



¿Está *Amanita muscaria* invadiendo los bosques de *Nothofagus dombeyi* en Patagonia, Argentina?

Paula Victoria Giles

Directora: Dra. María Eugenia Salgado Salomón

Codirectora: Dra. Carolina Barroetaveña

Tesina presentada al Departamento de Ingeniería Forestal,

Facultad de Ingeniería,

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Requerimiento parcial para el otorgamiento del título de Ingeniero Forestal

Esquel, Marzo de 2023

Ingeniería Forestal

Ingeniería Forestal

Trabajo Final de Paula Victoria Giles

Presentado en Marzo de 2023

Título del trabajo: ¿Está *Amanita muscaria* invadiendo los bosques de *Nothofagus dombeyi* en Patagonia, Argentina?

Aprobada por los profesores guía:

Dra. María Eugenia Salgado Salomón (Directora)

Dra. Carolina Barroetaveña (Codirectora)

Nota obtenida por el Trabajo Final y su defensa:

Acepto que mi Trabajo Final sea parte de la colección de las bibliotecas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y que esta universidad permita consultar mi Trabajo Final a cualquier lector. También afirmo que el contenido de mi Trabajo Final es de mi autoría.

Paula Victoria Giles

RESUMEN DE LA TESINA DE GRADO DE

Paula Victoria Giles. 2023. ¿Está *Amanita muscaria* invadiendo los bosques de *Nothofagus dombeyi* en Patagonia, Argentina? 56 p.

Amanita muscaria es un hongo ectomicorrícico (EM) típicamente asociado a bosques templados de *Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Cedrus*, *Fagus*, *Castanea*, *Quercus* y *Betula* en el hemisferio norte. Sin embargo, su presencia ha sido reportada en bosques de *Nothofagus dombeyi* en los Parques Nacionales Nahuel Huapi (PNNH), Lago Puelo (PNLP) y Los Alerces (PNLA) de Argentina. Similares situaciones de presencia de esta especie ya se han registrado en bosques de Nothofagaceae en Oceanía y para un bosque de *Quercus humboldtii* en Colombia. En esta Tesina, se estudió la presencia de *A. muscaria* en bosques de *N. dombeyi* sin evidencia de Pinaceae, pero también, plantaciones donde hubo reportes de la especie. Para ello, se colectaron en 11 sitios basidiomas de *A. muscaria* y el suelo rizosférico en bosques de *N. dombeyi* y plantaciones de Pinaceae en todos los parches de *A. muscaria*. Los materiales fueron herborizados y se realizaron análisis morfológicos y moleculares comparativos de fructificaciones y morfotipos de *A. muscaria* presentes en bosques de *N. dombeyi* y plantaciones en Patagonia. Además, se llevó a cabo un ensayo de inoculación para determinar la efectividad y abundancia de *A. muscaria* al colonizar *N. dombeyi* de distintas edades, comparando la capacidad de dicha especie fúngica para colonizar plantines de *P. ponderosa* y se propusieron alternativas para el manejo y control de *A. muscaria* en bosques de *N. dombeyi* en PNL. El presente estudio demuestra que, sin lugar a dudas, *A. muscaria* está invadiendo los bosques de *N. dombeyi* dentro de las áreas protegidas de PNNH, PNL y PNLA, evidenciado por la presencia de basidiomas de la especie en sitios con ausencia de especies vegetales exóticas, confirmada además por presencia de morfotipos de *A. muscaria* determinados morfológica y molecularmente en sus raíces. Si bien la distribución de *A. muscaria* está aún circunscripta, en pequeños parches, podría avanzar comprometiendo la biodiversidad de áreas protegidas. La invasión de especies EM puede producir desplazamiento de especies fúngicas nativas causando la disminución de la regeneración del bosque nativo, procesos de maladaptación y cambios en la diversidad de la biota fúngica lo que significaría una gran pérdida de biodiversidad para estos ecosistemas forestales nativos, de gran valor paisajístico, ecológico y económico de Patagonia Argentina.

Palabras clave: ectomicorrizas, especies exóticas, maladaptación, especies nativas.

AN ABSTRACT OF THE UNDERGRADUATE THESIS OF

Paula Victoria Giles. 2023. Is *Amanita muscaria* invading *Nothofagus dombeyi* forests in Patagonia, Argentina? 56 p.

Amanita muscaria is an ectomycorrhizal fungus (EM) normally associated with temperate *Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Cedrus*, *Fagus*, *Castanea*, *Quercus* and *Betula* forests in the northern hemisphere. However, its presence has been reported in *Nothofagus dombeyi* forests in Nahuel Huapi (PNNH), Lago Puelo (PNLP) and Los Alerces (PNLA) National Parks of Argentina. In the same way, the presence of this species has already been reported in Nothofagaceae forests from Oceania and for a *Quercus humboldtii* forest in Colombia. The aim of this Thesis was to study the presence of *A. muscaria* in *N. dombeyi* forests not invaded by Pinaceae, but also, in plantations where the species was reported. For this, basidiomes of *A. muscaria* and rhizospheric soil samples were collected in all patches of *A. muscaria* derived from 11 sites of in *N. dombeyi* forests and Pinaceae plantations. The materials were herborized and comparative morphological and molecular analyzes of basidiome and morphotypes of *A. muscaria* present in *N. dombeyi* forests and Pinaceae plantations in Patagonia were performed. In addition, an inoculation bioassay was carried out to determine the efficacy and abundance of *A. muscaria* when colonizing *N. dombeyi* at different ages, comparing the capacity of this species to colonize *P. ponderosa* seedlings. In accordance, alternatives for management and control of *A. muscaria* in *N. dombeyi* forests in PNLP were proposed. The present study clearly demonstrates that *A. muscaria* is invading *N. dombeyi* forests located in the protected areas of PNNH, PNLP and PNLA. The results, evidenced the presence of *A. muscaria* basidiomes in sites without the presence of exotic plant species. In addition, *A. muscaria* morphotypes were detected morphologically and molecularly, in *N. dombeyi* roots. Although the distribution of *A. muscaria* is still circumscribed, in small patches, it could further invade, compromising the biodiversity of the natural protected areas. The invasion of EM species can cause native fungal species displacement, which may cause a decrease in native forest regeneration, maladaptation processes, and changes in the fungal biodiversity, leading to a great biodiversity loss of these native forest ecosystems considered, of great landscape, ecological and economic value of Argentinian Patagonia.

Key words: ectomycorrhizae, exotic species, maladaptation, native species.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ESTADO DEL ARTE	4
Amanita muscaria	4
Caracterización taxonómica	4
Caracterización morfológica	4
Mitología y simbolismo	8
Toxicidad en humanos y consideraciones con la fauna nativa.....	9
Invasiones fúngicas EM y su impacto en bosques nativos	10
OBJETIVOS	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Trabajo de campo.....	14
Análisis de laboratorio	19
Análisis estadístico	29
Medidas de manejo aplicadas en PN Lago Puelo	29
RESULTADOS	30
Características de sitio y fenología de <i>A. muscaria</i> en bosques de <i>N. dombeyi</i>	30
Descripción morfológica de las colecciones de <i>A. muscaria</i>	30
Caracterización del morfotipo EM de <i>A. muscaria</i> asociado a <i>N. dombeyi</i>	34
Identificación molecular	36
Bioensayo.....	39
Medidas de manejo aplicadas en PN Lago Puelo	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sitios de Muestreo	17
Tabla 2. Secuencias incluidas en el análisis filogenético	22
Tabla 3. Datos analíticos y procedencia de las semillas utilizadas para el bioensayo ...	27
Tabla 4. Dimensiones de las distintas colecciones de <i>A. muscaria</i>	32
Tabla 5. Colecciones de los morfotipos de <i>A. muscaria</i>	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Basidioma de <i>A. muscaria</i>	5
Figura 2. Morfología de <i>A. muscaria</i>	6
Figura 3. Restos de <i>A. muscaria</i> consumidos por zorro colorado	10
Figura 4. Mapa de los sitios de muestreo	15
Figura 5. Sitios de muestreo	16
Figura 6. Esporas de las colecciones de los basidiomas colectados	32
Figura 7. Análisis de la dispersión considerando ancho y largo de las esporas de las colecciones de <i>A. muscaria</i>	33
Figura 8. Análisis de conglomerados. Clasificación de las colecciones según ancho y longitud de las esporas.....	34
Figura 9. Morfotipos de <i>A. muscaria</i> asociados a <i>N. dombeyi</i>	35
Figura 10. Anatomía de los morfotipos de <i>A. muscaria</i>	36
Figura 11. Filograma de <i>A. muscaria</i>	38

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Leticia y Daniel, por la posibilidad que me dieron de estudiar, por su apoyo, por creer siempre en mí. A mi hermanita Rocío, por mostrarse orgullosa de su hermana “casi Ingeniera”. Los amo!!!

