia hirsuta*) o *Cynoglossum creticum* presentaron mayor cobertura en sitios continentales con presencia histórica de herbívoros.

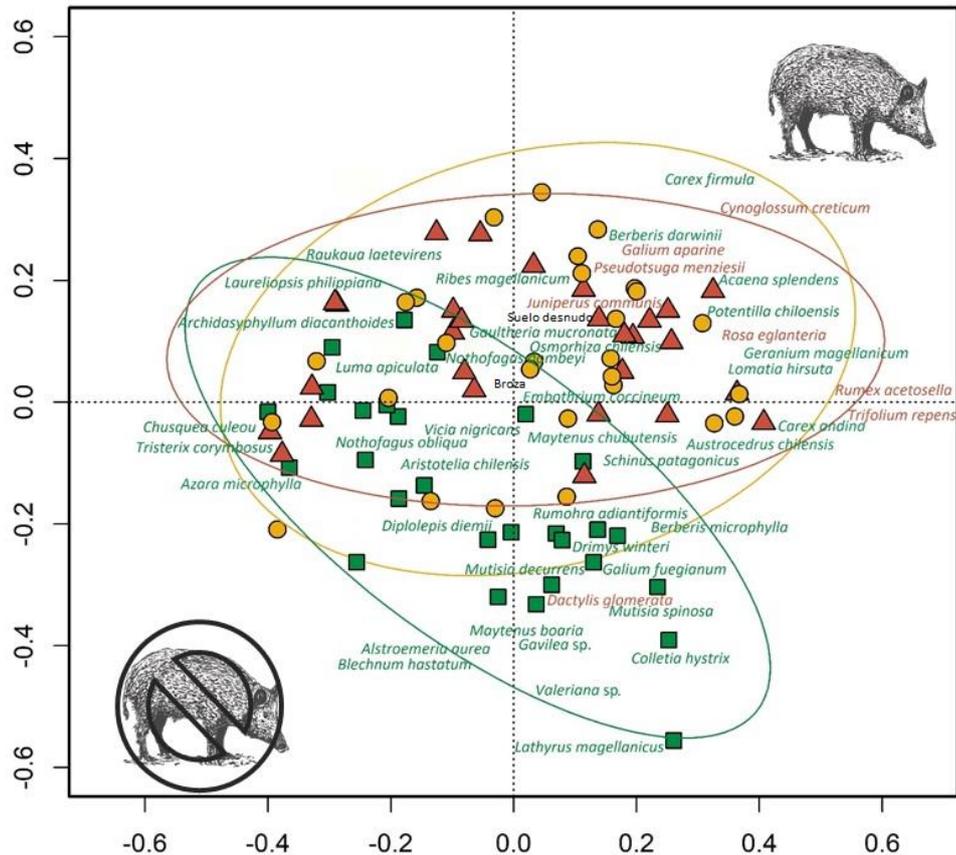


Figura 3.1 Análisis de Coordenadas Principales de la cobertura de vegetación por especie en los sitios de islas (cuadrados verdes), en los sitios del continente (círculos amarillos), y en los sitios del continente cercanos a plantación (triángulos rojos). Las elipses muestran el intervalo de confianza al 95 % y siguen el mismo código de colores. Los nombres de las especies se indican en dos colores: verdes para especies nativas y rojo para especies no nativas. Se indica a modo ilustrativo en el par de cuadrantes superior e inferior la asociación entre los sitios y la presencia o ausencia de ungulados no nativos.

En los estratos bajos de la vegetación, las islas estuvieron caracterizadas por la cobertura de especies de helechos (*Rumohra adiantiformis* y *Blechnum hastatum*) y enredaderas (*Diplolepis diemii* y *Mutisia decurrens*), mientras que en los sitios continentales estas especies estuvieron ausentes y se observó una mayor proporción de suelo desnudo.

Arbustos no nativos como la rosa mosqueta (*Rosa eglanteria*) sólo se registraron en los sitios continentales tanto cerca como lejos de plantaciones.

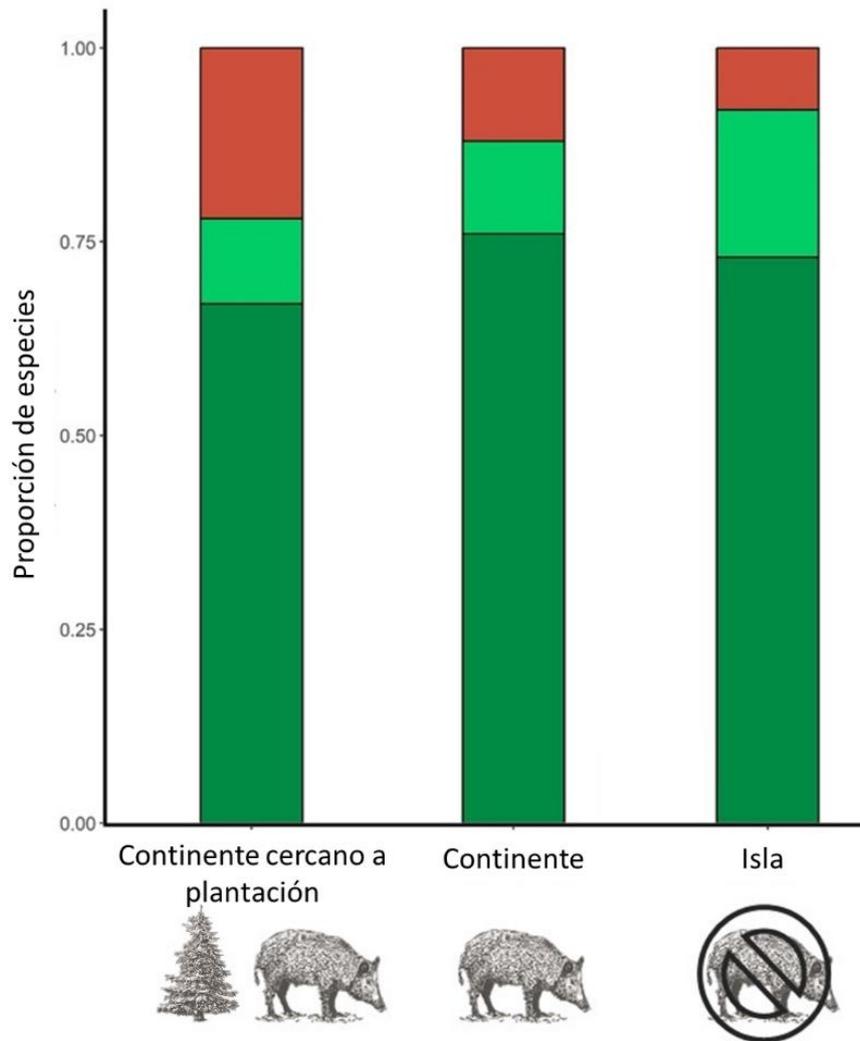


Figura 3.2 Tendencias en la proporción de especies de plantas nativas endémicas del bosque andino patagónico (verde oscuro), nativas (verde claro), y no nativas (rojo), para sitios de continente cercanos a plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* (total de especies = 37; presencia de ungulados no nativos), para sitios de continente (total de especies = 34; presencia de ungulados no nativos), y para sitios de isla (total de especies = 37; ausencia de ungulados no nativos).

En el estrato arbóreo, *Nothofagus dombeyi*, la especie arbórea dominante en el sitio de estudio, no se asoció a ninguno de los tres tipos de sitio en particular, estando presente con alta cobertura en todos ellos (Figura 3.1).

Las islas presentaron una tendencia a poseer mayor proporción de especies de plantas nativas (considerando nativas y nativas endémicas), comparado con los sitios continentales (Figura 3.2). La única especie no nativa registrada para las islas fue *Dactylis glomerata*, una gramínea perenne cuya distribución nativa abarca el continente Europeo, norte de África y parte de

Asia, de alto valor forrajero y ampliamente distribuida en Argentina (Correa 1978). Los sitios cercanos a las plantaciones presentaron una tendencia a poseer mayor proporción de especies no nativas, seguidos por los sitios continentales alejados de las plantaciones (Figura 3.2). Herbáceas no nativas como *Rumex acetosella* y *Trifolium repens* presentaron mayor cobertura en estos sitios, junto con arbustos no nativos como *Juniperus communis*, y ejemplares de la especie arbórea invasora *Pseudotsuga menziesii* (Figura 3.1).

3.4.2 Signos de presencia de herbívoros

Se encontró igual número de pellets fecales en los sitios continentales cercanos y lejanos a la plantación, no encontrándose pellets en islas (Figura 3.3). La mayoría de los pellets correspondieron a ciervo y vaca, en comparación con un menor número de pellets para el caso de jabalí y caballo (datos no mostrados). La superficie osada por jabalí siguió un patrón similar, siendo igual para los dos tipos de sitios continentales –cerca y lejos de la plantación- y no habiéndose registrado para ninguno de los sitios insulares (Figura S3.1).

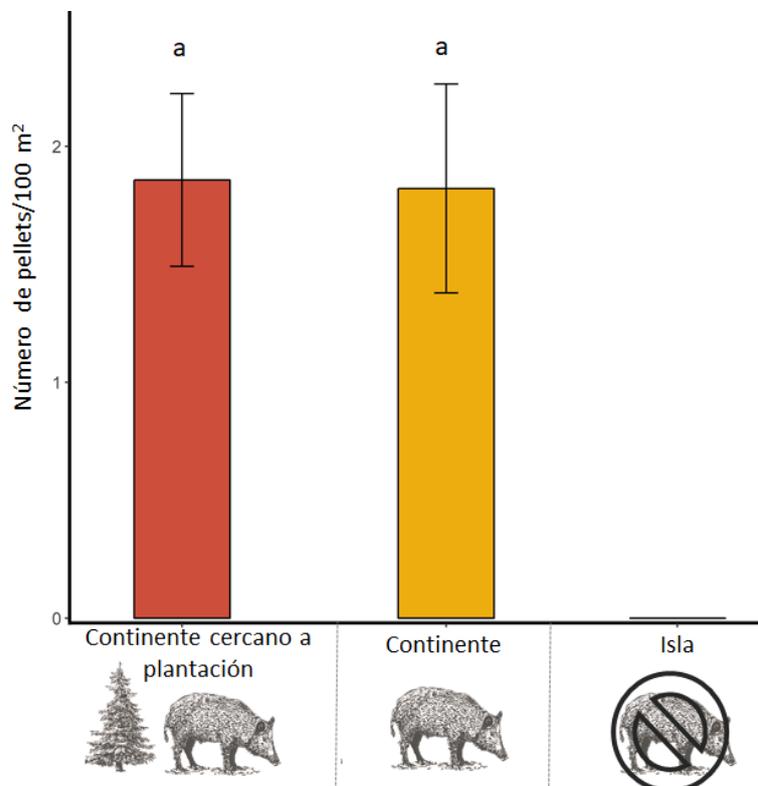


Figura 3.3. Número de pellets fecales (para todas las especies de ungulados) en un área de 100 m² para los sitios de continente cercano a plantación (barra roja), para los sitios de continente (barra amarilla), y para los sitios de islas (sin registro de pellets fecales). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.4.3 Ensayo de invernadero – Biomasa y colonización por hongos EM

No hubo diferencias entre la biomasa aérea de los ejemplares de *Pseudotsuga menziesii* creciendo en los diferentes tipos de suelo (continente, isla, continente cercano a plantación, Figura 3.4). En los tres casos la biomasa aérea fue más de tres veces mayor que la obtenida para las plantas creciendo en suelo estéril proveniente de los mismos sitios (Figura 3.4, Tabla S3.4). Para el caso del notro (*Embothrium coccineum*) no se registraron diferencias entre la biomasa aérea de las plantas creciendo en los tres tipos de suelo, pero se obtuvieron valores de biomasa siempre menores que para el caso de las plantas creciendo en suelo control estéril proveniente de los mismos sitios (Figura 3.5, Tabla S3.4). La biomasa de raíz siguió el mismo patrón que la aérea para ambas especies.

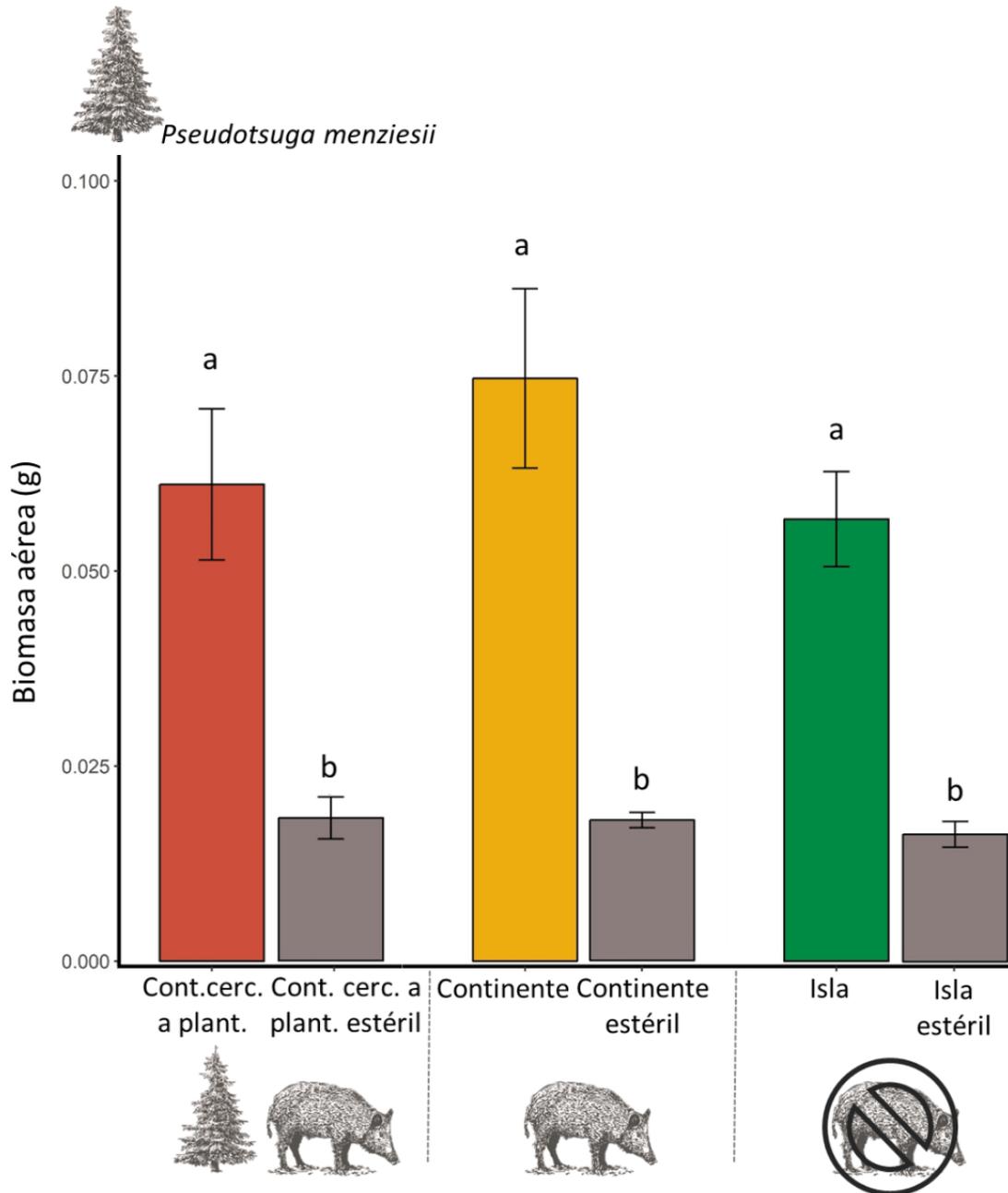


Figura 3.4 Biomasa aérea de la especie no nativa invasora *P. menziesii* creciendo en los diferentes suelos provenientes de: sitios de continente cercanos a plantaciones (barra roja), sitios de continente (barra amarilla), sitios de islas (barra verde), y sus respectivos controles estériles (barras grises). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

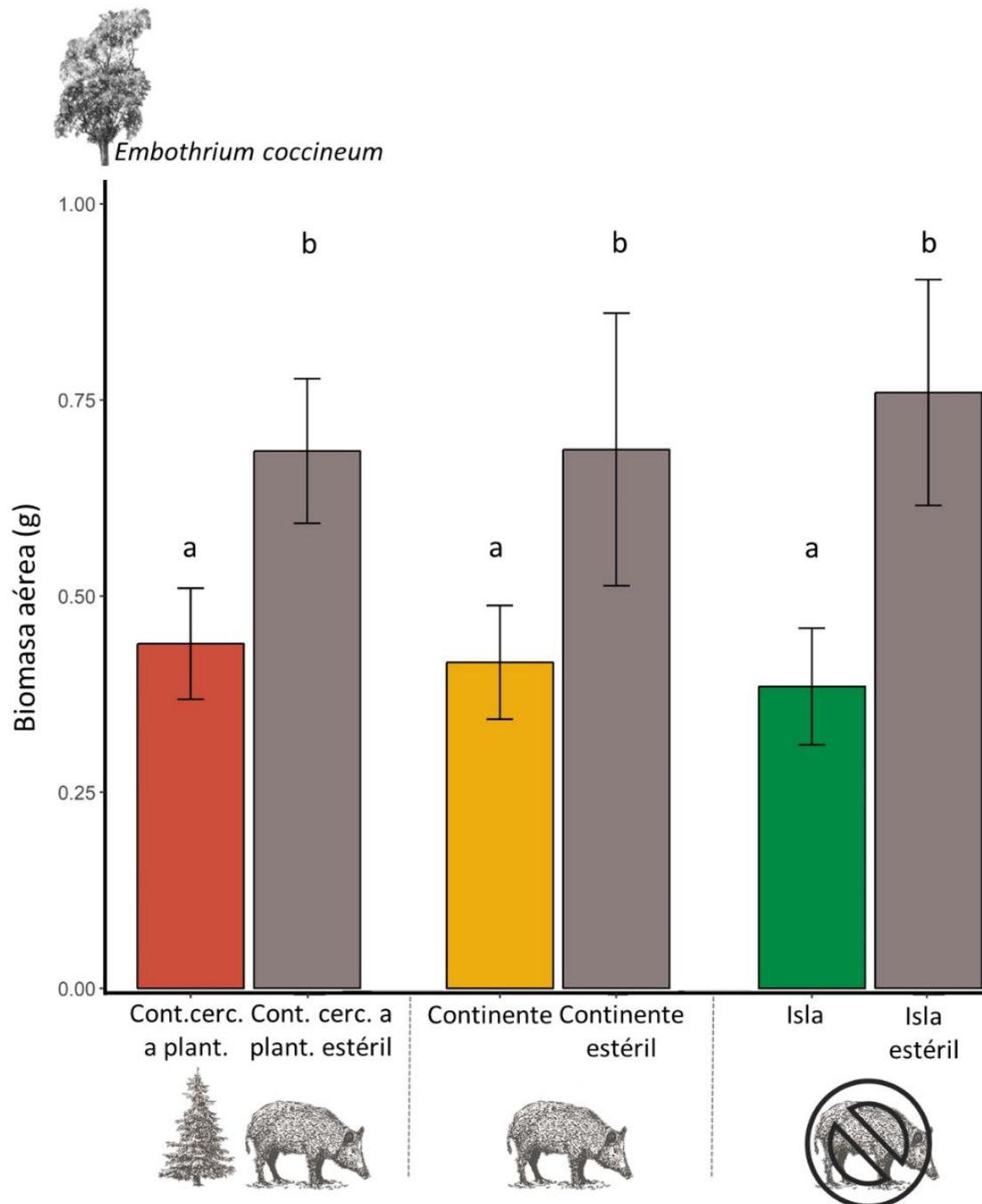


Figura 3.5 Biomasa aérea de la especie nativa no micorrícica *E. coccineum* creciendo en los diferentes suelos provenientes de: sitios de continente cercanos a plantaciones (barra roja), sitios de continente (barra amarilla), sitios de islas (barra verde), y sus respectivos controles estériles (barras grises). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La proporción de ápices radicales colonizados por hongos EM fue mayor para aquellas plantas de *P. menziesii* creciendo en suelo proveniente de sitios cercanos a plantaciones, para las cuales se obtuvieron porcentajes de

colonización cercanos al 50 %, en comparación con sitios continentales lejanos a plantaciones e islas, ambos con porcentajes cercanos al 25 % (Figura 3.6, Tabla S3.4). En todas las islas analizadas (n=7) se encontró colonización por hongos EM. Las raíces de las plantas crecidas en suelo estéril presentaron valores de colonización por hongos EM cercanos a cero (Figura 3.6).

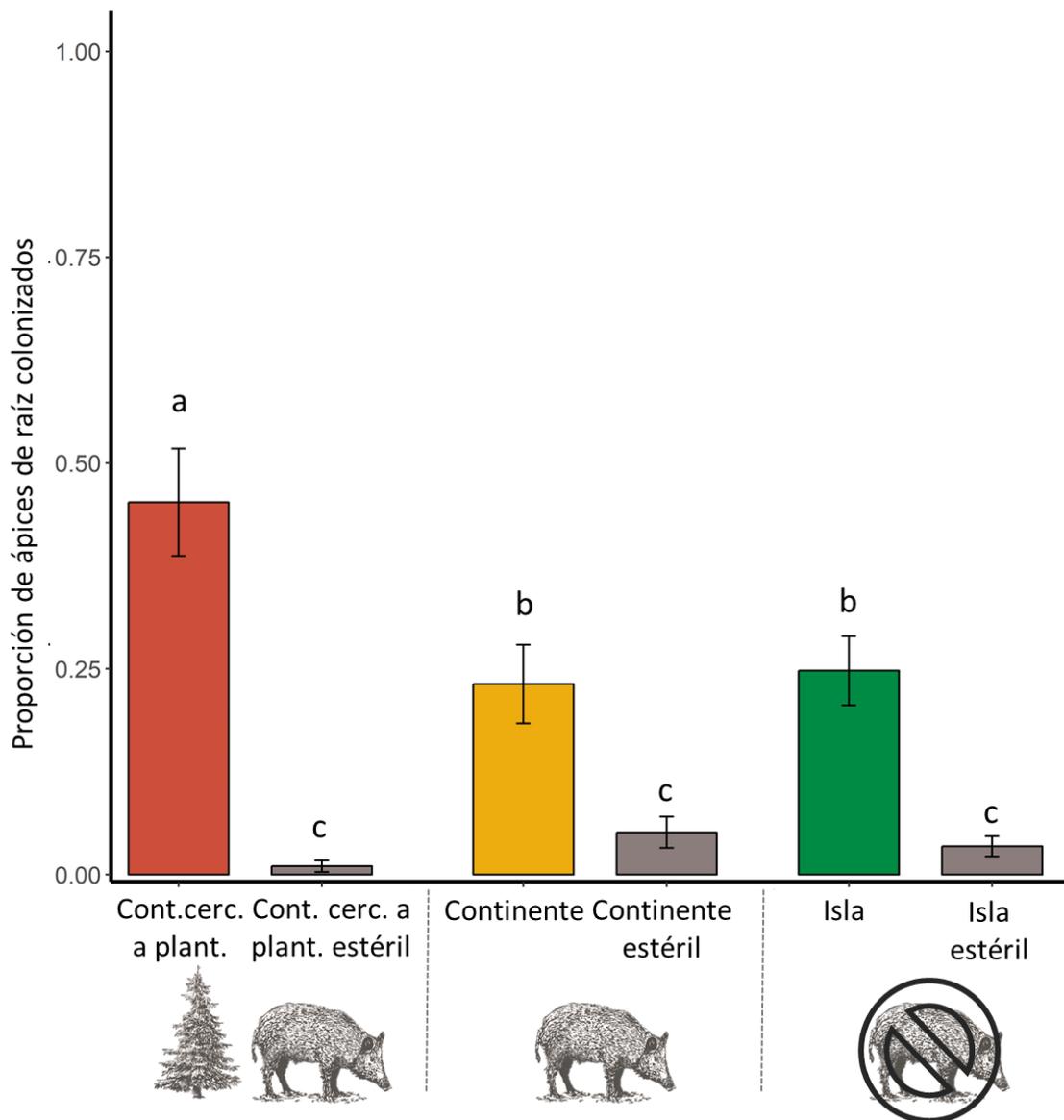


Figura 3.6 Proporción de ápices de raíz colonizados por hongos EM en plantas de *P. menziesii* creciendo en los diferentes suelos provenientes de: sitios de continente cercanos a plantaciones (barra roja), sitios de continente (barra amarilla), sitios de islas (barra verde), y sus respectivos controles estériles (barras grises). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Más de la mitad de los ápices de raíz analizados (53 %) produjeron amplicones de ITS. Las muestras que no produjeron amplicones mostraron signos de senescencia, probablemente estando senescentes o muertos al momento de la colecta. Estas muestras se encontraban repartidas azarosamente entre el total de muestras, sin un patrón determinado. Un total de 6 taxones identificados molecularmente fueron observados asociados a *P. menziesii*, de los cuales cinco se encontraron asociados a plantas creciendo a suelo del continente lejano la plantación, cuatro asociados a plantas creciendo en suelo cercano a plantación y sólo dos se encontraron en plantas creciendo en suelo de islas (Figura 3.7, Tabla S3.2). Ambos taxones encontrados en suelo de islas correspondieron a hongos suilloides, particularmente *Suillus lakei* y *Rhizopogon rogersii*. Esta última especie presentó una alta proporción de hospedadores colonizados tanto en suelo de isla como en suelo de continente cercano a plantación, y una menor proporción en suelo de continente alejado a plantación (Figura 3.7). El porcentaje de hospedadores colonizados por *S. lakei* resultó superior al 40 % en el caso de las islas, y cercano al 10 % en el caso de los sitios continentales tanto cerca como lejos de plantaciones. Otra especie de hongo suilloide, *R. villosulus*, se encontró en plántulas creciendo en suelo de sitios continentales cercanos y lejanos a plantación. Tres taxones fueron nombrados de acuerdo a su patrón único de RFLP dado que no se pudo recopilar información de la búsqueda BLAST debido a la calidad de la secuencia (RFLP1 – RFLP3, Figura 3.7). Dos de ellos (RFLP1 y RFLP2) se encontraron sólo en sitios continentales alejados de plantaciones, y el tercero (RFLP3) estuvo asociado a una muy baja proporción de los hospedadores creciendo en suelo de continente cercano a plantación (Figura 3.7).

No hubo diferencias en las variables fisicoquímicas medidas entre los suelos de continente, isla, y continente cercano a plantación (Tabla S3.3).

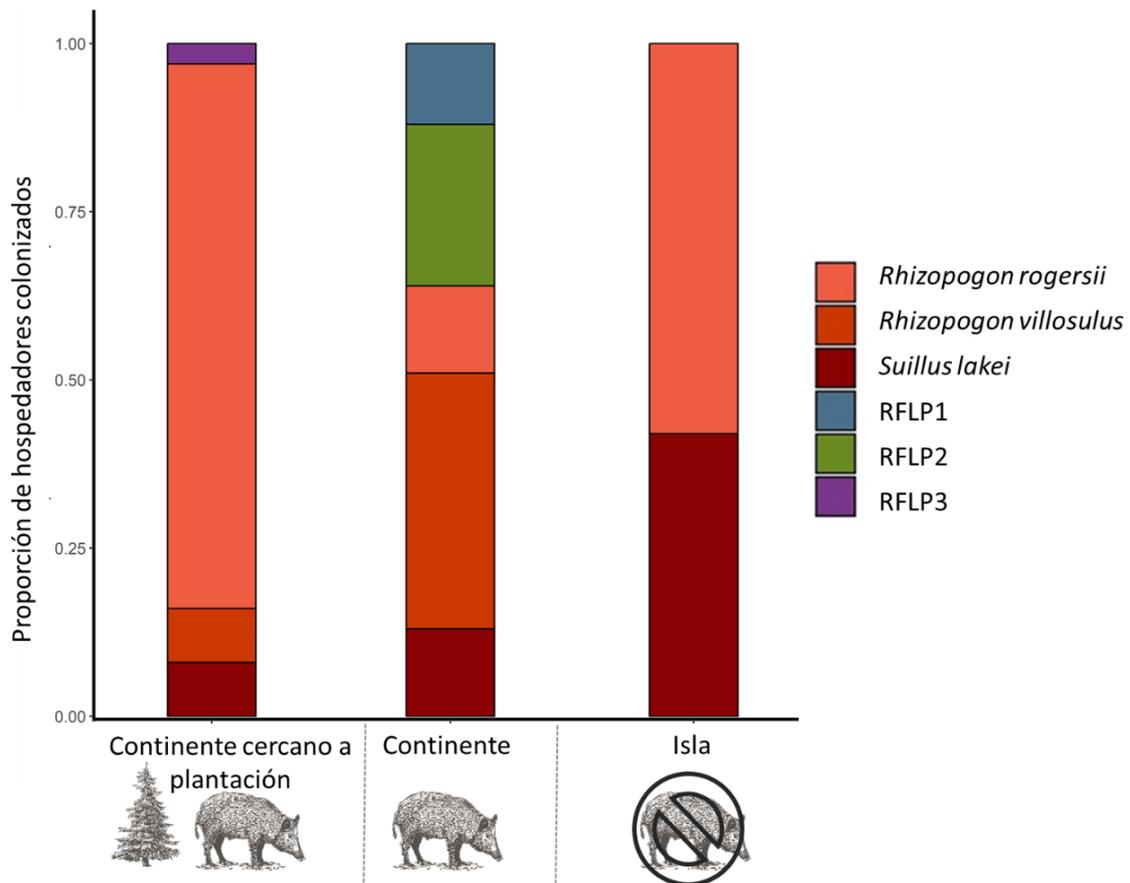


Figura 3.7 Proporción de hospedadores de la especie *Pseudotsuga menziesii* colonizados por diferentes taxones de hongos EM según el tipo de suelo en donde crecieron (proveniente de sitios de continente cercanos a plantación, proveniente de continente, o proveniente de isla). Tres de los taxones encontrados corresponden a hongos suilloides: *Rhizopogon rogersii* (color salmón), *R. villosulus* (color naranja), y *Suillus lakei* (color rojo). Tres taxones fueron nombrados de acuerdo a su patrón único de RFLP dado que no se pudo recopilar información de la búsqueda BLAST debido a la calidad de la secuencia (RFLP1 con color celeste, RFLP2 con color verde, y RFLP3 con color violeta).

3.5 Discusión

Las plantas de *Pseudotsuga menziesii* logran establecerse, crecer, y ser colonizadas por sus simbiontes fúngicos específicos, incluso en ausencia de los ungulados no nativos que los dispersan. Contrariamente a lo esperado, las plantas creciendo en suelo proveniente de sitios insulares, con ausencia histórica de ungulados no nativos, fueron colonizadas por hongos EM en porcentajes similares a los sitios continentales con presencia de ungulados no nativos. Si bien hay evidencia de que los ungulados no nativos facilitan la dispersión de hongos EM no nativos (Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015,

Livne-Luzon et al. 2017), siendo este un caso de *invasional meltdown*, su ausencia no sería un impedimento para la llegada de propágulos capaces de colonizar nuevos hospedadores, facilitando su invasión.

Las especies de hongos EM presentes en las islas parecen constituir un subgrupo de aquellas presentes en los sitios continentales. Sólo dos especies de hongos EM fueron encontradas en sitios con ausencia de ungulados, perteneciendo ambas al grupo de los hongos suilloides, nativos del hemisferio norte: *Suillus lakei* y *Rhizopogon rogersii*. Ambas especies han sido previamente encontradas asociadas a plantaciones e invasiones de *P. menziesii* en el área de estudio (Barroetaveña et al. 2007, Nuñez et al. 2013, Hayward et al. 2015a). Trabajos anteriores, discutidos en el Capítulo 2 de esta tesis, muestran que incluso una única especie de *Suillus* puede desencadenar la invasión de pinos (Hayward et al. 2015b). Este rol clave de los hongos suilloides en la invasión de Pinaceae estaría dado principalmente por la resistencia de sus esporas y su capacidad de dispersión (Policelli et al. 2019). Dado que las esporas de estos hongos son capaces de permanecer viables en el suelo por décadas (Bruns et al. 2009), los sitios insulares serían susceptibles a la invasión de *P. menziesii* debido a la presencia en el suelo de sus simbiontes específicos.

Propágulos viables de hongos EM son capaces de dispersarse a los sitios insulares y permanecer en el suelo hasta colonizar las raíces de sus hospedadores. Los resultados de este capítulo muestran que al menos las especies de hongos EM encontradas en los sitios insulares, no dependen exclusivamente de la dispersión mediada por grandes ungulados. Otros mecanismos de dispersión estarían involucrados en la llegada de estos propágulos a las islas. La dispersión aérea de esporas se produce generalmente a corta escala, en el rango de escasos metros desde el esporocarpo (Horton 2017). Sin embargo, particularmente para aquellas especies de hongos EM que producen esporocarpos epigeos, la generación de un gran número de esporas, a partir de una producción muy alta de esporocarpos, podría incrementar la posibilidad de que las mismas lleguen a sitios lejanos y se acumulen en el tiempo (Peay et al. 2012). En el caso de esporocarpos hipógeos como los de *Rhizopogon*, la dispersión por mamíferos no nativos probablemente explique su distribución en los sitios continentales

con alta abundancia de ungulados, donde este género de hongo EM es frecuentemente encontrado en pellets fecales (Nuñez et al. 2013). Sin embargo, otras formas de dispersión pueden estar involucradas en la llegada de esporas viables de este género a las islas. El movimiento del suelo puede transportar grandes masas de esporas que son depositadas una vez que los esporocarpos se degradan (Miller et al. 1993). Es posible que esas esporas logren llegar formando balsas en el agua o adheridas a material vegetal flotante (Ingold 1971, Bandoni y Koske 1974) y acumularse en los sitios insulares. Además de vectores abióticos, otros agentes bióticos son importantes dispersores de hongos EM (Vašutová et al. 2019). Algunas aves, por ejemplo, han sido recientemente reportadas como posibles dispersores de hongos a partir de la co-dispersión de esporas y semillas (Correia et al. 2019). La meso y macrofauna del suelo también son importantes vectores de esporas de hongos EM tanto por ecto y endozoocoria (Vašutová et al. 2019), como a partir de su interacción en las cadenas tróficas del suelo (Lilleskov y Bruns 2005). A su vez, el rol de los mamíferos nativos en la dispersión de esporas de hongos no nativos, que constituiría un ejemplo de interacción novedosa entre un dispersor nativo y un microorganismo no nativo invasor, ha sido escasamente estudiado (Meserve et al. 1988, Perez Calvo et al. 1989, Nuñez et al. 2013). El rol del ser humano como vector de propágulos fúngicos también podría ser importante y merece una mayor atención en futuros estudios (ver Capítulo 5). Dado que la dispersión condiciona fuertemente el ensamble de la comunidad de hongos EM (Peay et al. 2012, Vašutová et al. 2019), las distancias alcanzadas a partir de la dispersión por cada uno de los diferentes vectores podría ser clave en determinar que especies son capaces de llegar a sitios lejanos. Futuros estudios debieran indagar también en la dependencia en el rol de los ungulados no nativos como vectores de dispersión para el caso de los hongos EM encontrados en los sitios continentales.

El porcentaje de colonización de raíz por hongos EM fue menor en los sitios continentales alejados de las plantaciones y en las islas que en los sitios continentales cercanos a las plantaciones. Estos resultados son coincidentes con resultados anteriores que han visto menor colonización a distancias crecientes de la fuente de inóculo (Nuñez et al. 2009, Hayward et al. 2015a, Moyano et al. 2019). Incluso siendo menor, las plántulas analizadas han

desarrollado igual biomasa aérea en los tres tipos de suelo (continente alejado de la plantación, isla, continente cercano a plantación), al menos en invernadero y durante el período de crecimiento evaluado. Para el caso de una especie no micorrícica como el notro, y a diferencia de lo ocurrido con el pino oregon, las plantas creciendo en los suelos esterilizados superaron en biomasa a aquellas creciendo en los suelos de los tres tipos de sitios (sin deferencias entre sí). La liberación de nutrientes debido al proceso de esterilización (Wolf y Skipper 1994) y la ausencia de posibles agentes patógenos en el suelo (Koide y Li 1989) podrían explicar las diferencias observadas.

Los ungulados no nativos producen cambios en la estructura y la composición de la vegetación. Los sitios que presentan ungulados estuvieron asociados a una mayor cobertura de especies no nativas y un mayor porcentaje de suelo desnudo, mientras que los sitios con ausencia histórica de ungulados presentaron un sotobosque más desarrollado con enredaderas y helechos, junto con otras especies de plantas palatables, la mayoría de ellas nativas. La introducción de grandes ungulados afecta fuertemente a la comunidad vegetal del bosque (Relva et al. 2010, Barrios-Garcia y Ballari 2012). Los resultados obtenidos son coincidentes con estudios anteriores en los que se ha visto un empobrecimiento de la comunidad de especies vegetales (Gill 2001), y un aumento del área disturbada en el suelo (Barrios-Garcia et al. 2014) en sitios invadidos por ungulados no nativos. Estos cambios en la comunidad vegetal pueden facilitar el establecimiento de especies no nativas (Vavra et al. 2007), entre ellas especies de Pinaceae. Esto puede ocurrir ya sea porque estas especies están adaptadas al disturbio provocado por los ungulados, porque sus propágulos son transportados por endo o epizoocoria, o por no ser palatables y verse favorecidas ante la reducción de especies nativas palatables (Relva y Veblen 1998, Vavra et al. 2007, Relva et al. 2010). Si bien mostrar una relación directa entre la presencia de ungulados y el establecimiento de especies de plantas no nativas, muchas de ellas invasoras, está por fuera de los objetivos de este capítulo, los resultados obtenidos podrían sugerir la existencia de este patrón. Futuros estudios manipulativos debieran poner a prueba si la presencia de ungulados facilita el establecimiento y crecimiento de plantas no nativas e indagar sobre los mecanismos ecológicos involucrados.

El sistema isla-continente utilizado surge como un modelo ideal para estudios que involucren a ungulados no nativos. La ausencia de signos de ungulados en las islas, junto con los cambios en la estructura y composición de la vegetación en comparación con los sitios continentales, hacen que el modelo isla- continente resulte ideal para incorporar aspectos de la comunidad biótica del suelo mediados por ungulados no nativos, como el estudiado. Estudios locales sobre el impacto de los herbívoros no nativos en bosques patagónicos usando clausuras experimentales de 10 años de antigüedad, han encontrado pocos efectos significativos de los ungulados en las propiedades del suelo (Relva y Nuñez 2014). En cambio, estudios realizados en islas lacustres y otras zonas históricamente libres de herbívoros no nativos, han encontrado importantes diferencias en procesos claves como la descomposición de hojarasca (Piazza et al. 2016). Esto sugiere que las clausuras experimentales no representan adecuadamente una condición libre de herbívoros, ya que posiblemente trasladan efectos de largo plazo inducidos por los herbívoros antes de la instalación de las mismas. A su vez, las clausuras suelen mostrar efectos de recuperación post-herbivoría en vez de permitir evaluar efectos de ausencia de herbívoros. Un ejemplo de ello es que las clausuras instaladas en sitios con pastoreo crónico muestran efectos transitorios como por la dominancia extendida de unas pocas especies palatables inducido por la eliminación súbita de los herbívoros (Veblen et al. 1992), situación que difiere de sitios históricamente libres de herbívoros que presentan comunidades equitativas en la distribución de abundancias relativas (Piazza et al. 2016). Si bien las islas constituyen los mejores controles posibles de herbivoría, es razonable considerar que acarrear algunos otros problemas y efectos no deseados por el mero hecho de que las condiciones ambientales de las islas suelen ser diferentes a las del continente, sin embargo es posible medir dichas condiciones de interés e incorporarlas a los modelos en estudio.

La evidencia de trabajos anteriores muestra que los ungulados no nativos dispersan hongos EM no nativos lo que a su vez facilita la invasión de pinos no nativos invasores (Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015, Soteras et al. 2017). En este capítulo se ha mostrado, utilizando un sistema isla-continente, que si bien los ungulados no nativos producen cambios por encima del suelo en la comunidad vegetal, su presencia no es condición necesaria para que

algunas especies de simbioses específicos de pinos puedan dispersarse y colonizar nuevas plántulas, facilitando su invasión. Otros mecanismos de dispersión de los hongos EM complementarios a la endozoocoria por ungulados no nativos serían importantes en el proceso de co-invasión con sus hospedadores y merecen un mayor estudio a futuro. La ausencia de un eslabón de la triple interacción involucrada en este proceso de *invasional meltdown* no imposibilita la invasión de pinos no nativos asociados a sus hongos EM no nativos invasores. A partir de la dispersión de hongos EM por otras vías, sitios en principio libres de invasión pueden ser susceptibles a la misma debido a la presencia de microorganismos simbioses en el suelo que condicionan la invasión de la comunidad.

Capítulo 4 – Invasión de hongos EM en bosques nativos: tanto *Nothofagus antarctica* como *Pinus contorta* pueden encontrar simbiontes ectomicorrícicos compatibles en áreas cercanas dominadas por la otra especie

4.1 Resumen

Las invasiones biológicas han sido mayormente abordadas a partir de los procesos que ocurren por encima del suelo, por lo que se conoce poco acerca de los impactos de las invasiones subterráneas. En este capítulo se combinaron estudios a campo y experimentos en cámara de cultivo con el objetivo de evaluar el impacto de las invasiones subterráneas sobre el crecimiento de especies de árboles nativos, y estudiar la posibilidad de interacciones nuevas entre hospedadores nativos y no nativos y simbiontes micorrícicos nativos y no nativos. A partir de un ensayo en cámara de cultivo se comparó el crecimiento y el porcentaje de colonización micorrícica de la especie nativa *Nothofagus antarctica* y de la especie no nativa *Pinus contorta*, ambas altamente dependientes de hongos EM, creciendo en suelo invadido por pinos y en suelo no invadido de bosques nativos dominados por *Nothofagus*, separados aproximadamente 600 m. Se evaluó la identidad de las especies de hongos EM asociadas a ambos hospedadores en los diferentes tipos de suelo y se realizó un muestreo de raíces *in situ* en el campo. Se encontró que ambos hospedadores desarrollaron igual biomasa en ambos tipos de suelo, con un alto porcentaje de colonización micorrícica y sin que ocurra colonización cruzada de las especies de hongos EM. Los resultados obtenidos sugieren que el suelo donde los hospedadores no nativos invasores están ausentes es susceptible a la invasión por la presencia de hongos EM no nativos invasores. A su vez, los árboles nativos podrían ser capaces de permanecer en los sitios invadidos dada la presencia de hongos EM nativos. La presencia de hospedadores nativos no impide la invasión de hospedadores no nativos, y la

presencia de mutualistas fúngicos nativos parece no impedir la invasión de hongos EM no nativos, al menos en la escala estudiada.

4.2 Introducción

Los efectos de la biota del suelo no nativa sobre la comunidad nativa están escasamente comprendidos. Las invasiones de pinos en el hemisferio sur constituyen un sistema ideal para estudiar cómo los aspectos subterráneos de las invasiones pueden afectar la comunidad nativa tanto por encima como por debajo del suelo (Simberloff et al. 2010, Gundale et al. 2014b).

Paralelamente a los cambios producidos por las invasiones de pinos por encima del suelo, hay muchas especies de hongos EM nuevas introducidas, muchas de ellas con atributos fisiológicos y ecológicos novedosos para el sistema (Chapela et al. 2001, Bogar et al. 2015, Sulzbacher et al. 2018). De acuerdo al grado de especificidad que posean estas especies de hongos EM introducidas en relación a la asociación con sus hospedadores, los impactos producidos en la comunidad invadida pueden variar (Pringle et al. 2009). Como se ha discutido en capítulos anteriores, algunas especies de hongos EM específicos en su asociación pueden ser capaces de condicionar sitios previamente no invadidos para la invasión de sus hospedadores (Policelli et al. 2019). Otras especies de hongos EM no nativos más generalistas en cuanto a su asociación han sido reportados formando nuevas asociaciones con hospedadores nativos (Dunk et al. 2012, Wolfe y Pringle 2012, Nuñez y Dickie 2014, Truong et al. 2017). En estos casos, el crecimiento de las especies leñosas nativas podría estar afectado negativamente por el cambio en la biota del suelo provocado por la invasión. Análogo al decrecimiento en la diversidad a escala local que ocurre en las comunidades de plantas a partir de una invasión, se puede esperar que los mutualistas fúngicos co-invasivos provoquen un reemplazo de la comunidad de mutualistas nativos (Bonito et al. 2011), perjudicando a su vez a las plantas nativas. A su vez, los hospedadores no nativos invasores podrían ser capaces de establecer interacciones nuevas con hongos EM nativos, lo que facilitaría su invasión (Nuñez y Dickie 2014, Dickie et al. 2017).

En Patagonia, muchas co-invasiones de pinos y hongos EM ocurren en bosques nativos, donde la vegetación dominante, del género *Nothofagus*, está asociada a hongos EM nativos. Esto constituye un escenario único para poner a prueba cómo hongos EM no nativos co-invadiendo con árboles no nativos pueden afectar el crecimiento de árboles nativos a su vez asociados con hongos EM nativos. El objetivo de este capítulo es determinar cómo una especie de pino no nativa invasora crece en suelo de sitios no invadidos dominados por la especie ectomicorrícica nativa *Nothofagus antarctica*, y cómo *Nothofagus antarctica* crece en suelo de sitios invadidos por pinos, hospedadores de hongos EM no nativos. Se espera que los árboles nativos tengan un mejor desempeño en suelo proveniente de sitios no invadidos en comparación con suelo de sitios invadidos por pinos, dada la presencia de hongos EM nativos. A su vez, se espera que los árboles no nativos tengan un mejor desempeño en suelo de sitios invadidos en comparación con suelo dominados por vegetación nativa, dada la presencia de hongos EM no nativos. Se pretende evaluar la posibilidad de nuevas interacciones: hongos no nativos asociados con árboles nativos y hongos nativos asociados a árboles no nativos (hongos EM nativos asociados con *Nothofagus* capaces de asociarse con pinos no nativos). Para poner a prueba estos dos aspectos, se realizó un ensayo en cámara de cultivo en paralelo a muestreos de raíces a campo. Se espera aportar evidencia experimental sobre cómo la invasión de hongos EM puede impactar en la biota nativa que habita por encima del suelo y como la comunidad de hongos EM nativos responde a la invasión de hongos EM no nativos. Estos aspectos contribuirán al entendimiento de los factores que determinan el éxito o fracaso de las especies invasoras al mismo tiempo que consideran sus efectos en las comunidades nativas.

4.3 Metodología

4.3.1 Sitio de estudio

La colecta de suelos y de ápices radicales fue realizada en la Reserva Nacional Malalcahuello, región de La Araucanía en el norte de la Patagonia, Chile (38°30'S 71°35'W; 1420 msnm). La reserva es una de las únicas en Sudamérica que protege bosques mixtos de *Araucaria* (*Araucaria araucana*),

en peligro de extinción (IUCN Lista Roja de Especies Amenazadas, 2018), y Ñire (*Nothofagus antarctica*), éste último distribuido en densos parches a lo largo de todo el sitio. Las especies del género *Nothofagus* son las únicas especies nativas capaces de establecer una relación simbiótica con hongos EM en el bosque (Palfner et al. 2008, Nouhra et al. 2013). El sotobosque está dominado por gramíneas, principalmente la caña *Chusquea quila* y el pasto *Festuca scabriuscula*. La precipitación media anual es 3038mm y la temperatura media anual es de 8.5°C. La topografía del área se encuentra altamente influenciada por procesos de glaciación y actividad volcánica (Peña et al. 2008). El sitio de estudio se ubica en la ladera sur del Volcán Lonquimay. Los vientos predominan del noroeste, bajando por la ladera del volcán. El área se encuentra bajo un creciente proceso de invasión de *P. contorta*. A comienzos de los años 1970s, *P. contorta* fue plantado en pequeñas parcelas experimentales principalmente con el objetivo de utilizarlo para evitar la erosión del suelo (Peña et al. 2008). Esta especie, considerada una de las especies de árboles más agresivas en términos de su capacidad de invasión (Ledgard 2001, Richardson y Rejmánek 2011, Richardson et al. 2014), cubre actualmente un área de más de 100 ha en un gradiente de invasión que va desde áreas altamente invadidas cercanas a las plantaciones originales, a áreas sin pinos dominadas por individuos adultos de *Nothofagus antarctica* y *A. araucana*. Esta invasión de pinos amenaza a las comunidades nativas por encima y por debajo el suelo (Cóbar-Carranza et al. 2014, García et al. 2018).

4.3.2 Colecta de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron colectadas en dos áreas diferentes de la Reserva Malalcahuello: un área con alta densidad de invasión de *P. contorta* (de aquí en más “área invadida”) con 5000 pinos por hectárea (pinos mayores a 1 m de altura) y la otra dominada por *Nothofagus antarctica* y sin *P. contorta* presentes (de aquí en más “áreas no invadidas”). Ambas áreas distan entre sí 600 m. A pesar de la ausencia de pinos, los sitios no invadidos fueron seleccionados suficientemente cerca de los sitios invadidos para asegurar que las condiciones del hábitat sean comparables (Hejda et al. 2009). Durante la primavera austral (Noviembre) de 2015, se distribuyeron al azar 6 parcelas (10x10 m) en el área invadida y otras 6 en el área no invadida. En cada parcela

se extrajeron un total de 6 muestras de suelo de 900 cm³ (10 cm de diámetro x 12 cm de profundidad) utilizando tubos de PVC esterilizados con etanol, intentando disturbar el suelo por dentro y por fuera del tubo lo menos posible al momento de la colecta. Luego de colectar la muestra, cada tubo de PVC se cubrió con dos tapas de PVC esterilizadas con etanol y se envolvió en papel film. Para evitar la contaminación cruzada entre los sitios, se utilizaron guantes estériles y se lavaron todos los instrumentos con etanol antes y después de manipular cada muestra. Al final de cada día de muestreo se almacenaron las macetas de PVC a 4°C hasta el armado del experimento. Adicionalmente, se colectaron 36 muestras de suelo (18 de los sitios invadidos y 18 de los no invadidos) que fueron dejadas por separado y esterilizadas individualmente, siendo usadas como suelo control para detectar posibles contaminaciones con hongos EM durante el experimento. El total de 108 muestras (6 por cada parcela x 6 parcelas x 2 tratamientos – invadido, no invadido- + 18 macetas con suelo control estéril proveniente de suelo invadido y 18 macetas con suelo control estéril proveniente de suelo no invadido) fueron transportadas a una cámara de crecimiento. Para los controles de suelo estéril, se siguió el mismo protocolo de esterilización detallado en la sección 3.3.6 del Capítulo 3.

Para comparar las condiciones del suelo en sitios invadidos y no invadidos, se midieron variables físico-químicas del suelo (pH, fósforo, nitrato, amonio, relación carbono nitrógeno, y materia orgánica) de muestras de suelo colectadas en sitios invadidos y no invadidos. Seis muestras de suelo fueron extraídas del área invadida y otras seis del área no invadida en Malalcahuello (12 muestras en total), en las mismas parcelas de dónde se extrajeron las muestras de suelo para el ensayo. Las muestras fueron luego analizadas en el Laboratorio de Servicios Analíticos de Suelos, Plantas y Ambiente CERZOS - CONICET de la Universidad Nacional del Sur.

4.3.3 Ensayo en cámara de cultivo

Para determinar el efecto de la biota del suelo de sitios invadidos y no invadidos en el crecimiento de especies arbóreas nativas y no nativas, y determinar la posibilidad de colonización cruzada (esto es, hongos EM no nativos asociados con árboles nativos y/o hongos EM nativos asociados con árboles no nativos invasores) se realizó un ensayo en cámara de cultivo en la

Universidad de Concepción, Chile. Para el experimento, se utilizaron tres especies de árboles comúnmente encontradas en el área de estudio. Dos ectomicorrícicas: la especie no nativa invasora *P. contorta*, y la especie nativa y dominante *Nothofagus antarctica*. A su vez, tal como se realizó en el Capítulo 3, se utilizó una especie no micorrícica nativa como control por posibles cambios abióticos en el suelo entre tratamientos (Koide y Li 1989, Kahiluoto et al. 2000, Dr. Francois Teste com. pers.): *Embothrium coccineum* (Proteaceae). Se colectaron semillas de las tres especies del sitio de estudio. Las semillas fueron previamente estratificadas (Arana 2011) y esterilizadas superficialmente (Sudhakara Reddy y Natarajan 1997) para evitar la posible contaminación debido a propágulos fúngicos presentes en la superficie de las mismas. Una vez germinadas en condiciones estériles, se plantaron tres plántulas de la misma especie en cada una de los tubos de 1 L colectadas a campo, asemejados a macetas una vez retirada la tapa superior de los mismos. Se utilizaron 12 macetas por especie por tipo de suelo –invadido, no invadido-. Para el caso de los suelos control estériles se utilizaron 6 macetas por especie por tipo de suelo (ej. 6 macetas de suelo estéril proveniente de sitios invadidos en los que se sembró *P. contorta* y otras 6 macetas de suelo estéril proveniente de sitios no invadidos sembrados con la misma especie). De esta forma, se hicieron crecer plántulas en 108 macetas. Luego de un mes, sólo se dejó crecer la planta más alta, siendo el resto cortadas al nivel del suelo, para evitar efectos de la competencia intra-específica en el crecimiento. Durante toda la experiencia, se regó a capacidad de campo, y no se le agregaron nutrientes a las macetas. La temperatura en la cámara de cultivo estuvo en un rango de 18 a 20°C. Las condiciones de luz fueron de 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad con un ciclo de luz oscuridad de 16:8 horas. Luego de 8 meses de crecimiento, se cosecharon las plantas. Se limpiaron cuidadosamente las raíces del suelo adherido, se separó la planta en raíz y tallo, y se colocó la porción aérea en un sobre para ser secado en estufa a 65°C por dos días. Se midió biomasa seca de la fracción aérea utilizando una balanza con precisión de 0.1 mg. Tanto las raíces de *P. contorta* como las de *N. antarctica* se examinaron cuidadosamente bajo lupa para determinar el porcentaje de colonización micorrícica (basado en características morfológicas). Para examinarlas se utilizó una lupa Nikon SMZ645 y microscopios Nikon E600 DIC y Nikon E200. Las raíces fueron

ubicadas en una caja de Petri, y el número de ápices de raíz colonizados y no colonizados por hongos EM fue registrado.

4.3.4 Muestreo de raíces *in situ*

Se estudió la identidad de las especies de hongos EM asociados a los pinos a lo largo del gradiente de densidad de invasión en el sitio de estudio. Se dividió el gradiente en seis áreas de densidad de pinos creciente (desde áreas dominadas por una alta densidad de individuos reproductivos, hasta áreas de bosque de *N. antarctica* sin invasión). Para caracterizar el grado de invasión de *P. contorta* se establecieron al azar cuatro parcelas de 10x10 m en cada una de las seis áreas, y se midió la altura y el diámetro a la altura del pecho de cada pino individualmente (Cóbar-Carranza et al. 2014). Durante el otoño austral de 2016 (mayo), justo después del pico de producción de esporocarpos de los hongos, dentro de cada una de las seis áreas se extrajeron raíces de ocho juveniles elegidos al azar de *P. contorta* y ocho de *N. antarctica* (cuando estaban presentes). Los árboles se encontraban al menos a 20 m de distancia entre sí. Se colocaron los fragmentos de raíz colonizados por EMF de cada árbol individual junto con el suelo adyacente en sobres de papel y luego en bolsas herméticas, para ser conservados a 4° C hasta ser procesados la misma noche luego de la colecta. Se lavaron cuidadosamente las raíces del suelo adherido bajo agua corriente y se eligieron al azar cinco ápices radicales colonizados por EMF bajo lupa. Los ápices radicales seleccionados fueron separados de acuerdo a su morfología, y preservados en buffer CTAB 2 % para posteriores análisis de ADN (100 mmol/l Tris-HCl [pH 8.0], 1.4 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA, 2 % CTAB; Gardes y Bruns 1993). Se realizó el muestreo de raíces a campo en otro sitio para poder contrastar la consistencia de las observaciones y analizar posibles efectos del sistema estudiado en la composición de hongos EM asociada a las raíces de los hospedadores. Se colectaron muestras de raíces en un ecosistema con condiciones climáticas y características de la vegetación diferentes al sitio de estudio pero que presenta una invasión de *P. contorta* en un gradiente de densidad sobre parches de *N. antarctica*. La colecta se realizó siguiendo el mismo diseño experimental. Este segundo sitio constituye un ecosistema de estepa Patagónica cercano a la ciudad de Coyhaique en la Región de Aysén, al sur de Chile (45°30'2" S,

71°42'15" W, Figura 1.4 –Capítulo 1-). Para mayores detalles acerca de este sitio y una comparación detallada con el sitio de Malalcahuello, ver Langdon et al. 2010, Hayward et al. 2015b, y Franzese et al. 2017.

4.3.5 Identificación de las especies de hongos EM

De las muestras de invernadero y de campo, se colectó una muestra representativa de cada tipo morfológico (morfotipo) de ápice radical colonizado por hongos EM. Inmediatamente después de ser removido de la plántula, los ápices radicales fueron almacenados en solución buffer 2 % CTAB. Se extrajo ADN de cada morfotipo presente en cada plántula (Agerer 1987). En los casos en que dos o más morfotipos fueron observados, los ápices fueron analizados en forma separada para determinar su identidad genética. Se separaron los morfotipos sólo dentro de cada muestra, sin agrupar entre muestras. Se extrajo ADN de un total de 381 ápices de raíces colonizados siguiendo el protocolo de Gardes y Bruns (1993). Se amplificó la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) de los hongos a partir de extractos de ADN usando combinaciones de los cebadores ITS1f (Gardes y Bruns 1993) e ITS4 (White et al. 1990). Se siguió la metodología detallada en la sección 3.3.7 del Capítulo 3. Se obtuvieron patrones claros de RFLP para un total de 157 ápices de raíz.

4.3.6 Análisis de datos

Para analizar cómo la biomasa aérea seca de las diferentes especies cambia con el tipo de suelo, se asumió una distribución normal de la variable respuesta “biomasa”, y se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos ajustado por residuos de máxima probabilidad (REML, paquete nlme, función lme, Pinheiro et al. 2007). Se analizó cada especie en forma separada. Se incluyó la variable “tipo de suelo” como un factor fijo con tres niveles (suelo de pino, suelo de *Nothofagus*, y suelo control estéril) y “parcela” como factor aleatorio en el modelo. Se validó el modelo utilizando el test de Shapiro-Wilk como test de normalidad, testeando a su vez homocedasticidad. Para analizar la colonización de raíz por hongos EM en el caso de pinos y *Nothofagus* en los diferentes tipos de suelo, se asumió una distribución binomial de la variable respuesta “colonización de raíz” calculada como el número de ápices

colonizados / número total de ápices, y se utilizó un modelo lineal generalizado mixto basado en la aproximación de Laplace y la función de enlace *logit* (GLMM, paquete lme4, función glmer, Bates et al. 2018). En el caso de que hubiera sobredispersión, como para la colonización de raíz de *Nothofagus*, se incluyó al modelo un efecto aleatorio a nivel de observación para modelarla (Harrison 2014). Se utilizó el test de Tukey para analizar las diferencias entre los tratamientos (a un $\alpha = 0.05$). Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico R 3.4.0 (R Core Team 2018).

Para los datos moleculares, la asignación a nivel de especie fue realizada cuando la disimilitud de las secuencias de ITS fue menor al 3 % y no hubo conflictos evidentes en la asignación en los primeros 25 resultados del BLAST (unos pocos casos de datos incorrectos en el Genbank fueron ignorados, Bidartondo 2008); siguiendo los mismos criterios, para la asignación a nivel de género se tomó una disimilitud de ITS entre 3 % y 10 %, sin conflictos evidentes en la asignación en los primeros 25 resultados de BLAST; para la asignación a nivel de familia se tomó una disimilitud de ITS entre 10 % y 20 %. En los casos en los que no se obtuvo una secuencia clara, se identificó al patrón de RFLP obtenido con un número y fue tratado como un OTU diferente. Se comparó luego la frecuencia de hospedadores colonizados por cada OTU encontrado en pino y en *Nothofagus* de forma separada.

4.4 Resultados

No hubieron diferencias entre la biomasa aérea de las plántulas de pino creciendo en suelo de pino y en suelo de *Nothofagus*, aunque presentaron menor biomasa creciendo en suelo estéril (Figura 4.1a, Tabla S4.1). De forma similar, la especie nativa *N. antarctica* presentó mayor biomasa aérea tanto en

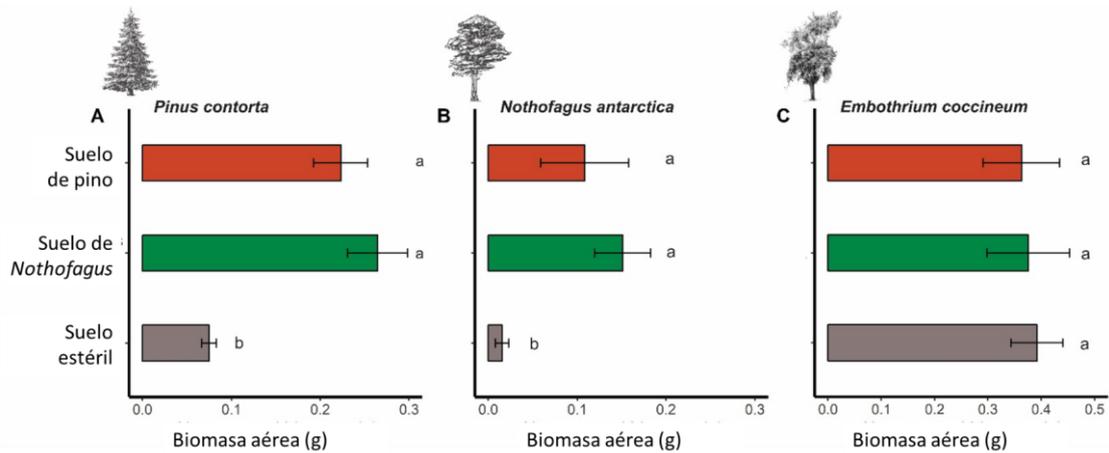


Figura 4.1. Biomasa seca de la porción aérea de A) *Pinus contorta* no nativo invasor, B) *Nothofagus antarctica* nativo, y C) *Embothrium coccineum* nativo, creciendo en tres tipos de suelos diferentes en el bioensayo en cámara de cultivo: suelo proveniente de áreas altamente invadidas por pinos (barras rojas), suelo proveniente de sitios nativos dominados por *N. antarctica* y sin presencia de pinos (barras verdes), y suelo estéril utilizado como control (barras grises), los datos para suelo estéril son presentados en forma conjunta dado que no se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos en suelo control proveniente de áreas invadidas y no invadidas para cada especie. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Las barras de error representan el error estándar.

suelo de pino como en suelo de *Nothofagus* comparado con suelo estéril (Figura 4.1b). No hubieron diferencias en el crecimiento de la especie nativa no micorrícica *Embothrium coccineum* entre los tres tipos de suelo (Figura 4.1c). Los pinos duplicaron la biomasa aérea de los *Nothofagus* creciendo durante el mismo período de tiempo y bajo las mismas condiciones (Figura 4.1a,b). Se exploraron los datos para la biomasa subterránea, obteniendo patrones consistentes con lo obtenido para la biomasa aérea.

Tanto los pinos (Figura 4.2a) como los *Nothofagus* (Figura 4.2b), presentaron una alta proporción de ápices de raíz colonizados (superior al 0.8 para pinos y superior a 0.6 para *Nothofagus*, respectivamente) sin diferencias entre el suelo de pino y de *Nothofagus*. Las raíces de las plántulas crecidas en suelo estéril no fueron colonizadas por hongos EM, mostrando que no ocurrieron inoculaciones de forma inadvertida en la cámara de cultivo (Figura 4.2, Tabla S4.2).

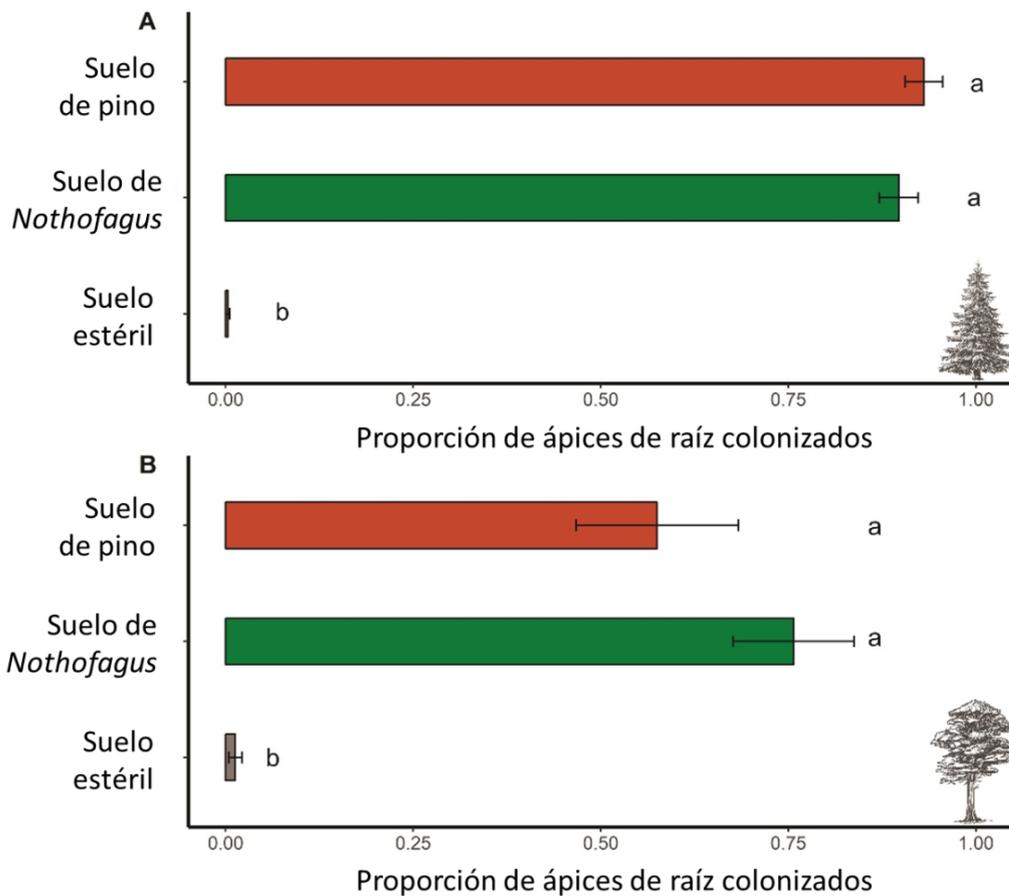


Figura 4.2. Proporción de ápices de raíz colonizados por hongos EM (ápices colonizados/ápices totales) para A) *Pinus contorta* no nativo invasor, B) *Nothofagus antarctica* nativo, creciendo en tres tipos de suelos diferentes en el bioensayo en cámara de cultivo: suelo proveniente de áreas altamente invadidas por pinos (barras rojas), suelo proveniente de sitios nativos dominados por *N. antarctica* y sin presencia de pinos (barras verdes), y suelo estéril utilizado como control (barras grises), los datos para suelo estéril son presentados en forma conjunta dado que no se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos en suelo control proveniente de áreas invadidas y no invadidas para cada especie. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Las barras de error representan el error estándar.

Más de la mitad de los ápices de raíz analizados (56 %; 205 de 368) produjeron amplicones de ITS (correspondientes a las muestras tomadas a campo y a las del bioensayo en cámara de cultivo). Las muestras que no produjeron amplicones mostraron signos de senescencia, probablemente estando senescentes o muertos al momento de la colecta. Estas muestras se encontraban repartidas azarosamente entre el total de muestras, sin un patrón determinado. Un total de 6 taxones identificados molecularmente fueron

observados asociados a *P. contorta*, de los cuales tres solo se encontraron en plantas creciendo en suelo de pino, dos sólo en las plantas creciendo en el suelo de *Nothofagus*, y uno (*Suillus luteus*) estuvo presente en ambos tipos de suelo (Figura 4.3, Tabla S4.3). *S. luteus* resultó el taxón dominante tanto para las muestras del ensayo en cámara de cultivo como para las muestras tomadas a campo y ocurrió en aproximadamente el 80% de las plantas de *P. contorta* analizadas. Además de *S. luteus*, otros taxones menos frecuentes se observaron en menos del 10 % de las plantas analizadas, siendo *Amanita muscaria* el más frecuente en este grupo, encontrado sólo en plantas creciendo en suelo de pino (Figura 4.3). A su vez un total de 11 taxones identificados molecularmente se observaron asociados a *N. antarctica*, de los cuales ocho se encontraron en plántulas creciendo en suelo de pino, dos en plantas creciendo en suelo de *Nothofagus* y sólo una (*Cortinarius* sp.) ocurrió en ambos tipos de suelo (Figura 4.3, tabla S4.3). La especie de *Cortinarius*, fue también la más frecuente encontrada en las plantas de *Nothofagus* creciendo en suelo propio, presente en casi el 20 % de las plantas analizadas. *Sistotrema* sp., fue el único taxón que se encontró asociado tanto a plantas de *P. contorta* como de *N. antarctica*, siempre en suelo de pino (Figura 4.3). Las muestras de campo de Malalcahuello y Coyhaique mostraron un patrón muy similar de asociación con hongos EM con una predominancia de *S. luteus* asociado a *P. contorta* en el caso de las muestras de campo de Coyhaique (Tabla S4.4) en comparación con las de Malalcahuello. Cinco taxones fueron nombrados de acuerdo a su patrón único de RFLP dado que no se pudo recopilar información de la búsqueda BLAST debido a la calidad de la secuencia (RFLP1 – RFLP5, Figura 4.3).

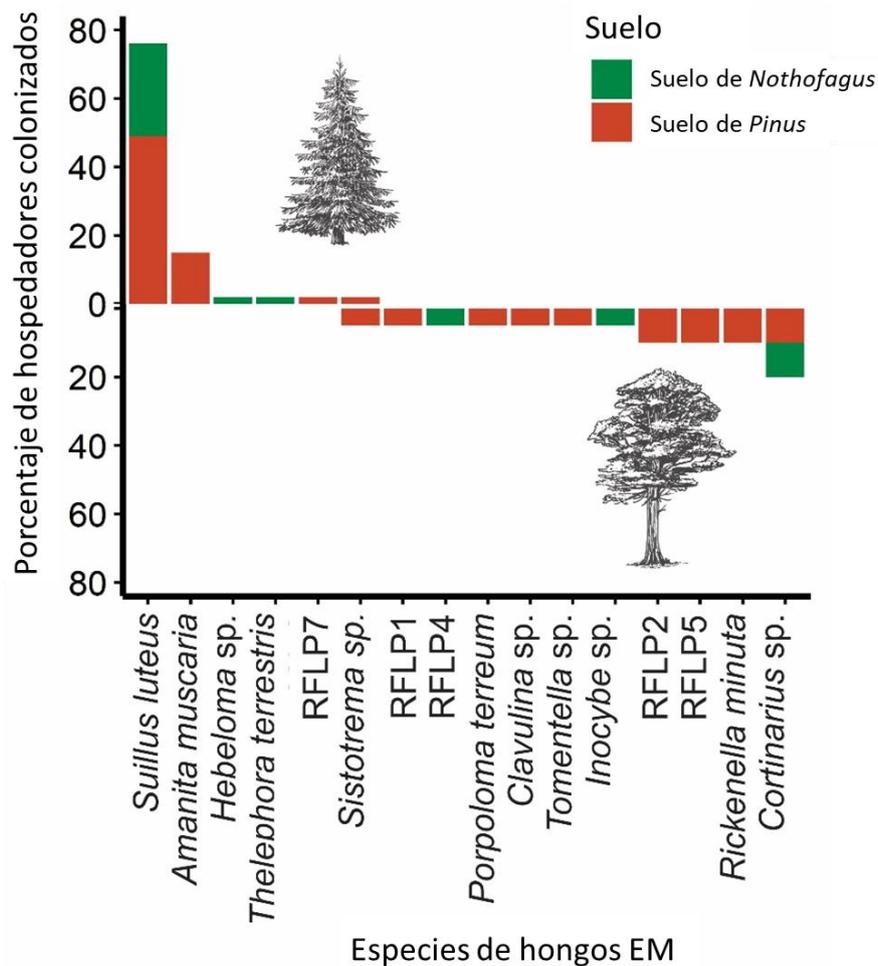


Figura 4.3. Porcentaje de hospedadores colonizados: *Pinus contorta* (panel superior) y *Nothofagus antarctica* (panel inferior) por los diferentes OTUs de hongos EM obtenidos a partir del análisis molecular de los ápices de raíz colonizados. Las barras muestran a los hospedadores creciendo en suelo de *Nothofagus* (barras verdes) o en suelo de pino (barras rojas). Los datos corresponden a las muestras de invernadero y de campo obtenidas en Malalcahuello. Aquellos OTUs a los que no se le pudo asignar fehacientemente una especie en Genbank son identificados mediante el patrón único de RFLP que presentaron y nombrados con un número.