A mi directora Dra. María Eugenia Salgado Salomón, por confiar en mí, enseñarme, dedicarme horas y horas de su tiempo, aconsejarme, por tantas charlas académicas y otras no tanto..., por contenerme en momentos de crisis, por tantas carcajadas. Mil gracias querida Maru.

A mi codirectora Dra. Carolina Barroetaveña por su paciencia, sus correcciones, sugerencias y apoyo constante.

A la Administración de Parques Nacionales por permitirme realizar muestreos en Parque Nacional Nahuel Huapi, Parque Nacional Lago Puelo y Parque Nacional Los Alerces.

A la Analista Ecológica Dalma Raymundi, al Dr. Ernesto Juan y a los Guardaparques Marco Taraborrelli y Marcelo Pietrobon por su ayuda y buena predisposición en las salidas a PNLP.

Al Sr. Carlos Belmar y Sra. Inés Belmar por permitirme ingresar a su propiedad en busca de muestras.

Al CONICET y CIN por el apoyo económico para este proyecto. MINCYT, Proyecto PICT Grupo en Formación N° PICT 2020-SERIE A-02235.

A la Téc. Uni. For. Teresa Schinelli e Ing. For. Mario Guzman por facilitarme las semillas para el bioensayo.

A la Dra. María Belén Pildain por su gran ayuda en los análisis filogenéticos.

A la Lic. Carolina Arguiano, la Lic. Mariana Martínez y Dr. Andrés de Errasti por su ayuda en el laboratorio y salidas de campo.

A la Diseñadora Industrial Sabina Pérez Fernández por su gran ayuda con el diseño y la estética de la presentación.

A la Ing. Agr. Virginia Alonso, Lic. Carla García Nowak, Lic. Marín Izquierdo, Guardaparque Florencia Pautasso y Sr. Jonatan Uribe por su ayuda en la colecta de muestras.

A Candela, compañera de carrera y amiga, por tantas horas de trabajos y estudio en equipo. Y a Luqui, que nos acompañó desde la pancita.

A mis amigos, por escucharme y aguantar mis tantos “hoy no puedo juntarme, tengo que estudiar”, por alentarme siempre.

Muchas gracias a todos...

INTRODUCCIÓN

Los Andes Patagónicos en Argentina presentan más de 5 millones de hectáreas (ha) de bosques nativos e implantados, que comprenden las formaciones boscosas nativas de Nothofagaceae Kuprian., Araucariaceae Henkel & W. Hochst. y Cupressaceae Rich. ex Bartl., y también exóticas con varias especies principalmente de Pinaceae Spreng. ex F. Rudolphi (Dimitri & Orfila 1985). Los bosques de Nothofagaceae y especies asociadas ocupan una superficie de más de 3,2 millones de ha (Mohr Bell et al. 2019) y comprenden las especies *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser, *N. antarctica* (G.Forst.) Oerst, el siempre verde *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst, *Lophozonia obliqua* (Mirb.) Heenan & Smissen, *L. alpina* (Poepp. & Endl.) Heenan & Smissen, y *N. betuloides* (Mirb.) Oerst. que forman extensos bosques monoespecíficos y mixtos (Donoso Zegers 2006), siendo todos ellos ectomicorrícicos (EM) obligados (Singer & Morello 1960; Valenzuela Flores 1993; Fontenla et al. 1998). Por otro lado, la icónica *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch y las especies de Cupressaceae, *Fitzroya cupressoides* (Molina) I.M. Johnst, *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic.Serm & Bizzarri y *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin, son todas micorrícico-arbusculares (AM) obligadas (Fontenla et al. 1998). Existen, por otra parte, más de 120.000 ha forestadas con especies exóticas, principalmente *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *P. contorta* var. *latifolia* (Engelmann) Critchfield, *P. contorta* var. *murrayana* (Balfour) Engelmann (Beale & Clodoveo Ortiz 2013; Peri et al. 2016; MinAgrI 2017), *Salix* L. spp. y *Populus* L. spp., además de 2.200.000 ha con aptitudes para ser forestadas (Bava et al. 2006; MinAgrI 2017). Esta introducción de árboles en un nuevo ambiente ha causado la introducción de especies EM en distintos ecosistemas del mundo (Barroetaveña et al. 2005, 2006, 2007, 2010; Dickie et al. 2010; Salgado Salomón et al. 2011, 2013, 2018a; Hynson et al. 2013; Bogar et al. 2015; Moeller et al. 2015; Hayward et al. 2015). Por otro lado, la pérdida y fragmentación de estos bosques nativos, debido a la extracción de madera, pastoreo excesivo, plagas o enfermedades e incendios, alteran su diversidad biológica y eso incluye las asociaciones micorrícicas (Bengtsson et al. 2003; Sapsford et al. 2021).

Las EM son un tipo de asociación simbiótica mutualista entre hongos pertenecientes a las divisiones Ascomycetes y Basidiomycetes y las raíces de plantas que predominan en regiones de climas templados y fríos (Allen et al. 1995; Smith & Read 2008). Se desarrollan, principalmente, en especies leñosas y se caracterizan por la

presencia de un manto, de la red de Hartig y de micelio extramatricial (Smith & Read 2008). El manto es un tejido fúngico pseudoparenquimático que cubre externamente a las raíces absorbentes finas, que induce modificaciones morfológicas, produciendo distintos patrones de alargamiento, bifurcaciones o agrupamientos que son específicos entre cada especie de hongo y cada planta asociada, denominado morfotipo (Smith & Read 2008). La red de Hartig es la estructura que se forma cuando las hifas se desarrollan entre las células corticales (Smith & Read 2008). Del manto surgen hifas que colonizan el suelo y forman la red extramatricial y los rizomorfos, que cumplen una función de exploración a distancia y absorción (Meyer 1973). La principal función de las EM es el intercambio de nutrientes, agua y fotosintatos (Pérez-Moreno & Read 2004). En el caso del hongo recibe productos provenientes de la fotosíntesis de la planta asociada, mientras que la planta recibe nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno a través de las hifas del hongo (Pérez-Moreno & Read 2004). Además, las EM son ecológicamente cruciales en los hábitats terrestres, mejorando la fertilidad de los suelos (Allen 1991; Tibbett & Sanders 2002; Selosse & Roy 2009), aumentando la tolerancia al estrés hídrico y salino de las plantas (Comandini et al. 2006; Aguilar-Aguilar et al. 2009), como así también a los metales pesados (Sousa et al. 2012; Kalucka & Jagodzinski 2016).

Muchas especies de hongos EM se han reportado como específicos de la especie vegetal asociada (Borowicz & Juliano 1991; Galán & Moreno 1998; Newton & Haigh 1998), entendiendo este comportamiento como una consecuencia de la coevolución (Zhou & Hide 2001). Sin embargo, algunos investigadores no han encontrado especificidad en los hongos EM de algunas coníferas (Horton & Bruns 1998), reportando su asociación con un rango comparativamente amplio de especies vegetales (Malajczuk et al. 1982; Lee & Kim 1987). Esta falta de especificidad implica que dichas especies EM tendrían la posibilidad de ampliar eventualmente su rango de hospedantes con facilidad.

Amanita muscaria (L.) Lam. es un hongo EM que forma naturalmente asociaciones en bosques maduros de *Pinus* L., *Abies* Mill, *Picea* Link, *Cedrus* Trew, *Fagus* L., *Castanea* Mill, *Quercus* L. y *Betula* L. en el hemisferio norte (Nara 2008). La especie ha sido reportada como presente en la región Patagonia previamente asociada a plantaciones de *Pinus* spp. (Barroetaveña 2006; Lorenzo 2018). Sin embargo, reportes de guardaparques y pobladores de los Parques Nacionales Los Alerces, Lago Puelo (Chubut, Argentina) y Nahuel Huapi (Río Negro, Argentina) indican que *A. muscaria* podría estar formando una asociación con *N. dombeyi* (De Errasti com. Pers.). Situaciones similares

de presencia de esta especie ya han sido reportadas para los bosques de Nothofagaceae en Nueva Zelanda, Tasmania y Australia (Stevenson 1962; Fuhrer & Robinson 1992; Johnston et al. 1998; Dunk 2002; Hall et al. 2003; Fuhrer 2005; May 2006; Robinson 2010), y en *Q. humboldtii* Bonpl. en Colombia (Vargas et al. 2019) donde podría estar desplazando a las especies EM nativas (Fuhrer 2005). Este mismo fenómeno en los bosques andino patagónicos, podría significar una gran pérdida de biodiversidad para estos ecosistemas forestales nativos, de gran valor paisajístico, ecológico y económico de la Patagonia Argentina.