Con respecto a las variables fisicoquímicas del suelo, sólo se encontraron diferencias en el pH siendo los suelos de pino (invadidos) ligeramente más ácidos comparado con los de *Nothofagus* (no invadidos) (5.2 ± 0.2 y 5.6 ± 0.2 respectivamente, Tabla S4.5). No se encontraron diferencias para el resto de las variables de suelo medidas (fósforo, nitrato, amonio, C:N, y materia orgánica) entre los suelos de pino y de *Nothofagus* (Tabla S4.5).

4.5 Discusión

Los resultados de este capítulo muestran que dada la presencia de inóculo de hongos EM no nativos, los hospedadores no nativos son capaces de establecerse y crecer en sitios aún no invadidos, dominados por hospedadores nativos. Contrariamente a lo esperado, los pinos no nativos invasores crecen igualmente bien y tienen un alto porcentaje de colonización por hongos EM tanto en suelo de sitios altamente invadidos como en suelo de sitios libres de invasión. Se encontró, a su vez, que incluso en sitios altamente invadidos, aún existe suficiente inóculo de hongos EM nativos para que los hospedadores nativos logren establecerse y crecer. La biomasa aérea de *Nothofagus* y el porcentaje de colonización por hongos EM no varió entre los suelos de pino y *Nothofagus*, lo que sustentaría la idea de que no habría interferencia negativa entre las especies de hongos EM nativas y no nativas para el par de especies de hospedadores estudiado y al menos en términos de inóculo resistente como evidencian los ensayos en la cámara de cultivo. Estos resultados sugieren que, en los sitios estudiados, la disponibilidad de hongos EM no sería un factor limitante para el establecimiento y crecimiento de árboles nativos y no nativos en áreas dominadas por la otra especie. A diferencia de las especies anteriores, la especie no micorrícica *Embothrium coccineum* no presentó diferencias en términos de biomasa entre los diferentes tratamientos, lo cual es consistente con lo esperado dada su capacidad de crecer en ausencia de hongos micorrícicos. No se descarta el rol de otros organismos del suelo en los resultados obtenidos (ej. patógenos). Sin embargo, dada la alta tasa de crecimiento de los pinos, y su falta de limitación en términos de hongos EM simbioses disponibles, se espera que los pinos continúen incrementado su rango e invadiendo el bosque nativo.

Una comunidad con pocas especies de hongos EM le permiten a los pinos invasores establecerse y sobrevivir al alcanzar sitios lejanos a la fuente de inóculo (Figura S4.1). En corroboración con otros autores (Nuñez et al. 2009, Hayward et al. 2015b, Urcelay et al. 2017), y coincidentemente con lo propuesto en el Capítulo 2 de esta tesis, se encontró que *Suillus luteus* es el principal hongo EM no nativo invasor que coloniza a las plántulas de *P. contorta* tanto en el experimento de cámara de cultivo como a campo, incluso

en suelo de sitios en donde los pinos no se encuentran aún presentes localmente. Los resultados obtenidos coinciden con este patrón tanto para un sistema de estepa como el de Coyhaique como para un bosque nativo. Los hongos suilloides, y *S. luteus* en particular, han sido descriptos como un factor determinante de la invasión de pinos a escala global, dada la resistencia y reactividad de sus esporas, y su alta capacidad dispersiva (Capítulos 2 y 3 de esta tesis y Policelli et al. 2019). Junto con *S. luteus* se encontraron *Hebeloma* sp. y *Thelephora terrestris*, que también han sido previamente reportados asociados a los frentes de invasión de *P. contorta* (Nuñez et al. 2009, Hayward et al. 2015a). Dada la presencia de esta comunidad de especies invasoras de hongos EM que pueden permanecer en el suelo por muchos años (Bruns et al. 2009, Nguyen et al. 2012, Policelli et al. 2019), los sitios dominados por vegetación nativa, dónde aún no hay pinos debieran ser reconocidos como potencialmente vulnerables a la invasión.

En este capítulo se muestra que los hongos EM nativos colonizan hospedadores nativos en sitios invadidos por pinos. Se encontró que *Cortinarius* sp. es capaz de colonizar hospedadores de *Nothofagus* tanto en suelo de sitios altamente invadidos por pinos como en suelo de sitios nativos sin pinos. Particularmente para las especies de hongos EM que no se dispersan de forma efectiva mediante esporas y colonizan mayormente mediante el crecimiento de sus hifas, como *Cortinarius* spp., la presencia de micelio viable en el suelo podría ser fundamental para permitir la colonización de plántulas nativas. A su vez, se encontraron especies menos frecuentes de hongos EM nativos que son coincidentes con lo que se ha reportado para sitios dominados por especies de *Nothofagus* (Nouhra et al. 2013, Fernández et al. 2015). La disponibilidad de inóculo nativo en sitios previamente invadidos, podría ser fuertemente dependiente de dos rasgos ecológicos de los hongos EM nativos: su capacidad de dispersión y la capacidad de formar un banco de esporas resistentes (Grove et al. 2017). La capacidad de dispersión está directamente asociada a la distancia a la que se encuentren las fuentes de inóculo de hongos EM nativos. Se ha visto que la falta de inóculo ectomicorrícico puede limitar el establecimiento de *Nothofagus*, incluso a distancias cortas en sistemas de pastizal (Dickie et al. 2012). Dado que las especies de hongos EM podrían no ser capaces de dispersarse a grandes

distancias, la limitación en la dispersión condiciona fuertemente la disponibilidad de esporas (Galante et al. 2011, Peay y Bruns 2014, Horton 2017) por lo que la presencia de fuentes de inóculo de hongos EM nativos en la cercanías pareciera una condición necesaria para asegurar la colonización de los hospedadores nativos. En este trabajo no se analizó si el inóculo nativo estaba presente en el suelo en forma de micelio activo, formando un banco de esporas en el suelo de sitios invadidos, o si arriba constantemente a partir de la dispersión. Ensayos futuros podrían analizar si las esporas de hongos EM nativos llegan efectivamente a los sitios invadidos y si logran resistir y esperar por la llegada de sus hospedadores. Otros aspectos de la colonización por hongos EM nativos, como el acceso a redes de micorrizas disponibles a partir de la presencia de hospedadores cercanos (Horton et al. 1999, Nara y Hogetsu 2004, Nara 2006b, Grove et al. 2019), pueden ser relevantes para lograr un establecimiento exitoso de los hospedadores nativos en el campo y merecen un mayor estudio.

No se encontró colonización cruzada de los hongos EM entre las especies nativas y no nativas. Las interacciones planta-suelo suelen depender del hecho de que las plantas compartan o no mutualistas del suelo (Crawford et al. 2019). Las plantas invasoras son capaces de modificar las interacciones existentes entre las plantas nativas y la biota del suelo nativa o establecer nuevas interacciones mutualistas con la biota del suelo nativa, y así lograr invadir en el nuevo rango (Reinhart y Callaway 2006, Nuñez y Dickie 2014, Nuñez et al. 2016, Wardle y Peltzer 2017). Incluso para los hongos EM nativos, la alta abundancia de hospedadores no nativos incrementaría la probabilidad de que se forme una interacción nueva (Aslan et al. 2015). Para el caso de los pinos invadiendo bosques de *Nothofagus* en el hemisferio sur, la ausencia de un grupo de hospedadores filogenéticamente cercano podría impedir la asociación con hongos EM nativos, siendo igualmente exitoso en su invasión (Reinhart 2012, Hoeksema et al. 2018). La co-invasión es el principal mecanismo que posibilita que las plantas introducidas mantengan a sus simbiontes, especialmente si la comunidad receptora no posee especies hospedadoras emparentadas como en el caso de los pinos invadiendo en bosques de *Nothofagus* (Tedersoo et al. 2007, Dickie et al. 2010, Nuñez y Dickie 2014). La presencia de interacciones novedosas en el otro sentido

(hongos EM no nativos asociados a árboles nativos) ha sido escasamente reportada a pesar de haber sido evaluada anteriormente (Sulzbacher et al. 2018). Sin embargo, la especie hongo EM generalista *Amanita muscaria*, ha sido reportada en colonizaciones cruzadas entre especies de Fagaceae y Pinaceae (Dickie y Johnston 2008, Dunk et al. 2012, Nuñez y Dickie 2014, Truong et al. 2017).

En este trabajo se encontró a *Sistotrema* sp. colonizando tanto *Nothofagus* nativos como *P. contorta* no nativos. *Sistotrema* spp. han sido previamente reportadas y caracterizadas formando ectomicorrizas con *Pinus* (Münzenberger et al. 2012) así como también con otras especies de Fagaceae y Pinaceae (Kim et al. 2005, Nilsson et al. 2006, Dunham et al. 2007, Di Marino et al. 2008). Sin embargo, el rol ecológico de *Sistotrema* asociado a las raíces de estos hospedadores es poco claro y, por el momento, está descrito como neutral (ni beneficioso ni perjudicial) para el hospedador (Potvin et al. 2012). Con esa excepción, no se ha encontrado en este estudio colonización cruzada de hospedadores, sin poder descartar la posibilidad de que hongos EM no nativos puedan asociarse con hospedadores nativos o que hongos EM nativos se asocien con hospedadores no nativos (Bahram et al. 2013), lo cual sería más probable para especies de hospedadores cercanas filogenéticamente (Hoeksema et al. 2018).

Si bien no ha sido directamente evaluado en este capítulo, la disponibilidad de hongos EM nativos no parece ser una limitante para la restauración de sitios previamente invadidos por pinos, la cual es por lo general dificultosa (Nuñez et al. 2017, Sample et al. 2019). El re-establecimiento de asociaciones interrumpidas entre hongos micorrícicos y sus hospedadores puede ser necesario para la restauración exitosa de especies de plantas foco (Kardol y Wardle 2010). En los hábitats invadidos, sin embargo, las comunidades de hongos EM nativos podrían permanecer en el suelo, permitiendo que los árboles nativos se establezcan y crezcan. La inoculación con suelo colectado de sitios de referencia o incluso con esporas de ciertas especies de hongos EM, están siendo crecientemente utilizadas para asegurar la colonización micorrícica y mejorar el establecimiento de las plántulas (Maltz y Treseder 2015, pero ver Grove et al. 2019). En algunos casos, sin embargo, no

sería necesario dado que habría inóculo viable presente en el suelo, lo que reduciría los costes implicados en los esfuerzos de restauración.

Generalmente en las comunidades de plantas, las especies no nativas afectan negativamente a las especies nativas en mayor medida que a otras especies no nativas, y las especies nativas tienen un efecto neutral o incluso negativo sobre sus vecinos nativos (Kuebbing y Nuñez 2016). En este capítulo se muestra que tanto los hospedadores nativos como no nativos desarrollan igual biomasa tanto en suelo nativo como no nativo, en presencia de sus propios simbiontes fúngicos específicos. Los suelos de los sitios donde los hospedadores no nativos están ausentes son susceptibles a la invasión por la presencia de hongos EM no nativos invasores, y los hospedadores nativos podrían ser capaces de permanecer en los sitios invadidos dada la presencia de hongos EM nativos. Al menos a la escala analizada, la presencia de hospedadores nativos no es una barrera para la invasión de hospedadores no nativos y la presencia de mutualistas fúngicos nativos pareciera no impedir la expansión de hongos EM no nativos.

Capítulo 5 – Manejo adaptativo de hongos ectomicorrícicos invasores en bosques nativos – Lecciones de la experiencia en el Parque Nacional Lago Puelo

5.1 Resumen

Cómo manejar las invasiones de los microorganismos del suelo es una pregunta abierta. A pesar de una creciente preocupación acerca de los impactos que estos invasores subterráneos podrían tener en las comunidades nativas, la evidencia disponible para su manejo está limitada a ciertos patógenos que afectan cultivos de interés comercial. Los organismos mutualistas no nativos invasores que habitan el suelo, como algunos hongos micorrícicos, pueden causar impactos indeseados en los ecosistemas y generar asociaciones nuevas con especies nativas con consecuencias ecológicas desconocidas, por lo que su manejo no puede ser ignorado. En este capítulo se analiza un caso de estudio en el que la Administración de Parques Nacionales llevó a cabo una primera aproximación al manejo de hongos EM en un área dominada por hospedadores nativos, invadida por el hongo ectomicorrícico no nativo *Amanita muscaria*. La colecta manual de esporocarpos, junto con la remoción de los hospedadores nativos en un área invadida delimitada, no impidió la aparición de nuevos esporocarpos en el bosque nativo. En base a los aspectos positivos y negativos de esta primera experiencia local, de acuerdo a la bibliografía disponible, y teniendo en cuenta los resultados de capítulos previos de esta tesis, en este capítulo se propone un esquema conceptual para un plan de manejo de hongos EM invasores que toma en cuenta las diferentes etapas del proceso de invasión y se focaliza en cómo, qué, y cuándo manejar a la invasión de hongos EM no nativos en bosques nativos.

5.2 Introducción

Existe una creciente preocupación acerca de los organismos invasores que habitan el suelo y sus efectos en la estructura y el funcionamiento de las comunidades nativas (Marler et al. 1999, Callaway et al. 2004, Reinhart y Callaway 2006, Weidenhamer y Callaway 2010, Wall et al. 2012). Sin embargo, la evidencia acerca de cómo manejarlos es escasa, lo que dificulta la posibilidad de un accionar rápido destinado a prevenir, erradicar, contener, o mitigar la invasión. Esto podría deberse, entre otros factores, a la naturaleza críptica de la mayoría de las especies que invaden bajo tierra, especialmente los microorganismos del suelo, y a dificultades metodológicas en cuanto a su detección y caracterización (Horton y Bruns 2001, Peay et al. 2008, Bardgett y van der Putten 2014). Los trabajos previos que han abordado la temática de manejo de microorganismos del suelo están principalmente focalizados en patógenos, particularmente aquellos que afectan cultivos de interés comercial (Thiele-Bruhn et al. 2012, Wall et al. 2015, Mercado-Blanco et al. 2018). Sin embargo, los microorganismos mutualistas, por ejemplo, podrían no seguir los mismos patrones de invasión, por lo que las estrategias de manejo destinadas a patógenos no serían efectivas para su manejo (Dickie et al. 2016). Las sugerencias acerca del manejo de invasiones de microorganismos del suelo son por lo general teóricas, y dado su falta de aplicación a situaciones reales, poco puede concluirse acerca de su eficiencia.

Entre las invasiones subterráneas, la invasión de hongos micorrícicos puede causar diversos impactos en los ecosistemas (Desprez-Loustau et al. 2007, Dickie et al. 2017). Una vez introducidos, los hongos micorrícicos invasores pueden por ejemplo modificar el ciclado de nutrientes (Chapela et al. 2001, Dickie et al. 2011), cambiar su disponibilidad (Chapela et al. 2001), o generar posibles efectos competitivos sobre la comunidad local de hongos (Kennedy et al. 2007, Wolfe et al. 2010). A su vez, pueden tener efectos positivos, neutrales, o negativos para los hospedadores nativos en comparación con los hongos nativos (Nuñez y Dickie 2014, Nuñez et al. 2016). Los impactos posibles en el ecosistema invadido son altamente idiosincráticos, y por lo tanto imprevisibles.

Muchas especies de hongos EM son problemáticas, y su manejo debiera ser prioritario. La especie tóxica *Amanita phalloides*, por ejemplo, es mortalmente tóxica para los humanos con varios reportes de víctimas tanto en su rango nativo como no nativo (Pringle y Vellinga 2006). Como se ha demostrado en los capítulos anteriores, las especies del género *Suillus* son altamente invasoras y facilitan a su vez la invasión de especies de pinos en sitios previamente no invadidos (Hayward et al. 2015b, Policelli et al. 2019). *Amanita muscaria*, ha sido reportada invadiendo bosques nativos, en dónde se encontró asociada a hospedadores ectomicorrícicos nativos tanto en sistemas prístinos como disturbados (Dickie y Johnston 2008, Dunk et al. 2012, Truong et al. 2017, Vargas et al. 2019). La invasión de estas especies tiene implicancias desconocidas tanto para los hospedadores como para la microbiota del suelo en los sitios invadidos (Dickie et al. 2016).

En este capítulo se analiza un caso de estudio en el que la Administración de Parques Nacionales, con el asesoramiento de investigadores, llevó a cabo una primera aproximación al manejo de la invasión del hongo ectomicorrícico no nativo *Amanita muscaria* en un sitio de bosque nativo. En base a los aspectos positivos y negativos de esta experiencia, a la evidencia recopilada en los Capítulos 2, 3, y 4 de esta tesis, y a la bibliografía disponible, se propone en este capítulo una estrategia de manejo aplicable en casos similares, que considera las diferentes etapas de la invasión y dos atributos ecológicos de las especies de hongos EM: su capacidad dispersiva y su especificidad en relación al hospedador. Se discute acerca de cómo y cuándo es necesario controlar la invasión de hongos EM a partir de la bibliografía disponible y de los propios resultados del manejo realizado.

5.3 Una primera aproximación al manejo de hongos EM invasores – La experiencia en Lago Puelo

El manejo de hongos EM invasores cuenta con una primera experiencia a escala local, llevada a cabo en el Parque Nacional Lago Puelo, provincia del Chubut, por la Administración de Parques Nacionales, con el asesoramiento de investigadores. En esta sección se detallan aspectos técnicos de este caso de estudio y se muestran los resultados obtenidos.

5.3.1 Sitio de estudio

Las acciones de manejo se realizaron en el Parque Nacional Lago Puelo, en la Provincia del Chubut, Argentina (42°06'15.40"S 71°43'33.60"O, Figura 5.1). La temperatura media anual es de 12 °C y la precipitación media anual es 1350 mm, concentrada durante los meses de otoño e invierno. La comunidad vegetal está dominada por el árbol nativo *Nothofagus dombeyi*, formando bosques mixtos con *Lomatia hirsuta* y *Austrocedrus chilensis*. Las especies del género *Nothofagus* son las únicas nativas capaces de asociarse a hongos EM en estos bosques. El sotobosque está compuesto por varios arbustos nativos como *Colletia hystrix*, *Ugni molinae*, *Berberis darwinii*, *Gaultheria insana*, *G. mucronata* y *Grisselinia racemosa*.

En el sitio de estudio hay dos áreas claramente distinguibles (Figura 5.1)

- 1- Un área altamente antropizada que incluye el sector de acceso al Parque Nacional y un sector de acampe, todos de acceso público. En esta área, varias especies no nativas de los géneros *Pinus*, *Picea* y *Acer*, han sido plantadas previamente a la creación del área protegida. En 2015 un incendio forestal afectó parte de esta área antropizada, incluyendo el sector de acceso. Durante los años siguientes, se realizaron tareas de limpieza y reacondicionamiento lo que provocó que el área sufra un alto grado de disturbio antrópico.
- 2 – Un área semi-prístina dominada por bosque nativo de *Nothofagus*, a 9 km del acceso al Parque Nacional y a 5 km del límite del área antropizada. En esta área no hay hospedadores no nativos de hongos EM (Zermatten 2016), y es muy poco transitada por personas que utilizan una senda de montaña que conecta el sector de acceso con el límite internacional con Chile. Dado su estado de preservación, esta área es de un alto valor de conservación para el Parque Nacional. En ambas áreas descritas así como en el resto de la región hay especies no nativas invasoras de ungulados (mayormente jabalí, *Sus scrofa*), reportados como dispersores de hongos EM (Nuñez et al. 2013, Soteras et al. 2017), cuyo rol se ha discutido en el Capítulo 3 de esta tesis.

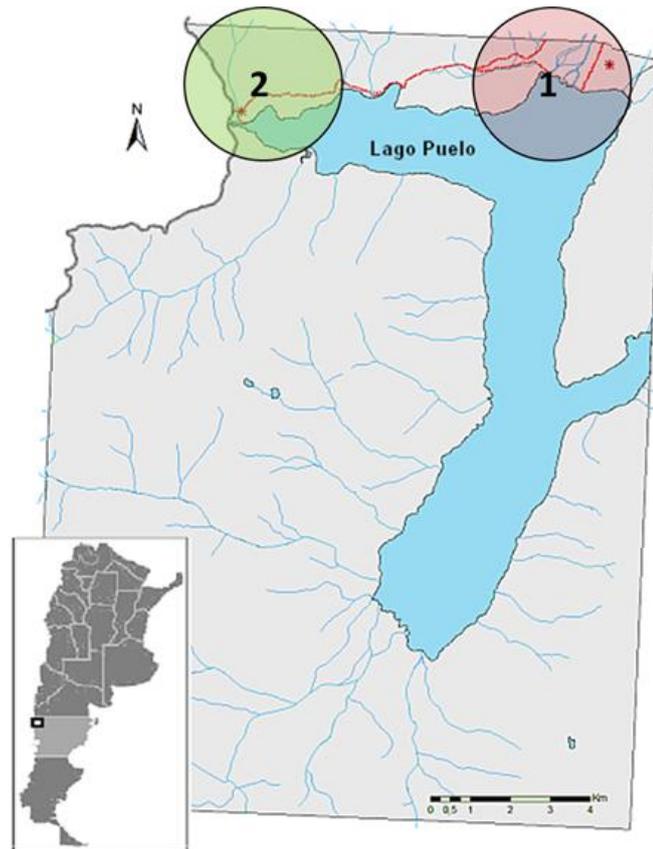


Figura 5.1. Sitio de estudio. Límites del Parque Nacional Lago Puelo en la Provincia del Chubut, Argentina. Los círculos indican las dos áreas del sitio de estudio: El área altamente antropizada (Círculo rojo con el número 1) cercana al sitio de acceso al Parque Nacional y con presencia de hospedadores no nativos de hongos EM; área semi-prístina (círculo verde con el número 2), dominada por bosque nativo de *Nothofagus*. La senda que conecta la entrada del Parque Nacional con el límite internacional con Chile está marcada en rojo. Modificado de la Administración de Parques Nacionales, F. Cantarell DRPN Nodo Patagonia SIB 2018.

5.3.2 Reportes de invasión y acciones de manejo

En el área antropizada del Parque Nacional Lago Puelo (Figura 5.1), esporocarpos del hongo ectomicorrícico no nativo invasor *Amanita muscaria* se reportaron por primera vez en el año 2008, cercanos a hospedadores no nativos plantados (*Picea* spp. y *Pinus* spp.). La aparición de *A. muscaria* no despertó mayores preocupaciones en ese momento dadas las características del sitio de aparición y el bajo número de esporocarpos detectados, junto con la falta de conocimiento acerca de una posible amenaza para las especies nativas. Durante los siguientes seis años, los reportes de aparición de esporocarpos de *A. muscaria* comenzaron a ser comunes en el área

antropizada, cerca de la entrada del Parque Nacional, siempre en un número bajo y en sitios dominados por hospedadores no nativos.

En el otoño de 2014, técnicos de la Administración de Parques Nacionales reportaron la presencia de esporocarpos de *A. muscaria* en el área semi-prístina, a 9 km de los reportes previos del área antropizada y en un sitio dominado por *Nothofagus dombeyi*, en ausencia de hospedadores no nativos cercanos (Zermatten 2015). Dado el alto valor de conservación del área, personal técnico del Parque Nacional contactó a investigadores para la identificación taxonómica de los esporocarpos, recomendaciones de manejo, y seguimiento del caso de estudio. Como primera medida de manejo, los esporocarpos comenzaron a ser colectados manualmente para evitar una mayor dispersión del hongo. Desde ese momento (otoño de 2014) la colecta manual se implementó tanto en el área antropizada como en el área semi-prístina para cada esporocarpo de *A. muscaria* encontrado. El número de esporocarpos colectados fue registrado anualmente. En 2015, reaparecieron esporocarpos en ambas áreas. En el área semi-prístina estaban restringidos a una zona pequeña de aproximadamente 30 m² dominada por *Nothofagus dombeyi*, y delimitada por un arroyo natural y el ya mencionado sendero. Dado que la zona afectada era pequeña y estaba bien delimitada, se acordó entre el personal técnico del Parque Nacional e investigadores, cortar a los posibles hospedadores en esa zona para restringir la fuente de carbono al hongo invasor (Dickie et al. 2016). En mayo de 2015, todos los individuos de *Nothofagus dombeyi* dentro de la zona de 30 m² fueron cortados, los individuos estuvieron en un rango desde los 10 cm a los 40 cm de DAP. Luego del corte se iniciaron relevamientos exhaustivos para monitorear la reaparición de esporocarpos de *A. muscaria* tanto en la zona intervenida como en el bosque nativo circundante.

5.3.3 Identificación taxonómica

Los esporocarpos colectados de la especie focal fueron morfológicamente identificados por especialistas como *Amanita muscaria* (L.) Lam. (Fungi, Basidiomycota, Agaricales, Amanitaceae). La identificación de esta especie es relativamente sencilla dadas sus características morfológicas distintivas, diferenciándose de cualquier otra especie fúngica nativa o no nativa

en la región. Los esporocarpos colectados fueron debidamente preservados y forman parte del herbario de la Universidad Nacional del Comahue (Número de Referencia BCRU 5387). Todo el material ya colectado fue debidamente preservado para futuros análisis moleculares tendientes a indagar acerca de posibles variaciones genéticas intraespecíficas entre las poblaciones asociadas a hospedadores nativos de *Nothofagus* y aquellas asociadas a plantaciones e invasiones de hospedadores no nativos en la región.

5.3.4 Resultados de la experiencia en Lago Puelo

La colecta manual de esporocarpos y el corte de posibles hospedadores no evitaron la reaparición de nuevos esporocarpos de la especie foco (Figura 5.2). En el área antropizada, los esporocarpos comenzaron a ser colectados manualmente en 2014, cuando todavía se presentaban en un número bajo (no más de cinco cada año desde el primer reporte en 2008). Luego del incendio forestal y el subsecuente disturbio antrópico, mayormente dado por el movimiento de suelo debido a las tareas de limpieza y reacondicionamiento, el número de esporocarpos de *Amanita muscaria* se incrementó notablemente, alcanzando picos de más de 80 en 2017 y en los años subsiguientes (Figura 5.2). Desde 2018, los esporocarpos han sido encontrados en nuevos sectores del área antropizada (por ejemplo, en sitios cercanos al área de acampe), pero siempre asociados a sitios dominados por hospedadores no nativos. En el área semi-prístina, la colecta manual desde 2014 y el corte de hospedadores en el área intervenida de 30 m² no evitaron la reaparición de esporocarpos de *A. muscaria* (Figura 5.2) tanto dentro como fuera del área intervenida. En total durante este período, seis esporocarpos fueron encontrados fuera del área intervenida en sitios de bosque nativo, todos a menos de 5 m del área intervenida. La colecta manual continuó cada vez que un nuevo esporocarpo fue encontrado.

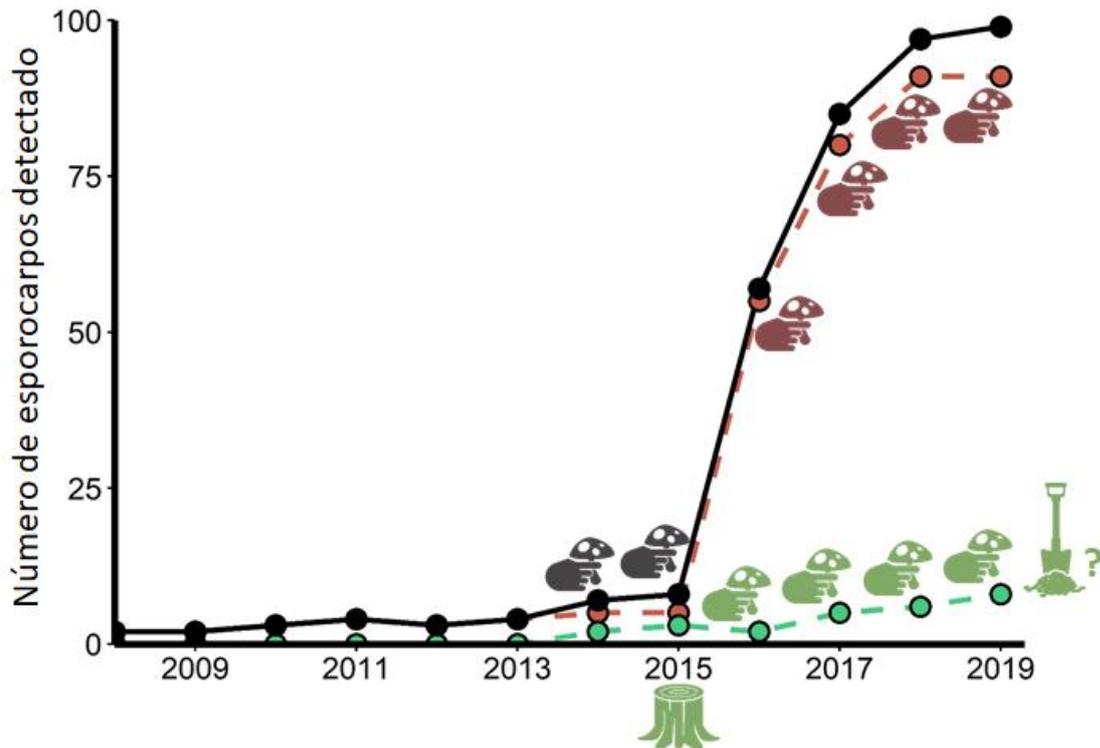


Figura 5.2. Resultados de una primer aproximación al manejo de *Amanita muscaria* invadiendo el bosque nativo de *Nothofagus* en el Parque Nacional Lago Puelo. Las líneas representan el número de esporocarpos de *A. muscaria* detectados desde el año 2008 al 2019 en: el área antropizada dominada por hospedadores no nativos (línea punteada y puntos rojos), el área semi-prístina dominada por el hospedador nativo *Nothofagus* (línea punteada y puntos verdes), ambas áreas consideradas en conjunto (línea continua y puntos negros). Los dibujos muestran la estrategia de manejo realizada cada año (en rojo lo que se aplicó solo en el área antropizada, en verde lo que se aplicó solo en el área semi-prístina, y en negro lo aplicado en ambas áreas para el año correspondiente): colecta manual de esporocarpos –imagen de la mano sosteniendo un esporocarpo-, corte de hospedadores –imagen del tocón de árbol-. El zanjado se muestra como una posible técnica de manejo a ser aplicada a futuro en la zona invadida del área semi-prístina –imagen de la pala en la tierra junto al signo de pregunta-.

5.3.5 Lecciones de la experiencia en el Parque Nacional Lago Puelo

Las medidas de manejo de colecta manual de esporocarpos y remoción de hospedadores, tal y como fueron efectuadas, no erradicaron a la especie de hongo ectomicorrícico no nativa invasora *Amanita muscaria*. La colecta manual de esporocarpos de forma activa no disminuyó el número de esporocarpos producidos en ninguna de las dos áreas del sitio de estudio. Se ha reportado en estudios previos que la remoción manual de esporocarpos tiene por lo general poco impacto en las poblaciones de hongos nativos en sistemas de bosque, en términos de producción de esporocarpos (Egli et al. 2006), pudiendo tener un

impacto diferencial de acuerdo a las características ecológicas del hongo. Para aquellas especies de hongos EM que producen un bajo número de esporocarpos y que poseen esporas con poca viabilidad una vez dispersadas, como el caso de *A. muscaria*, la remoción manual de esporocarpos podría ser recomendada y podría constituir una buena estrategia para involucrar a la población local en controlar la invasión (Dickie et al. 2016). Sin embargo, sólo sería efectiva si los esporocarpos son colectados cuando están inmaduros y aún no han dispersado sus esporas, y en estadios tempranos de la invasión de forma combinada con otras estrategias de manejo. Aquellas especies de hongos EM que producen una gran cantidad de esporocarpos y poseen esporas con una alta viabilidad, podrían no ser afectadas por la remoción manual, que incluso podría beneficiarlas si la dispersión de las esporas no es minimizada durante y luego de la colecta. La llegada de esporas de estas especies de hongos EM, que pueden persistir en el suelo por muchos años (Bruns et al. 2009), puede transformar sitios libres de invasión en sitios susceptibles a la invasión de los hospedadores (Policelli et al. 2019).

El corte de hospedadores nativos, de la forma en que fue realizado, no erradicó a *A. muscaria*. Tal como ocurre en Nueva Zelanda, la invasión de *A. muscaria* en el bosque nativo parece estar avanzando lentamente y afectando áreas puntuales, por lo que interrumpir la fuente de carbono al simbionte fúngico mediante el corte de su hospedador podría impedir la invasión (Dickie et al. 2016). Dado que las raíces de los hospedadores no fueron analizadas para cerciorarse de que exista colonización activa, existe la posibilidad de que hospedadores nativos colonizados cercanos al área intervenida hayan sido dejados en pie. El corte parcial, cuando ciertos hospedadores son deliberadamente dejados en pie, no necesariamente afecta negativamente a la comunidad de hongos EM (Kranabetter y Kroeger 2011, Sterkenburg et al. 2019). Por el contrario, el corte de todos los hospedadores reduce la abundancia y la riqueza de la comunidad de hongos EM (Wallander et al. 2010, Kyaschenko et al. 2017). Cortar todos los posibles hospedadores en sitios pequeños y bien delimitados de bosque nativo es posible, pero podría funcionar como un corte parcial si se dejan hospedadores colonizados en pie.

Determinar la extensión del micelio por debajo del área donde aparecen los esporocarpos es fundamental para aplicar el corte de los hospedadores.

Incluso cuando la presencia de esporocarpos claramente refleja la presencia de micelio, su ausencia no puede ser interpretada como ausencia de micelio y por lo tanto posible colonización de raíces (Gardes y Bruns 1996a) en sitios distantes al lugar de aparición de los esporocarpos. A pesar de ser parcialmente informativo, el censo de esporocarpos provee información limitada acerca de la dinámica de invasión de hongos EM (Bagley y Orlovich 2004), y debiera ser complementado con análisis moleculares de ápices radicales siempre que sea posible. Para *A. muscaria* las entidades genéticas idénticas tienden a ser pequeñas (aproximadamente 6 m, Bagley y Orlovich 2004), lo que incrementa la probabilidad de colonización agrupada de hospedadores cerca de los esporocarpos. Sin embargo, una vez establecida la especie, puede persistir y expandirse a través tanto del crecimiento del micelio, como de la esporulación (Wolfe et al. 2010). En el caso estudiado, no fue posible determinar si el micelio del área intervenida estaba colonizando otros hospedadores además de los que fueron cortados.

En el área antropizada, el número de esporocarpos de *A. muscaria* se incrementó notablemente luego de un incendio forestal y del posterior disturbio antrópico a partir de las tareas de reacondicionamiento llevadas a cabo por personal del Parque Nacional. Como otras especies invasoras, algunos hongos EM son capaces de sobrevivir y colonizar de forma activa sitios disturbados (Baar et al. 1999, Dunk et al. 2012, Glassman et al. 2016). En particular, *A. muscaria* ha sido asociada tanto a ambientes disturbados donde la presencia de vectores de dispersión y el movimiento de suelo es mayor (Dunk et al. 2012), como a sitios no disturbados (Moeller et al. 2015). Un grupo de especies de hongos EM ruderales es capaz de sobrevivir luego del fuego dado que forman bancos de esporas resistentes (Glassman et al. 2016). Sin embargo las especies de *Amanita* poseen esporas menos resistentes que la mayoría de las especies que colonizan sitios post-fuego como *Rhizopogon* spp. y *Suillus* spp. (Baar et al. 1999, Glassman et al. 2016). *Amanita* es comúnmente caracterizado como un hongo tardío en la sucesión capaz de desplazar competitivamente a los colonizadores tempranos (Peay et al. 2011). En el sistema estudiado, es más probable que el movimiento de suelo y el disturbio antrópico luego del fuego hayan beneficiado la proliferación de *A. muscaria* en el área antropizada, a pesar de que la producción de un mayor número de

esporocarpos luego de un disturbio, no implica necesariamente un mayor grado de colonización de los hospedadores (Dove y Hart 2017). De cualquier modo, las estrategias de manejo tendientes a impedir el disturbio del suelo y los vectores de dispersión, podrían favorecer al manejo de la invasión de hongos EM no nativos.

La ausencia de réplicas en el diseño y de un área no manejada que funcione como control de las prácticas llevadas a cabo, limitan el alcance de las conclusiones acerca de esta primera experiencia de manejo. Sin embargo, los resultados obtenidos a escala local sugieren que varias estrategias de manejo necesitan ser implementadas en forma simultánea, dependiendo de la especie de hongo ectomicorrícico no nativo invasor, de sus características ecológicas, y de la etapa en la que se encuentre la invasión, de forma tal de aumentar las posibilidades de un manejo exitoso.

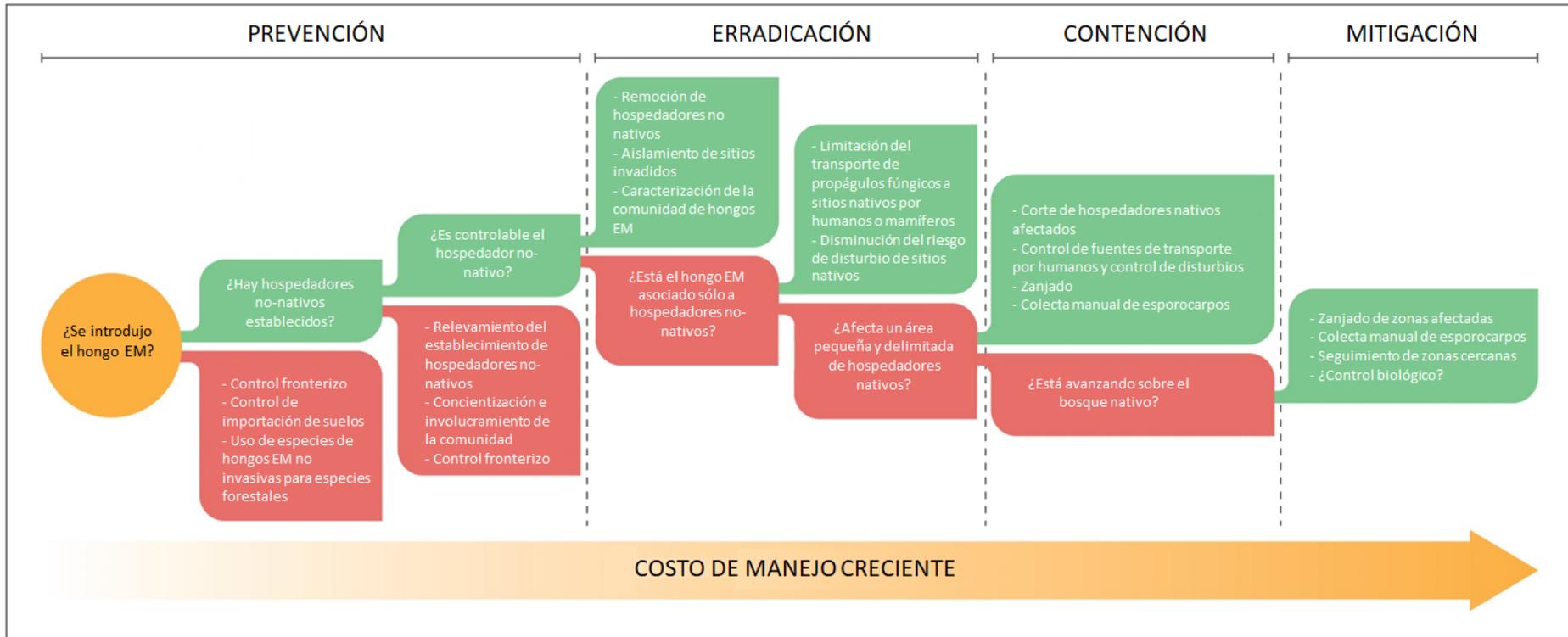
5.4 ¿Cómo manejar la invasión de hongos ectomicorrícicos?

Tomando en cuenta los aportes de la experiencia de manejo en el Parque Nacional Lago Puelo, en forma conjunta con los resultados de los Capítulos 2, 3 y 4 de esta tesis, y la bibliografía disponible en estrategias de manejo similares (Dickie et al. 2016), en esta sección se propone un esquema de manejo para la invasión de hongos EM. A su vez, se proponen prioridades de manejo para diferentes grupos de hongos EM y/o de sus hospedadores, dependiendo de la capacidad de dispersión de los hongos y el grado de especificidad en la interacción simbiótica. A pesar de que la invasión de hongos EM es altamente dependiente del contexto en el que ocurre, la información generada podría ser útil en casos similares en los que se requiera tomar decisiones de manejo, resaltando la idea de que el manejo activo es necesario para evitar la invasión.

5.4.1 Prevención

Como ocurre con la mayoría de los organismos invasores, la prevención es la mejor alternativa para evitar la invasión de hongos EM no nativos (Figura 5.3) y su posible impacto asociado. Evitar la entrada tanto de posibles hospedadores como de los propios hongos EM es crucial. Un control estricto en

las fronteras para evitar el transporte de suelo que podría contener propágulos fúngicos viables, o incluso limitar el transporte de plantas ya inoculadas, es mucho más efectivo en términos de costos que cualquier otra medida de manejo en las subsiguientes etapas de la invasión (Dickie et al. 2016). El transporte de especies vegetales potencialmente hospedadoras de hongos EM debiera ser evitado (Vellinga et al. 2009), especialmente para aquellas especies reportadas como hospedadores de hongos EM altamente invasivos como los pinos (Bogar et al. 2015, Nuñez et al. 2016, Policelli et al. 2019). En particular, *Amanita muscaria* ha sido ampliamente transportado e introducido en nuevas regiones a partir del movimiento de suelo y de hospedadores para fines forestales u ornamentales (Vellinga et al. 2009). Un posible origen asiático de la invasión de *A. muscaria* (Oda et al. 2004) con posteriores introducciones en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Sudamérica (Pringle et al. 2009, Vellinga et al. 2009), le permitió a esta especie invadir en sitios con potenciales hospedadores nativos como *Nothofagus*. En Nueva Zelanda, pionero en el control de *A. muscaria*, la especie está regulada como una peste (Ministerio de Agricultura y Bosques, Nueva Zelanda, 2008) con altos niveles de control fronterizo. Para aquellas especies hospedadoras utilizadas para la industria forestal, se está estudiando la posibilidad de utilizar hongos EM no invasores como inoculante y evitar así la invasión, mientras se aseguran buenos rendimientos para el productor (Hayward et al. 2015a, Policelli y Nuñez en prep.). El conocimiento público y la participación ciudadana en la detección de invasiones tempranas también suelen ser útiles, especialmente para aquellos hospedadores y hongos EM que son fácilmente reconocibles. La colecta manual de los esporocarpos de estos hongos podría ser efectiva para involucrar a las personas locales en el manejo de especies no nativas (Dickie et al. 2016) como en el caso del Parque Nacional Lago Puelo. Sin embargo, una vez que las especies están establecidas en el nuevo hábitat puede ser necesario considerar la combinación de diferentes estrategias de manejo para lograr la erradicación.



1

2 **Figura 5.3.** ¿Cómo manejar la invasión de hongos ectomicorrícicos? Esquema de decisiones mostrando el plan de manejo sugerido de acuerdo a las
 3 diferentes etapas de la invasión, desde la prevención antes de la introducción de los hongos EM hasta la mitigación luego de su avance en el bosque nativo.
 4 Las cajas verdes representan respuestas afirmativas a la caja previa, mientras que las cajas rojas representan respuestas negativas. El foco del manejo
 5 cambia de controlar al hospedador a controlar al hongo en sí mismo. El costo de manejo se incrementa a medida que la invasión avanza.

5.4.2 Erradicación

Una vez que tanto la o las especies de hongos EM y sus hospedadores se han establecido, la erradicación podría ser posible cuando los hongos EM están restringidos a hospedadores no nativos (Figura 5.3). Esto puede darse en el caso de: 1. Hongos EM altamente específicos que co-invaden con sus hospedadores y tienen una baja probabilidad de interactuar con hospedadores nativos o 2. Hongos EM generalistas en su asociación en etapas tempranas de la invasión que tienen el potencial de alcanzar sitios nativos a través de cualquier forma de dispersión (abiótica, mediada por humanos, o mediada por animales, Horton 2017). En ambos casos, la dispersión de propágulos viables de los hongos EM debiera ser minimizada y restringida al interior de áreas dominadas por hospedadores no nativos. En forma conjunta, se debiera minimizar posibles disturbios antrópicos que puedan favorecer la invasión en áreas nativas. En este punto, es necesario recopilar información acerca de la identidad de las especies de hongos EM asociados con los hospedadores no nativos para establecer prioridades de manejo (Figura 5.4).

Los hongos EM que son altamente específicos, a pesar de ser más susceptibles a la eliminación de sus hospedadores, debieran ser erradicados dado que son capaces de dispersarse a sitios nativos. Si bien no serían capaces de interactuar con hospedadores nativos, podrían condicionar estos sitios para la posterior invasión de sus hospedadores no nativos (por ejemplo los hongos suilloides y los pinos como se desarrolló en capítulos anteriores). Como ocurre con las plantas y los bancos de semillas, la erradicación puede ser dificultosa para aquellos hongos que son capaces de producir un banco de esporas persistente (Rejmánek y Pitcairn 2002). Los hongos generalistas que tienen el potencial de asociarse con hospedadores nativos, deben ser rápidamente controlados si son capaces de dispersarse por fuera de la zona de introducción y formar un banco de esporas resistente. *A. muscaria*, particularmente, no es una especie tan efectiva en formar un banco de esporas duradero como sí lo son otras especies de hongos EM (Bruns et al. 2009, Glassman et al. 2015), lo cual puede ser visto como una ventaja en términos de la posibilidad de erradicar la especie en estadios tempranos de la invasión. Si el hongo EM no nativo invasor es capaz de asociarse con hospedadores

nativos y ha alcanzado áreas de vegetación nativa, la erradicación podría no ser posible y se debieran tomar acciones de contención.

5.4.3 Contención

Las medidas de contención debieran aplicarse cuando la invasión ya no es incipiente y afecta áreas nativas en las cercanías de las fuentes de invasión (Figura 5.3). Junto con evitar las vías de dispersión de propágulos fúngicos, incluyendo la dispersión mediada por humanos, varias medidas de manejo deben ser tomadas de forma simultánea. El zanjado de zonas invadidas pequeñas y bien delimitadas, combinado con estrategias que eviten la dispersión de las esporas, podrían ser efectivas para evitar una mayor invasión del área de vegetación nativa (Dickie et al. 2016). El zanjado del suelo podría ser efectivo en reducir la expansión del micelio, cortando la conexión física entre las hifas (Thiet y Boerner 2007, Dickie et al. 2016). A pesar de ser una técnica laboriosa y costosa (Dickie et al. 2016), para áreas pequeñas como la que se describió en este capítulo, el zanjado podría ser la siguiente acción de manejo recomendada en combinación con las ya aplicadas. El zanjado de 30 cm de profundidad o incluso más profundo, ha sido mayormente utilizado para fines experimentales, excluyendo exitosamente el micelio de hongos EM y las raíces de los hospedadores (Gadgil y Gadgil 1971, Zhu y Ehrenfeld 1996, McGuire et al. 2010). Esta técnica excluye también hongos nativos y raíces de especies nativas, por lo que su aplicación debiera ser recomendada solo para áreas pequeñas de vegetación nativa. Sin embargo, el zanjado no evitaría la dispersión por medio de esporas u otros tipos de propágulos de resistencia a través de viento u otros vectores (Horton 2017). En este punto, puede ser poco probable lograr eliminar la o las especies foco, pero las medidas de contención protegen el ecosistema nativo de una mayor invasión tanto por encima como por debajo del suelo. Si la contención no es efectiva, se requieren medidas de mitigación (Figura 5.3).

5.4.4 Mitigación

Para la mitigación, el control biológico sería una alternativa complementaria a las acciones de manejo previas. No hay en la literatura

reportes de control biológico de hongos EM no nativos invasores. Algunos insectos micófagos (Hiol Hiol et al. 1994) o micoparásitos (por ejemplo *Hypomyces*, miembros de la familia Gomphidiaceae) podrían actuar como posibles agentes de biocontrol. Algunas especies de *Hypomyces*, por ejemplo, exhiben una alta especificidad por especies particulares de hongos EM (Douhan y Rizzo 2003). Sin embargo, el control biológico podría tener impactos negativos en las especies de hongos EM nativas, por lo que se requiere de una mayor evidencia y estudios para evitar resultados no deseados.

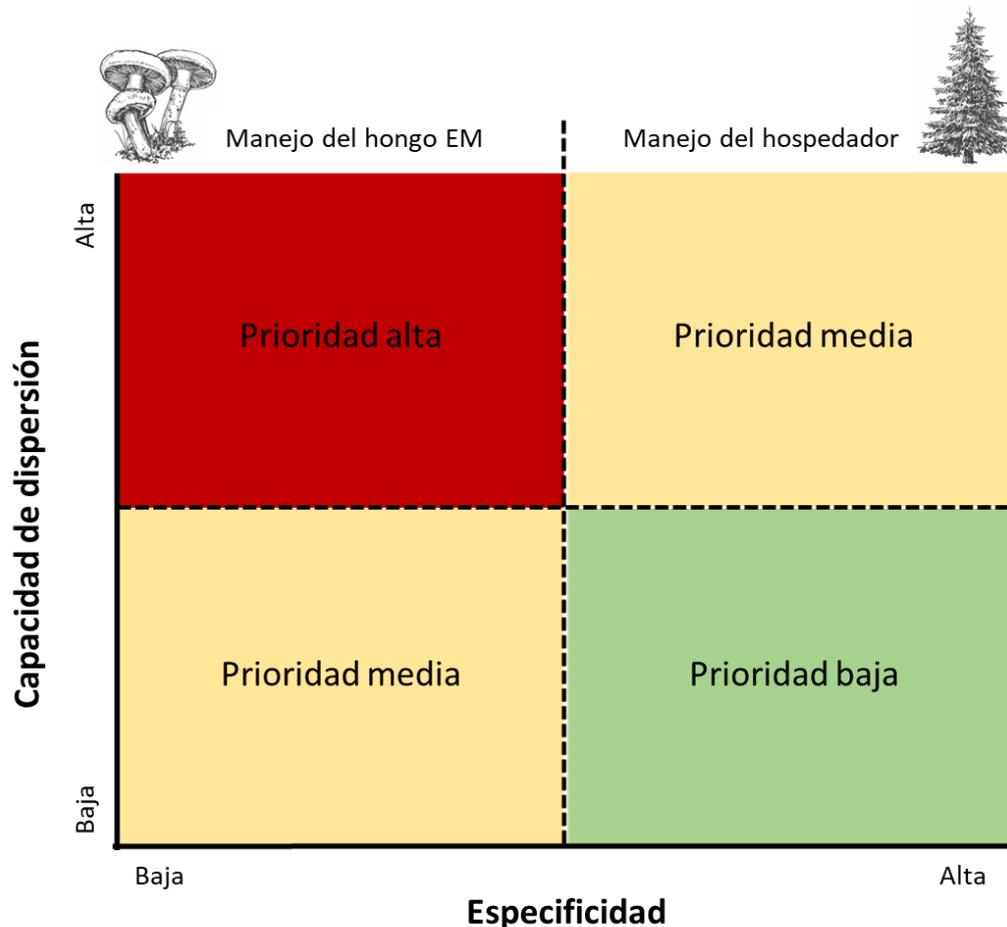


Figura 5.4. ¿Qué manejar? La prioridad de manejo de hongos EM dependerá de dos rasgos ecológicos de los simbiontes fúngicos: su capacidad de dispersión y su especificidad en la interacción con el hospedador. Los colores indican diferentes prioridades de manejo (rojo: prioridad alta, naranja: prioridad media, y verde: prioridad baja). A su vez, cuando la especificidad del hongo EM por su hospedador es alta, sería más efectivo el manejo del hospedador que el del simbionte fúngico (por ejemplo cortar pinos para evitar el éxito de la co-invasión con hongos suilloides). En el caso de hongos EM con menos especificidad, y por lo tanto un mayor riesgo de asociación con hospedadores nativos, el manejo del simbionte fúngico podría ser más efectivo (por ejemplo zanjado o colecta de esporocarpos para el caso de *Amanita muscaria*).

5.4.5 Prioridades de manejo

Los rasgos ecológicos de los hongos, como su capacidad de dispersión y su especificidad, pueden ser usados para evaluar su prioridad de manejo (Figura 5.4). A los simbioses ectomicorrícicos que son capaces de dispersarse lejos del área inicial de introducción se les puede asignar una alta prioridad, dado que pueden facilitar el establecimiento de nuevos hospedadores en zonas aún no invadidas (Hayward et al. 2015a), como se evidenció en el Capítulo 4 de este trabajo de tesis. Dentro de este grupo, aquellos hongos EM con una alta especificidad por su hospedador (por ejemplo los hongos suilloides y los pinos, Policelli et al. 2019) tienen una baja probabilidad de asociarse con hospedadores nativos, por lo que los esfuerzos de manejo debieran estar focalizados en controlar la dispersión y el establecimiento de los hospedadores en vez de las especies fúngicas en sí mismas. Contrariamente, aquellos que poseen tanto una buena capacidad de dispersión como la capacidad de formar nuevas asociaciones debieran poseer el grado de prioridad de manejo más alto, aplicando técnicas combinadas de manejo para controlar rápidamente su expansión. Determinar la capacidad de dispersión y la especificidad de hongos EM no nativos no es una tarea sencilla, sin embargo puede ser complementada con el conocimiento de estos rasgos en el rango nativo.

5.5 Conclusiones

Los resultados de la experiencia de manejo en el Parque Nacional Lago Puelo sugieren que la colecta manual de esporocarpos y el corte de hospedadores nativos no evitan la invasión de una especie de hongo EM no nativa en el bosque nativo. Sin embargo, las técnicas y el diseño utilizado pueden ser mejorados a futuro. Entre las mejoras necesarias, resulta fundamental la determinación de una asociación efectiva entre el hongo EM invasor y los hospedadores nativos. A su vez, diferentes combinaciones de estrategias de manejo podrían ser puestas a prueba en el campo considerando tanto el estadio en la invasión como la ecología de las especies de hongos EM.

La detección temprana de las especies invasoras, el relevamiento posterior a la aplicación de las medidas de manejo, el seguimiento intensivo, el conocimiento detallado de las especies foco, y las acciones rápidas y

enérgicas, son necesarias para un manejo exitoso de las especies invasoras (Simberloff 2009). Igualmente importante es la cooperación entre actores diversos de la comunidad, técnicos, tomadores de decisiones y científicos. Las agencias de conservación y manejo tienen poca o nula tradición de publicar sus resultados, sean estos exitosos o no, en revistas científicas. Esto hace que el acceso a la información sea complejo o incluso imposible, lo que dificulta las acciones de manejo similares en otras partes del mundo (Simberloff 2009). Incluso en el caso de que sean publicados, el acceso a los resultados es usualmente restringido para los que toman las decisiones técnicas y administrativas a escala local y regional, ya sea por cuestiones del idioma de publicación, o la ininteligibilidad del lenguaje técnico-científico utilizado. Se necesita, entonces, una mayor integración entre los diversos actores para generar medidas de manejo adaptativas como las presentadas en este capítulo. Es posible aplicar medidas de manejo apropiadas a organismos que habitan el suelo para controlar su invasión. Así como ocurre con el resto de las especies invasoras, no actuar no supone una solución.

Capítulo 6 – Discusión general

En este trabajo de tesis se ha abordado la problemática de la co-invasión de pinos y sus hongos simbiotes ectomicorrícicos, con especial énfasis en la Patagonia argentina y chilena. A partir de una revisión bibliográfica (Capítulo 2), experimentos en cámara de cultivo e invernadero (Capítulos 3 y 4), observaciones a campo (Capítulos 3 y 4), y un abordaje desde la ecología aplicada (Capítulo 5), se ha visto que: 1. La identidad de los hongos EM no nativos, y sus atributos ecológicos, pueden ser factores determinantes del éxito de invasión de pinos. 2. Incluso en ausencia de ungulados no nativos, capaces de dispersar sus esporas, estos hongos EM no nativos están presentes en sitios lejanos de la fuente de inóculo y son capaces de colonizar nuevos hospedadores, facilitando su invasión. 3. El suelo de sitios aún no invadidos por pinos puede ser susceptible a la invasión por la presencia de hongos EM no nativos invasores específicos. 4. Hospedadores de hongos EM nativos del género *Nothofagus* se asocian con hongos EM nativos tanto en sitios invadidos como no invadidos por pinos. 5. Los hongos EM no nativos podrían ser objeto de un plan de manejo tendiente a prevenir, contener y/o mitigar su co-invasión, y este plan de manejo debiera considerar la etapa en la que se encuentre la invasión y las características ecológicas de los hongos EM. Estos resultados sugieren que es necesario indagar y considerar los aspectos subterráneos de las invasiones biológicas para poder predecir su éxito o fracaso, y diseñar medidas destinadas a su manejo.

La identidad de los hongos EM co-introducidos con los pinos es relevante, y puede actuar como un factor determinante de su invasión. Un grupo reducido de especies de hongos EM son clave en el proceso de invasión. A nivel predictivo, un sitio cuyo suelo posea propágulos viables de hongos suilloides es más vulnerable a la invasión de pinos que un suelo en donde estos hongos están ausentes (Policelli et al. 2019). Diversos estudios han analizado aspectos asociados a las características ecológicas de los pinos que podrían explicar su invasión, tales como el tamaño y la dispersión de sus semillas (Rejmanek y Richardson 1996), su rápido crecimiento en comparación con las plantas nativas (Richardson 1998), o la adaptación a disturbios como el

fuego (Franzese y Raffaele 2017). Los resultados de esta tesis sugieren que la presencia de ciertos hongos EM debe ser considerada a futuro como otro factor predictivo en el riesgo de invasión de pinos. Un creciente número de estudios incorporan la co-invasión con mutualistas del suelo como un factor a evaluar en forma conjunta con otras hipótesis de invasión (Moyano et al. 2019), reconociendo que las características ecológicas de estos organismos, como por ejemplo su capacidad de dispersión, condicionan fuertemente el proceso de invasión de plantas.

La dispersión de los hongos EM es un factor determinante de la invasión de sus hospedadores. En esta tesis, se ha indagado sobre la presencia de hongos EM no nativos en suelos de sitios que carecen de uno de sus principales agentes dispersores, los ungulados no nativos (Nuñez et al. 2013, Wood et al. 2015, Livne-Luzon et al. 2017, Soteras et al. 2017). Contrariamente a lo esperado se vio que estos sitios, incluso en ausencia de ungulados no nativos, ya poseen propágulos fúngicos viables capaces de colonizar pinos. A su vez, los pinos creciendo en suelo de sitios con ausencia histórica de ungulados presentan una colonización por hongos EM y una biomasa similares a aquellos creciendo en suelo proveniente de sitios donde los ungulados están presentes. Complementando los resultados obtenidos por Nuñez et al. (2013), estos resultados sugieren fuertemente que hay otras vías de dispersión que pueden estar siendo importantes para la llegada de hongos EM a zonas lejanas. La evaluación del ser humano como un vector de hongos EM, de las aves, de la fauna del suelo y de agentes abióticos como el agua, aún requieren de estudios experimentales que evalúen su rol en ambientes no nativos. A su vez, el rol de los dispersores nativos de hongos EM no nativos debiera ser tomado en cuenta ya que constituiría un ejemplo de interacción novedosa en el rango invadido. Junto con la capacidad dispersiva de los hongos EM, la especificidad en la interacción con el hospedador también condiciona el proceso de invasión.

Hongos EM específicos en su interacción son capaces de condicionar sitios aún no invadidos y facilitar la invasión de sus hospedadores. Sitios de bosque nativo en donde aún no se observan plantas no nativas invasoras como los pinos, pueden ser susceptibles a la invasión dada la presencia de hongos EM invasores. Así como la invasión de especies de plantas o animales

conlleven por lo general a una homogeneización biótica que afecta aspectos ecológicos, económicos y socioculturales de los ecosistemas invadidos (Simberloff et al. 2013, García et al. 2018), podría esperarse que lo mismo ocurra en términos de la invasión de hongos. Si bien los procesos que ocurren por encima del suelo debido a la invasión no necesariamente tienen un correlato por debajo del suelo, los efectos de esta posible homogeneización de la biota subterránea sobre la comunidad nativa por encima y por debajo del suelo permanecen aun escasamente explorados (Reinhart y Callaway 2006, Kardol y Wardle 2010, Bardgett y van der Putten 2014). Debido a este desconocimiento en relación a los efectos de la invasión de hongos EM, se requieren acciones tendientes a prevenir, controlar o mitigar la invasión.

Es necesario desarrollar estrategias de manejo enfocadas en la interacción entre plantas invasoras y mutualistas del suelo. Ante la ausencia de ejemplos exitosos de manejo de hongos EM a campo y su complejidad, diversas estrategias debieran ponerse en práctica en forma conjunta considerando la etapa en que se encuentre la invasión. A la bibliografía disponible en el tema (Dickie et al. 2016), este trabajo de tesis ha incorporado la idea de que las características ecológicas del hongo EM son importantes para su manejo, en particular su capacidad dispersiva y su especificidad. Estas características tienen el potencial de determinar prioridades de manejo al momento de tomar decisiones. La propuesta de manejo de hongos EM expuesta en esta tesis se fundamenta, a su vez, en la idea de que el manejo de una interacción entre dos organismos invasores puede ser más efectivo que el manejo enfocado en una sola especie de interés.

En relativamente pocos años se ha logrado un avance fundamental en las técnicas moleculares tendientes a analizar la composición de los microorganismos del suelo (Horton y Bruns 2001, Peay et al. 2008, Branco et al. 2017). Sin embargo, interacciones ecológicas que se encuentran bien descritas para las comunidades que habitan por encima del suelo, aún permanecen prácticamente desconocidas en el caso de los organismos que habitan el suelo. Procesos como la competencia entre hongos micorrícicos (Kennedy et al. 2007, Kennedy 2010, Mujic et al. 2016), la sucesión (Peay et al. 2011), o el impacto de los disturbios sobre la comunidad del suelo (Rincón et al. 2014, Glassman et al. 2016) requieren de un mayor estudio para lograr un

entendimiento no solo de la composición de especies sino también del rol funcional y el ensamble de la comunidad biótica del suelo y su impacto sobre la comunidad de plantas. Los escenarios de invasión constituyen modelos ideales para indagar sobre estos aspectos a partir de experimentos manipulativos que involucren un bajo número de especies de hongos EM.

El modelo de co-invasión entre hongos suilloides y pinos representa una posibilidad para poner a prueba diversas preguntas de la ecología de hongos EM y su rol en la invasión de plantas. Las características ecológicas de estos hongos los hacen fácilmente manipulables en condiciones controladas, siendo posible inocularlos en plántulas de pinos y evaluar tanto el desempeño de los hongos EM como de la plántula en distintas condiciones (Hayward et al. 2015a, Policelli et al. 2019). Una posible pregunta a evaluar a futuro podría ser cómo estos organismos simbioses interactúan con la planta en distintos escenarios de temperatura, humedad o nutrientes del suelo. Siendo las micorrizas fundamentales para la invasión de pinos, se podría evaluar el cambio de la intensidad de esta interacción simulando condiciones de cambio climático, en las que se espera que el rol de los hongos EM sea fundamental (Rillig et al. 2002, Compant et al. 2010). A su vez, se podría evaluar la interacción en relación no solo con la planta sino también con otros organismos del suelo como hongos saprobios en distintas condiciones de nutrientes del suelo y de la planta (Fernandez y Kennedy 2016), y como esto puede afectar la invasión. La combinación de un modelo sencillo de manipular como el de los pinos y los hongos suilloides y las herramientas moleculares disponibles abren un abanico de preguntas a futuro tendientes a entender en mayor medida la funcionalidad de los procesos bajo tierra y su rol en la invasión de plantas.

Los resultados de esta tesis y la evidencia disponible sugieren que la co-invasión es un mecanismo generalizado para el caso de algunas plantas ectomicorrícicas invasoras, como son las pináceas, pero los mecanismos por los cuales la especie no nativa invasora invade en relación a sus simbioses fúngicos pueden verse modificados de acuerdo al contexto en el que se produce la invasión (Bogar y Kennedy 2013, Moeller et al. 2015). En este sentido, el caso de la co-invasión de pinos y sus hongos ectomicorrícicos puede constituir una excepción, ya que se da mayormente en regiones carentes de especies filogenéticamente emparentadas. De existir especies

emparentadas, la probabilidad de que la especie no nativa invasora genere interacciones con la biota nativa podría verse incrementada (Bahram et al. 2013). La presencia de una especie de hospedador nativo emparentada con el no nativo invasor funcionaría como un factor facilitador de la invasión (Moeller et al. 2015) a partir de su interacción con simbiontes fúngicos nativos compatibles tanto con el hospedador nativo como con el no nativo. Utilizando especies no nativas invasoras asociadas a hongos EM pertenecientes a otras familias (Salicaceae o Myrtaceae por ejemplo), se podría poner a prueba experimentalmente si la especie no nativa logra establecerse y crecer en suelo proveniente de sitios dominados por la especie nativa dada la presencia de hongos ectomicorrícicos nativos con los que puede asociarse. Esto permitiría poner a prueba, a su vez, la generalidad del proceso de co-invasión para otras leñosas arbóreas por fuera de la familia Pinaceae (Bogar et al. 2015, Nuñez et al. 2016).

Muchos resultados obtenidos en este trabajo de tesis fueron opuestos a lo esperado inicialmente. El rol clave de unas pocas especies de hongos EM en el proceso de co-invasión, la presencia de hongos EM invasores como *Rhizopogon* spp. en sitios con ausencia histórica de ungulados, la colonización por hongos EM específicos de pinos en sitios de bosque nativo aún no invadidos por el hospedador, el crecimiento de los pinos en suelo de sitios de bosque nativo comparable con su crecimiento en zonas invadidas, y la dificultad en el manejo de una especie de hongo EM invasor incluso habiendo cortado posibles hospedadores, constituyen ejemplos de que aún resta mucho por entender acerca de la ecología de hongos EM y de su manejo. Los resultados obtenidos aportan al reconocimiento de los hongos ectomicorrícicos como organismos invasores y las posibles consecuencias que pueden tener en los ecosistemas nativos, resaltando la potencial implementación de prácticas de manejo y restauración que los consideren. Han surgido a lo largo de este trabajo de tesis nuevos cuestionamientos e hipótesis, necesarios para una disciplina en constante crecimiento como es la ecología de hongos micorrícicos, particularmente en su interacción con la ecología de invasiones. El componente subterráneo de las invasiones biológicas puede explicar parte de su éxito o fracaso en los ecosistemas nativos. En términos de la co-invasión de pinos y hongos ectomicorrícicos, los resultados sugieren que la invasión de

algunas especies de plantas puede estar explicada en parte por los rasgos ecológicos de sus simbioses específicas.

Bibliografía

- Adjoud-Sadadou, D., y R. Halli-Hargas. 2017. Dual mycorrhizal symbiosis: an asset for eucalypts out of Australia? *Canadian Journal of Forest Research* 47:500–505.
- Agerer, R. 1987. *Colour atlas of ectomycorrhizas*. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Alemania.
- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107–114.
- Agrawal, A. A., P. M. Kotanen, C. E. Mitchell, A. G. Power, W. Godsoe, y J. Klironomos. 2005. Enemy release? An experiment with congeneric plant pairs and diverse above- and belowground enemies. *Ecology* 86:2979–2989.
- Allsopp, N., y P. M. Holmes. 2001. The impact of alien plant invasion on mycorrhizas in mountain fynbos vegetation. *South African Journal of Botany* 67:150–156.
- Arana, S. V. & V. 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal, INTA EEA Bariloche. Bariloche, Argentina. Páginas 1-10.
- Ashkannejhad, S., y T. R. Horton. 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes. *New Phytologist* 169:345–354.
- Aslan, C. E., B. A. Sikes, y K. B. Gedan. 2015. Research on mutualisms between native and non-native partners can contribute critical ecological insights. *NeoBiota* 26:39–54.
- Ayesa, J. A., C. R. Lopez, D. E. Bran, F. J. Umana, y P. A. Lagorio. 2002. Cartografía biofísica de la Patagonia Norte. INTA Estación Experimental Agropecuaria Bariloche, PAN, PRODESAR. Bariloche, Argentina.
- Baar, J., T. R. Horton, A. M. Kretzer, y T. D. Bruns. 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist* 143:409–418.
- Baas-Becking, L. 1934. *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde (en holandés)*. W.P. van Stockum & Zoon, La Haya, Holanda.
- Bagley, S. J., y D. A. Orlovich. 2004. Genet size and distribution of *amanita muscaria* in a suburban park, Dunedin, New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 42:939–947.
- Bahram, M., U. Kõljalg, P. Kohout, S. Mirshahvaladi, y L. Tedersoo. 2013. Ectomycorrhizal fungi of exotic pine plantations in relation to native host trees in Iran: evidence of host range expansion by local symbionts to distantly related host taxa. *Mycorrhiza* 23:11–19.
- Bandoni, R. J., y R. E. Koske. 1974. Monolayers and Microbial Dispersal. *Science* 183:1079–1081.
- Bardgett, R. D., y W. H. van der Putten. 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515:505–511.
- Barrios-García, M. N., y S. A. Ballari. 2012. Impact of wild boar (*Sus scrofa*) in its introduced and native range: a review. *Biological Invasions* 14:2283–2300.

- Barrios-García, M. N., A. T. Classen, y D. Simberloff. 2014. Disparate responses of above- and belowground properties to soil disturbance by an invasive mammal. *Ecosphere* 5:art44.
- Barroetaveña, C., E. Cázares, y M. Rajchenberg. 2007. Ectomycorrhizal fungi associated with ponderosa pine and Douglas-fir: A comparison of species richness in native western North American forests and Patagonian plantations from Argentina. *Mycorrhiza* 17:355–373.
- Bates, D. M., M. Maechler, B. Bolker, y S. Walker. 2015. lme4: linear mixed-effects models using Eigen and Eigen. *Journal of statistical software*.
- Bates, D., M. Maechler, B. Bolker, S. Walker, R. H. B. Christensen, H. Singmann, y et al. 2018. Package “lme4”.
- Bates, S. T., J. C. Clemente, G. E. Flores, W. A. Walters, L. W. Parfrey, R. Knight, y N. Fierer. 2013. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil. *The ISME Journal* 7:652–659.
- Bennett, J. A., H. Maherali, K. O. Reinhart, Y. Lekberg, M. M. Hart, y J. Klironomos. 2017. Plant-soil feedbacks and mycorrhizal type influence temperate forest population dynamics. *Science* 355:181–184.
- Bever, J. D., I. A. Dickie, E. Facelli, J. M. Facelli, J. Klironomos, M. Moora, M. C. Rillig, W. D. Stock, M. Tibbett, y M. Zobel. 2010. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 25:468–78.
- Bever, J. D., S. C. Richardson, B. M. Lawrence, J. Holmes, y M. Watson. 2009. Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters* 12:13–21.
- Bidartondo, M. I. 2008. Preserving Accuracy in GenBank. *Science* 319:1616.
- Blackburn, T. M., P. Pyšek, S. Bacher, J. T. Carlton, R. P. Duncan, V. Jarošík, J. R. U. Wilson, y D. M. Richardson. 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 26:333–339.
- Bogar, L. M., I. A. Dickie, y P. G. Kennedy. 2015. Testing the co-invasion hypothesis: Ectomycorrhizal fungal communities on *Alnus glutinosa* and *Salix fragilis* in New Zealand. *Diversity and Distributions* 21:268–278.
- Bogar, L. M., y P. G. Kennedy. 2013. New wrinkles in an old paradigm: Neighborhood effects can modify the structure and specificity of *Alnus*-associated ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 83:767–777.
- Bohlen, P. J. 2006. Biological invasions: Linking the aboveground and belowground consequences. *Applied Soil Ecology* 32:1–5.
- Bonito, G., J. M. Trappe, S. Donovan, y R. Vilgalys. 2011. The Asian black truffle *Tuber indicum* can form ectomycorrhizas with North American host plants and complete its life cycle in non-native soils. *Fungal Ecology* 4:83–93.
- Bonfante, P., y A. Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 1: 48.
- Bourgeois, K., C. M. Suehs, E. Vidal, y F. Médail. 2005. Invasional meltdown potential: Facilitation between introduced plants and mammals on French Mediterranean islands. *Ecoscience* 12:248–256.