ESTADO DEL ARTE

Amanita muscaria

Caracterización taxonómica

Reino: Fungi;

Filo: Basidiomycota;

Clase: Agaricomycetes;

Orden: Agaricales;

Familia: Amanitaceae;

Género: *Amanita*;

Especie: *Amanita muscaria* (L.) Lam. (1783)

Caracterización morfológica

Este hongo crece en el suelo formando una red de filamentos microscópicos, llamados hifas que se asocian con las raíces de los árboles, formando EM. Parte de esas hifas, en otoño, forman una estructura reproductiva llamada basidioma, esporoma, cuerpo fructífero o seta (Fig. 1) (Lorenzo 2018).

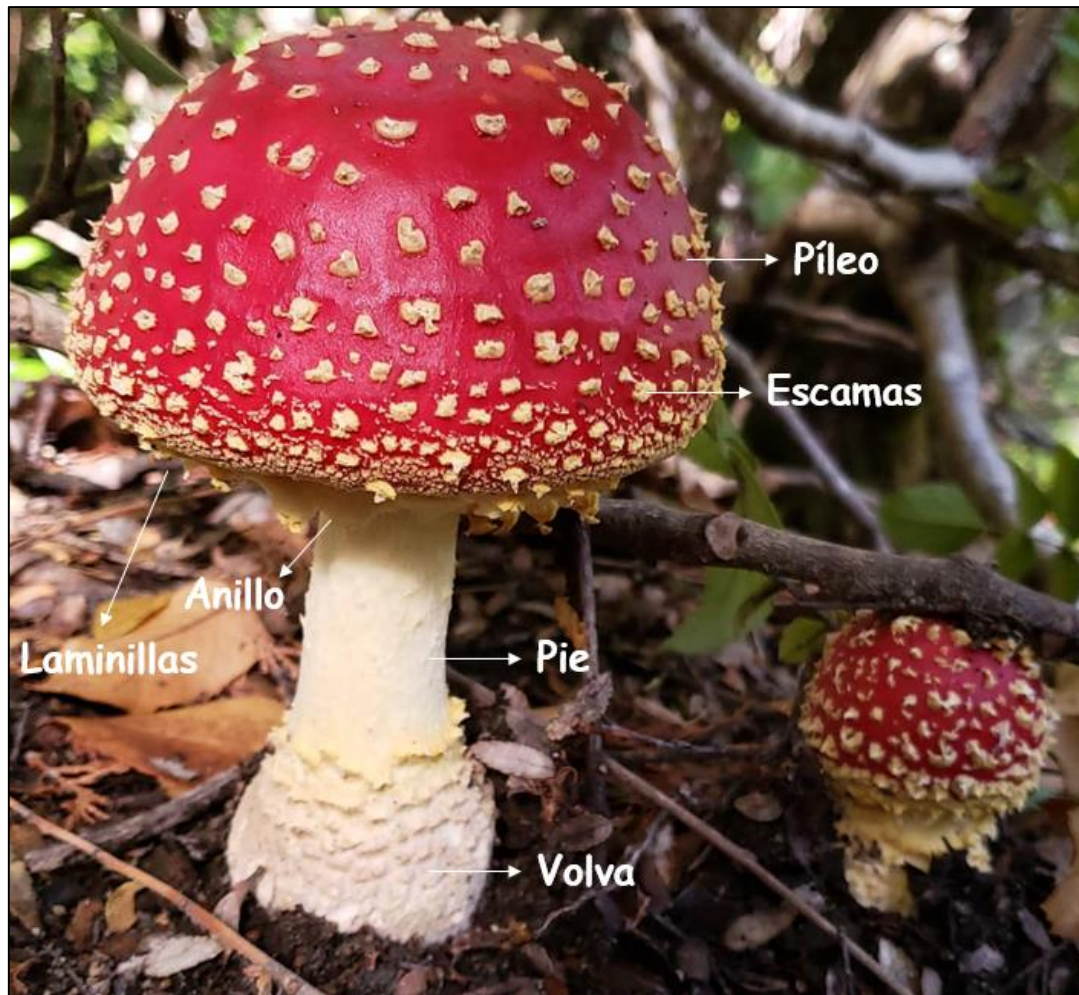


Figura 1. Basidioma de *A. muscaria*. Foto: Dalma Raymundi.

Macroscopía: presenta un píleo de 9-12 cm de diámetro, que es globoso en estadios tempranos y está cubierto por un velo universal (Jenkins & Petersen 1976), el cual es una membrana más o menos gruesa que cubre todo el primordio del cuerpo fructífero típicamente en forma de huevo (Fig. 2 a) (Furci 2007; Guiñón 2014; Lorenzo 2018). A medida que se expande, el píleo se hace hemisférico y finalmente, en la madurez, es aplanado o levemente deprimido en el centro, con un margen más o menos estriado (Fig. 2 b) (Jenkins & Petersen 1976). La cutícula es separable, húmeda, viscosa y brillante, de color rojo vivo homogéneo, pero también anaranjado rojizo o amarillo anaranjado especialmente en los márgenes (muchas veces dependiendo del lugar donde el cuerpo fructífero está creciendo). El píleo está recubierto de restos del velo universal en forma de granulaciones o escamas blancas a amarillentas, que forman círculos más o menos concéntricos (Jenkins & Petersen 1976; Lorenzo 2018).

La carne es blanca en el píleo, pero amarillenta debajo de la cutícula, sin olor ni sabor; después de secarse se oscurece (de color crema a pardo claro) y toma un olor acre y poco agradable (Lorenzo 2018).

El estípite es blanco, cilíndrico y fácilmente separable del píleo, con base bulbosa y una volva típicamente fragmentada cuyos restos se disponen en varios círculos concéntricos. El anillo es membranoso, muy amplio, y de color blanco a amarillento (Fig. 2 c). Las laminillas son libres a anexas, de color blanco amarillento (Fig. 2 d) (Jenkins & Petersen 1976; Furci 2007; Guiñón 2014; Lorenzo 2018).

Microscopía: esporada blanca (Fig. 2 e). Esporas ovoides a elipsoidales, de 6.9-7.7 x 9.2-10 μm , de pared delgada, lisas, hialinas, y no amiloides (Jenkins & Petersen 1976). Los basidios son claviformes, 37-60 x 8-10 μm y tetraspóricos, pleurocistidios ausentes (Daniele et al. 2005; Guiñón 2014).



Figura 2. Morfología de *A. muscaria*. a) Ejemplar joven de *A. muscaria* en forma de huevo, b) Ejemplar adulto de *A. muscaria*, c) Anillo de color amarillento luego de pasadas unas horas la colecta, d) Laminillas y d) Característica esporada blanca.

Los morfotipos de *A. muscaria* asociados con *Picea*, *Cedrus* y *Pinus* han sido descritos por Agerer & Rambold (2004-2023) y Daniele et al. (2005). Los morfotipos descritos con Fagales Engler por su parte, incluyen a la asociación con *Betula*, y con *Lophozonia cunninghamii* (Hook.) Heenan & Smissen descriptas a continuación.

Ectomicorriza de A. muscaria asociada a Betula (Agerer & Rambold 2004-2023):

Ramificación monopodial pinnada o monopodial piramidal. Puntas de 0,22-0,54 mm de diámetro, curvadas en un plano, sinuosas o tortuosas y cilíndricas. Normalmente es de color blanquecino tornándose a ocre y marrones amarillentos o castaños cuando senescente. Textura lisa, pero puede contener detalles granulados. Hifas emanantes ausentes. Rizomorfos concolor con el manto, poco frecuentes restringidos a un punto. Elementos emanantes tipo rizomorfos o cistidios localizados desde la superficie del manto. Manto externo plectenquimatoso con arreglo tipo anillo, septos simples y células dilatadas. Manto interno plectenquimatoso a pseudoparenquimatoso con agrupamientos de células que no siguen ningún patrón. Cistidios fusiformes o globulares que pueden tener septos simples o fibulados en la célula basal. Textura lisa con contenidos finamente granulados.

Ectomicorriza de A. muscaria asociada a Lophozonia cunninghamii (Dunk et al. 2011):

Ramificación típicamente monopodial piramidal que se ramifica de forma variable, desde muy ramificado a pocas ramificaciones dispersas. Las puntas son derechas a curvadas en un plano o ligeramente tortuosas, color blanco con moteado marrón pálido y textura finamente afieltrada. La longitud varía entre de 0,20-1,65 mm mientras que el ancho varía entre 0,17-0,28 mm, los morfotipos suelen tener alrededor de 1 mm de largo y 0,2 mm de ancho. Posee agrupamientos miceliales blancos de 25-100 μm de diámetro desde la superficie del manto restringidas en un punto. Los rizomorfos se componen de hifas compactas lisas e indiferenciadas de ancho variable (1-6,5 μm). Estas hifas son hialinas con paredes delgadas y a menudo contienen contenidos celulares granulares finos. Las uniones hifales son raras y no se observaron anastomosis. No posee hifas emanantes pero ocasionalmente se observaron hifas tipo cistidios cortos. Estas hifas son variadas en

forma, formadas por una sola célula fusiforme, curvadas en un plano con septos simples. No fueron observadas fíbulas. Manto externo prosénquima neto denso. Manto interno sinénquima irregular no intertrabado, ocasionalmente tiene células elongadas o ligeramente intertrabadas.

Mitología y simbolismo

Amanita muscaria tiene una larga historia de uso en diversas actividades humanas. Documentos históricos, como pinturas murales, tallados en madera y esculturas sugieren que las propiedades psicotrópicas de este hongo han sido conocidas desde la antigüedad y que ha sido utilizada con fines religiosos, sociales y terapéuticos en todos los continentes, particularmente en Asia (Michelot & Melendez-Howell 2003). Por ejemplo, representaciones de este hongo han sido reportadas en pinturas rupestres policromadas en el Sahara datadas en el Paleolítico (9000-7000 a. C.) (Michelot & Melendez-Howell 2003); por más de 4000 años fue el ingrediente de una bebida ritual sagrada y alucinógena llamada “*soma*” en India e Irán, mientras que los chamanes siberianos lo consumían, solo o en un extracto con agua, leche de reno o con el jugo de varias plantas dulces para viajar a otra realidad (Schultes & Hofmann 1979). En países de Norteamérica y Mesoamérica, *A. muscaria* también ha sido utilizado como un hongo alucinógeno sagrado en prácticas chamánicas (Schultes & Hofmann 1979). Según una teoría que surgió en el siglo XVIII, los *berserker* (siglos VIII-XI), guerreros escandinavos profesionales, se sumían en una especie de trance de furia casi incontrolable, eran insensibles al dolor y si estaban heridos en la batalla no lo sentían y seguían adelante (Hinojosa Becerra & Marín-Gutiérrez 2017; Kamienski & López 2017). En 1784, Samuel Lorenzo Ødman, tras comparar las descripciones del *berserkgang* («furor berserker») con los relatos acerca del uso de hongos tóxicos por parte de las tribus siberianas, en especial los koriak, llegó a la conclusión de que ambos se comportaban de manera similar, y propuso que los *berserkers* debían de inducirse ese estado mediante la ingesta de este hongo (Kamienski & López 2017).

Amanita muscaria es probablemente uno de los hongos más conocido por su vistosa apariencia y ha aparecido en numerosas historias de cuentos fantásticos tales como Los Pitufos, o el videojuego Super Mario Bros. También han aparecido en diversas películas y en literatura. Algunos ejemplos son Alicia en el País de las Maravillas (1865)

de Lewis Carroll, Hereward, Last of the English (1866) de Charles Kingsley y The Documents in the Case (1930) de Dorothy Sayers (Crundwell 1987).

Toxicidad en humanos y consideraciones con la fauna nativa

Ha sido utilizada, mezclada con leche, para matar a las moscas, de ahí su nombre “matamoscas o agárico de la mosca”. Es una especie tóxica que contiene compuestos con acción insecticida y narcótica (Furci 2007; Lorenzo 2018). Aunque no es mortal, se han citado algunos casos fatales por consumo de grandes cantidades de basidiomas. Los tóxicos se localizan en todas las partes del cuerpo fructífero, por lo que quitarle el pie antes de consumirla, no evita la intoxicación (Lorenzo 2018). Contiene los alcaloides psicoactivos muscarina, ácido iboténico y muscimol (Rampolli et al. 2021). Estas dos últimas sustancias actúan como neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC), siendo el muscimol el agente responsable de la mayoría de los síntomas, que comienzan de 30 minutos a 2 horas después de la ingesta (Rampolli et al. 2021). La manifestación clínica relacionada con la ingestión se caracteriza por síntomas del SNC como confusión, mareos, agitación, ataxia, cansancio y cambios en la percepción visual y auditiva (Michelot & Melendez-Howell 2003; Lorenzo 2018; Rampolli et al. 2021). Las náuseas, los vómitos y la diarrea son poco frecuentes (Michelot & Melendez-Howell 2003; Rampolli et al. 2021). En intoxicaciones extremadamente graves, puede haber coma y, en casos raros, insuficiencia circulatoria y respiratoria que conduce a la muerte (Rampolli et al. 2021).

Debido a su toxicidad, también debe tenerse especial cuidado con animales. Se ha reportado intoxicación en perros y gatos que pueden ser fatales (Beug & Shaw 2009; Romano et al. 2019). Esto puede depender del tamaño de éstos y de la cantidad de los basidiomas consumidos, ya que la toxicidad se mide en términos de cantidad de toxina por kg de peso corporal; así un pequeño perro o gato que come un basidioma termina con una concentración mucho más alta que un humano (Beug & Shaw 2009; NAMA 2023).

Otros animales reportados como consumidores de *A. muscaria* son los renos o caribúes (*Rangifer tarandus*, L. 1758), muy comunes en Siberia y América del Norte, que actúan como si estuvieran ebrios, corren sin rumbo haciendo ruidos extraños, y sacudiendo las cabezas (Arnold 2016). Dentro de la familia de los cérvidos nativos del bosque andino patagónico, se encuentran el huemul (*Hippocamelus bisulcus*, Molina

1782) y pudú (*Pudu puda*, Molina 1782), ambos en constante declinación poblacional, categorizados por UICN y SAyDS-SAREM como En Peligro de Extinción y Vulnerable, respectivamente (Black-Decima et al. 2016; Silva-Rodríguez et al. 2016; Ballari et al. 2019). En el caso de que consuman este hongo su vulnerabilidad aumentaría, debido a que los vuelve presa fácil de otros animales o de humanos. En uno de los muestreos realizados para este trabajo, en el Parque Nacional Los Alerces, pudimos observar un zorro colorado (*Lycalopex culpaeus*, Molina 1782) que había consumido una gran cantidad de sombreros de *A. muscaria* (Fig. 3), actuando como si estuviera perdido, corriendo de manera no habitual y sin notar nuestra presencia.



Figura 3. Restos de *A. muscaria* consumidos por zorro colorado.

Invasiones fúngicas EM y su impacto en bosques nativos

Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre los hongos y las raíces de las plantas, por lo tanto, ambos dependen de esta asociación, ya que sin ella no podrían sobrevivir (Smith & Read 2008). Esto significa que, si se encuentran fructificaciones de una especie EM en ambientes naturales, efectivamente existe una asociación micorrícica con alguna de las especies vegetales presentes (Bagley & Orlovich 2004; Smith & Read 2008). Si bien la presencia de basidiomas claramente refleja la presencia de micelio asociado a raíces de alguna especie vegetal, su ausencia no puede ser interpretada como ausencia de micelio; por otra parte, es posible la colonización de raíces en sitios distantes

al lugar de aparición de los basidiomas (Gardes & Bruns 1996). Por ello, el censo de basidiomas es parcialmente informativo, provee información limitada acerca de la dinámica de invasión de hongos EM (Bagley & Orlovich 2004), pero debiera ser complementado con análisis moleculares de ápices radicales siempre que sea posible.