- Bradley, B. A., D. M. Blumenthal, D. S. Wilcove, y L. H. Ziska. 2010. Predicting plant invasions in an era of global change. *Trends in Ecology & Evolution* 25:310-318.
- Branco, S., K. Bi, H. L. Liao, P. Gladioux, H. Badouin, C. E. Ellison, N. H. Nguyen, R. Vilgalys, K. G. Peay, J. W. Taylor, y T. D. Bruns. 2017. Continental-level population differentiation and environmental adaptation in the mushroom *Suillus brevipes*. *Molecular Ecology* 26:2063–2076.
- Braun-Blanquet, J., H. S. Conard, y G. D. Fuller. 1932. *Plant sociology; the study of plant communities*. McGraw-Hill book company, inc., New York, EEUU.
- Bray, J. R., y J. T. Curtis. 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27:325–349.
- Briscoe, C. 1959. Early results of mycorrhizal inoculation of pine in Puerto Rico. *Caribbean Forester*:73–77.
- Brooks, M. E., K. Kristensen, K. J. van Benthem, A. Magnusson, C. W. Berg, A. Nielsen, H. J. Skaug, M. Maechler, y B. M. Bolker. 2017. Modeling Zero-Inflated Count Data With glmmTMB. *bioRxiv*:132753.
- Brundrett, M. C., y L. Tedersoo. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220:1108-1115.
- Bruns, T. D., K. G. Peay, P. J. Boynton, L. C. Grubisha, N. A. Hynson, N. H. Nguyen, y N. P. Rosenstock. 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.
- Brussaard, L. 1997. Biodiversity and Ecosystem Functioning. *Ambio* 26:563–570.
- Buscardo, E., S. Rodríguez-Echeverría, M. P. Martín, P. De Angelis, J. S. Pereira, y H. Freitas. 2010. Impact of wildfire return interval on the ectomycorrhizal resistant propagules communities of a Mediterranean open forest. *Fungal Biology* 114:628–636.
- Callaway, R. M., D. Cipollini, K. Barto, G. C. Thelen, S. G. Hallett, D. Prati, K. Stinson, y J. Klironomos. 2008. Novel weapons: Invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* 89:1043–1055.
- Callaway, R. M., G. C. Thelen, A. Rodriguez, y W. E. Holben. 2004. Soil biota and exotic plant invasion. *Nature* 427:731–733.
- Chao, A., C. Chiu, U. Niversity, H. S. I. N. Hu, y T. Aiwan. 2016. Species Richness: Estimation and Comparison:1–38.
- Chapela, I. H., L. J. Osher, T. R. Horton, y M. R. Henn. 2001. Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1733–1740.
- Chu-Chou, M., y L. J. Grace. 1988. Mycorrhizal fungi of radiata pine in different forests of the north and south islands in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 20:883–886.
- Clarke, K., y R. M. Warwick. 1994. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Natural Environment Research Council (NERC), Plymouth, Reino Unido.
- Cóbar-Carranza, A. J., R. A. García, A. Pauchard, y E. Peña. 2014. Effect of *Pinus contorta* invasion on forest fuel properties and its potential implications on the fire regime of *Araucaria araucana* and *Nothofagus antarctica* forests. *Biological Invasions* 16:2273–

2291.

- Collier, F. A., y M. I. Bidartondo. 2009. Waiting for fungi: The ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal of Ecology* 97:950–963.
- Compant, S., M. G. A. van der Heijden, y A. Sessitsch. 2010. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology* 73:197-214.
- Correa, M. N. 1978. Flora Patagónica, Parte III Gramineae. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina.
- Correia, M., R. Heleno, L. P. Silva, J. M. Costa, y S. Rodríguez-Echeverría. 2019. First evidence for the joint dispersal of mycorrhizal fungi and plant diaspores by birds. *New Phytologist* 222:1054–1060.
- Crawford, K. M., J. T. Bauer, L. S. Comita, M. B. Eppinga, D. J. Johnson, S. A. Mangan, S. A. Queenborough, A. E. Strand, K. N. Suding, J. Umbanhowar, y J. D. Bever. 2019. When and where plant-soil feedback may promote plant coexistence: a meta-analysis. *Ecology Letters*:1274–1284.
- Danielson, R. M. 1984. Ectomycorrhizal associations in jack pine stands in northeastern Alberta. *Canadian Journal of Botany* 62:932–939.
- Dawson, W., y M. Schrama. 2016. Identifying the role of soil microbes in plant invasions. *Journal of Ecology* 104:1211–1218.
- Desprez-Loustau, M. L., C. Robin, M. Buée, R. Courtecuisse, J. Garbaye, F. Suffert, I. Sache, y D. M. Rizzo. 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 22:472–480.
- Di Marino, E., L. Scattolin, P. Bodensteiner, y R. Agerer. 2008. *Sistotrema* is a genus with ectomycorrhizal species - Confirmation of what sequence studies already suggested. *Mycological Progress* 7:169.
- Dickie, I. A., N. Bolstridge, J. A. Cooper, y D. A. Peltzer. 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mychorrhizal fungi. *New Phytologist* 187:475–484.
- Dickie, I. A., J. L. Bufford, R. C. Cobb, G. Grelet, P. E. Hulme, J. Klironomos, A. Makiola, M. A. Nu, A. Pringle, P. H. Thrall, S. G. Tourtellot, L. Waller, y N. M. Williams. 2017. The emerging science of linked plant – fungal invasions. *New Phytologist* 215:1314–1332.
- Dickie, I. A., M. Davis, y F. E. Carswell. 2012. Quantification of mycorrhizal limitation in beech spread. *New Zealand Journal of Ecology* 36:210–215.
- Dickie, I. A., y P. Johnston. 2008. Invasive Fungi Research Priorities, with a Focus on *Amanita muscaria*. Landcare Research. Wellington, Nueva Zelanda.
- Dickie, I. A., M. A. Nuñez, A. Pringle, T. Lebel, S. G. Tourtellot, y P. R. Johnston. 2016. Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biological Invasions* 18:3383–3395.
- Dickie, I. A., M. G. St John, G. W. Yeates, C. W. Morse, K. I. Bonner, K. Orwin, y D. A. Peltzer. 2014. Belowground legacies of *Pinus contorta* invasion and removal result in multiple mechanisms of invasional meltdown. *AoB PLANTS* 6:1–15.
- Dickie, I. A., G. W. Yeates, M. G. St. John, B. A. Stevenson, J. T. Scott, M. C. Rillig, D. A. Peltzer, K. H. Orwin, M. U. F. Kirschbaum, J. E. Hunt, L. E. Burrows, M. M. Barbour, y J. Aislabie. 2011. Ecosystem service and biodiversity trade-offs in two woody successions. *Journal of Applied Ecology* 48:926–934.

- Douhan, G. W., y D. M. Rizzo. 2003. Host-parasite relationships among bolete infecting *Hypomyces* species. *Mycological Research* 107:1342–1349.
- Dove, N. C., y S. C. Hart. 2017. Fire Reduces Fungal Species Richness and In Situ Mycorrhizal Colonization: A Meta-Analysis. *Fire Ecology* 13:37–65.
- Dunham, S. M., K. H. Larsson, y J. W. Spatafora. 2007. Species richness and community composition of mat-forming ectomycorrhizal fungi in old- and second-growth Douglas-fir forests of the HJ Andrews Experimental Forest, Oregon, USA. *Mycorrhiza* 17:633–645.
- Dunk, C. W., T. Lebel, y P. J. Keane. 2012. Characterisation of ectomycorrhizal formation by the exotic fungus *Amanita muscaria* with *Nothofagus cunninghamii* in Victoria, Australia. *Mycorrhiza* 22:135–147.
- Egli, S., M. Peter, C. Buser, W. Stahel, y F. Ayer. 2006. Mushroom picking does not impair future harvests - Results of a long-term study in Switzerland. *Biological Conservation* 129:271–276.
- Ehrenfeld, J. G. 2010. Ecosystem Consequences of Biological Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41:59–80.
- Elton, C. S. 1958. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Springer US, Boston, EEUU.
- Engelmark, O., K. Sjöberg, B. Andersson, O. Rosvall, G. I. Ågren, W. L. Baker, P. Barklund, C. Björkman, D. G. Despain, B. Elfving, R. A. Ennos, M. Karlman, M. F. Knecht, D. H. Knight, N. J. Ledgard, *et al.* 2001. Ecological effects and management aspects of an exotic tree species: the case of lodgepole pine in Sweden. *Forest Ecology and Management* 141:3–13.
- Ettema, C., y D. A. Wardle. 2002. Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 17:177–183.
- Eviner, V. T., y C. V. Hawkes. 2008. Embracing Variability in the Application of Plant-Soil Interactions to the Restoration of Communities and Ecosystems. *Restoration Ecology* 16:713–729.
- Fernandez, C. W., y P. G. Kennedy. 2016. Revisiting the “Gadgil effect”: Do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils? *New Phytologist* 209:1382–1394.
- Fernández, N. V., P. Marchelli, F. Gherghel, G. Kost, y S. B. Fontenla. 2015. Ectomycorrhizal fungal communities in *Nothofagus nervosa* (Raulí): A comparison between domesticated and naturally established specimens in a native forest of Patagonia, Argentina. *Fungal Ecology* 18:36–47.
- Franzese, J., y E. Raffaele. 2017. Fire as a driver of pine invasions in the Southern Hemisphere: a review. *Biological Invasions* 19:2237–2246.
- Franzese, J., J. Urrutia, R. A. García, K. Taylor, y A. Pauchard. 2017. Pine invasion impacts on plant diversity in Patagonia: invader size and invaded habitat matter. *Biological Invasions* 19:1015–1027.
- Fries, N. 1987. Ecological and evolutionary aspects of spore germination in the higher basidiomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 88:1–7.
- Gadgil, R. L., y P. D. Gadgil. 1971. Mycorrhiza and Litter Decomposition. *Nature* 233:133.
- Galante, T. E., T. R. Horton, y D. P. Swaney. 2011. 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. *Mycologia* 103:1175–1183.

- Gallien, L., y M. Carboni. 2017. The community ecology of invasive species: where are we and what's next? *Ecography* 40:335–352.
- Gantchoff, M. G., J. L. Belant, y D. A. Masson. 2013. Occurrence of invasive mammals in southern Nahuel Huapi National Park. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 48:175–182.
- García, R. A., J. Franzese, N. Policelli, Y. Sasal, R. D. Zenni, M. A. Nuñez, K. Taylor, y A. Pauchard. 2018. Non-native Pines Are Homogenizing the Ecosystems of South America. En: Rozzi R. et al. (eds) *From Biocultural Homogenization to Biocultural Conservation. Ecology and Ethics*, vol 3. Springer, Cham. Páginas 245–263.
- Gardes, M., y T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Gardes, M., y T. D. Bruns. 1996a. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* 74:1572–1583.
- Gardes, M., y T. D. Bruns. 1996b. ITS-RFLP Matching for Identification of Fungi. *Species Diagnostics Protocols*. Humana Press, New Jersey, EEUU.
- Gass, T. M., y D. Binkley. 2011. Soil nutrient losses in an altered ecosystem are associated with native ungulate grazing. *Journal of Applied Ecology* 48:952–960.
- Gehring, C. A., T. C. Theimer, T. G. Whitham, y P. Keim. 1998. Ectomycorrhizal Fungal Community Structure of Pinyon Pines Growing in Two Environmental Extremes. *Ecology* 79:1562–1572.
- Gill, R. M. A. 2001. The impact of deer on woodlands: the effects of browsing and seed dispersal on vegetation structure and composition. *Forestry* 74:209–218.
- Glassman, S. I., C. R. Levine, A. M. Dirocco, J. J. Battles, y T. D. Bruns. 2016. Ectomycorrhizal fungal spore bank recovery after a severe forest fire: Some like it hot. *ISME Journal* 10:1228–1239.
- Glassman, S. I., K. G. Peay, J. M. Talbot, D. P. Smith, J. A. Chung, J. W. Taylor, R. Vilgalys, y T. D. Bruns. 2015. A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: A quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern. *New Phytologist* 205:1619–1631.
- Grove, S., K. A. Haubensak, C. Gehring, y I. M. Parker. 2017. Mycorrhizae, invasions, and the temporal dynamics of mutualism disruption. *Journal of Ecology* 105:1496–1508.
- Grove, S., N. P. Saarman, G. S. Gilbert, B. Faircloth, K. A. Haubensak, y I. M. Parker. 2019. Ectomycorrhizas and tree seedling establishment are strongly influenced by forest edge proximity but not soil inoculum. *Ecological Applications*:e01867.
- Gundale, M. J., J. P. Almeida, H. Wallander, D. A. Wardle, P. Kardol, M. C. Nilsson, A. Fajardo, A. Pauchard, D. A. Peltzer, S. Ruotsalainen, B. Mason, y N. Rosenstock. 2016. Differences in endophyte communities of introduced trees depend on the phylogenetic relatedness of the receiving forest. *Journal of Ecology* 104:1219–1232.
- Gundale, M. J., P. Kardol, M. C. Nilsson, U. Nilsson, R. W. Lucas, y D. A. Wardle. 2014a. Interactions with soil biota shift from negative to positive when a tree species is moved outside its native range. *New Phytologist* 202:415–421.
- Gundale, M. J., A. Pauchard, B. Langdon, D. A. Peltzer, B. D. Maxwell, y M. A. Nuñez. 2014b.

- Can model species be used to advance the field of invasion ecology? *Biological Invasions* 16:591–607.
- Hallett, S. G. 2006. Dislocation from coevolved relationships: a unifying theory for plant invasion and naturalization? *Weed Science* 54:282–290.
- Harrison, X. A. 2014. Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ* 2:e616
- Hausmann, N. T., y C. V. Hawkes. 2009. Plant neighborhood control of arbuscular mycorrhizal community composition. *New Phytologist* 183:1188–1200.
- Hayward, J., T. R. Horton, y M. A. Nuñez. 2015a. Ectomycorrhizal fungal communities coinvasive with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytologist* 208:497–506.
- Hayward, J., T. R. Horton, A. Pauchard, y M. A. Nuñez. 2015b. A single ectomycorrhizal fungal species can enable a Pinus invasion. *Ecology* 96:1438–1444.
- Hejda, M., P. Pyšek, y V. Jarošík. 2009. Impact of invasive plants on the species richness, diversity and composition of invaded communities. *Journal of Ecology* 97:393–403.
- Hibbett, D. S., L.-B. Gilbert, y M. J. Donoghue. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407:506–508.
- Hiol Hiol, F., R. K. Dixon, y E. A. Curl. 1994. The feeding preference of mycophagous Collembola varies with the ectomycorrhizal symbiont. *Mycorrhiza* 5:99–103.
- Hobbs, N. T. 1996. Modification of Ecosystems by Ungulates. *The Journal of Wildlife Management* 60:695.
- Hoeksema, J. D., J. D. Bever, S. Chakraborty, V. B. Chaudhary, M. Gardes, C. A. Gehring, M. M. Hart, E. A. Housworth, W. Kaonongbua, J. N. Klironomos, M. J. Lajeunesse, J. Meadow, B. G. Milligan, B. J. Piculell, A. Pringle, *et al.* 2018. Author Correction: Evolutionary history of plant hosts and fungal symbionts predicts the strength of mycorrhizal mutualism. *Communications Biology* 1:1–10.
- Hoffmann, B. D., y L. M. Broadhurst. 2016. The economic cost of managing invasive species in Australia. *NeoBiota* 31:1–18.
- Horton, T. R. 2006. The number of nuclei in basidiospores of 63 species of ectomycorrhizal Homobasidiomycetes. *Mycologia* 98:233–238.
- Horton, T. R. 2017. Spore dispersal in ectomycorrhizal fungi at fine and regional scales. Páginas 61–78 *en* L. Tedersoo (ed.) *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Springer International Publishing. Boston, EEUU.
- Horton, T. R., y T. D. Bruns. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10:1855–1871.
- Horton, T. R., T. D. Bruns, y V. T. Parker. 1999. Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Canadian Journal of Botany* 77:93–102.
- Horton, T. R., E. Cázares, y T. D. Bruns. 1998. Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8:11–18.
- Hsieh, T. C., K. H. Ma, y A. Chao. 2016. iNEXT : an R package for rarefaction and extrapolation

- of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* 7:1451–1456.
- Hynson, N. A., V. S. F. T. Merckx, B. A. Perry, y K. K. Treseder. 2013. Identities and distributions of the co-invading ectomycorrhizal fungal symbionts of exotic pines in the Hawaiian Islands. *Biological Invasions* 15:2373–2385.
- Inderjit, y J. F. Cahill. 2015. Linkages of plant-soil feedbacks and underlying invasion mechanisms. *AoB PLANTS* 7:plv022.
- Inderjit, y W. H. van der Putten. 2010. Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 25:512–519.
- Ingold, C. T. 1971. *Fungal Spores: Their Liberation and Dispersal*. Oxford University Press. Londres, Reino Unido.
- Ishida, T. A., K. Nara, M. Tanaka, A. Kinoshita, y T. Hogetsu. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180:491–500.
- Jeschke, J. M., y P. Pysek. 2018. Tens rule. Páginas 124–132 *en* J. M. Jeschke y T. Heger, editores. *Invasion biology: hypotheses and evidence*. CABI, Wallingford.
- Johnson, C. N. 1996. Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 11:503–507.
- Johnson, N. C., J. H. Graham, y F. A. Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575–586.
- Kahiluoto, H., E. Ketoja, y M. Vestberg. 2000. Creation of a non-mycorrhizal control for a bioassay of AM effectiveness. *Mycorrhiza* 9:241–258.
- Kardol, P., N. J. Cornips, M. M. L. Van Kempen, J. M. T. Bakx-Schotman, y W. H. van der Putten. 2007. Microbe-mediated plant-soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecological Monographs* 77:147–162.
- Kardol, P., I. A. Dickie, M. G. St. John, S. W. Husheer, K. I. Bonner, P. J. Bellingham, y D. A. Wardle. 2014. Soil-mediated effects of invasive ungulates on native tree seedlings. *Journal of Ecology* 102:622–631.
- Kardol, P., T. Martijn Bezemer, y W. H. van der Putten. 2006. Temporal variation in plant-soil feedback controls succession. *Ecology Letters* 9:1080–1088.
- Kardol, P., y D. A. Wardle. 2010. How understanding aboveground-belowground linkages can assist restoration ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 25:670–679.
- Kawai, M., M. Yamahara, y A. Ohta. 2008. Bipolar incompatibility system of an ectomycorrhizal basidiomycete, *Rhizopogon rubescens*. *Mycorrhiza* 18:205–210.
- Keane, R. M., M. J. Crawley, R. M. Keane, y M. J. Crawley. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* 17:164–170.
- Kennedy, P. 2010. Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: Species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist* 187:895–910.
- Kennedy, P. G., y T. D. Bruns. 2005. Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytologist* 166:631–638.

- Kennedy, P. G., S. Hortal, S. E. Bergemann, y T. D. Bruns. 2007. Competitive interactions among three ectomycorrhizal fungi and their relation to host plant performance. *Journal of Ecology* 95:1338–1345.
- Kennedy, P. G., K. G. Peay, y T. D. Bruns. 2009. Root tip competition among ectomycorrhizal fungi: Are priority effects a rule or an exception? *Ecology* 90:2098–2107.
- Kim, J.-J., E. A. Allen, L. M. Humble, y C. Breuil. 2005. Ophiostomatoid and basidiomycetous fungi associated with green, red, and grey lodgepole pines after mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) infestation. *Canadian Journal of Forest Research* 35: 274-284.
- Klironomos, J. N. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* 417:67–70.
- Kohout, P., Z. Sýkorová, M. Bahram, V. Hadincová, J. Albrechtová, L. Tedersoo, y M. Vohník. 2011. Ericaceous dwarf shrubs affect ectomycorrhizal fungal community of the invasive *Pinus strobus* and native *Pinus sylvestris* in a pot experiment. *Mycorrhiza* 21:403–412.
- Koide, R. T., y M. Li. 1989. Appropriate controls for vesicular-arbuscular mycorrhiza research. *New Phytologist* 111:35–44.
- Kolar, C. S., y D. M. Lodge. 2001. Progress in invasion biology: Predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution* 16:199–204.
- Kranabetter, J. M., y P. Kroeger. 2011. Ectomycorrhizal mushroom response to partial cutting in a western hemlock - western redcedar forest. *Canadian Journal of Forest Research* 31:978–987.
- Kropp, B. R., y J. A. Fortin. 1988. The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokaryons and reconstituted dikaryons of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 66:289–294.
- Kuebbing, S. E., y M. A. Nuñez. 2016. neighbouring natives than other non-natives. *Nature Plants* 2:1–7.
- Kulmatiski, A., K. H. Beard, J. R. Stevens, y S. M. Cobbold. 2008. Plant-soil feedbacks: A meta-analytical review. *Ecology Letters* 11:980–992.
- Kyaschenko, J., K. E. Clemmensen, A. Hagenbo, E. Karlton, y B. D. Lindahl. 2017. Shift in fungal communities and associated enzyme activities along an age gradient of managed *Pinus sylvestris* stands. *ISME Journal* 11:863–874.
- Langdon, B., A. Pauchard, y M. Aguayo. 2010. *Pinus contorta* invasion in the Chilean Patagonia: Local patterns in a global context. *Biological Invasions* 12:3961–3971.
- Ledgard, N. 2001. The spread of lodgepole pine (*Pinus contorta*, Dougl.) in New Zealand. *Forest Ecology and Management* 141:43-57.
- Liao, H. L., Y. Chen, y R. Vilgalys. 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.
- Lilleskov, E. A., y T. D. Bruns. 2005. Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia* 97:762–769.
- Lilleskov, E. A., T. D. Bruns, T. E. Dawson, y F. J. Camacho. 2009. Water sources and controls on water-loss rates of epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps during summer drought. *New Phytologist* 182:483–494.

- Livne-Luzon, S., Y. Avidan, G. Weber, H. Migael, T. Bruns, O. Ovadia, y H. Shemesh. 2017. Wild boars as spore dispersal agents of ectomycorrhizal fungi: consequences for community composition at different habitat types. *Mycorrhiza* 27:165–174.
- Lockwood, J. J. L., M. F. M. Hoopes, y M. P. M. Marchetti. 2007. *Invasion ecology*. 2da Edición. Wiley-Blackwel. West Sussex, Reino Unido.
- Mack, R. N., D. Simberloff, W. M. Lonsdale, H. Evans, M. Clout, y F. A. Bazzaz. 2000. Biotic Invasions: Causes, Epidemiology, Global Consequences, and Control. *Ecological Applications* 10:689.
- Malloch, D. W., K. A. Pirozynski, y P. H. Raven. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77:2113–2118.
- Malo, J. E., B. Jimenez, y F. Suarez. 2000. Herbivore Dunging and Endozoochorous Seed Deposition in a Mediterranean Dehesa. *Journal of Range Management* 53:322.
- Maltz, M. R., y K. K. Treseder. 2015. Sources of inocula influence mycorrhizal colonization of plants in restoration projects: A meta-analysis. *Restoration Ecology* 23:625–634.
- Marler, M. J., C. A. Zabinski, R. M. Callaway, y N. Jun. 1999. Mycorrhizae Indirectly Enhance Competitive Effects of an Invasive Forb on a Native Bunchgrass. *Ecology* 80:1180–1186.
- Maron, J. L., J. Klironomos, L. Waller, y R. M. Callaway. 2014. Invasive plants escape from suppressive soil biota at regional scales. *Journal of Ecology* 102:19–27.
- Maron, J. L., W. Luo, R. M. Callaway, y R. W. Pal. 2015. Do exotic plants lose resistance to pathogenic soil biota from their native range? A test with *Solidago gigantea*. *Oecologia* 179:447–454.
- Martin, J.-L., S. A. Stockton, S. Allombert, y A. J. Gaston. 2010. Top-down and bottom-up consequences of unchecked ungulate browsing on plant and animal diversity in temperate forests: lessons from a deer introduction. *Biological Invasions* 12:353–371.
- Marx, D. H., y E. W. Ross. 1970. Aseptic synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* by basidiospores of *Thelephora terrestris*. *Canadian Journal of Botany* 48:197–198.
- McGuire, K. L., T. W. Henkel, I. Granzow de la Cerda, G. Villa, F. Edmund, y C. Andrew. 2008. Dual mycorrhizal colonization of forest-dominating tropical trees and the mycorrhizal status of non-dominant tree and liana species. *Mycorrhiza* 18:217–222.
- McGuire, K. L., D. R. Zak, I. P. Edwards, C. B. Blackwood, y R. Upchurch. 2010. Slowed decomposition is biotically mediated in an ectomycorrhizal, tropical rain forest. *Oecologia* 164:785–795.
- McNabb, R. F. R. 1968. The boletaceae of New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 6:137–176.
- Menkis, A., R. Vasiliauskas, A. F. S. Taylor, J. Stenlid, y R. Finlay. 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16:33–41.
- Menzel, A., S. Hempel, S. Klotz, M. Moora, P. Pyšek, M. C. Rillig, M. Zobel, y I. Kühn. 2017. Mycorrhizal status helps explain invasion success of alien plant species. *Ecology* 98:92–102.

- Mercado-Blanco, J., I. Abrantes, A. B. Caracciolo, A. Bevivino, A. Ciancio, P. Grenni, K. Hryniewicz, L. Kredics, y D. N. Proença. 2018. Belowground microbiota and the health of tree crops. *Frontiers in Microbiology* 9:1–27.
- Meserve, P. L., B. K. Lang, y B. D. Patterson. 1988. Trophic Relationships of Small Mammals in a Chilean Temperate Rainforest. *Journal of Mammalogy* 69:721–730.
- Miller, S. L., P. Torres, y T. M. McClean. 1993. Basidiospore viability and germination in ectomycorrhizal and saprotrophic basidiomycetes. *Mycological Research* 97:141–149.
- Mitchell, C. E., A. A. Agrawal, J. D. Bever, G. S. Gilbert, R. A. Hufbauer, J. N. Klironomos, J. L. Maron, W. F. Morris, I. M. Parker, A. G. Power, E. W. Seabloom, M. E. Torchin, y D. P. Vázquez. 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecology letters* 9: 726-740.
- Moeller, H. V., I. A. Dickie, D. A. Peltzer, y T. Fukami. 2015. Mycorrhizal co-invasion and novel interactions depend on neighborhood context. *Ecology* 96:2336–2347.
- Moor, M., S. Berger, J. Davison, M. Öpik, W. E. Kunin, H. Bruehlheide, y I. Ku. 2011. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa : evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing. *Journal of Biogeography* 38:1305–1317.
- Morales, C. L., y M. A. Aizen. 2002. Does invasion of exotic plants promote invasion of exotic flower visitors in the Temperate Forest of southern South America. *Biological Invasions* 4:87–100.
- Mordecái, E. A. 2011. Pathogen impacts on plant communities: unifying theory, concepts, and empirical work. *Ecological Monographs* 81:429–441.
- Morelle, K., y P. Lejeune. 2015. Towards understanding wild boar *Sus scrofa* movement: a synthetic movement ecology approach. *Mammal review* 45:15-29.
- Moyano, J., M. C. Chiuffo, N. Policelli, M. A. Nuñez, y M. A. Rodríguez-Cabal. 2019. The interplay between propagule pressure, seed predation and ectomycorrhizal fungi in plant invasion. *NeoBiota* 42:45–58.
- Mujic, A. B., D. M. Durall, J. W. Spatafora, y P. G. Kennedy. 2016. Competitive avoidance not edaphic specialization drives vertical niche partitioning among sister species of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 209:1174–1183.
- Münzenberger, B., B. Schneider, R. H. Nilsson, B. Bubner, K. H. Larsson, y R. F. Hüttel. 2012. Morphology, anatomy, and molecular studies of the ectomycorrhiza formed axenically by the fungus *Sistotrema* sp. (Basidiomycota). *Mycological Progress* 11:817–826.
- Nara, K. 2006a. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytologist* 169:169–178.
- Nara, K. 2006b. Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert. *New Phytologist* 171:187–198.
- Nara, K. 2009. Spores of ectomycorrhizal fungi: Ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytologist* 181:245-248.
- Nara, K., y T. Hogetsu. 2004. Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology* 85:1700–1707.
- Nguyen, N. H., N. A. Hynson, y T. D. Bruns. 2012. Stayin' alive: Survival of mycorrhizal fungal

- propagules from 6-yr-old forest soil. *Fungal Ecology* 5:741–746.
- Nilsson, R. H., K. H. Larsson, E. Larsson, y U. Kõljalg. 2006. Fruiting body-guided molecular identification of root-tip mantle mycelia provides strong indications of ectomycorrhizal associations in two species of *Sistotrema* (Basidiomycota). *Mycological Research* 110: 1426-1432.
- Nouhra, E., C. Urcelay, S. Longo, y L. Tedersoo. 2013. Ectomycorrhizal fungal communities associated to *Nothofagus* species in Northern Patagonia. *Mycorrhiza* 23:487–496.
- Nuñez, M. A., M. C. Chiuffo, A. Torres, T. Paul, R. D. Dimarco, P. Raal, N. Policelli, J. Moyano, R. A. García, B. W. van Wilgen, A. Pauchard, y D. M. Richardson. 2017. Ecology and management of invasive Pinaceae around the world: progress and challenges. *Biological Invasions* 19:3099–3120.
- Nuñez, M. A., y I. A. Dickie. 2014. Invasive belowground mutualists of woody plants. *Biological Invasions* 16:645–661.
- Nuñez, M. A., J. Hayward, T. R. Horton, G. C. Amico, R. D. Dimarco, M. N. Barrios-García, y D. Simberloff. 2013. Exotic Mammals Disperse Exotic Fungi That Promote Invasion by Exotic Trees. *PLoS ONE* 8:1–6.
- Nuñez, M. A., T. R. Horton, y D. Simberloff. 2009. Lack of belowground mutualisms hinders Pinaceae invasions. *Ecology* 90:2352–2359.
- Nuñez, M. A., N. Policelli, y R. D. Dimarco. 2016. Co-invasion of invasive trees and their associated belowground mutualists *en*: L. Vítková y F. Krumm (eds). *Introduced tree species in European forests: opportunities and challenges*. European Forest Institute. Freiburg, Alemania.
- Nuñez, M. A., M. A. Relva, y D. Simberloff. 2008. Enemy release or invasional meltdown? Deer preference for exotic and native trees on Isla Victoria, Argentina. *Austral Ecology* 33:317–323.
- Oda, T., C. Tanaka, y M. Tsuda. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pantherina*. *Mycological Research* 108:885–896.
- Öpik, M., M. Moora, J. Liira, y M. Zobel. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94:778–790.
- Orellana, I. A., y E. Raffaele. 2012. Effects of *Pseudotsuga menziesii* plantations on vascular plants diversity in northwest Patagonia, Argentina *en*: G. A. Lameed (ed.) *Biodiversity enrichment in a diverse world*. InTech. Rijeka, Croacia.
- Orlovich, D. A., y J. G. Cairney. 2004. Ectomycorrhizal fungi in New Zealand: Current perspectives and future directions. *New Zealand Journal of Botany* 42:721–738.
- Palfner, G., M. I. Canseco, y A. Casanova-Katny. 2008. Post-fire seedlings of *Nothofagus alpina* in Southern Chile show strong dominance of a single ectomycorrhizal fungus and a vertical shift in root architecture. *Plant and Soil* 313:237–250.
- Paliy, O., y V. Shankar. 2016. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology* 25:1032–1057.
- Peay, K. G. 2018. Timing of mutualist arrival has a greater effect on *Pinus muricata* seedling growth than interspecific competition. *Journal of Ecology* 106:514–523.

- Peay, K. G., y T. D. Bruns. 2014. Spore dispersal of basidiomycete fungi at the landscape scale is driven by stochastic and deterministic processes and generates variability in plant-fungal interactions. *New Phytologist* 204:180–191.
- Peay, K. G., T. D. Bruns, P. G. Kennedy, S. E. Bergemann, y M. Garbelotto. 2007. A strong species-area relationship for eukaryotic soil microbes: Island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 10:470–480.
- Peay, K. G., P. G. Kennedy, y T. D. Bruns. 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience* 58:799–810.
- Peay, K. G., P. G. Kennedy, y T. D. Bruns. 2011. Rethinking ectomycorrhizal succession: Are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation? *Fungal Ecology* 4:233–240.
- Peay, K. G., M. G. Schubert, N. H. Nguyen, y T. D. Bruns. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: Macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* 21:4122–4136.
- Pejchar, L., y H. A. Mooney. 2009. Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends in Ecology and Evolution* 24:497–504.
- Peña, E., M. Hidalgo, B. Langdon, y A. Pauchard. 2008. Patterns of spread of *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. invasion in a Natural Reserve in southern South America. *Forest Ecology and Management* 256: 1049-1054
- Perez Calvo, J. G., Z. Maser, y C. Maser. 1989. Note on fungi in small mammals from the *Nothofagus* forest in Argentina. *Monte L. Bean Life Science Museum*, Brigham Young University. *The Great Basin Naturalist* 49:618–620.
- Piattoni, F., F. Ori, M. Morara, M. Iotti, y A. Zambonelli. 2012. The role of wild boars in spore dispersal of hypogeous fungi. *Acta Mycologica* 47:145–153.
- Piazza, M., L. A. Garibaldi, T. Kitzberger, y E. J. Chaneton. 2016. Forest Ecology and Management Impact of introduced herbivores on understory vegetation along a regional moisture gradient in Patagonian beech forests 366:11–22.
- Pickles, B. J., y S. W. Simard. 2017. Mycorrhizal Networks and Forest Resilience to Drought. *En: Johnson N.C, Gehring C., Jansa J. (eds). Mycorrhizal Mediation of Soil. Elsevier Inc. New York, EEUU.*
- Pimentel, D., R. Zuniga, y D. Morrison. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52: 273-288
- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, y D. Sarkar. 2007. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Development Core Team.*
- Pinheiro, J. C., y D. M. Bates. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Springer-Verlag, New York, EEUU.*
- Policelli, N., T. D. Bruns, R. Vilgalys, y M. A. Nuñez. 2019. Suilloid fungi as global drivers of pine invasions. *New Phytologist* 222:714–725.
- Policelli, N., M. C. Chiuffo, J. Moyano, A. Torres, M. A. Rodríguez-Cabal, y M. A. Nuñez. 2018. Pathogen accumulation cannot undo the impact of invasive species. *Biological Invasions* 20:1-4.