En Patagonia, se ha reportado que algunos hongos EM como *Hebeloma hiemale* Bres. y *Wilcoxina* Chin S. Yang & Korf sp., comúnmente asociados a *P. menziesii* (Cline et al. 2005; Barroetaveña et al. 2007) y que no habían sido reportados previamente para los bosques de Nothofagaceae, se asociaron con plantines de *N. antarctica* (Salgado Salomón et al. 2018a). A su vez, *Inocybe sindonia* (Fr.) P. Karst. y *Amanita rubescens* Pers., típicamente asociadas a bosques de *P. menziesii* y *P. radiata* D. Don respectivamente, podrían estar formando una asociación con bosques de *N. dombeyi* y *N. pumilio*, dado que fueron reportadas, aunque sin confirmación molecular, en áreas protegidas con invasión evidente de coníferas exóticas (Romano & Kuhar 2017). La invasión de especies EM puede producir desplazamiento de especies fúngicas nativas causando la disminución de la regeneración del bosque nativo (Inderjit et al. 2006; Mummey & Rillig 2006; Zhang et al. 2007; Rudgers & Orr 2009; Salgado Salomón et al. 2013, 2018a), procesos de maladaptación (Klironomos 2003; Kranabetter et al. 2015) y cambios en la diversidad de la biota fúngica (Dickie & Johnstone 2008; Dunk et al. 2011; Policelli et al. 2019).

En Oceanía, particularmente en Australia, *A. muscaria* ha sido introducida junto con la introducción de *P. radiata* y probablemente con otras especies vegetales como robles, álamos y abedules, entre 1920-1940 y en la región de Victoria en 1960 (Stevenson 1962). En 1992, basidiomas de *A. muscaria* fueron observados en un bosque mixto de *Nothofagus-Eucalyptus* en el Estado de Noojee, Victoria, sin árboles de *P. radiata* u otras especies vegetales reconocidas a la vista (Fuhrer & Robinson 1992). Diez años después, el hongo todavía estaba fructificando en el sitio, y observaciones posteriores en los últimos cinco años indicaron que su área de distribución se estaba extendiendo lentamente, lo que sugirió que *A. muscaria* se había establecido con éxito en una asociación micorrícica con al menos una de las especies nativas en el área (Dunk et al. 2011). Luego de la colecta de raíces y análisis moleculares se determinó que *A. muscaria* se asoció con *L. cunninghamii* (Dunk et al. 2011). Según Dunk et al. (2011), no existen registros de presencia de *P. radiata* u otros árboles introducidos en este sitio en el pasado, y los especímenes más cercanos de *P. radiata* se ubicaron aproximadamente 1700 m al

oeste a lo largo de la vía de acceso. El sitio se encontraba expuesto a una perturbación considerable, incluyendo la tala continua de eucaliptos, y situado en medio de un camping con suelo de grava. Evaluando los tiempos entre la introducción de árboles exóticos al avistaje de los primeros basidiomas se puede inferir que el cambio de especie vegetal asociada entre *Pinus* y *Lophozonia* se ha logrado en un tiempo relativamente corto, lo que plantea preocupaciones para el futuro (Dunk et al. 2011).

Entre los procesos asociados a la invasión, la maladaptación es uno de los que genera más preocupación en esta situación de posible invasión de *N. dombeyi*. Se define como una disminución relativa en la aptitud (supervivencia, crecimiento, nutrición), de las especies vegetales asociadas (Kranabetter et al. 2015). Además, las EM compiten por los recursos de las raíces (planta asociada, fuente de carbono) y del suelo (nutrientes y agua) (Kennedy et al. 2007). En el caso de *A. muscaria* que ha invadido bosques de Nothofagaceae en Oceanía, producen una alta densidad de basidiomas cuando está presente en estos bosques, por lo que es lógico suponer que está capturando una porción significativa de los recursos disponibles, haciendo que estos no estén disponibles para los hongos nativos (Dickie et al. 2008).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Contribuir al conocimiento de las especies invasoras de hongos ectomicorrícicos en bosques de *Nothofagus* de Patagonia Argentina.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de la especie exótica *A. muscaria* formando ectomicorrizas con *N. dombeyi*.
2. Realizar análisis morfológicos y moleculares comparativos de fructificaciones y morfotipos de *A. muscaria* presentes en bosques de *N. dombeyi* y plantaciones de *Pinus* spp. en Patagonia.
3. Analizar la efectividad y abundancia de *A. muscaria* al invadir plantines de *N. dombeyi*.
4. Proponer alternativas para el manejo y control de *A. muscaria* en bosques de *N. dombeyi*, discutiendo posibles vías de invasión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

Durante los otoños de 2020, 2021 y 2022 se colectaron 18 colecciones de basidiomas de *A. muscaria* en bosques de *N. dombeyi* y plantaciones de *Pinus*, también conformadas por ejemplares de *Picea*, *Pseudotsuga*, *Sequoia*, *Betula* y *Quercus* en las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut. A cada colección, se le realizaron descripciones en fresco, se tomaron fotos y se referenciaron con puntos de GPS en el sitio de colecta (Fig. 4 y 5, Tabla 1). Todos los sitios de muestreo corresponden al Distrito del Bosque Caducifolio, Provincia Subantártica, Dominio Subantártico (Cabrera & Willink 1980).

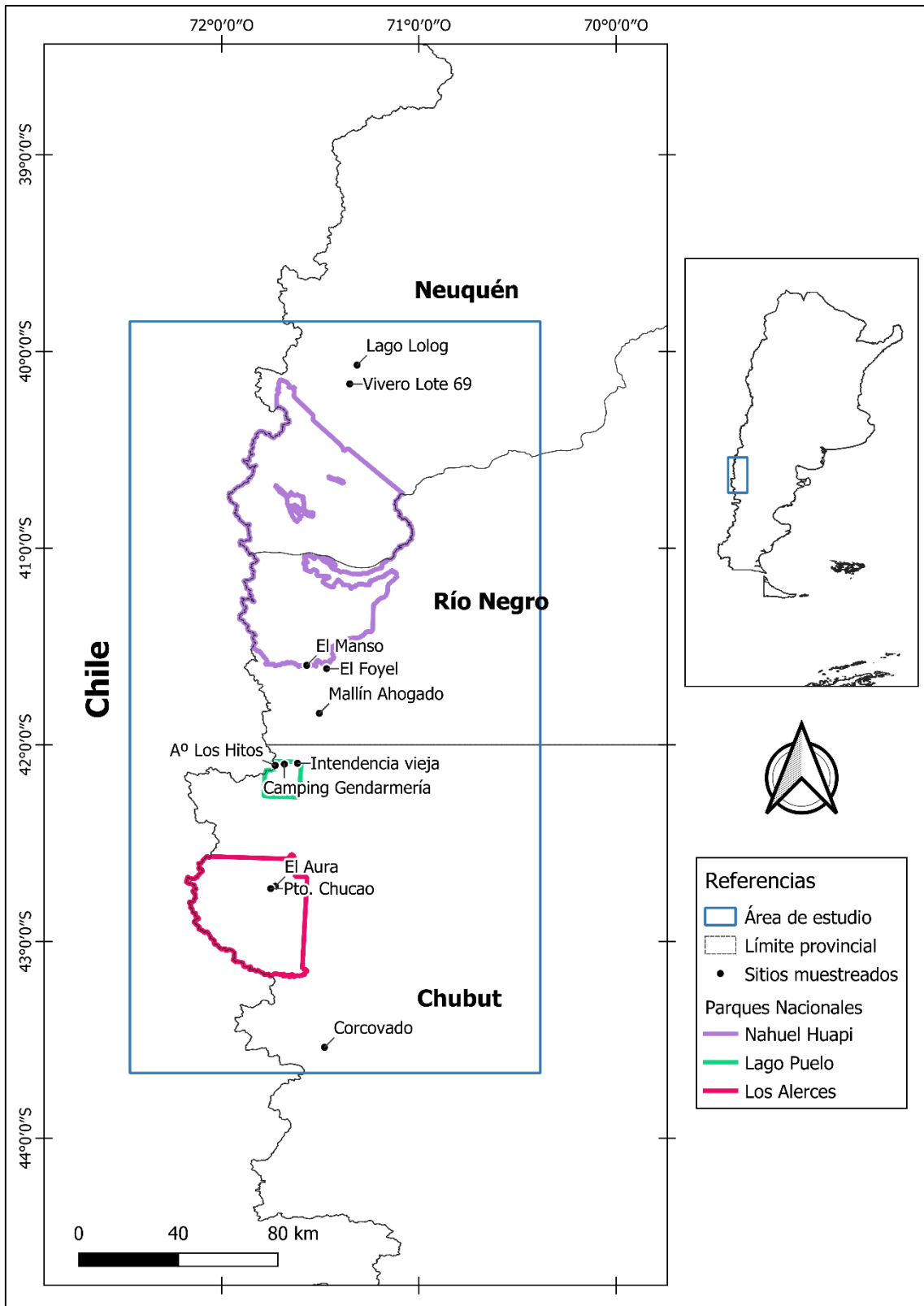


Figura 4. Mapa de los sitios de muestreo.



Figura 5. Sitios de muestreo. a) y b) Lago Verde, c) Corcovado, d) y e) Los Hitos, f) y g) El Manso, h) e i) Intendencia Vieja, j) y k) Camping Gendarmería, l) y m) Camino pasarela Pto. Chucao. Las flechas blancas indican la ubicación de algunos de los basidiomas colectados.

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo.

Colección	Código HCFC	Sitio¹	Lat/Long	Fecha de colecta	Especies vegetales presentes²	Observaciones
A1	3155	Lago Verde-PNLA	42° 43.123` S 71° 43.670` O	25/4/2020	PIPO, NODO, AUCH, ARCH, LOHI, LUAP, MACH	
A2	3156	El Aura-PNLA	42° 43.034` S 71° 43.705` O	25/4/2020	PIPO, LUAP, DIJU, MACH	
A3	3157	El Aura-PNLA	42° 43.040` S 71° 43.612` O	25/4/2020	PIPO, PRCE, LUAP, MACH	
A4	3158	Plantación camino a Corcovado	43°32'14.38" S 71°28'43.02" O	3/6/2020	PIRA, PIPO, ROEG	
A5	3159	Lago Verde-PNLA	42°43.123` S 71° 43.670` O	21/4/2021	PIPO, NODO, AUCH, ARCH, LOHI, MACH	
A6, A7, A8	3160, 3161, 3162	El Aura-PNLA	42° 43.129` S 71° 43.722` O	27/4/2021	PIRA, NODO, LOHI, ARCH, LUAP, AUCH	
A9	3163	A° Los Hitos-PNLP	42° 6'16.00" S 71°43'42.68" O	13/5/2021	NODO, LOHI, GEAV, GAMU, RHSP, MYNU, LUAP, AUCH	Área transitada por personas que utilizan una senda de montaña a orillas del arroyo Los Hitos y que conecta el sector de acceso con el límite internacional con Chile.

Colección	Código HCFC	Sitio ¹	Lat/Long	Fecha de colecta	Especies vegetales presentes ²	Observaciones
A10	3164	Lago Lolog	Sin datos	Abril-2021	PISP	
A11	3165	Vivero Lote 69	Sin datos	Abril-2021	PISP	
A12	3166	El Foyel	41° 36.743' S 71° 28.085' O	4/4/2022	PIRA	
A13	3167	El Manso-PNNH	41° 35.748' S 71° 34.134' O	4/4/2022	NODO	Área a orillas del río Manso.
A14	3168	Intendencia Vieja-PNLP	42° 05.616' S 071° 36.934' O	5/4/2022	SESP, PICE, PSME, LUAP	
A15	3169	Camping Gendarmería-PNLP	42° 05.964' S 71° 41.027' O	5/4/2022	NODO, LOHI, AUCH, GAMU, RHSP, ROEG	Sitio de acampe a orillas del Lago Puelo donde especies de los géneros <i>Pinus</i> , <i>Picea</i> y <i>Acer</i> han sido plantadas previamente a la creación del área protegida.
A16	3170	Camino pasarela Pto. Chucao-PNLA	42°43'49.86"S 71°45'5.64"O	3/5/2022	NODO, FICU	Sitio entre orilla del Lago Menéndez y sendero.
A17	3171	A° Los Hitos-PNLP	42° 6'16.00" S 71°43'42.68" O	19/4/2022	NODO, LOHI, GEAV, GAMU, RHSP, MYNU, LUAP, AUCH	
A18	3172	Mallín Ahogado	Sin datos	13/4/2022	PISP	

Sitios¹: PNNH: Parque Nacional Nahuel Huapi; PNLA: Parque Nacional Los Alerces, PNLP: Parque Nacional Lago Puelo. Especies presentes²: ARCH: *Aristotelia chilensis*; AUCH: *Austrocedrus chilensis*; BEPE: *Betula pendula*; DIJU: *Diostea juncea*; FICU: *Fitzroya cupressoides*; GAMU; *Gaultheria mucronata*; GEAV: *Gevuina avellano*; LOHI: *Lomatia hirsuta*; LUAP: *Luma apiculata*; MACH: *Maytenus chubutensis*; MYNU: *Myrteola nummularia*; NODO: *Nothofagus dombeyi*; PICE: *Picea* spp.; PIPO: *Pinus*

ponderosa; PIRA: *Pinus radiata*; PISP: *Pinus* spp.; PRCE: *Prunus cerasus*; PSME: *Pseudotsuga menziesii*; QUSP: *Quercus* spp.; RHSP: *Rhaphithamnus spinosus*; ROEG: *Rosa eglanteria*; SESP: *Sequoia* spp.

Cuando se observaron basidiomas de *A. muscaria* asociados a bosques de *N. dombeyi* sin presencia de especies exóticas se tomaron muestras de suelo con raíces asociadas, debajo del basidioma de *A. muscaria*. Se consideró ausencia de *especies exóticas* a sitios donde las especies vegetales exóticas ectomicorrícicas se encontraran a más de 5000 m o a más de 1000 m en caso de contarse una barrera natural como un río. Para una mayor representatividad de la muestra se tomaron muestras de suelo con pala de los primeros 10 cm de profundidad (zona donde se desarrollan la mayor cantidad de raicillas de las especies de *Nothofagus* Blume). Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno nuevas y llevadas al laboratorio de Microbiología Aplicada y Fitopatología del CIEFAP, donde fueron conservadas a 4°C hasta su posterior análisis.

Análisis de laboratorio

a) Identificación y descripción morfo-anatómica de morfotipos:

Se cuantificaron los morfotipos presentes en las raicillas, según la metodología descrita por Goodman et al. (1996). Cada muestra de suelo fue lavada con agua corriente sobre un tamiz de 2 mm para coleccionar las raíces finas de *N. dombeyi*, que se colocaron en bandejas con agua corriente para ser analizadas bajo lupa estereoscópica Zeiss Stemi 508. Los morfotipos fueron caracterizados según el tamaño, arquitectura, color, aspecto de la peridermis, presencia de hifas emanantes y rizomorfos, y se realizaron preparados microscópicos en agua destilada para evaluar la anatomía considerando las características de la red de Hartig, forma y dimensiones de las hifas, presencia y tipo de septos y presencia de concreciones de cristales sobre las paredes u ornamentaciones (Agerer 1994, Agerer & Rambold 2004-2023; Goodman et al. 1996; Dunk et al. 2011).

Los morfotipos se preservaron a -18°C para posteriores análisis moleculares en el Cepario del Área de Fitopatología y Microbiología Aplicada del CIEFAP.

b) Identificación morfológica de basidiomas:

Se describieron las características morfológicas y reacciones químicas (KOH 3%, Sulfovainillina) de los basidiomas colectados (Largent 1986; Largent et al. 1986). Los caracteres microscópicos taxonómicamente relevantes (esporas, basidios, pileipellis) se

visualizaron en KOH (3%) y Floxina, Azul de Algodón y/o Melzer, utilizando un microscopio Leica Wild M3Z. Para la estadística de las esporas, las mismas fueron colectadas de la cortina del estípite, que es donde se encuentran las esporas maduras. Todas las mediciones se llevaron a cabo en números estadísticamente relevantes ($n > 60$) (Salgado Salomón et al. 2018b). Colores de las estructuras fúngicas y EM fueron determinados con tablas de colores (Mearz & Paul 1930).

Todos los materiales colectados se herborizaron en estufa de aire forzado a 45°C y se depositaron en el Herbario (HCFC) del Área de Fitopatología y Microbiología Aplicada del CIEFAP.

La nomenclatura y clasificación de las especies identificadas corresponden a la citada en la base de datos del Index Fungorum (www.indexfungorum.org).

c) Análisis moleculares:

Para la extracción de ADN de los basidiomas se tomaron 2-3 laminillas de cada colección, sin evidencias de contaminación y se utilizó el método CTAB según Salgado Salomón et al. (2018b).