- Potvin, L. R., D. L. Richter, M. F. Jurgensen, y R. K. Dumroese. 2012. Association of *Pinus banksiana* Lamb. and *Populus tremuloides* Michx. seedling fine roots with *Sistotrema brinkmannii* (Bres.) J. Erikss. (Basidiomycotina). *Mycorrhiza* 22:631–638.
- Pringle, A., J. D. Bever, M. Gardes, J. L. Parrent, M. C. Rillig, y J. N. Klironomos. 2009. Mycorrhizal Symbioses and Plant Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:699–715.
- Pringle, A., y E. C. Vellinga. 2006. Last chance to know? Using literature to explore the biogeography and invasion biology of the death cap mushroom *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr. :Fr.) link. *Biological Invasions* 8:1131–1144.
- Pyšek, P., V. Jarošík, P. E. Hulme, J. Pergl, M. Hejda, U. Schaffner, y M. Vilà. 2012. A global assessment of invasive plant impacts on resident species, communities and ecosystems: The interaction of impact measures, invading species' traits and environment. *Global Change Biology* 18:1725–1737.
- Pyšek, P., y D. M. Richardson. 2010. Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health. *Annual Review of Environment and Resources* 35(1)
- Pyšek, P., D. M. Richardson, J. Pergl, V. Jarošík, Z. Sixtová, y E. Weber. 2008. Geographical and taxonomic biases in invasion ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 23:237–244.
- R Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org>
- Reinhart, K. O. 2012. The organization of plant communities: Negative plant — soil feedbacks and semiarid grasslands. *Ecology* 93:2377–2385.
- Reinhart, K. O., y R. M. Callaway. 2006. Soil biota and invasive plants. *The New phytologist* 170:445–457.
- Rejmánek, M., y M. J. Pitcairn. 2002. When is eradication of exotic pest plants a realistic goal? *en*: Veitch, C. R., y Clout, M. N. (eds.) *Turning the tide: the eradication of invasive species. Proceedings of the International conference on eradication of island invasives*. Páginas 249–253.
- Rejmanek, M., y D. M. Richardson. 1996. What Attributes Make Some Plant Species More Invasive? *Ecology* 77:1655–1661.
- Relva, M. A., y M. A. Nuñez. 2014. Factores que facilitan y retrasan la invasión de coníferas exóticas en la Isla Victoria. *Ecología Austral* 24:145–153.
- Relva, M. A., M. A. Nuñez, y D. Simberloff. 2010. Introduced deer reduce native plant cover and facilitate invasion of non-native tree species: Evidence for invasional meltdown. *Biological Invasions* 12:303–311.
- Relva, M. A., y T. T. Veblen. 1998. Impacts of introduced large herbivores on *Austrocedrus chilensis* forests in northern Patagonia, Argentina. *Forest Ecology and Management* 108:27–40
- Richardson, D. M. 1998. Forestry Trees as Invasive Aliens. *Conservation Biology* 12:18–26.
- Richardson, D. M., N. Allsopp, C. M. D'Antonio, S. J. Milton, y M. Rejmanek. 2000. Plant invasions - the role of mutualism. *Biological Review* 75:65–93.
- Richardson, D. M., P. Pyšek, M. Rejmánek, M. G. Barbour, F. D. Panetta, y C. J. West 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and*

- distributions 6:93-107.
- Richardson, D. M., C. Hui, M. A. Nuñez, y A. Pauchard. 2014. Tree invasions: Patterns, processes, challenges and opportunities. *Biological Invasions* 16:473–481.
- Richardson, D. M., P. Pysek, M. Rejmanek, M. G. Barbour, F. Dane, y C. J. West. 2008. Naturalization and Invasion of Alien Plants : Concepts and Definitions. *Diversity and Distributions* 6:93–107.
- Richardson, D. M., y M. Rejmánek. 2004. Conifers as invasive aliens: A global survey and predictive framework. *Diversity and Distributions* 10:321–331.
- Richardson, D. M., y M. Rejmánek. 2011. Trees and shrubs as invasive alien species - a global review. *Diversity and Distributions* 17:788–809.
- Richardson, D. M., y P. A. Williamst. 2015. Pine invasions in the Southern Hemisphere : determinants of spread and invadability. *Journal of Biogeography* 21:511–527.
- Rigby, R. A., y D. M. Stasinopoulos. 2005. Generalized additive models for location, scale and shape. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* 54:507–554.
- Rillig, M. C., K. K. Treseder, y M. F. Allen. 2002. Global Change and Mycorrhizal Fungi. *En: M. G. A. van der Heijden, I. R. Sanders (eds.) Mycorrhizal ecology*. Springer, Berlín, Alemania. Páginas 135–160.
- Rincón, A., B. P. Santamaría, L. Ocaña, y M. Verdú. 2014. Structure and phylogenetic diversity of post-fire ectomycorrhizal communities of maritime pine. *Mycorrhiza* 24:131–141.
- Rozzi, R., R. H. May, F. S. Chapin III, F. Massardo, M. C. Gavin, I. J. Klaver, A. Pauchard, M. A. Nuñez, y D. Simberloff. 2018. *From Biocultural Homogenization to Biocultural Conservation*. Springer International Publishing, Cham, Alemania.
- Rundel, P. W., I. A. Dickie, y D. M. Richardson. 2014. Tree invasions into treeless areas: Mechanisms and ecosystem processes. *Biological Invasions* 16:663–675.
- Salgado Salomón, M. E., C. Barroetaveña, y M. Rajchenberg. 2011. Do pine plantations provide mycorrhizal inocula for seedlings establishment in grasslands from Patagonia, Argentina? *New Forests* 41:191–205.
- Sample, M., C. E. Aslan, N. Policelli, R. L. Sanford, E. Nielsen, y M. A. Nuñez. 2019. Increase in nonnative understorey vegetation cover after nonnative conifer removal and passive restoration. *Austral Ecology*:1–14.
- Schüßler, A., D. Schwarzott, y C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413–1421.
- Selosse, M.-A., F. Richard, X. He, y S. W. Simard. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution* 21:621–628.
- Simberloff, D. 2006. Invasional meltdown 6 years later: Important phenomenon, unfortunate metaphor, or both? *Ecology Letters* 9:912–919.
- Simberloff, D. 2009. We can eliminate invasions or live with them - Successful management projects. *Biological Invasions* 11:149–157.
- Simberloff, D. 2011. How common are invasion-induced ecosystem impacts? *Biological Invasions* 13:1255–1268.
- Simberloff, D., y B. Von Holle. 1999. Positive interaction of nonindigenous species: invasional

- meltdown? *Biological Invasions* 1:21–32.
- Simberloff, D., J. L. Martin, P. Genovesi, V. Maris, D. A. Wardle, J. Aronson, F. Courchamp, B. Galil, E. García-Berthou, M. Pascal, P. Pyšek, R. Sousa, E. Tabacchi, y M. Vilà. 2013. Impacts of biological invasions: What's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution* 28:58-66.
- Simberloff, D., M. A. Nuñez, N. J. Ledgard, A. Pauchard, D. M. Richardson, M. Sarasola, B. W. Van Wilgen, S. M. Zalba, R. D. Zenni, R. Bustamante, E. Peña, y S. R. Ziller. 2010. Spread and impact of introduced conifers in South America: Lessons from other southern hemisphere regions. *Austral Ecology* 35:489–504.
- Simberloff, D., M. A. Relva, y M. Nuñez. 2003. Introduced species and management of a *Nothofagus/Austrocedrus* forest. *Environmental Management* 31:263-75.
- Simberloff, D., M. a Relva, y M. a Nuñez. 2002. Gringos en el bosque: Introduced tree invasión in a native *Nothofagus/Austrocedrus* forest. *Biological Invasions* 4:35–53.
- Singh, S. P., Inderjit, J. S. Singh, S. Majumdar, J. Moyano, M. A. Nuñez y D. M. Richardson. 2018. Insights on the persistence of pines (*Pinus* species) in the Late Cretaceous and their increasing dominance in the Anthropocene. *Ecology and Evolution* 8: 10345-10359.
- Smith, S. E., y D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3era edición. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Soteras, F., C. Ibarra, J. Geml, M. N. Barrios-García, L. S. Domínguez, y E. R. Nouhra. 2017. Mycophagy by invasive wild boar (*Sus scrofa*) facilitates dispersal of native and introduced mycorrhizal fungi in Patagonia, Argentina. *Fungal Ecology* 26:51–58.
- Steidinger, B. S., T. W. Crowther, J. Liang, M. E. Van Nuland, G. D. A. Werner, P. B. Reich, G. Nabuurs, S. de-Miguel, M. Zhou, N. Picard, B. Herault, X. Zhao, C. Zhang, D. Routh, K. G. Peay, *et al.* 2019. Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature* 569:404–408.
- Sterkenburg, E., K. E. Clemmensen, B. D. Lindahl, y A. Dahlberg. 2019. The significance of retention trees for survival of ectomycorrhizal fungi in clear-cut Scots pine forests. *Journal of Applied Ecology* 56:1367–1378.
- Stricker, K. B., P. F. Harmon, E. M. Goss, K. Clay, y S. Luke Flory. 2016. Emergence and accumulation of novel pathogens suppress an invasive species. *Ecology Letters* 19:469–477.
- Strullu-Derrien, C., M.-A. Selosse, P. Kenrick, y F. M. Martin. 2018. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist* 220:1012–1030.
- Sudhakara Reddy, M., y K. Natarajan. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7:133–138.
- Suding, K. N., W. Stanley Harpole, T. Fukami, A. Kulmatiski, A. S. Macdougall, C. Stein, y W. H. van der Putten. 2013. Consequences of plant-soil feedbacks in invasion. *Journal of Ecology* 101:298–308.
- Sulzbacher, M. A., T. Grebenc, C. B. Bevilacqua, R. B. Steffen, G. Coelho, A. O. Silveira, R. J. S. Jacques, y Z. I. Antoniolli. 2018. Co-invasion of ectomycorrhizal fungi in the Brazilian Pampa biome. *Applied Soil Ecology* 130:194–201.
- Talbot, J. M., T. D. Bruns, J. W. Taylor, D. P. Smith, S. Branco, S. I. Glassman, S. Erlandson, R.

- Vilgalys, H.-L. Liao, M. E. Smith, y K. G. Peay. 2014. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:6341–6346.
- Taylor, D. L., y T. D. Bruns. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* 8:1837–1850.
- Tedersoo, L. 2017. Global Biogeography and Invasions of Ectomycorrhizal Plants: Past, Present and Future. *En: Tedersoo L. (ed.) Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 230. Springer, Cham, Alemania.*
- Tedersoo, L., M. Bahram, S. Polme, U. Koljalg, N. S. Yorou, R. Wijesundera, L. V. Ruiz, A. M. Vasco-Palacios, P. Q. Thu, A. Suija, M. E. Smith, C. Sharp, E. Saluveer, A. Saitta, M. Rosas, *et al.* 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:1256688–1256688.
- Tedersoo, L., T. W. May, y M. E. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217–263.
- Tedersoo, L., T. Suvi, K. Beaver, y U. Kõljalg. 2007. Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: Diversity patterns and host shifts from the native *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist* 175:321–333.
- Teste, F. P., y S. W. Simard. 2008. Mycorrhizal networks and distance from mature trees alter patterns of competition and facilitation in dry Douglas-fir forests. *Oecologia* 158:193–203.
- Thiele-Bruhn, S., J. Bloem, F. T. de Vries, K. Kalbitz, y C. Wagg. 2012. Linking soil biodiversity and agricultural soil management. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 4:523–528.
- Thiet, R. K., y R. E. J. Boerner. 2007. Spatial patterns of ectomycorrhizal fungal inoculum in arbuscular mycorrhizal barrens communities: Implications for controlling invasion by *Pinus virginiana*. *Mycorrhiza* 17:507–517.
- Traveset, A., y D. Richardson. 2006. Biological invasions as disruptors of plant reproductive mutualisms. *Trends in Ecology & Evolution* 21:208–216.
- Traveset, A., y D. M. Richardson. 2014. Mutualistic Interactions and Biological Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45:89–113.
- Treu, R., J. Karst, M. Randall, G. J. Pec, P. W. Cigan, S. W. Simard, J. E. K. Cooke, N. Erbilgin, y J. F. Cahill. 2014. Decline of ectomycorrhizal fungi following a mountain pine beetle epidemic. *Ecology* 95:1096–1103.
- Truong, C., A. B. Mujic, R. Healy, F. Kuhar, G. Furci, D. Torres, T. Niskanen, P. A. Sandoval-Leiva, N. Fernández, J. M. Escobar, A. Moretto, G. Palfner, D. Pfister, E. Nouhra, R. Swenie, M. Sánchez-García, P. B. Matheny, y M. E. Smith. 2017. How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytologist* 214:913–919.
- Urcelay, C., S. Longo, J. Geml, P. A. Tecco, y E. Nouhra. 2017. Co-invasive exotic pines and their ectomycorrhizal symbionts show capabilities for wide distance and altitudinal range expansion. *Fungal Ecology* 25:50–58.
- van der Linde, S., L. M. Suz, C. D. L. Orme, F. Cox, H. Andreae, E. Asi, B. Atkinson, S. Benham, C.

- Carroll, N. Cools, B. De Vos, H. P. Dietrich, J. Eichhorn, J. Gehrman, T. Grebenc, H. S. *et al.* 2018. Environment and host as large-scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature* 558:243–248.
- van der Putten, W. H., R. D. Bardgett, J. D. Bever, T. M. Bezemer, B. B. Casper, T. Fukami, P. Kardol, J. N. Klironomos, A. Kulmatiski, J. A. Schweitzer, K. N. Suding, T. F. J. Van de Voorde, y D. A. Wardle. 2013. Plant-soil feedbacks: The past, the present and future challenges. *Journal of Ecology* 101:265–276.
- van der Putten, W. H., J. N. Klironomos, y D. A. Wardle. 2007. Microbial ecology of biological invasions. *ISME Journal* 1:28-37.
- Vargas, N., S. C. Gonçalves, A. E. Franco-Molano, S. Restrepo, y A. Pringle. 2019. In Colombia the Eurasian fungus *Amanita muscaria* is expanding its range into native, tropical *Quercus humboldtii* forests. *Mycologia*:1-14.
- Vašutová, M., P. Mleczko, A. López-García, I. Maček, G. Boros, J. Ševčík, S. Fujii, D. Hackenberger, I. H. Tuf, E. Hornung, B. Páll-Gergely, y R. Kjølner. 2019. Taxi drivers: the role of animals in transporting mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*: 10.1007/s00572-019-00906-1.
- Vavra, M., C. G. Parks, y M. J. Wisdom. 2007. Biodiversity, exotic plant species, and herbivory: The good, the bad, and the ungulate. *Forest Ecology and Management* 246:66–72.
- Veblen, T. T., C. Donoso, T. Kitzberger, y A. J. Rebertus. 1996. Ecology of Southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* Forests. *En*: T. T. Veblen, R. S. Hill, y J. Read, (eds.) *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*. Yale University Press, New Haven, Reino Unido. Páginas 293–353
- Veblen, T. T., M. Mermoz, C. Martin, y T. Kitzberger. 1992. Ecological Impacts of Introduced Animals in Nahuel Huapi National Park, Argentina. *Conservation Biology* 6:71–83.
- Vellinga, E. C., B. E. Wolfe, y A. Pringle. 2009. Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181:960–973.
- Vilà, M., J. L. Espinar, M. Hejda, P. E. Hulme, V. Jarošík, J. L. Maron, J. Pergl, U. Schaffner, Y. Sun, y P. Pyšek. 2011. Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology Letters* 14:702–708.
- Vilà, M., E. Weber, y C. M. Antonio. 2000. Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biological Invasions* 2: 207–217.
- Vitousek, P. M., L. R. Walker, L. D. Whiteaker, D. Mueller-Dombois, y P. A. Matson. 1987. Biological Invasion by *Myrica faya* Alters Ecosystem Development in Hawaii. *Science* 238:802–804.
- Walbert, K., T. D. Ramsfield, H. J. Ridgway, y E. E. Jones. 2010. Ectomycorrhizal species associated with *Pinus radiata* in New Zealand including novel associations determined by molecular analysis. *Mycorrhiza* 20:209–215.
- Wall D.H., R.D. Bardgett, V. Behan-Pelletier, J.E. Herrick, T.H. Jones, K. Ritz, J. Six, D.R. Strong, W.H. van der Putten 2012. *Soil ecology and ecosystem services*. Oxford University Press. Oxford, Reino Unido.
- Wall, D. H., U. N. Nielsen, y J. Six. 2015. Soil biodiversity and human health. *Nature* 528:69–76.
- Wallander, H., U. Johansson, E. Sterkenburg, M. Brandström Durling, y B. D. Lindahl. 2010. Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce

- forests. *New Phytologist* 187:1124–1134.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. van der Putten, y D. H. Wall. 2004. Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science* 304:1629–1633.
- Wardle, D. A., G. M. Barker, G. W. Yeates, K. I. Bonner, y A. Ghani. 2001. Introduced Browsing Mammals in New Zealand Natural Forests : Aboveground and Belowground Consequences. *Ecological Monographs* 71:587–614.
- Wardle, D. A., y D. A. Peltzer. 2017. Impacts of invasive biota in forest ecosystems in an aboveground – belowground context. *Biological Invasions* 19:3301–3316.
- Watt, M., y J. R. Evans. 1999. Update on Root Biology Proteoid Roots . *Physiology and Development* 121:317–323.
- Weidenhamer, J. D., y R. M. Callaway. 2010. Direct and Indirect Effects of Invasive Plants on Soil Chemistry and Ecosystem Function:59–69.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics *en*: PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual. Academic Press, Cambridge, EEUU.
- Williams, F., R. Eschen, A. Harris, D. Djeddour, C. Pratt, R. H. Shaw, S. Varia, J. Lamontagne-Godwin, S. E. Thomas, y S. T. Murphy. 2010. The economic cost of invasive non-native species on Great Britain. CABI Project No. VM10066, páginas 1– 199.
- Wolf, D. C., y H. D. Skipper. 1994. Soil Sterilization. *En* R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, S. Smith, A. Tabatabai, A. Wollum, y S. Hart (eds.). *Methods of soil analysis Part 2 - Microbiological and biochemical properties*. Soil Science Society of America. Madison, EEUU. Páginas 60–78.
- Wolfe, B. E., y J. N. Klironomos. 2005. Breaking new ground: Soil communities and exotic plant invasion. *Bioscience* 55:477–487.
- Wolfe, B. E., y A. Pringle. 2012. Geographically structured host specificity is caused by the range expansions and host shifts of a symbiotic fungus. *ISME Journal* 6:745–755.
- Wolfe, B. E., F. Richard, H. B. Cross, y A. Pringle. 2010. Distribution and abundance of the introduced ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* in North America. *New Phytologist* 185:803–816.
- Wood, J. R., I. A. Dickie, H. V Moeller, D. A. Peltzer, K. I. Bonner, G. Rattray, y J. M. Wilmshurst. 2015. Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. *Journal of Ecology* 103:121–129.
- Wu, T., E. Ayres, R. D. Bardgett, D. H. Wall, y J. R. Garey. 2011. Molecular study of worldwide distribution and diversity of soil animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:17720–17725.
- Young, I. M., y J. W. Crawford. 2004. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* 304:1634–1637.
- Zermatten, N. 2015. Informe Control *Amanita muscaria*. Informe técnico de la Administración de Parques Nacionales. Lago Puelo, Argentina.
- Zermatten, N. 2016. Segundo informe *Amanita muscaria* en Los Hitos, Reserva Nacional Lago Puelo Zona Norte. Informe técnico de la Administración de Parques Nacionales. Lago

Puelo, Argentina.

Zhu, W., y J. G. Ehrenfeld. 1996. The effects of mycorrhizal roots on litter decomposition, soil biota, and nutrients in a spodosolic soil. *Plant and Soil* 179:109–118.

Zuloaga, F. O., y M. J. Belgrano. 2015. The Catalogue of Vascular Plants of the Southern Cone and the Flora of Argentina: their contribution to the World Flora. *Rodriguésia* 66:989–1024.

Material suplementario

Material suplementario del Capítulo 3

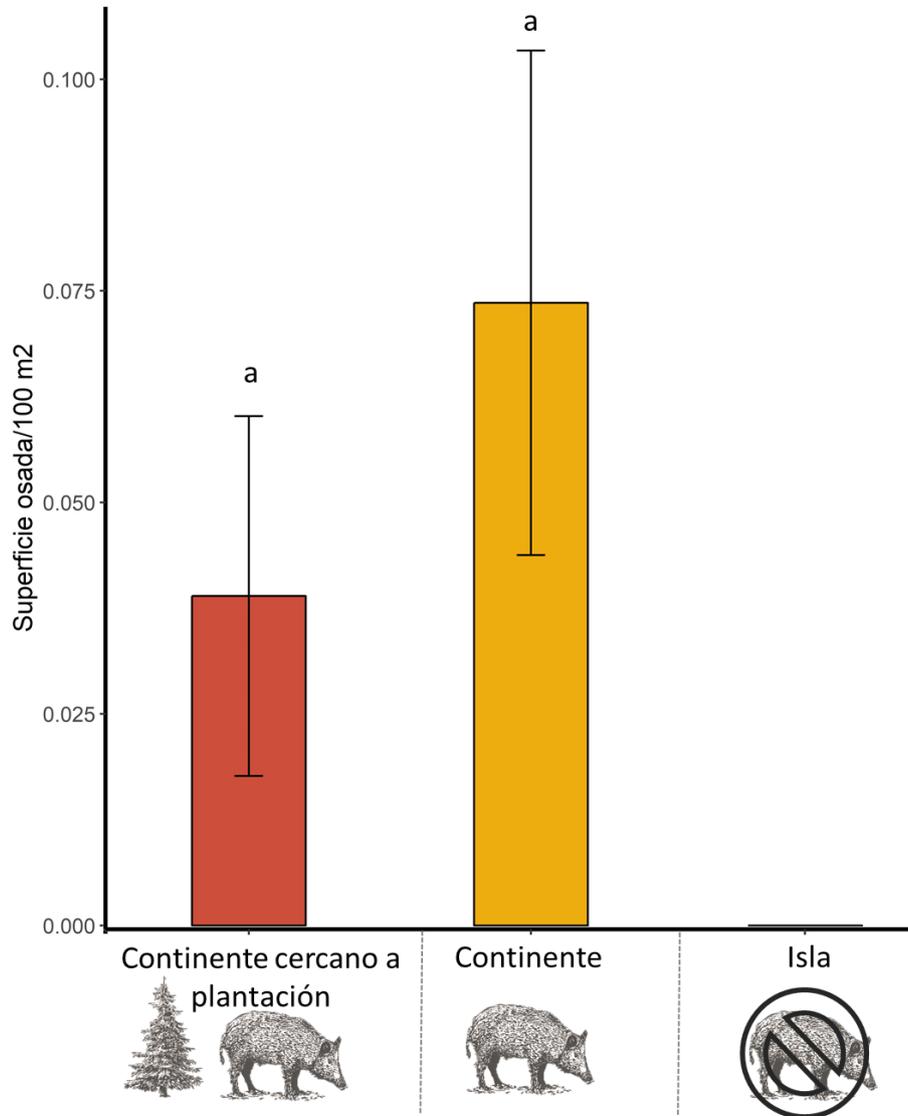


Figura S3.1. Superficie osada por jabalí en cada uno de los tres tipos de sitios evaluados. No hubo diferencias en la superficie osada entre ambos tipos de sitios continentales (continente cercano a plantación –barras rojas- y continente -- barras amarillas–). No se registró superficie osada en ninguna de las islas evaluadas. Los datos fueron convertidos a proporción (metros cuadrados osados / 100 metros cuadrados) y analizados utilizando una distribución Beta para datos inflados en cero, se utilizó la variable explicatoria “tipo de sitio” con tres niveles (continente, isla, continente cercano a plantación) y se incorporó al modelo el efecto aleatorio del bloque. El análisis se realizó utilizando el paquete “gamIss” (función gamIss, Rigby y Stasinopoulos 2005) usando el software estadístico R versión 3.4.0 (R Core Team, 2018). Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla S3.1. Detalle de los bloques utilizados, considerando las coordenadas geográficas y las distancias entre los tres tipos de sitio (isla, continente cercano a plantación, continente alejado de plantación).

Nombre del bloque	Distancias (km)	Coordenadas Isla	Coordenadas continente cercano a plantación	Coordenadas continente
Angostura	Isla – Continente cerca de plantación	3.7		
	Isla – Sitio continental	3.5	40°46'10.62"S 71°40'39.23"O	40°45'13.56"S 71°38'31.12"O
	Continente cerca de plantación – Sitio continental	3.9		40°47'26.21"S 71°39'23.67"O
Fósiles	Isla – Continente cerca de plantación	1.7		
	Isla – Sitio continental	1.6	40°59'10.43"S 71°33'30.11"O	40°58'59.04"S 71°34'32.58"O
	Continente cerca de plantación - Sitio continental	1.5		40°59'34.35"S 71°34'19.11"O
Lácar	Isla – Continente cerca de plantación	2.7	40°10'4.60"S 71°34'25.18"O	
	Isla – Sitio continental	2.8	(Con presencia de individuos aislados de <i>Pseudotsuga menziesii</i> en la costa)	40° 9'7.36"S 71°35'37.00"O
	Continente cerca de plantación – Sitio continental	3.3		40° 9'1.51"S 71°33'9.16"O
Pájaros	Isla – Continente cerca de plantación	3.9		
	Isla – Sitio continental	3.4	41° 0'50.02"S 71°32'38.33"O	40°58'57.02"S 71°31'21.67"O
	Continente cerca de plantación - Sitio	3.6		41° 0'41.73"S 71°30'14.03"O

	continental				
Robles	Isla – Continente cerca de plantación	6.5			
	Isla – Sitio continental	5.2	41° 0'51.10"S 71°27'29.22"O	41° 0'57.67"S 71°22'13.85"O	40°58'44.30"S 71°24'56.53"O
	Continente cerca de plantación - Sitio continental	5.7			
Tigre	Isla – Continente cerca de plantación	1.5			
	Isla – Sitio continental	1.6	40°58'36.15"S 71°33'51.56"O	40°58'56.13"S 71°34'41.83"O	40°59'17.58"S 71°34'23.12"O
	Continente cerca de plantación - Sitio continental	1.5			
Victoria	Isla – Continente cerca de plantación	3.1	40°59'36.38"S 71°33'7.71"O		
	Isla – Sitio continental	3.6	(Con presencia de individuos aislados de <i>Pseudotsuga menziesii</i> en la costa)	40°58'54.21"S 71°31'1.55"O	41° 0'5.49"S 71°30'22.85"O
	Continente cerca de plantación - Sitio continental	2.7			

Tabla S3.2. Muestras secuenciadas y sus parámetros de consenso de acuerdo a la herramienta de búsqueda por alineamiento básico BLAST en GenBank.

Muestra	Longitud de la muestra (pb)	Max Score	E _{value}	Ident	Número de acceso en Genbank	Consenso	Referencia
2_ITS1F_Plate_AJNS45_A01	762	1061	0.0	99%	AF071437.1	<i>Rhizopogon rogersii</i>	Grubisha, L. C., et al. (2002). Biology of the ectomycorrhizal genus <i>Rhizopogon</i> . <i>Mycologia</i> , 94(4), 607-619.
9_ITS1F_Plate_AJNS45_A02	200	143	2E-30	99%	KT964688.1	<i>Suillus lakei</i>	Zhao, W.Q. et al. Genetic diversity and geographic distribution of <i>Suillus cavipes</i> complex (Suillaceae, Boletales). <i>No publicado</i>
16_ITS1F_Plate_AJNS45_A03	104	156	1E-33	100%	KT964688.1	<i>Suillus lakei</i>	Zhao, W.Q. et al. Genetic diversity and geographic distribution of <i>Suillus cavipes</i> complex (Suillaceae, Boletales). <i>No publicado</i>
39_ITS1F_Plate_AJNS45_A04	150	267	9E-68	99%	KC306769.1	<i>Rhizopogon villosulus</i>	Bubriski, R., & Kennedy, P. (2014). A molecular and morphological analysis of the genus <i>Rhizopogon</i> subgenus <i>Villosuli</i> section <i>Villosuli</i> as a preface to ecological monitoring. <i>Mycologia</i> , 106(2), 353-361.

44_ITS1F_Plate_AJNS45_A05	718	1303	0.0	99%	KC306769.1	<i>Rhizopogon villosulus</i>	Bubriski, R., & Kennedy, P. (2014). A molecular and morphological analysis of the genus <i>Rhizopogon</i> subgenus <i>Villosuli</i> section <i>Villosuli</i> as a preface to ecological monitoring. <i>Mycologia</i> , 106(2), 353-361.
53_ITS1F_Plate_AJNS45_A06	765	1055	0.0	99%	EU837234.1	<i>Rhizopogon rogersii</i>	Gordon, M. Preservation of genetic information from rare macrofungi of the U.S. Pacific Northwest. <i>No publicado</i>
99_ITS1F_Plate_AJNS45_A10	714	1303	0.0	99%	KJ146731.1	<i>Suillus lakei</i>	Berbee, M.L., Bazzicalupo, A. et al. Fungi of Capilano River Regional Park, North Vancouver BC Canada. <i>No publicado</i>

Tabla S3.3. Análisis de variables fisicoquímicas de los suelos provenientes de sitios continentales lejanos a plantación, sitios de islas, y sitios continentales cercanos a plantación. Se informa el valor medio y el desvío estándar. No hubo diferencias en ninguna de las variables medidas.

Variable del suelo (mean ± SE)	Carbono total (%)	Nitrógeno total (%)	Materia Orgánica (%)	pH	Fósforo extractable (ppm)	Nitrógeno de amonio (ppm)
Continente	7.09 ± 2.04	0.44 ± 0.15	13.6 ± 3.8	5.9 ± 0.5	21.6 ± 8.3	22.8 ± 13.4
Isla	6.80 ± 1.39	0.36 ± 0.10	13.0 ± 2.7	6.4 ± 0.3	19.6 ± 7.7	14.6 ± 6.9
Continente cercano a plantación	6.48 ± 2.60	0.55 ± 0.29	12.6 ± 3.8	6.2 ± 0.5	28.4 ± 9.8	22.02 ± 10.3
	<i>p = 0.84</i>	<i>p = 0.21</i>	<i>p = 0.83</i>	<i>p = 0.30</i>	<i>p = 0.16</i>	<i>p = 0.31</i>

Tabla S3.4 Parámetros de los modelos utilizados en el análisis de datos. A – modelo Hurdle Poisson para la variable respuesta “número de fecas/100 m²”. B - modelo lineal de efectos mixtos ajustado por residuos de máxima probabilidad para la variable respuesta “biomasa de *Pseudotsuga menziesii*”. C - modelo lineal de efectos mixtos ajustado por residuos de máxima probabilidad para la variable respuesta “biomasa de *Embothrium coccineum*”. D - modelo lineal generalizado mixto basado en la aproximación de Laplace y la función de enlace logit para la variable respuesta “colonización de raíz de *Pseudotsuga menziesii*”. En todos los casos se muestran los factores fijos y aleatorios por separado

A

<i>MODELO FECAS (Factor fijo)</i>	<i>Estimador</i>	<i>Error Std.</i>	<i>Pr(> z)</i>
<i>Intercepto</i>	-0.4353	0.3870	0.261
<i>Tipo de Suelo</i>	0.2922	0.5416	0.590

<i>MODELO FECAS (Factor aleatorio)</i>	<i>Varianza</i>	<i>Desvío Std.</i>
<i>Bloque</i>	0.14	0.3835

B

<i>MODELO BIOMASA P. menziesii</i>	<i>Estimador</i>	<i>Error Std.</i>	<i>Pvalor</i>
<i>Intercepto</i>	0.0799	0.0133	0.000
<i>Tratamiento Isla</i>	-0.0163	0.0095	0.094
<i>Tratamiento Plantación</i>	-0.0131	0.0120	0.283
<i>Tratamiento Continente</i>	-0.0176	0.0102	0.082

<i>MODELO BIOMASA P. menziesii (Factor aleatorio)</i>	<i>Intercepto</i>	<i>Residuo</i>
<i>Desvío estándar</i>	0.0265	0.0185

C

<i>MODELO BIOMASA E. coccineum (Factor fijo)</i>	<i>Estimador</i>	<i>Error Std.</i>	<i>Pvalor</i>
--	------------------	-------------------	---------------

<i>Intercepto</i>	0.4168	0.0923	0.000
<i>Tratamiento Isla</i>	-0.0311	0.0915	0.735
<i>Tratamiento Plantación</i>	0.0051	0.0891	0.954

MODELO BIOMASA E.
coccineum (Factor
aleatorio) *Intercepto* *Residuo*

<i>Desvío estándar</i>	0.1753	0.3257
------------------------	--------	--------

D

MODELO COLONIZACIÓN
(Factor fijo) *Estimador* *Error Std.* *Pr(>|z|)*

<i>Intercepto</i>	-2.1401	-2.863	0.0042
<i>Tratamiento Isla</i>	-0.8557	-0.675	0.4999
<i>Tratamiento Plantación</i>	2.1401	2.457	0.0140

MODELO COLONIZACIÓN (Factor
aleatorio) *Varianza* *Desvío Std.*

<i>Bloque</i>	7.3E-9	8.5E-5
---------------	--------	--------

Material suplementario del Capítulo 4

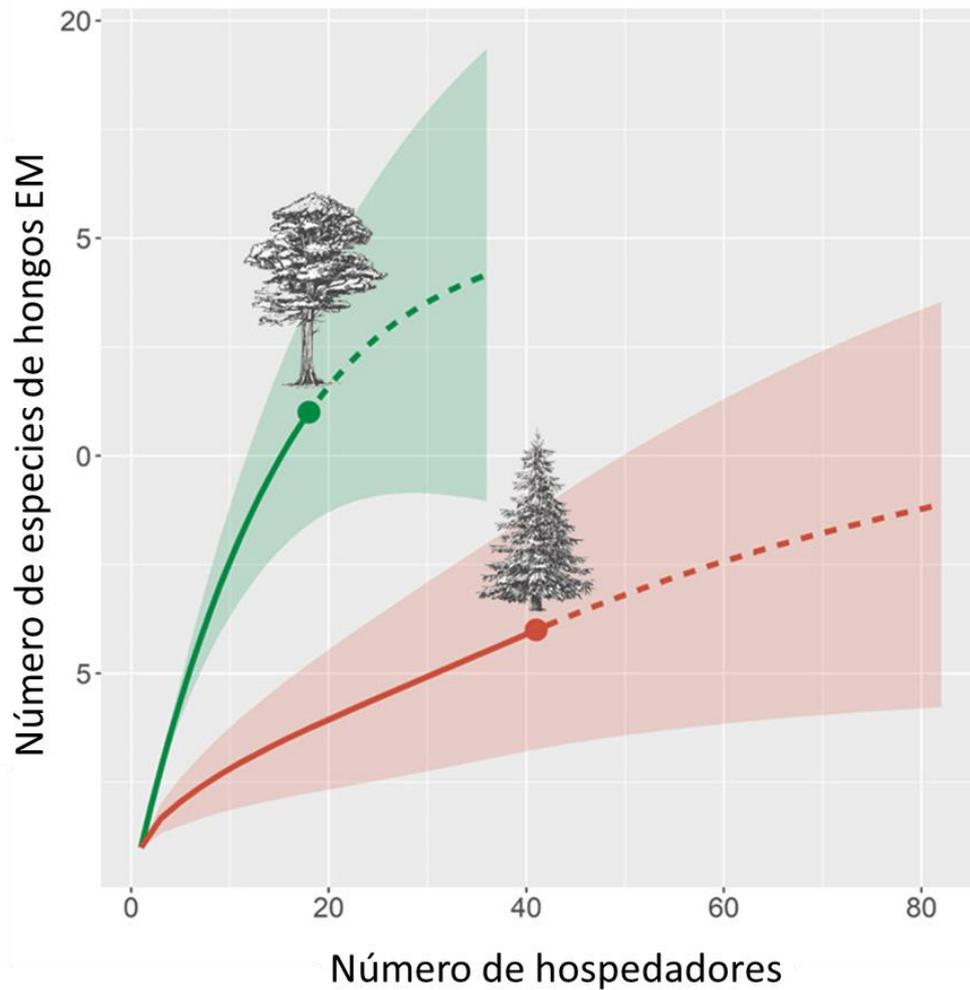


Figura S4.1 Curvas de rarefacción para el número de especies de hongos EM asociadas a individuos de la especie nativa *Nothofagus antarctica* (en color verde) y de la especie no nativa *Pinus contorta* (en color rojo) en función del número de hospedadores muestreados. La línea continua muestra datos interpolados, mientras que la línea punteada representa datos extrapolados. El área sombreada muestra los intervalos de confianza al 95 %. Los datos fueron analizados utilizando interpolación y extrapolación de números de Hill basadas en el tamaño muestral con el paquete de R iNEXT (Chao et al. 2016, Hsieh et al. 2016).

Tabla S4.1 Parámetros del modelo lineal de efectos mixtos ajustado por residuos de máxima probabilidad para la variable respuesta “biomasa aérea” de las tres especies utilizadas en el ensayo en cámara de cultivo (*Pinus contorta*, *Nothofagus antarctica*, y *Embothrium coccineum*) en los diferentes “tipos de suelo”, efecto fijo con tres niveles: suelo de pino, suelo de *Nothofagus*, y suelo control estéril. La variable explicativa “parcela” fue incorporada al modelo como efecto aleatorio. Los parámetros para los efectos fijos y aleatorios son presentados por separado. En la columna “grupo” se muestran los resultados de las múltiples comparaciones de Tukey para cada una de las especies por separado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$).

	Estimador \pm Error std.	Pvalor	Grupo
<i>Pinus</i> en suelo estéril	0.07 \pm 0.02	0.0091	A
<i>Pinus</i> en suelo de <i>Nothofagus</i>	0.19 \pm 0.04	0.0000	B
<i>Pinus</i> en suelo de pino	0.15 \pm 0.04	0.0005	B
<i>Nothofagus</i> en suelo estéril	0.01 \pm 0.04	0.6759	a
<i>Nothofagus</i> en suelo de <i>Nothofagus</i>	0.14 \pm 0.05	0.0098	b
<i>Nothofagus</i> en suelo de pino	0.10 \pm 0.05	0.0840	b
<i>Embothrium</i> en suelo estéril	0.39 \pm 0.07	0.0000	A
<i>Embothrium</i> en suelo de <i>Nothofagus</i>	0.02 \pm 0.09	0.8637	A
<i>Embothrium</i> en suelo de pino	0.03 \pm 0.09	0.7610	A

	PARCELA (ALEATORIO)	RESIDUO
STDDEV (MODELO PINUS)	1.48E-06	0.092
STDDEV (MODELO NOTHOFAGUS)	6.46E-06	0.101
STDDEV (MODELO EMBOTHRIUM)	2.37E-06	0.232

Tabla S4.2. Parámetros del modelo lineal generalizado mixto basado en la aproximación de Laplace y la función de enlace logit, utilizado para analizar la colonización de raíz por hongos EM para *Pinus contorta* y *Nothofagus antarctica* en los diferentes tipos de suelo. Los parámetros para los efectos fijos y aleatorios son presentados por separado. En la columna “grupo” se muestran los resultados de las múltiples comparaciones de Tukey dentro de cada especie (letras mayúsculas para *P. contorta* y minúsculas para *Nothofagus antarctica*). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$).

	Estimador \pm Error std.	Pvalor	Grupo
<i>Pinus</i> en suelo estéril	-5.917 \pm 1.023	7.32E-9	A
<i>Pinus</i> en suelo de <i>Nothofagus</i>	8.151 \pm 1.038	4.10E-15	B
<i>Pinus</i> en suelo de pino	8.559 \pm 1.040	2E-16	B
<i>Nothofagus</i> en suelo estéril	-5.255 \pm 0.909	7.46E-9	a
<i>Nothofagus</i> en suelo de <i>Nothofagus</i>	6.815 \pm 1.052	9.37E-11	b
<i>Nothofagus</i> en suelo de pino	5.778 \pm 1.076	7.80E-8	b

	VARIANZA	SD
PARCELA (ALEATORIO – MODELO PINUS)	0.11	0.33
PARCELA (ALEATORIO - MODELO NOTHOFAGUS)	3.82E-10	1.95E-5
OBSERVACIÓN (ALEATORIO - MODELO NOTHOFAGUS)	2.18	1.47

Tabla S4.3 Muestras secuenciadas y sus parámetros de consenso de acuerdo a la herramienta de búsqueda por alineamiento básico BLAST en GenBank.