Se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN_r utilizando los primers ITS4 e ITS5. Para la reacción de PCR se incluyeron: 12,5 µL de GoTaq polymerase master mix (Promega, Madison, WI, USA), 0,5 µL de primer ITS1F 10 µM, 0,5 µL de primer ITS4 10 µM, 0,5 µL de BSA, 10 µL de agua estéril libre de nucleasas y 1 µL de ADN. El volumen final de la reacción fue de 25 µL (adaptado de Salgado Salomón et al. 2018b). Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador My Cycler™ (BioRad). Para los basidiomas el protocolo de amplificación utilizado para la región ITS fue adaptado del descrito por Salgado Salomón et al. (2017) e incluyó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido por 41 ciclos de annealing a 94°C por 45 s, a 54°C por 45 s, desnaturalización a 72°C por 1 min, con una elongación final de 10 min a 72°C.

Para la extracción de ADN de los morfotipos se seleccionaron 2 a 5 puntas de raíces representativas de cada uno para cada sitio, cuidando que estuvieran turgentes, sin evidencias de senescencia a fin de evitar contaminación con otros hongos. Fueron lavados dos veces con agua destilada estéril y conservados a -18°C. La extracción de ADN siguió el método CTAB según Salgado Salomón et al. (2018a). Se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN_r utilizando los primers ITS1F e ITS4 (Gardes & Bruns 1993; White

et al. 1990). Para la reacción de PCR se incluyeron: 12,5 µL de GoTaq polymerase master mix (Promega, Madison, WI, USA), 0,5 µL de primer ITS4 10 µM, 0,5 µL de primer ITS5 10 µM, 0,5 µL de BSA, 8 µL de agua estéril libre de nucleasas y 2,5 µL de ADN. El volumen final de la reacción fue de 25 µL (adaptado de Salgado Salomón et al. 2018a).

El protocolo de amplificación utilizado para la región ITS fue adaptado de Salgado Salomón et al. (2017), e incluyó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido por 50 ciclos de annealing a 94°C por 45 s, a 54°C por 45 s, desnaturalización a 72°C por 1 min, con una elongación final de 10 min a 72°C.

d) Secuenciación:

Todos los productos PCR obtenidos se separaron en un gel al 1% de agarosa (p/v) teñido con Gel-Red™ (Biotium, California, EEUU) y se visualizaron con iluminación UV. Se secuenciaron de manera tercerizada, en un secuenciador automático de capilares modelo ABI3130 (Applied Biosystems) en CERELA (Tucumán, Argentina).

e) Análisis filogenético de las secuencias:

Para corregir, alinear y realizar análisis filogenéticos de todas las secuencias obtenidas en este trabajo (basidiomas y morfotipos) se realizó la comparación “Blastn” de Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La matriz de alineamiento se conformó con secuencias de trabajos de referencia (Tabla 2) (Oda et al. 1999, 2004; Geml et al. 2006, 2008; Dunk et al. 2011). El outgroup utilizado corresponde a la secuencia de *A. ceciliae* LEM950069 AB015694.

Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron inicialmente editadas con BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Mientras que el alineamiento se realizó utilizando la estrategia L-INS-i implementada en MAFFT v 7.0 (Katohy Standley 2013) y ajustado manualmente usando el software MEGA vX (Kumar et al. 2018). El conjunto de datos ITS final quedó compuesto por 70 secuencias y 638 caracteres incluyendo gaps. Se determinaron los mejores modelos de evolución utilizando el criterio AIC (Akaike 1974) implementado en jModelTest (Posada 2008) y fue GTR+G. El análisis del conjunto de datos se realizó utilizando Maximum Likelihood usando RAxML 7.2.8 (Stamatakis 2014). Los valores de Bootstrap en el árbol más probable fueron calculados con 1000 repeticiones.

Las secuencias producidas en esta tesina con calidad inferior a 350 bp y de mala calidad no fueron utilizadas en los análisis filogenéticos.

El trabajo de laboratorio y análisis correspondientes a esta sección fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular del Área de Fitopatología y Microbiología Aplicada del CIEFAP.

Tabla 2. Secuencias incluidas en el análisis filogenético.

Especie	Sitio	Número de acceso de GenBank	Tipo de muestra	Cita
<i>Amanita muscaria</i>	Plantación camino a Corcovado	OQ324766	Basidioma	Esta tesina
<i>Amanita muscaria</i>	El Aura-PNLA	OQ324769	Basidioma	Esta tesina
<i>Amanita muscaria</i>	A° Los Hitos-PNLP	OQ324770	Basidioma	Esta tesina
<i>Amanita muscaria</i>	El Manso-PNNH	OQ324774	Basidioma	Esta tesina
<i>Amanita muscaria</i>	Intendencia Vieja-PNLP	OQ324775	Basidioma	Esta tesina
<i>Amanita muscaria</i>	Mallín Ahogado	OQ324778	Basidioma	Esta tesina
<i>Amanita muscaria</i>	A° Los Hitos-PNLP	OQ324779	Morfotipo	Esta tesina
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>formosa</i>	Fairbanks, Alaska, EEUU	DQ060891	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Fairbanks, Alaska, EEUU	DQ060907	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>formosa</i>	Fairbanks, Alaska, EEUU	DQ060892	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Bonanza Creek LTER site, Alaska, EEUU	DQ060893	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>alba</i>	Cascade, Idaho, EEUU	AB080793	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>formosa</i>	Amador, California, EEUU	AB080795	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>formosa</i>	Piscataquis, Massachusetts, EEUU	AB080792	Basidioma	Oda et al. 2004

Especie	Sitio	Número de acceso GenBank	de de Tipo de muestra	Cita
<i>Amanita muscaria</i>	Hampshire, Massachusetts, EEUU	AB080788	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Hampshire, Massachusetts, EEUU	AB080789	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Chino-shi, Nagano, Japón	AB081296	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>formosa</i>	Alpine, California, EEUU	AB080794	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Sussex Co., New Jersey, EEUU	EU071899	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i>	Monmouth Co., New Jersey, EEUU	EU071917	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i>	Bronx, Nueva York, EEUU	AB080790	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Lawrence, Massachusetts, EEUU	AB080791	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Cape May Co., New Jersey, EEUU	EU071901	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Dovre, Oppland, Noruega	AB080780	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Nordre-land, Oppland, Noruega	AB080782	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Gjøvik, Oppland, Noruega	AB080781	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Nome, Alaska, EEUU	DQ060909	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Eagle Summit, Alaska, EEUU	DQ060905	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Dalton Highway, mile 122, Alaska, EEUU	DQ060904	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Chino-shi, Nagano, Japón	AB096050	Basidioma	Oda et al. 2004

Especie	Sitio	Número de acceso de GenBank	Tipo de muestra	Cita
<i>Amanita muscaria</i>	Chino-shi, Nagano, Japón	AB096049	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Chino-shi, Nagano, Japón	AB081296	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>alba</i>	Fairbanks, Alaska, EEUU	DQ060896	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Nome, Alaska, EEUU	DQ060903	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Nome, Alaska, EEUU	DQ060898	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>alba</i>	North Pole, Alaska, EEUU	DQ060899	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>formosa</i>	North Pole, Alaska, EEUU	DQ060900	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Juneau, Alaska, USA	DQ060906	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Dalton Highway, mile 122, Alaska, EEUU	DQ060897	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>regalis</i>	Denali National Park, Alaska, EEUU	DQ060908	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Denali National Park, Alaska, EEUU	DQ060901	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Victoria, Australia	EU236711	Basidioma	Dunk et al. 2011
<i>Amanita muscaria</i>	Queenstown, Nueva Zelanda	AB096052	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>alba</i>	Denali National Park, Alaska, EEUU	DQ060895	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Gdynia, Polonia	AB080983	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Surrey, Inglaterra, Reino Unido	AB080779	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Aomori-shi, Aomori, Japón	AB080980	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Kitakoma-gun, Yamanashi, Japón	AB080981	Basidioma	Oda et al. 2004