Muestra	Longitud de la muestra (pb)	Max Score	E _{value}	Ident	Número de acceso en Genbank	Consenso	Referencia
127_ITS1F_Plate_AJNS45_B04	455	832	0.0	99%	MK028943.1	<i>Suillus luteus</i>	Kotowski,M., Pietras,M. and Luczaj,L. 2019. Extreme levels of mycophilia documented in Mazovia, a region of Poland. <i>J Ethnobiol Ethnomed</i> .15: 12
130_ITS1F_Plate_AJNS45_B05	200	147	2.00E-31	99%	MK028943.1	<i>Suillus luteus</i>	Kotowski,M., Pietras,M. and Luczaj,L. 2019. Extreme levels of mycophilia documented in Mazovia, a region of Poland. <i>J Ethnobiol Ethnomed</i> .15: 12
140_ITS1F_Plate_AJNS45_B06	268	160	2.00E-17	98%	MG383665.1	<i>Suillus luteus</i>	Borthakur,M. and Joshi,S.R. Wild mushrooms of Meghalaya. <i>No publicado</i>
148_ITS1F_Plate_AJNS45_B07	165	302	3.00E-78	99%	MK028943.1	<i>Suillus luteus</i>	Kotowski,M., Pietras,M. and Luczaj,L. 2019. Extreme levels of mycophilia documented in Mazovia, a region of Poland. <i>J Ethnobiol Ethnomed</i> .15: 12
159_ITS1F_Plate_AJNS45_B08	441	798	0.0	99%	KP814242.1	<i>Sistotrema</i> sp.	Rosenthal,L.M., Larsson, K.H., Branco, S., et al. Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal. <i>Mycologia</i> 109(1):115-127

181_ITS1F_Plate_AJNS45_B09	578	1061	0.0	99%	MH878756.1	<i>Suillus luteus</i>	Mujic, A.B., Zheng, N., Kim, K., Spatafora, et al. 2019. The <i>Cedrus</i> -associated truffle <i>Trappeindia himalayensis</i> is a morphologically unique and phylogenetically divergent species of <i>Rhizopogon</i> . <i>Mycologia</i> 12:1-10
239_ITS1F_Plate_AJNS45_B10	717	1310	0.0	99%	AY898620.1	<i>Suillus luteus</i>	Ruiz-Diez,B., Rincon,A.M., de Felipe,M.R. and Fernandez-Pascual,M. Facts of biodiversity of <i>Suillus</i> spp. from succeeds of Comunidad de Madrid (Spain). <i>No publicado</i>
240_ITS1F_Plate_AJNS45_B11	463	856	0.0	100%	DQ440568.1	<i>Suillus luteus</i>	Ruiz-Diez,B., Rincon,A.M., de Felipe,M.R. and Fernandez-Pascual,M. 2006. Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of <i>Suillus</i> isolates from central Spain for the selection of fungal inoculants. <i>Mycorrhiza</i> 16 (7), 465-474
241_ITS1F_Plate_AJNS45_B12	331	399	2.00E-107	93%	AB848421.1	<i>Clavulina</i> sp.	Miyamoto,Y., Nakano,T., Hattori,M. and Nara,K. 2014. The mid-domain effect in ectomycorrhizal fungi: range overlap along an elevation gradient on Mount Fuji, Japan. <i>ISME J</i> 8 (8), 1739-1746

250_ITS1F_Plate_AJNS45_C02	356	651	0.0	99%	KY559323.1	<i>Rickenella minuta</i>	Matheny,P.B., Korotkin,H.B. and Smith,M.E. Fungi from southern South America. <i>No publicado</i>
253_ITS1F_Plate_AJNS45_C03	221	270	1.00E-68	96%	MH930362.1	<i>Tomentella</i> sp.	Mujic,A.B. and Smith,M.E. Chilean and Argentinian Fungal OTUs. <i>No publicado</i>
258_ITS1F_Plate_AJNS45_C04	590	1053	0.0	99%	MF568553.1	<i>Cortinarius</i> sp.	San-Fabian, B., Niskanen, T., Liimatainen, K. et al. (2018) New species of <i>Cortinarius</i> sect. Austroamericani, sect. nov., from South American Nothofagaceae forests. <i>Mycologia</i> 110:6, 1127-1144
260_ITS1F_Plate_AJNS45_C05	401	741	0.0	100%	NR_154303.1	<i>Porpoloma terreum</i>	Sanchez-Garcia,M., Matheny,P.B., Palfner,G. and Lodge,J.D. 2014. Deconstructing the Tricholomataceae (Agaricales) and introduction of the new genera <i>Albomagister</i> , <i>Corneriella</i> , <i>Pogonoloma</i> and <i>Pseudotracheloma</i> <i>Taxon</i> 63 (5), 993-1007.
270_ITS1F_Plate_AJNS45_C06	404	747	0.0	100%	NR_154303.1	<i>Porpoloma terreum</i>	Sanchez-Garcia,M., Matheny,P.B., Palfner,G. and Lodge,J.D. 2014. Deconstructing the Tricholomataceae (Agaricales) and introduction of the new genera <i>Albomagister</i> , <i>Corneriella</i> , <i>Pogonoloma</i> and

							<i>Pseudotricholoma</i> Taxon 63 (5), 993-1007.
276 ITS1F_Plate_AJNS45_C09	312	571	4.00E-159	99%	KP814242.1	<i>Sistotrema</i> sp.	Rosenthal,L.M., Larsson, K.H., Branco, S., et al. Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal. <i>Mycologia</i> 109(1):115-127
279 ITS1F_Plate_AJNS45_C10	525	525	9.00E-178	93%	KY462436.1	<i>Inocybe</i> sp.	Truong,C., Mujic,A.B., Healy,R et al. 2017 How to know the fungi: combining Campo inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. <i>New Phytologist</i> 214 (3), 913-919
282 ITS1F_Plate_AJNS45_C11	253	302	4.00E-78	100%	MH508442	<i>Amanita muscaria</i>	Cui, Y. Y., Cai, Q., Tang, L. P. et al. 2018. The family Amanitaceae: molecular phylogeny, higher-rank taxonomy and the species in China. <i>Fungal Diversity</i> 91(1): 5-230
284 ITS1F_Plate_AJNS45_D02	146	191	5.00E-45	93%	EU071932.1	<i>Amanita muscaria</i>	Geml,J., Tulloss,R.E., Laursen,G.A., et al. 2008. Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in <i>Amanita muscaria</i> , a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. <i>Mol. Phylogenet.</i>

							<i>Evol.</i> 48 (2), 694-701
286_ITS1F_Plate_AJNS45_D03	481	640	2.00E-179	96%	KP814242.1	<i>Sistotrema</i> sp.	Rosenthal,L.M., Larsson, K.H., Branco, S., et al. Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal. <i>Mycologia</i> 109(1):115-127
288_ITS1F_Plate_AJNS45_D04	765	1387	0.0	99%	DQ440568.1	<i>Suillus luteus</i>	Ruiz-Diez,B., Rincon,A.M., de Felipe,M.R. and Fernandez-Pascual,M. 2006. Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of Suillus isolates from central Spain for the selection of fungal inoculants. <i>Mycorrhiza</i> 16 (7), 465-474
289_ITS1F_Plate_AJNS45_D05	714	1053	0.0	99%	KP814242.1	<i>Sistotrema</i> sp.	Rosenthal,L.M., Larsson, K.H., Branco, S., et al. Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal. <i>Mycologia</i> 109(1):115-127
295_ITS1F_Plate_AJNS45_D06	384	604	5.00E-	95%	KU693329.1	<i>Amanita</i>	Vargas-Estupinan,N., Goncalves,S., Franco-Molano,A.E. et al. <i>Amanita</i>

			19			<i>muscaria</i>	<i>muscaria</i> (Amanitaceae) introduced to Colombia has an Eurasian origin and is expanding its range into tropical <i>Quercus humboldtii</i> forests. <i>No publicado</i>
296_ITS1F_Plate_AJNS45_D07	314	575	3.00E-60	99%	MK028943.1	<i>Suillus luteus</i>	Kotowski,M., Pietras,M. and Luczaj,L. 2019. Extreme levels of mycophilia documented in Mazovia, a region of Poland. <i>J Ethnobiol Ethnomed</i> .15: 12
301_ITS1F_Plate_AJNS45_D09	759	1306	0.0	99%	JQ711981.1	<i>Thelephora terrestris</i>	Jones, M. D., Phillips, L. A., Treu, R., et al. 2012. Functional responses of ectomycorrhizal fungal communities to long-term fertilization of lodgepole pine (<i>Pinus contorta</i> Dougl. ex Loud. var. latifolia Engelm.) stands in central British Columbia. <i>Applied Soil Ecology</i> 60, 29-40.
302_ITS1F_Plate_AJNS45_D10	772	1339	0.0	98%	KY706198.1	<i>Hebeloma</i> sp.	Hay, C.R.J. Agaricomycetes of Ontario Tallgrass Prairies. <i>No publicado</i>
304_ITS1F_Plate_AJNS45_D11	342	634	6.00E-178	100%	KT354984.1	<i>Suillus luteus</i>	Angeles-Argaiz,R.E. and Garibay-Orijel,R. Mexican ectomycorrhizal fungi strains. <i>No publicado</i>
306_ITS1F_Plate_AJNS45_D12	788	1391	0.0	99%	DQ440568.1	<i>Suillus luteus</i>	Ruiz-Diez,B., Rincon,A.M., de Felipe,M.R. and Fernandez-Pascual,M. 2006. Molecular characterization and evaluation of

mycorrhizal capacity of *Suillus*
isolates from central Spain for the
selection of fungal inoculants.
Mycorrhiza 16 (7), 465-474

Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Tomentella</i> sp.
Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Cortinarius</i> sp.
Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Cortinarius</i> sp.
Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Porpoloma terreum</i>
Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Cortinarius</i> sp.
Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Porpoloma terreum</i>
Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Sistotrema</i> sp.
Coyhaique	Campo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Inocybe</i> sp.

Tabla S4.5. Análisis de nutrientes y propiedades químicas del suelo en el área invadida y no invadida de Malalcahuello. Los datos fueron analizados utilizando un test de t comparando ambos tipos de sitios. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el los sitios invadidos y no invadidos para una determinada variable ($\alpha = 0.05$).

Variable del suelo (Media \pm Error Std.)	pH	P (mg/kg) - Olsen	NO ₃ ⁻ (mg/kg)	NH ₄ ⁺ (mg/kg)	C:N	Materia Orgánica (%)
Invadido	5.2 \pm 0.2*	17.2 \pm 3.3	2.3 \pm 0.7	1.6 \pm 1.7	19.3 \pm 1.7	4.7 \pm 1.0
No invadido	5.6 \pm 0.2*	22.9 \pm 9.3	2.5 \pm 0.8	3.4 \pm 1.4	20.3 \pm 2.6	5.1 \pm 1.8
	<i>p</i> = 0.0015	<i>p</i> = 0.13	<i>p</i> = 0.57	<i>p</i> = 0.054	<i>p</i> = 0.41	<i>p</i> = 0.60

Anexo – Artículo científico de respaldo

Se adjunta a continuación la versión publicada del artículo científico de respaldo requerido en el Reglamento del Doctorado en Biología de la Universidad Nacional del Comahue (Capítulo XI, Ordenanza N°557/10). El Capítulo 2 de la presente tesis ha sido publicado en su totalidad bajo el nombre “Suilloid fungi as global drivers of pine invasions” en la revista *New Phytologist*, 222(2), 714-725, en 2019, siendo sus autores: Policelli N., Bruns TD., Vilgalys R., Nuñez MA. Dicha publicación ha sido aprobada por la Comisión de Doctorado el 22 de agosto de 2019 (ACTA CPRUB N°2326/19).

Research review

Suilloid fungi as global drivers of pine invasions

Author for correspondence:

Nahuel Policelli

Tel: +54 294 444 2676

Email: npolicelli@comahue-conicet.gob.ar

Received: 11 September 2018

Accepted: 19 December 2018

Nahuel Policelli¹ , Thomas D. Bruns² , Rytas Vilgalys³  and
Martin A. Nuñez¹ 

¹Grupo de Ecología de Invasiones, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente INIBIOMA, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – Universidad Nacional del Comahue (UNCo), Avenida de los Pioneros 2350, San Carlos de Bariloche, 8400 Río Negro, Argentina; ²Department of Plant and Microbial Biology, University of California at Berkeley, 111 Koshland Hall, Berkeley, CA 94720-3102, USA; ³Biology Department, Duke University, 130 Science Drive, Durham, NC 27708-0338, USA

New Phytologist (2019)
doi: 10.1111/nph.15660

Key words: belowground biota, ectomycorrhizal fungi (EMF), invasive species, Pinaceae, plant–soil feedback, *Rhizopogon*, *Suillus*.

Summary

Belowground biota can deeply influence plant invasion. The presence of appropriate soil mutualists can act as a driver to enable plants to colonize new ranges. We reviewed the species of ectomycorrhizal fungi (EMF) that facilitate pine establishment in both native and non-native ranges, and that are associated with their invasion into nonforest settings. We found that one particular group of EMF, suilloid fungi, uniquely drive pine invasion in the absence of other EMF. Although the association with other EMF is variable, suilloid EMF are always associated with invasive pines, particularly at early invasion, when invasive trees are most vulnerable. We identified five main ecological traits of suilloid fungi that may explain their key role at pine invasions: their long-distance dispersal capacity, the establishment of positive biotic interactions with mammals, their capacity to generate a resistant spore bank, their rapid colonization of roots and their long-distance exploration type. These results suggest that the identity of mycorrhizal fungi and their ecological interactions, rather than simply the presence of compatible fungi, are key to the understanding of plant invasion processes and their success or failure. Particularly for pines, their specific association with suilloid fungi determines their invasion success in previously uninvaded ecosystems.

Introduction

Biological invasions, the process by which human-introduced populations spread and maintain themselves without further human assistance (Blackburn *et al.*, 2011), are highly idiosyncratic and hence difficult to predict (Richardson *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2006; Bradley *et al.*, 2010). Perhaps one of the most unexplored aspects of plant invasions is the role of belowground biotic interactions in conditioning the success or failure of this process (Wardle *et al.*, 2004; Van Der Putten *et al.*, 2007; Simberloff *et al.*, 2013). The soil-inhabiting microbiota includes pathogens, herbivores and mutualists, and their negative or positive effects strongly influence the relative abundance and composition of plant species in a community (Klironomos, 2002; Wardle *et al.*, 2004), and can be crucial in determining the success or failure of invasive plants (Traveset & Richardson, 2014; Dickie *et al.*, 2017). The role of negative

plant–soil feedbacks has historically received greater attention as they can suppress plant recruitment, growth and survival, mediate successional trajectories and competitive processes, and help to maintain plant coexistence through Janzen–Connell effects (Kulmatiski *et al.*, 2008; Mordecai, 2011; Maron *et al.*, 2014). However, positive plant–soil feedbacks also occur and can facilitate the invasion of non-native plant species in the introduced range, increasing their invasiveness and impact (Simberloff & Von Holle, 1999; Simberloff, 2006). Although negative and positive interactions are not mutually exclusive and occur as part of the same invasion process (Dickie *et al.*, 2017), the positive effects of soil biota and their role in plant invasions have received less attention. Increasing evidence suggests that positive plant–soil feedbacks are at least as important as negative ones in mediating plant invasions (Reinhart & Callaway, 2006; Nuñez & Dickie, 2014; Traveset & Richardson, 2014) and, with respect to some invasive species

establishment, they can be even more important than inter-specific competition in affecting the plant community assembly (Peay, 2018).

The symbiosis between plants and mycorrhizal fungi is a good example of a positive plant–soil feedback that can influence the trajectory of plant species invasion. Invasion success is strongly conditioned by the presence of suitable mycorrhizal fungi at the site at which the plant species are introduced (Pringle *et al.*, 2009). In the invaded range, non-native invasive plant species can establish novel associations with native, non-native or co-invasive mycorrhizal fungi (Nuñez & Dickie, 2014). Non-native invasive plant species can even disrupt existing native plant–fungal interactions, thus affecting native plant communities and having subsequent positive effects on the invasion (Callaway *et al.*, 2008).

A well-known example of the role of mycorrhizal fungi in plant invasions is the case of pines and their co-invading ectomycorrhizal fungi (EMF). Although both plants and fungi disperse independently, if EMF are absent in the novel habitat, pines are not able to establish and survive as a result of the obligate nature of this symbiosis (Briscoe, 1959; Nuñez *et al.*, 2009; Dickie *et al.*, 2010). Therefore, the co-introduction of competent fungi has been crucial in overcoming the barriers against establishment and has inadvertently led to several cases of pine invasions (Richardson *et al.*, 2000). Pine invasions constitute a major ecological and economic problem in the Southern Hemisphere. In New Zealand, for example, nearly 2 million hectares are invaded by pines, transforming previously opened habitats into dense monospecific forests with negative ecological and economic impacts (Nuñez *et al.*, 2017).

As mutualistic interactions are necessary for the success of invasive pines, our main question is about the identity of the mutualist. Can a specific belowground mutualistic interaction drive the invasion process of an invasive plant worldwide, or is the presence of any compatible fungus enough? To answer this, we reviewed all cases in which the role of EMF has been addressed for widely invasive and globally problematic pine species. We compared all available case studies of invasion in both native and non-native ranges, searching for common EMF species associated with invasive pines. Based on these studies, we tried to identify which traits of the mutualists might be involved in making them determinant in the invasion. Our hope was that, by studying the relationship between pine invasion and specific EMF, we could provide key insights that could predict and avoid future plant invasions, or could help us to understand cases of invasion failure.

Can a particular group of EMF fungi enable pine invasion globally?

We performed a global systematic review of the literature, gathering publications addressing the role of EMF on pine invasions. We used Scopus to search for the keywords ‘invas*’ and ‘mycor*’ and ‘Pinaceae’ in all fields (title, abstract, keywords and text body), yielding 351 documents. We repeated the search using Google Scholar to check for papers that could have been missed in the Scopus search. We considered cases of pine species invasion in both their native and non-native ranges, as well as evidence from

glasshouse bioassays, and field sampling. Papers that only evaluated EMF in plantations and did not evaluate invasion contexts were excluded, as were those that did not perform any molecular analysis to confirm fungal species identity and their effective association with plant roots, or only analyzed soil samples without examining roots. We restricted our search to the genus *Pinus* because it is the genus with by far the most case studies (92%). From the papers obtained, 12 were suitable according to the criteria used. These papers evaluated pine invasion in six different countries (Table 1).

All the reported evidence from pines in both native and non-native ranges showed that a particular group of EMF, suilloid fungi (and specifically the genera *Suillus* and *Rhizopogon*), is always associated with invasive pines and is crucial during the first stages of invasion (Table 1). *Suillus* and *Rhizopogon* species are always among the first fungi to occur in young nurseries and plantations (Chu-Chou & Grace, 1988; Menkis *et al.*, 2005), and are often critically important during early establishment by invading pines. Although many other ‘later’ stage EMF are also important as pines grow, these suilloid fungi are always associated with young, invasive pine seedlings, and play a key role in allowing their establishment and advance during the invasion (Hayward *et al.*, 2015a). Although the other co-invasive EMF species vary, all invasive pines are associated with at least one suilloid species (Table 1).

Suilloid fungi are the main group associated with pine invasion fronts (Fig. 1). In Patagonia, for example, Nuñez *et al.* (2009) showed how low levels of EMF inoculum retarded pine invasions. In that study, for two invasive pine species (*Pinus contorta* and *Pinus ponderosa*), suilloid fungi were the most abundant group of EMF associated far from the invasion source. In northwest Patagonia, *Rhizopogon* sp., as determined by root tip morphotyping, was reported as the most common EMF species colonizing pines at increasing distances from the invasion source, and was the only EMF capable of colonizing at 400 m from *Pinus ponderosa* plantation edges (Salgado Salomón *et al.*, 2011). *Suillus luteus* was found to be the only species present at > 750 m from the source of invasion in southern Patagonia and its presence was sufficient to enable the invasion of *Pinus contorta* (Hayward *et al.*, 2015b). In a recent study, suilloid fungi have also been found to be important drivers of pine invasions in high-altitude environments, with *Suillus granulatus* being the only EMF present associated with *Pinus elliotti* invading at 2200 m above sea level (asl) and > 6 km away from the closest pine plantation (Urcelay *et al.*, 2017).

Pines typically invade nonforested sites because of their shade intolerance, and, when they do, seedling establishment differs between mature invaded sites and invasion fronts in two main ways. First, in mature invaded areas, in which established trees already exist, there are also established mycelial networks with which new seedlings can interact. This means that EMF colonization of new seedling roots can occur efficiently without spores. By contrast, at the invasion front, EMF mycelial networks are absent; thus, the colonization of new seedlings must occur by spores. Second, habitat conditions are likely to be better for mycelial growth of EMF inside mature invaded areas, given the cooler, wetter soil environment and a higher density of roots (Peay *et al.*, 2011). These environmental conditions are also conducive for enhanced fruiting of a more diverse set of EMF, and this results in increased spore rain for such

Table 1 List of studies, ordered by publication year addressing the role of ectomycorrhizal fungi (EMF) in different *Pinus* species invasions around the world; considering different methodological approaches, suilloid fungi species (in bold) are always associated with pines, being particularly important at the invasion front and during the establishment of seedlings.

Citation	Invasion location	Invasive host	EMF present in invasion front	EMF present in mature stands	Type of study	Main findings
Collier & Bidartondo (2009)	Lowland heathlands, England	<i>Pinus sylvestris</i> (native invasive)	Rhizopogon luteolus , Suillus bovinus , Suillus variegatus	<i>Amanita rubescens</i> , Atheliaceae sp., <i>Cenococcum geophilum</i> , <i>Laccaria</i> spp., <i>Lactarius</i> spp., R. luteolus , <i>Russula emetica</i> , <i>Scleroderma citrinum</i> , S. bovinus , S. variegatus , <i>Thelephora terrestris</i> , <i>Tomentella</i> spp., <i>Xerocomus</i> sp.	Soil bioassay and <i>in situ</i> survey	Few keystone spore-dispersed EMF can mediate tree expansion
Núñez <i>et al.</i> (2009)	Isla Victoria, Patagonia, Argentina	<i>Pinus contorta</i>	<i>C. geophilum</i> , Cortinariaceae sp., Suillus luteus , <i>Hebeloma</i> sp., <i>Wilcoxina mikolae</i>	Atheliaceae sp., <i>Cadophora findlandica</i> , <i>C. geophilum</i> , Cortinariaceae sp., <i>Hebeloma</i> sp., <i>Lactarius quieticolor</i> , S. luteus , Thelephoraceae spp., <i>Wilcoxina</i> spp.	Soil bioassay and <i>in situ</i> survey	Low inoculum levels far from the plantations retard the invasion of pine species
Dickie <i>et al.</i> (2010)	Canterbury, New Zealand	<i>Pinus ponderosa</i>	S. luteus , <i>T. terrestris</i> , <i>W. mikolae</i>	Atheliaceae sp., Cortinariaceae sp., <i>Hebeloma</i> sp., <i>L. quieticolor</i> , Sebacinaceae sp., S. luteus , Thelephoraceae spp., <i>W. mikolae</i>	<i>In situ</i> survey	Co-invasion by mutualists rather than novel associations could explain how pines avoid or overcome the loss of mutualists
Kohout <i>et al.</i> (2011)	Elbe Sandstone Mountains, Czech Republic	<i>Pinus strobus</i>	Not assessed (9- to 20-yr-old self-established pines sampled)	Atheliaceae (cf <i>Tylospora</i>), <i>Amanita muscaria</i> , <i>Cantharellales</i> sp., Suillus granulatus , S. luteus , <i>Tomentella</i> sp., <i>Tricholoma</i> sp., <i>Tylospora</i> sp.	Soil bioassay	Host plant species identity and surrounding vegetation may influence EMF assemblages in roots of establishing pine seedling
Salgado Salomón <i>et al.</i> (2011)	NW Patagonia, Argentina	<i>P. ponderosa</i>	Rhizopogon sp.	<i>C. geophilum</i> , <i>Inocybe</i> sp., <i>Meliniomyces bicolor</i> , R. luteolus , R. roseolus , Rhizopogon salebrosus , S. bovinus , S. granulatus , S. luteus , S. variegatus , <i>T. terrestris</i> , <i>W. mikolae</i> <i>Amphinema</i> sp., Rhizopogon sp.	Soil bioassay (species identity determined by morphotyping)	<i>Rhizopogon</i> sp. acts as a pioneering taxon regarding the colonization of seedlings, being the most persistent and frequent symbiont

Table 1 (Continued)

Citation	Invasion location	Invasive host	EMF present in invasion front	EMF present in mature stands	Type of study	Main findings
Hynson <i>et al.</i> (2013)	Maui and Hawaii, USA	<i>Pinus patula</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus radiata</i> , <i>Pinus taeda</i> (<i>in situ</i> survey)	Atheliaceae sp. 1, <i>Cadophora</i> sp., <i>Suillus brevipes</i> , <i>S. luteus</i> (> 250 m far from plantation)	Atheliaceae spp., <i>Cadophora</i> sp., <i>Cortinarius</i> sp., Hyaloscyphaceae sp., <i>Inocybe</i> sp., <i>Laccaria</i> sp., <i>Meliniomyces</i> sp., <i>Pseudotomentella</i> sp., Pyronemataceae sp., <i>R. salebrosus</i> , <i>S. brevipes</i> , <i>S. luteus</i> , <i>Suillus pungens</i> , <i>Thelephora</i> sp., <i>Tuber</i> sp., <i>Wilcoxina</i> spp.	<i>In situ</i> survey and soil bioassay	A restricted suite of EMF are the common dominants with pine introductions
Núñez <i>et al.</i> (2013)	Isla Victoria, Patagonia, Argentina	<i>P. radiata</i> (soil bioassay)	<i>Rhizopogon rubescens</i> , <i>S. luteus</i> (1000 m far from plantation)	Atheliaceae sp. 1, <i>Descomyces</i> sp., <i>Laccaria</i> sp., Pyronemataceae sp., <i>R. rubescens</i> , <i>R. salebrosus</i> , Sebacinaceae sp., <i>S. brevipes</i> , <i>S. luteus</i> , <i>S. pungens</i> , <i>Thelephora</i> sp., <i>Tomentella</i> spp., <i>Tuber</i> sp., <i>Wilcoxina</i> spp.	Soil bioassay with fecal pellets of non-native mammals	Non-native mammals can be important dispersers of non-native EMF which, in turn, can promote pine invasion
Hayward <i>et al.</i> (2015a)	Isla Victoria, Patagonia, Argentina	<i>P. ponderosa</i> , <i>Pinus monticola</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. contorta</i>	<i>Amphinema</i> sp., <i>Hebeloma mesophaeum</i> , <i>Melanogaster</i> sp., <i>Rhizopogon cf arctostaphyli</i> , <i>R. cf rogersii</i> , <i>R. roseolus</i> , <i>S. luteus</i> , <i>Amphinema</i> sp., <i>Hebeloma</i> sp., <i>Inocybe</i> sp., <i>L. quieticolor</i> , <i>Leotiomyces</i> sp., <i>Rhizopogon</i> spp. , <i>Suillus lakei</i> , <i>S. luteus</i>	<i>Amphinema</i> sp., <i>Boletus edulis</i> , <i>Cortinarius</i> spp., <i>Hebeloma</i> spp., <i>Helotiales</i> sp. 1, <i>Inocybe</i> spp., <i>L. quieticolor</i> , <i>Leotiomyces</i> sp., <i>Melanogaster</i> sp., <i>Pseudotomentella tristis</i> , Pyronemataceae sp., <i>Rhizopogon</i> sp. , <i>Russula</i> sp., Sebacinaceae sp. 1, <i>S. lakei</i> , <i>S. luteus</i> , <i>T. terrestris</i> , <i>Tomentella</i> spp., <i>Tricholoma</i> sp.	<i>In situ</i> survey	Suilloid fungi possess notable potential to invade and to facilitate co-invasions by pine species
Hayward <i>et al.</i> (2015b)	Coyhaique, Chile	<i>P. contorta</i>	<i>S. luteus</i>	<i>H. mesophaeum</i> , Hydnaceae spp., <i>Tomentella cf Sublilacina</i>	<i>In situ</i> survey	Extremely depauperate fungal communities (even one species) may be sufficient to enable a pine invasion outside the native range

Table 1 (Continued)

Citation	Invasion location	Invasive host	EMF present in invasion front	EMF present in mature stands	Type of study	Main findings
Wood <i>et al.</i> (2015)	South Island of New Zealand	<i>P. contorta</i>	Rhizopogon spp., S. luteus (long distance dispersal by large mammals; only species effectively colonizing from fecal pellets)	No other effective colonizers from fecal pellets in spite of consumption evidence of <i>A. muscaria</i>	<i>In situ</i> survey Soil bioassay with fecal pellets of non-native mammals	Introduced mammals from Australia and Europe facilitate the co-invasion of invasive North American trees and Northern Hemisphere fungi in New Zealand, with no benefit for native trees or fungi Invading pines support different fungal communities in comparison with their places of origin. In environments with phylogenetically distant vegetation, <i>Pinus contorta</i> becomes associated with a unique fungal community that appears to have originated from multiple co-introduction events
Gundale <i>et al.</i> (2016)	Chile New Zealand	<i>P. contorta</i>	<i>Atheliales</i> sp., <i>Sistotrema</i> sp., S. luteus , <i>W. mikolae</i>	<i>A. muscaria</i> , <i>Atheliales</i> sp., <i>Cadophora finlandica</i> , Rhizopogon ochraceorubens , <i>Sistotrema</i> sp., S. luteus , <i>W. mikolae</i>	<i>In situ</i> survey	
Urceley <i>et al.</i> (2017)	Sierras Grandes mountain range, Córdoba, Argentina	<i>Pinus elliotii</i>	S. granulatus (EMF at high altitude: 2700 m above sea level, asl)	<i>A. muscaria</i> , <i>C. finlandica</i> , <i>Clavulina</i> sp., <i>Endogone lactiflua</i> , <i>Inocybe curvipes</i> , <i>Inocybe jacobii</i> , <i>Inocybe sindonia</i> , <i>Laccaria</i> sp., <i>M. bicolor</i> , <i>Paxillus involutus</i> , Rhizopogon pseudoroeseolus , <i>Russula</i> sp., <i>Scleroderma areolaum</i> , <i>Scleroderma</i> sp., <i>Sebacina</i> sp., <i>Sebacinaceae</i> sp., <i>Sistotrema</i> sp., S. granulatus , <i>Thelephoraceae</i> sp., <i>T. terrestris</i> , <i>Tomentella coerulea</i> , <i>Tomentella</i> sp., <i>Tuber</i> sp., <i>Tylospora</i> sp., <i>W. mikolae</i> , <i>Wilcoxina</i> sp. (EMF at lower altitudes: <2200 m asl)	Soil bioassay and <i>in situ</i> survey	The availability of suitable fungal symbionts might constrain, but not hinder, the expansion of a pine species over wide distances and altitudinal zones, even in areas with no native EMF

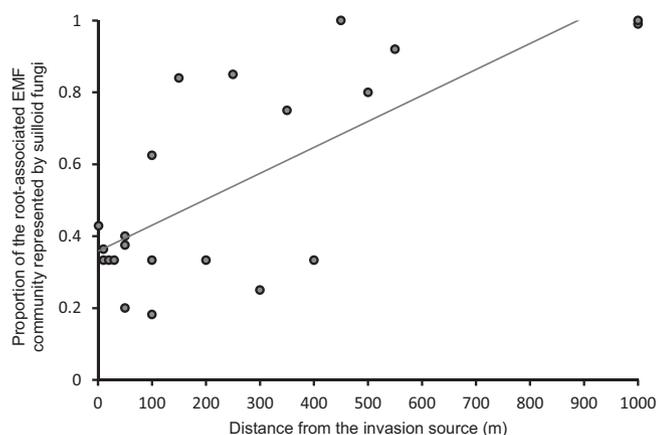


Fig. 1 The proportion of suilloid fungi associated with pine roots increases with distance from the invasion source; at 1000 m from the invasion source, the community is only represented by suilloid fungi ($R^2 = 0.546$). Data were extracted from papers that evaluated the community of root-associated ectomycorrhizal fungi (EMF) at different distances from the invasion source for pine seedlings (Nuñez *et al.*, 2009; Salgado Salomón *et al.*, 2011; Hynson *et al.*, 2013; Hayward *et al.*, 2015b). In cases in which a distance range was used, the proportion of the EMF community represented by suilloid fungi is given for the average distance of that range. Data were analyzed using 'Proportion of the community represented by suilloid fungi' as a response variable (number of suilloid fungi/total EMF species associated with the root). We assumed a binomial distribution using generalized linear mixed models (GLMM) based on a Laplace approximation and a logit link function (LME4 package, glmer function) (Bates *et al.*, 2015). Together with the explicative variable 'distance from the invasion source', we included an observation-level random effect for modeling overdispersion (Harrison, 2014). All analyses were performed with R 3.4.0 statistical software (R Core Team, 2018).

species within the forest (Peay *et al.*, 2012). The opposite happens in the invasion front, where only long-distance dispersed fungi, primarily *Suillus* spp., and those with resistant spores, *Suillus* and *Rhizopogon* spp., dominate the inoculum. In addition, fruiting is typically restricted to these same fungi on or near the invasion front (Ashkannejhad & Horton, 2006), with the addition of *Thelephora* spp. and *Laccaria* spp. in native settings (Peay *et al.*, 2007, 2012).

Suilloid fungi also act as pine expansion drivers in their native range (Table 1). For example, a few key suilloid fungal species are able to mediate the expansion of the native *Pinus sylvestris* into lowland heathland habitats in England (Collier & Bidartondo, 2009). Although fungal richness and colonization percentage decrease at increasing distance from the inoculum source, suilloid fungi are the only taxa found to colonize seedlings planted in soil from uninvaded areas (Collier & Bidartondo, 2009). In the Hawaiian islands, where there are no native pine species and no native ectomycorrhizal trees, suilloid fungi are also the dominant group colonizing invading pines (Hynson *et al.*, 2013). In Europe, several non-native pine species have been introduced together with their associated EMF, and many have become naturalized (Vellinga *et al.*, 2009; Richardson & Rejmánek, 2011; Nuñez *et al.*, 2017; Tedersoo, 2017). However, there are scarce records of pine invasions (Engelmark *et al.*, 2001) and less of the role of EMF in the process (Kohout *et al.*, 2011). Their limited expansion, in comparison with sites in the Southern Hemisphere, is probably the result of low introduction effort and phylogenetic closeness

between non-native and native trees and non-native and native EMF (Nuñez *et al.*, 2017).

In a noninvasive context, suilloid fungi often act as early-successional species able to colonize pine seedlings, and are later displaced by late-successional fungi (Peay *et al.*, 2011). As a result, in established pine forests, suilloid fungi are less frequent and less abundant relative to a diverse array of other EMF (Gardes & Bruns, 1996; Gehring *et al.*, 1998; Taylor & Bruns, 1999; Talbot *et al.*, 2014; Van Der Linde *et al.*, 2018). Suilloid fungi have been reported to constitute < 5% of the total mycorrhizas associated with noninvasive pine roots (Danielson, 1984; Gardes & Bruns, 1996). In native settings, suilloid fungi do become dominant after disturbance. *Rhizopogon* spp., for example, have been found to dominate EMF communities associated with native pine roots in post-fire settings (Horton *et al.*, 1998; Baar *et al.*, 1999; Buscardo *et al.*, 2010; Rincón *et al.*, 2014).

Several suilloid fungal species have been reported with invasive pines (Fig. 2). These EMF species were all introduced into non-native, Southern Hemisphere locations, in which they successfully established in the novel habitat with Northern Hemisphere pines, and were not replaced by local fungi (Vellinga *et al.*, 2009). Pine invasion success could be easily predicted if an already reported combination of one particular species of suilloid fungi is present in the invaded range together with a compatible pine host. From the set of all papers that have evaluated EMF interaction in a pine invasion context (Table 1), there are many examples of novel interactions between North American hosts and European EMF in the invasive context (Fig. 2). The most reported interaction is that between *Pinus contorta*, a North American pine, and *Suillus luteus*, a European fungus. *Suillus luteus* is also the suilloid fungus reported to interact with the greatest number of pine species (Fig. 2). The analysis of these common invaders reveals the range of species specificities within different invasions, and may account for a high context dependence of the ecological role of these fungal species. It is clear that North American pine species and European suilloid species are common associates in exotic settings, and a single suilloid–pine combination can be sufficient to drive an invasion, even when the combination is novel (e.g. *S. luteus* and *P. contorta*; Hayward *et al.*, 2015b). What is less clear is whether pines preferentially associate with their native suilloid species if the opportunity is available. There is some indication that preference for native suilloids may occur with exotic pines (McNabb, 1968; T. D. Bruns, pers. obs.), but the pattern is in need of more careful documentation.

Suilloid fungi also contribute to the invasion of other Pinaceae species. Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*), for example, is well documented as an invasive species spreading under forest gaps, as it is more shade tolerant than pines (Simberloff *et al.*, 2002; Nuñez *et al.*, 2009). *Rhizopogon* sp. was found to be the only EMF colonizing *P. menziesii* trees inoculated with soil far from the invasion source in a field experiment (Nuñez *et al.*, 2009), and also the only species effectively colonizing *P. menziesii* trees inoculated with fecal pellets of mammals (Wood *et al.*, 2015). *Suillus lakei* has also been reported as an invasion driver of Douglas fir in South America (Nuñez *et al.*, 2009; Hayward *et al.*, 2015a) and New Zealand (Moeller *et al.*, 2015).

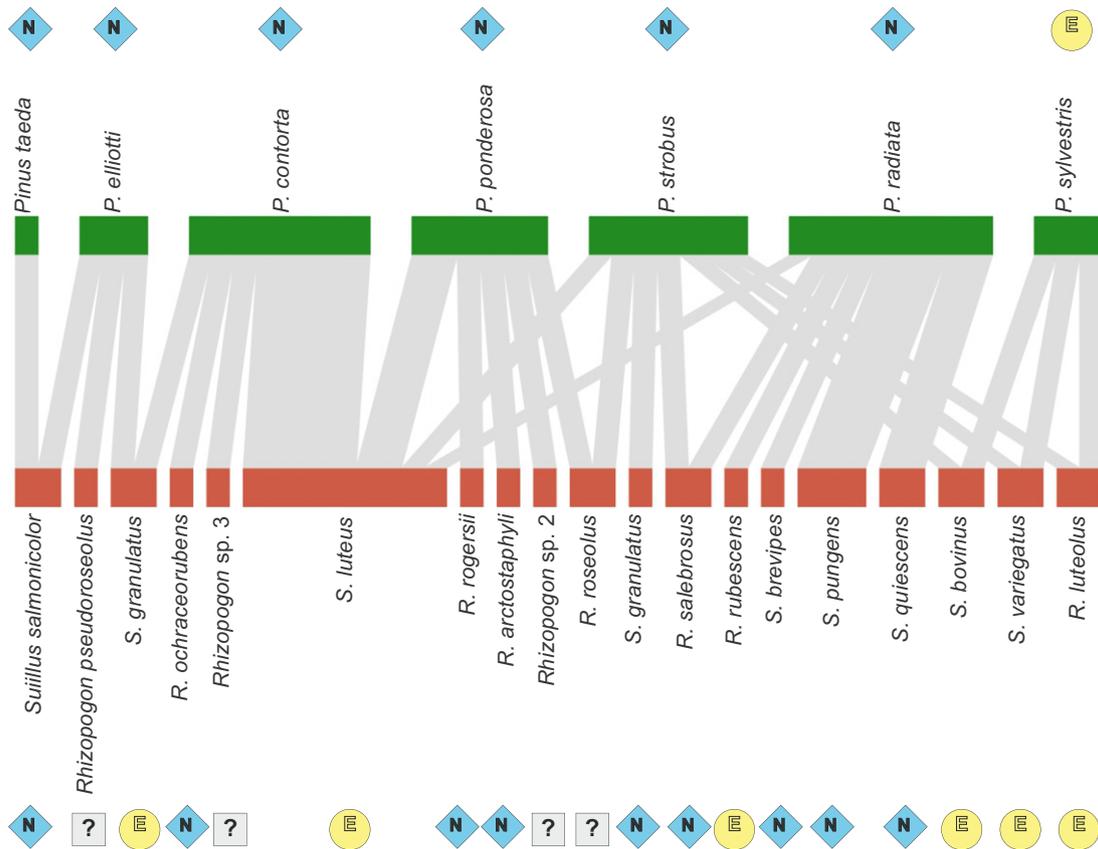


Fig. 2 Common invaders. A map of the reported interactions between suilloid fungi (red boxes) and pine host species (green boxes) in an invasion context. The size of the boxes and the width of the connections are proportional to the number of papers that found the interaction. The thickest connection (that between *Suillus luteus* and *Pinus contorta*) represents a total number of five studies. European (yellow circles with letter E) or North American (blue diamonds with letter N) origins are indicated for both pine and suilloid ectomycorrhizal fungi (EMF) species; gray squares with question marks symbolize an unknown origin. For *Suillus granulatus*, both North American (restricted to *Pinus strobus*) and European (reported with *P. eliotti* and *P. contorta*) species are indicated.

It is likely that other nonsuilloid EMF species will be able to colonize pines as the invasion process advances, and they may also be of special concern for global pine invasions (Nara, 2006; Bahram *et al.*, 2013). *Amanita muscaria*, for example, has been widely introduced in the Southern Hemisphere and is reported as highly invasive (Pringle *et al.*, 2009) in places such as Australia and New Zealand (Dickie *et al.*, 2010; Walbert *et al.*, 2010). *Amanita muscaria* is also capable of forming novel associations with different native tree species (Pringle *et al.*, 2009; Nuñez & Dickie, 2014), which could have severe implications in the displacement of native fungal partners (Orlovich & Cairney, 2004). By contrast with suilloid fungi, *A. muscaria* is considered as a later successional fungus (Peay *et al.*, 2011) and spreads into native habitats on a smaller scale and at a slower rate (Dickie *et al.*, 2016). Although it is possible that other EMF species may be required by pines at later life stages, current evidence shows that pines can invade with only suilloid partners.

What factors can explain the success of suilloid fungi?

We hypothesize that five characteristics of suilloid fungi are responsible for their success in colonizing young pine hosts and in facilitating the invasive behavior of these trees in both native and

non-native settings. In combination, these five factors ensure that seedlings become inoculated with these EMF fungi at a high frequency at the advancing front of invasion.

Abiotic long-distance dispersal

Suillus species are very effective at dispersing by air, and are quantitatively better at this than other fungi found at the margins of pine forest. This general trait can be seen as the consequence of numerous characteristics: the production of a large number of fruiting bodies at the edge of forests with young trees, together with the size, height and relative durability of these fruiting bodies (Peay *et al.*, 2012). At a fine scale, species with higher stem length and smaller spore size disperse further than species that produce fruiting bodies closer to the ground and have larger spores (Galante *et al.*, 2011). The presence of pores in *Suillus* allows for greater sporulation surface per unit area than that of a similar-sized gilled mushroom (Ingold, 1971), and the large biomass of a fruiting body makes it more resistant to desiccation and probably prolongs sporulation in drier climates. Although the majority of spores for any mushroom fall within a short distance of the cap and decrease with a leptokurtic function (Peay *et al.*, 2012; Horton, 2017), the total volume of spore production matters. This is evidenced by the

fact that very few fungal spores are able to wind disperse at a scale of kilometers from a forest edge, but *Suillus* is highly successful at this and is by far the most abundant EMF spore type in such settings (Peay *et al.*, 2012; Horton, 2017). *Suillus luteus*, for example, disperses spores at least 1000 m from the borders of pine plantations and at least 500 m from single pine trees outside plantations (Nuñez *et al.*, 2009; Hynson *et al.*, 2013). Similarly, in a native forest setting, *S. pungens* was found to be the only fungal species capable of colonizing pine seedlings at > 1 km away from native pine forests, and it exhibited an estimated spore production of 8×10^{12} spores km⁻² (Peay *et al.*, 2012). Other EMF in that system produced orders of magnitude fewer spores, resulting in dispersal at a more local scale (that is, less than a few meters from the fruiting body), and did not successfully colonize advancing pine seedlings.

Following long-distance dispersal, finding a compatible mating type is a major constraint to the successful establishment of EMF. The majority of EMF species can establish a functional mycorrhizal symbiosis only when a dikaryotic mycelium is formed, although some Basidiomycota can form functioning mycorrhizal roots even as monokaryons (Kropp & Fortin, 1988; Gardes *et al.*, 1990). As distance from fungal spore sources increases, the probability of encountering germinants of compatible strains and forming the dikaryon decreases (Horton, 2017). However, the chances of finding mating type-compatible spores distant from the inoculum source are higher for fungi with a bipolar mating system (e.g. *Rhizopogon rubescens*, Kawai *et al.*, 2008) compared with those fungi with a tetrapolar mating system (e.g. *Laccaria* spp., Kropp & Fortin, 1988; Horton, 2017). Also, secondary homothallism, a process of self-fertilization that produces binucleate spores (Horton, 2006), has been reported for some *Suillus* species as well as for other EMF (Horton, 2006, 2017). Those EMF with greater chances of finding a compatible mating type because of their mating system, or capable of producing dikaryotic spores by secondary homothallism, may be favored in invasive contexts. How EMF are able to prosper far from the inoculum source in terms of their mating system still needs to be elucidated further (Kawai *et al.*, 2008; Horton, 2017).

Biotic dispersal mediated by mammals

Mycophagy by mammals is a second key dispersal process of viable EMF propagules. Truffle-like fungi, such as *Rhizopogon*, rely almost exclusively on animal dispersion. No spores are actively shed to the wind; instead, mammals eat the fruiting bodies and a great mass of spores is ingested, transported and returned to the soil in feces (Johnson, 1996). Mammals also eat mushrooms, especially in seasonal abundance peaks (Piattoni *et al.*, 2012). Deer, for example, can effectively disperse *Suillus brevipes* through mycophagy in native habitats (Ashkannejhad & Horton, 2006). However, as discussed above, *Suillus* is also effectively dispersed through the air. In order to be effectively dispersed by animals, the fungal fruiting body needs to be attractive and nontoxic to the animal vector, and the spores must be resistant to the digestive system and remain viable in fecal pellets. Both *Suillus* and

Rhizopogon meet these criteria. Apart from being dispersed in feces, suilloid fungi are able to resist possible desiccation for at least 1 yr and remain viable (Ashkannejhad & Horton, 2006). Many other EMF fruiting bodies might be consumed by large mammals, but their spores may lack the ability to survive and rapidly colonize roots.

The ecological role of mammals in the dispersal of suilloid fungi in the non-native range can assemble novel three-way interactions. Non-native deer and wild boar eat fruiting bodies of non-native EMF, mainly *Rhizopogon* spp., and spores present in their feces are able to survive, germinate and colonize non-native pine seedlings, improving their growth and survival (Nuñez *et al.*, 2013). There is also experimental evidence of a similar three-way interaction in New Zealand, where non-native Australian possums disperse non-native European and North American suilloid fungi (species of *Rhizopogon* and *Suillus*), facilitating North American pine establishment (Wood *et al.*, 2015). Native EMF can also be consumed by non-native invasive mammals, but current evidence shows that they are not capable of readily colonizing either native or invasive tree species (Wood *et al.*, 2015). Interestingly, studies from South America show that native mammals (rodents and a native dwarf deer *Pudu pudu*) do not play a significant role in dispersing non-native fungi because of the scarce abundance of these animals (Nuñez *et al.*, 2013).

Resistant spore bank

Analogous to seed banks, fungal spore banks play a key role in terrestrial ecosystems as a source of fungal propagules. Not all fungal species are able to produce a long-lived spore bank, and so the species that remain viable in the soil can uniquely act as pioneers in colonization. More importantly, they can precondition a site to enable the growth of tree seedlings, thus facilitating establishment and, ultimately, invasion. Spore banks for some species, particularly *Rhizopogon* and *Suillus* species, are likely to be viable for decades (Bruns *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2012), enabling the colonization of plant hosts in the long term and preconditioning a site. By contrast with suilloid fungi, the spore longevity of most EMF is short and insufficient to accumulate effective numbers of viable spores at soil spore banks (Nara, 2009).

Both in their native and non-native ranges, suilloid fungi are the predominant group in the EMF spore bank for pines. In the native range, EMF spore banks are predominantly composed of species that produce truffles, within which *Rhizopogon* is the most common (Glassman *et al.*, 2015). The genus *Wilcoxina* can also be well represented in native pine spore banks, but, unlike the suilloids, *Wilcoxina* spores are not dispersed well by air or mammals. Most of the *Wilcoxina* propagules are chlamydospores that are produced on site within the soil and are dispersed through soil movement. Among the aboveground fruiting species, *Suillus* is the most common mushroom able to colonize *Pinus* spp. from spore bank propagules, if those species forming resupinate crusts are not considered (e.g. *Thelephora* spp., *Amphinema* spp., *Piloderma* sp., Marx & Ross, 1970; Glassman *et al.*, 2015). The fact that suilloid fungi last for years in the soil makes them particularly important in primary successional areas (Ashkannejhad & Horton, 2006) and

crucial in pine invasion fronts (Collier & Bidartondo, 2009). In an invasion context, having a resistant soil spore bank facilitates the introduction of suilloid fungi at any time at which soil is moved together with pine seedlings.

Several mechanisms could explain the high spore resistance of suilloid fungi. The deposition of a higher number of spores that remain deeper in the soil as the basidiome decomposes (Miller *et al.*, 1993) might be one of the main reasons that allows *Rhizopogon* to dominate spore banks. Moreover, the dependence of *Rhizopogon* on herbivore consumption of the fruiting bodies could partially explain its long-lived spore bank (Bruns *et al.*, 2009); as they must be well adapted to resist enzymatic and microbial degradation in the mammal gut, they may also have increased resistance to degradation by soil microbes. Mammal dispersal would also avoid loss of viability from UV irradiation or desiccation that would otherwise occur during aerial dispersal. Morphological and physiological traits that could be acting in spore resistance and longevity, such as spore wall thickness or biochemical traits, remain understudied.

Responsive, host-stimulated spores guarantee rapid colonization

Rapid colonization of pine seedling roots by suilloid spores is a critical feature of their biology that allows them to facilitate pine establishment (Ashkannejhad & Horton, 2006; Hayward *et al.*, 2015b). Although one might assume that most EMF should behave in this way, they do not. In fact, the reverse is true: spores from the overwhelming majority of EMF do not readily germinate and colonize seedlings under any conditions that can be reproduced in the laboratory, glasshouse or nature (Fries, 1987; Nara, 2009). Studies on fungal succession describe suilloid fungi as early-stage EMF that rapidly react to hosts (Ishida *et al.*, 2008; Peay *et al.*, 2011). By contrast with other EMF, basidiospores of most *Suillus* and *Rhizopogon* species will germinate readily, especially when stimulated by roots of compatible pine hosts (Fries, 1987; Liao *et al.*, 2016). Earlier colonization of roots can, in turn, provide a competitive advantage to suilloid fungi compared with late-successional EMF because of strong priority effects (Kennedy & Bruns, 2005). Spore quantity contributes to the predictability of the process in nature, as a fairly high spore density is needed to guarantee that all seedlings become colonized (Bruns *et al.*, 2009). However, the fact that specific, pine-derived chemical signals stimulate spore germination (Fries, 1987) is probably more important, because it means that suilloid spores can lie quiescently in soil until stimulated by an uncolonized pine root. This behavior, coupled with spore longevity, allows the density of the spore bank to increase over time and to remain responsive.

Long-distance exploration type

Suilloid fungi are an example of the long-distance exploration type (Agerer, 1994), characterized by the formation of long rhizomorphs able to colonize distant areas and to conduct nutrients efficiently. In a pine invasion context, long rhizomorphs may be able to better connect 'sink' seedlings into the existing hyphal network supported by the 'source' adult hosts

(Selosse *et al.*, 2006; F. Kuhar, pers. comm.). The formation of mycelial networks able to mediate long-range water and nutrient transfer between plants, and even mediate their interactions (Selosse *et al.*, 2006), could be fundamental for pines to prosper far from adult hosts (Teste & Simard, 2008). The formation of both long-distance and extensive vertically distributed mycelia also ensures that suilloid species have access to water sources during fruiting (Lilleskov *et al.*, 2009) and can be fundamental for pines to thrive under harsh conditions (Pickles & Simard, 2017). Whether resource and water subsidy as a result of these networks can explain pine invasion remains unsolved.

Suilloid fungi as drivers of pine invasions: open questions

Several aspects of the interaction between Pinaceae trees and suilloid symbionts remain completely unexplored or have evidence only from their native range. Here, we identify some gaps of knowledge in the current literature.

Causality

The literature shows that suilloid fungi are always present in pine invasions and occur on the invasion front. This strong pattern, coupled with the ecological traits outlined above, lead to our hypothesis that they are necessary components for successful pine invasion. However, direct experimental evidence for this hypothesis is not available and this represents a challenge for future research. There is still no reported cases in which suilloid species are present, but pines still fail to invade. Future experiments could address this topic by evaluating a certain range of circumstances under which suilloid fungi contribute to pine invasion, examining how this contribution may vary according to different soil types and climatic conditions.

Diversity

By contrast with the situation in the native range, an extremely depauperate community of fungal mutualists is present in the non-native range. The case of suilloid fungi as ecological drivers of global pine invasions is an example of how a low diversity of mutualists, in this case represented even by a single species, can drive an ecological process, such as the invasion of the tree host. In general terms, it seems intuitive to assume that greater numbers of EMF species are better for the host, but there is no strong evidence supporting this idea from either the native or non-native range. Instead, the pattern suggests that the identity of the EMF species and their ecological traits are more important than their diversity in invasive settings. In this context, one could take advantage of the relatively low number of EMF species in the non-native range, and use it to test the effects of different EMF species and different levels of EMF diversity on host growth and establishment. It might also be possible to establish pine plantations that have a low risk of invasion by selecting nonsuilloid EMF species for their EMF associates (Hayward *et al.*, 2015a).

Role of pathogens

Pathogen release is a common mechanism proposed to explain successful invasions, but whether reduced pathogen load in the invaded range interacts with EMF species and indirectly facilitates their host invasion is completely unknown. Certainly, the success of suilloid fungi in the non-native range could be partially increased by the absence of pathogens from their native range. For example, the absence of mycophagous insects (Hiol Hiol *et al.*, 1994) or mycoparasites (e.g. *Hypomyces*, members of the Gomphidiaceae family) might increase the numbers of fruiting bodies or extend their longevity, and thereby increase spore production. The escape from pathogens that could affect suilloid fungi during a non-reproductive stage may further represent an advantage in the invaded range compared with native settings.

The reduced load of pathogens on the host tree could also have indirect benefits to EMF. For example, mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosa*), which is currently absent from the Southern Hemisphere pine forests, has been found to affect both the proportion of EMF species and the hyphal length in the soil following an epidemic outbreak in western North America (Treu *et al.*, 2014). EMF that are highly specific, as in the case of *Suillus*, would be more strongly affected by host declines in comparison with EMF species that are capable of establishing symbiotic associations with other plant species. Richer EMF communities in the native range could also act as a protective mechanism against feeder root pathogens (Bennett *et al.*, 2017). However, trees such as *Pinus contorta* are aggressive colonizers of disturbed settings, even in their native range, where the presence of greater numbers of pathogens is typical.

Invasion failures and lag phase

As a result of their dispersal ability and the longevity of their spores, suilloid fungi are able to stay viable for long periods in areas in which hosts are absent and facilitate pine invasions. By contrast, does the absence of suitable fungal inocula and the low reactivity of spores during the first years post-introduction explain a lack of host establishment away from places in which they were initially introduced? Pines might not be invasive until the suilloid partner fungi arrive, or until they have built up a soil spore bank at the margins of the plantings, when the invasion could be triggered. This could explain the observed time lags (Hallett, 2006; Nuñez *et al.*, 2009) in pine invasions. Reported cases of EMF invasion failures are scarce (Vellinga *et al.*, 2009), but it would be useful to determine whether they coincide with pine invasion failures. In this aspect, the role of suilloid fungi in pine invasions is potentially testable. If small isolated pine plots with access only to noninvasive EMF are compared with pines in plots that have access to suilloid fungi, we would predict that only those pines with access to suilloid fungi will become invasive.

Legacy effects of pine invasions

Spores of suilloid fungi are likely to persist in the soil after removal of their hosts. Their high specificity, large quantities

and longevity may make lasting restoration difficult unless no pine propagules are present in the area. In turn, restoration chances in areas in which invasive pines have been removed could be hindered because of the presence of suilloid fungi that remain in the soil and allow the re-establishment of pines for a long time period (Dickie *et al.*, 2014). The possible management strategies for invasive EMF propagules that remain in the soil are increasingly being considered (Dickie *et al.*, 2016), together with an increasing recognition of some EMF as invasive species.

Concluding remarks

The study of belowground fungal ecology is increasing our understanding of aboveground ecological processes. Particularly for invasion ecology, an increasing number of studies have linked plant–fungal interactions as a mechanism to explain invasion success or failure. Here, we have reviewed the increasing evidence that shows that, within all co-invading EMF species, one particular group is key at driving pine invasions. All the evidence available from the native and the non-native ranges strongly suggests that, without suilloid fungi, pine invasion does not occur and that suilloid fungi are facilitating pine invasion worldwide. The set of key traits of suilloid fungi, related to effective and abundant dispersal and reactive spore banks, make them drivers of some of the most problematic invasive plants worldwide. Here, we provide an example of how the identity, rather than just the presence, of belowground mutualists can determine plant invasion success, and how the invasion of some plant species can be explained in part by the traits of their specific symbionts.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Francisco Kuhar for his insightful comments on preliminary versions of the manuscript. We also thank Dr Marc-André Selosse, Dr Brian John Pickles and two other anonymous reviewers who enhanced the quality of the paper with their revisions. MAN and NP were funded by FONCyT grant nos. PICT 2014-0662 and PICT 2016-1412 of the ANPCyT of Argentina. RV was funded by NSF DEB 1554181.

Author contributions

NP and MAN conceived the study. NP collected the data and led the writing of the manuscript. NP, TDB, RV and MAN participated in data interpretation and revised the manuscript.

ORCID

Thomas D. Bruns  <https://orcid.org/0000-0002-2943-8669>
 Martin A. Nuñez  <https://orcid.org/0000-0003-0324-5479>
 Nahuel Policelli  <https://orcid.org/0000-0001-9708-5829>
 Rytas Vilgalyš  <https://orcid.org/0000-0001-8299-3605>

References

- Agerer R. 1994. Index of unidentified ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 4: 183–184.
- Ashkannejhad S, Horton TR. 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist* 169: 345–354.
- Baar J, Horton TR, Kretzer AM, Bruns TD. 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist* 143: 409–418.
- Bahram M, Köljal U, Kohout P. 2013. Ectomycorrhizal fungi of exotic pine plantations in relation to native host trees in Iran: evidence of host range expansion by local symbionts to distantly related host taxa. *Mycorrhiza* 23: 11–19.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67: 1–48.
- Bennett JA, Maherali H, Reinhart KO, Lekberg Y, Hart MM, Klironomos J. 2017. Plant–soil feedbacks and mycorrhizal type influence temperate forest population dynamics. *Science* 355: 181–184.
- Blackburn TM, Pyšek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarošík V, Wilson JRU, Richardson DM. 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 333–339.
- Bradley BA, Blumenthal DM, Wilcove DS, Ziska LH. 2010. Predicting plant invasions in an era of global change. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 310–318.
- Briscoe C. 1959. Early results of mycorrhizal inoculation of pine in Puerto Rico. *Caribbean Forester* 2: 73–77.
- Bruns TD, Peay KG, Boynton PJ, Grubisha LC, Hynson NA, Nguyen NH, Rosenstock NP. 2009. Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 years of a 99 years spore burial experiment. *New Phytologist* 181: 463–470.
- Buscardo E, Rodríguez-Echeverría S, Martín MP, De Angelis P, Pereira JS, Freitas H. 2010. Impact of wildfire return interval on the ectomycorrhizal resistant propagules communities of a Mediterranean open forest. *Fungal Biology* 114: 628–636.
- Callaway RM, Cipollini D, Barto K, Thelen GC, Hallett SG, Prati D, Stinson K, Klironomos J. 2008. Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* 89: 1043–1055.
- Chu-Chou M, Grace LJ. 1988. Mycorrhizal fungi of radiata pine in different forests of the North and South Islands in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 883–886.
- Collier FA, Bidartondo MI. 2009. Waiting for fungi: the ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal of Ecology* 97: 950–963.
- Danielson RM. 1984. Ectomycorrhizal associations in jack pine stands in northeastern Alberta. *Canadian Journal of Botany* 62: 932–939.
- Dickie IA, Bolstridge N, Cooper JA, Peltzer DA. 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 475–484.
- Dickie IA, Bufford JL, Cobb RC, Grelet G, Hulme PE, Klironomos J, Makiola A, Nu MA, Pringle A, Thrall PH *et al.* 2017. The emerging science of linked plant–fungal invasions. *New Phytologist* 215: 1314–1332.
- Dickie IA, Nuñez MA, Pringle A, Lebel T, Tourtellot SG, Johnston PR. 2016. Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biological Invasions* 18: 3383–3395.
- Dickie IA, St John MG, Yeates GW, Morse CW, Bonner KI, Orwin K, Peltzer DA. 2014. Belowground legacies of *Pinus contorta* invasion and removal result in multiple mechanisms of invasional meltdown. *AoB Plants* 6: 1–15.
- Engelmark O, Sjöberg K, Andersson B, Rosvall O, Ågren GI, Baker WL, Barklund P, Bjorkman C, Despain DG, Elfving B *et al.* 2001. Ecological effects and management aspects of an exotic tree species: the case of lodgepole pine in Sweden. *Forest Ecology and Management* 141: 3–13.
- Fries N. 1987. Ecological and evolutionary aspects of spore germination in the higher basidiomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 1–7.
- Galante TE, Horton TR, Swaney DP. 2011. 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field and modeling based study. *Mycologia* 103: 1175–1183.
- Gardes M, Bruns TD. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* 74: 1572–1583.
- Gardes M, Wong KKY, Fortin JA. 1990. Interactions between monokaryotic and dikaryotic isolates of *Laccaria bicolor* on roots of *Pinus banksiana*. *Symbiosis* 8: 233–250.
- Gehring CA, Theimer TC, Whitham TG, Keim P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of piñon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* 79: 1562–1572.
- Glassman SI, Peay KG, Talbot JM, Smith DP, Chung JA, Taylor JW, Vilgalys R, Bruns TD. 2015. A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: a quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern. *New Phytologist* 205: 1619–1631.
- Gundale MJ, Almeida JP, Wallander H, Wardle DA, Kardol P, Nilsson MC, Fajardo A, Pauchard A, Peltzer DA, Ruotsalainen S *et al.* 2016. Differences in endophyte communities of introduced trees depend on the phylogenetic relatedness of the receiving forest. *Journal of Ecology* 104: 1219–1232.
- Hallett SG. 2006. Dislocation from coevolved relationships: a unifying theory for plant invasion and naturalization? *Weed Science* 54: 282–290.
- Harrison XA. 2014. Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ* 2: e616.
- Hayward J, Horton TR, Nuñez MA. 2015a. Ectomycorrhizal fungal communities coinvasing with Pinaceae host plants in Argentina: gringos bajo el bosque. *New Phytologist* 208: 497–506.
- Hayward J, Horton TR, Pauchard A, Nuñez MA. 2015b. A single ectomycorrhizal fungal species can enable a *Pinus* invasion. *Ecology* 96: 1438–1444.
- Hiol H, Dixon RK, Curl EA. 1994. The feeding preference of mycophagous Collembola varies with the ectomycorrhizal symbiont. *Mycorrhiza* 5: 99–103.
- Horton TR. 2006. The number of nuclei in basidiospores of 63 species of ectomycorrhizal Homobasidiomycetes. *Mycologia* 98: 233–238.
- Horton TR. 2017. Spore dispersal in ectomycorrhizal fungi at fine and regional scales. In: Tedersoo L, ed. *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. New York, NY, USA: Springer International Publishing, 61–78.
- Horton TR, Cázares E, Bruns TD. 1998. Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8: 11–18.
- Hynson NA, Merckx VSFT, Perry BA, Treseder KK. 2013. Identities and distributions of the co-invasing ectomycorrhizal fungal symbionts of exotic pines in the Hawaiian Islands. *Biological Invasions* 15: 2373–2385.
- Ingold CT. 1971. *Fungal spores: their liberation and dispersal*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Ishida TA, Nara K, Tanaka M, Kinoshita A, Hogetsu T. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180: 491–500.
- Johnson CN. 1996. Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 503–507.
- Kawai M, Yamahara M, Ohta A. 2008. Bipolar incompatibility system of an ectomycorrhizal basidiomycete, *Rhizopogon rubescens*. *Mycorrhiza* 18: 205–210.
- Kennedy PG, Bruns TD. 2005. Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytologist* 166: 631–638.
- Klironomos JN. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* 417: 67–70.
- Kohout P, Sýkorová Z, Bahram M, Hadincová V, Albrechtová J, Tedersoo L, Vohník M. 2011. Ericaceous dwarf shrubs affect ectomycorrhizal fungal community of the invasive *Pinus strobus* and native *Pinus sylvestris* in a pot experiment. *Mycorrhiza* 21: 403–412.
- Kropp BR, Fortin JA. 1988. The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokaryons and reconstituted dikaryons of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 66: 289–294.
- Kulmatiski A, Beard KH, Stevens JR, Cobbold SM. 2008. Plant–soil feedbacks: a meta-analytical review. *Ecology Letters* 11: 980–992.
- Liao HL, Chen 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.
- Lilleskov EA, Bruns TD, Dawson TE, Camacho FJ. 2009. Water sources and controls on water-loss rates of epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps during summer drought. *New Phytologist* 182: 483–494.

- Maron JL, Klironomos J, Waller L, Callaway RM. 2014. Invasive plants escape from suppressive soil biota at regional scales. *Journal of Ecology* 102: 19–27.
- Marx DH, Ross EW. 1970. Aseptic synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* by basidiospores of *Thelephora terrestris*. *Canadian Journal of Botany* 48: 197–198.
- McNabb RFR. 1968. The Boletaceae of New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 6: 137–176.
- Menkis A, Vasiliauskas R, Taylor AFS, Stenlid J, Finlay R. 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16: 33–41.
- Miller SL, Torres P, McClean TM. 1993. Basidiospore viability and germination in ectomycorrhizal and saprotrophic basidiomycetes. *Mycological Research* 97: 141–149.
- Mitchell CE, Agrawal AA, Bever JD, Gilbert GS, Hufbauer RA, Klironomos JN, Maron JL, Morris WF, Parker IM, Power AG *et al.* 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecology Letters* 9: 726–740.
- Moeller HV, Dickie IA, Peltzer DA, Fukami T. 2015. Mycorrhizal co-invasion and novel interactions depend on neighborhood context. *Ecology* 96: 2336–2347.
- Mordecai EA. 2011. Pathogen impacts on plant communities: unifying theory, concepts, and empirical work. *Ecological Monographs* 81: 429–441.
- Nara K. 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytologist* 169: 169–178.
- Nara K. 2009. Spores of ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytologist* 181: 245–248.
- Nguyen NH, Hynson NA, Bruns TD. 2012. Stayin' alive: survival of mycorrhizal fungal propagules from 6 years old forest soil. *Fungal Ecology* 5: 741–746.
- Núñez MA, Chiuffo MC, Torres A, Paul T, Dimarco RD, Raal P, Policelli N, Moyano J, García RA, van Wilgen BW *et al.* 2017. Ecology and management of invasive Pinaceae around the world: progress and challenges. *Biological Invasions* 19: 3099–3120.
- Núñez MA, Dickie IA. 2014. Invasive belowground mutualists of woody plants. *Biological Invasions* 16: 645–661.
- Núñez MA, Hayward J, Horton TR, Amico GC, Dimarco RD, Barrios-García MN, Simberloff D. 2013. Exotic mammals disperse exotic fungi that promote invasion by exotic trees. *PLoS ONE* 8: 1–6.
- Núñez MA, Horton TR, Simberloff D. 2009. Lack of belowground mutualisms hinders Pinaceae invasions. *Ecology* 90: 2352–2359.
- Orlovich DA, Cairney JG. 2004. Ectomycorrhizal fungi in New Zealand: current perspectives and future directions. *New Zealand Journal of Botany* 42: 721–738.
- Peay KG. 2018. Timing of mutualist arrival has a greater effect on *Pinus muricata* seedling growth than interspecific competition. *Journal of Ecology* 106: 514–523.
- Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SE, Garbelotto M. 2007. A strong species-area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 10: 470–480.
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD. 2011. Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation? *Fungal Ecology* 4: 233–240.
- Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH, Bruns TD. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* 21: 4122–4136.
- Piattoni F, Ori F, Morara M, Iotti M, Zambonelli A. 2012. The role of wild boars in spore dispersal of hypogeous fungi. *Acta Mycologica* 47: 145–153.
- Pickles BJ, Simard SW. 2017. Mycorrhizal networks and forest resilience to drought. In: Johnson N, Gehring C, Jansa J, eds. *Mycorrhizal mediation of soil*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 319–339.
- Pringle A, Bever JD, Gardes M, Parrent JL, Rillig MC, Klironomos JN. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 699–715.
- R Core Team. 2018. *R: a language and environment for statistical computing*. Software v. 3.5.1. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. [WWW document] URL <http://www.r-project.org> [accessed 16 July 2018].
- Reinhart KO, Callaway RM. 2006. Soil biota and invasive plants. *New Phytologist* 170: 445–457.
- Richardson DM, Allsopp N, D'Antonio CM, Milton SJ, Rejmanek M. 2000. Plant invasions – the role of mutualism. *Biological Reviews* 75: 65–93.
- Richardson DM, Rejmanek M. 2011. Trees and shrubs as invasive alien species, a global review. *Diversity and Distributions* 17: 788–809.
- Rincón A, Santamaría BP, Ocaña L, Verdú M. 2014. Structure and phylogenetic diversity of post-fire ectomycorrhizal communities of maritime pine. *Mycorrhiza* 24: 131–141.
- Salgado Salomón ME, Barroetaña C, Rajchenberg M. 2011. Do pine plantations provide mycorrhizal inocula for seedlings establishment in grasslands from Patagonia, Argentina? *New Forests* 41: 191–205.
- Selosse MA, Richard F, He X, Simard SW. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution* 21: 621–628.
- Simberloff D. 2006. Invasional meltdown 6 years later: important phenomenon, unfortunate metaphor, or both? *Ecology Letters* 9: 912–919.
- Simberloff D, Martin JL, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, Courchamp F, Galil B, García-Berthou E, Pascal M *et al.* 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution* 28: 58–66.
- Simberloff D, Relva MA, Núñez MA. 2002. Gringos en el bosque: introduced tree invasion in a native *Nothofagus Austrocedrus* forest. *Biological Invasions* 4: 35–53.
- Simberloff D, Von Holle B. 1999. Positive interaction of nonindigenous species: invasional meltdown? *Biological Invasions* 1: 21–32.
- Talbot JM, Bruns TD, Taylor JW, Smith DP, Branco S, Glassman SI, Erlandson S, Vilgalys R, Liao H-L, Smith ME *et al.* 2014. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 111: 6341–6346.
- Taylor DL, Bruns TD. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* 8: 1837–1850.
- Tedesco L. 2017. Global biogeography and invasions of ectomycorrhizal plants: past, present and future. *Ecological Studies* 230: 469–531.
- Teste FP, Simard SW. 2008. Mycorrhizal networks and distance from mature trees alter patterns of competition and facilitation in dry Douglas-fir forests. *Oecologia* 158: 193–203.
- Traveset A, Richardson DM. 2014. Mutualistic interactions and biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45: 89–113.
- Treu R, Karst J, Randall M, Pec GJ, Cigan PW, Simard SW, Cooke JEK, Erbilgin N, Cahill JF. 2014. Decline of ectomycorrhizal fungi following a mountain pine beetle epidemic. *Ecology* 95: 1096–1103.
- Urcelay C, Longo S, Geml J, Tecco PA, Nouhra E. 2017. Co-invasive exotic pines and their ectomycorrhizal symbionts show capabilities for wide distance and altitudinal range expansion. *Fungal Ecology* 25: 50–58.
- Van Der Linde S, Suz LM, Orme CDL, Cox F, Andreae H, Asi E, Atkinson B, Benham S, Carroll C, Cools N *et al.* 2018. Environment and host as large-scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature* 558: 243–248.
- Van Der Putten WH, Klironomos JN, Wardle DA. 2007. Microbial ecology of biological invasions. *ISME Journal* 1: 28–37.
- Vellinga EC, Wolfe BE, Pringle A. 2009. Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181: 960–973.
- Walbert K, Ramsfield TD, Ridgway HJ, Jones EE. 2010. Ectomycorrhizal species associated with *Pinus radiata* in New Zealand including novel associations determined by molecular analysis. *Mycorrhiza* 20: 209–215.
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, Van Der Putten WH, Wall DH. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304: 1629–1633.
- Wood JR, Dickie IA, Moeller HV, Peltzer DA, Bonner KI, Rattray G, Wilmshurst JM. 2015. Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. *Journal of Ecology* 103: 121–129.