Especie	Sitio	Número de acceso de GenBank	Tipo de muestra	Cita
<i>Amanita muscaria</i>	Kitakoma-gun, Yamanashi, Japón	AB080982	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Kiso-gun, Nagano, Japón	AB081294	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Ohno-gun, Gifu, Japón	AB081295	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Ohno-gun, Gifu, Japón	AB096048	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Surrey, Inglaterra, Reino Unido	AB080778	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Hampshire, Inglaterra, Reino Unido	AB080777	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Gdansk, Polonia	AB080984	Basidioma	Oda et al. 2004
<i>Amanita muscaria</i>	Victoria, Australia	EU236713	Morfotipo	Dunk et al. 2011
<i>Amanita muscaria</i>	Victoria, Australia	GQ914918	Morfotipo	Dunk et al. 2011
<i>Amanita muscaria</i>	Victoria, Australia	EU236714	Morfotipo	Dunk et al. 2011
<i>Amanita muscaria</i>	Nome, Alaska, EEUU	DQ060902	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Juneau, Alaska, EEUU	DQ060910	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i> . var. <i>formosa</i>	Juneau, Alaska, EEUU	DQ060894	Cepa	Geml et al. 2006
<i>Amanita muscaria</i>	Sussex Co., New Jersey, EEUU	EU071926	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i>	Harrison Co., Mississippi, EEUU	EU071888	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i>	Santa Cruz Island, California, EEUU	EU071959	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i>	Santa Cruz Island, California, EEUU	EU071958	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i>	Aomori-shi, Aomori, Japón	AB096051	Basidioma	Oda et al. 2004

Especie	Sitio	Número de acceso de GenBank	Tipo de muestra	Cita
<i>Amanita muscaria</i>	Santa Cruz Island, California, EEUU	EU071962	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita muscaria</i>	Santa Cruz Island, California, EEUU	EU071961	Cepa	Geml et al. 2008
<i>Amanita pseudoporphyria</i>	Midorogaike, Kyoto-shi, Japón	AB015702	Basidioma	Oda et al. 1999
<i>Amanita ceciliae</i>	Kamigamo, Kyoto-shi, Japón	AB015694	Basidioma	Oda et al. 1999

f) Instalación de bioensayos

Para determinar la efectividad de *A. muscaria* al colonizar *N. dombeyi* de distintas edades, se realizaron ensayos de inoculación comparando la capacidad de dicha especie fúngica para colonizar plantines de *P. ponderosa*, con suspensión de esporas de *A. muscaria*.

Ensayo 1: Plántulas

Obtención de los plantines axénicos: se utilizaron semillas de calidad comercial (Tabla 3) de *P. ponderosa*. y *N. dombeyi*.

Tabla 3. Datos analíticos y procedencia de las semillas utilizadas para el bioensayo.

Especie	Procedencia	Cosecha	Poder germinativo	Pureza	Cantidad de semillas por kilo
<i>Pinus ponderosa</i>	Campo Experimental INTA Trevelin	2019	78%	99%	17.196
<i>Nothofagus dombeyi</i>	Subida del coihue	2020	Sin datos	Sin datos	Sin datos

Las semillas fueron remojadas durante 48 hs. y estratificadas durante 45 días (entre el 10/08/20 al 30/09/20) para *N. dombeyi* y 28 días (entre el 11/05/20 al 10/06/20) para *P. ponderosa* con lavados en agua corriente cada 4 días a 4°C (Willan 1991; Schinelli Casares 2012).

Se realizó esterilización superficial de las semillas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%: *N. dombeyi* 5' y para el *P. ponderosa* 10', seguido de 3 lavados posteriores de 5' c/u con agua destilada. La germinación se realizó en sustrato estéril de pumicita esterilizadas (3 autoclavadas consecutivas con intervalos de 36 hs., a 120°C, 1 Atm, 30') (siembra *P. ponderosa* 15/09/20 y *N. dombeyi* 20/10/20). Las plántulas se obtuvieron en una cámara de crecimiento a 17/19°C, 48-55% de humedad relativa del aire; 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad con 1400 lux de la radiación durante 30 días.

Se trasplantaron 40 plantines (20 de *P. ponderosa* y 20 de *N. dombeyi*) en tubetes plásticos de 250 cm³ esterilizados (con solución de hipoclorito de sodio-agua destilada 1:5) en suelo de bosque de *N. dombeyi* esterilizado (3 autoclavadas consecutivas con intervalos de 36 hs., a 120°C, 1 Atm, 30'). Como control se colocaron adicionalmente 10 plantines por especie en suelo esterilizado mezclado de todos los tratamientos de muestreo (en autoclave, a 1,2 Atm durante 30 min) mezclado (1:1 v/v) con pumicita esterilizada (en estufa de aire forzado durante 48 hs a 120 °C) (van der Heijden et al. 1998) con el fin de verificar la posible contaminación con inóculo a través de riego o de otras fuentes.

Todas las herramientas de trabajo utilizadas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio-agua 1:5.

Los plantines fueron conservados con condiciones de luz natural, humedad y temperaturas apropiadas durante 7 meses en cámara de crecimiento acondicionada para tal fin; el agua de riego provenía de red natural hasta su posterior inoculación.

Inoculación con *A. muscaria*: se obtuvieron basidiomas de *A. muscaria* asociados a coníferas exóticas en la zona de Lago Verde (42° 43.123` S 71° 43.670` O). Para la preparación del inóculo se utilizaron 60 gr. de laminillas secas re-hidratadas (previamente deshidratadas en estufa a 40°C por 48 hs inmediatamente después de la colecta), y trituradas con un mixer en 500 ml. de agua destilada. La dosis de inoculación (aplicada el 3 de junio de 2021) consistió en 8×10^6 esporas totales, con un porcentaje promedio de esporas viables de 62.08% (analizadas siguiendo la metodología de tinción con Bromuro de tetrazolio propuesta en Bassani et al. 2013). Se las dejó crecer en una cámara de crecimiento a 17/19°C, 48-55% de humedad relativa del aire; 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad con 1400 lux de la radiación durante 3 meses. El bioensayo incluyó dos tratamientos con dos especies forestales, y sus respectivos controles que fueron inoculados con agua sin material fúngico. Todos los tratamientos incluyeron 10 plantines de 7 meses de cada especie.

Ensayo 2: Plantines de 6 años

Obtención de los plantines: se utilizaron plantines de 6 años de *N. dombeyi* producidos en el “Vivero Niños del Lago” ubicado en Villa Futalaufquen.

Preparación del inóculo: se obtuvieron basidiomas de *A. muscaria* asociados a coníferas exóticas en la zona de la Intendencia vieja de Lago Puelo (42° 05.616` S 71° 36.934` O), durante los meses de otoño de 2022. Para la preparación del inóculo se utilizaron 22 gr. de laminillas secas re-hidratadas y trituradas en 400 ml. de agua destilada. La dosis de inoculación (aplicada el 6 de julio de 2022) consistió en 4×10^6 esporas totales, con un porcentaje promedio de esporas viables de 65.15% determinado de la misma manera que en el apartado Ensayo 1. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento en las mismas condiciones anteriormente descriptas por 5 meses.

Análisis de los bioensayos

Se analizaron los sistemas radicales completos de los plantines de cada ensayo. De los mismos, se recolectaron raíces frescas que se lavaron cuidadosamente con agua corriente, colocándolas luego en bandejas con agua para su posterior observación bajo lupa. La abundancia se estableció utilizando la metodología descrita por Brundrett et al. (1996) que cuantifica el porcentaje de puntas micorrizadas (PM) sobre el total de puntas, evaluando el total de las raicillas del sistema radical.

El porcentaje de micorrización total (PM) sobre la muestra fue calculada de la siguiente manera:

$$PM (\%) = (\text{puntas micorrizadas} / \text{total de puntas}) \times 100$$

Análisis estadístico

Las diferencias en el tamaño de las colecciones de esporas se analizarán mediante un análisis de conglomerados con el método de promedio ponderado y tipo de distancia Euclídea², con un nivel de significancia del 0,05 con el paquete estadístico Infostat para Windows versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011). Los gráficos de dispersión de ancho y largo de las esporas y QQ-Plots se realizaron con el paquete estadístico R (R Core Team 2019).

Medidas de manejo aplicadas en PN Lago Puelo

Durante los muestreos realizados para el presente trabajo, en áreas menores a 0,5 ha en Los Hitos y Camping Gendarmería, se realizaron medidas de manejo de mínima invasión con la colaboración de los Guardaparques durante las temporadas de otoño 2021 y 2022. Las medidas de manejo consistieron en cosecha de basidiomas en todos los parches de *A. muscaria* y disrupción de la red miceliar por debajo de la fructificación con una pala pequeña, tipo pala de jardín. La efectividad de estas medidas se evaluó contabilizando la abundancia de basidiomas antes y después de la intervención.

RESULTADOS

Características de sitio y fenología de *A. muscaria* en bosques de *N. dombeyi*

Se encontraron fructificaciones de *A. muscaria* creciendo en bosque de *N. dombeyi*, sin evidencia de especies vegetales exóticas cercanas en El Manso (PNNH), Los Hitos y Camping Gendarmería (PNLP) y pasarela camino a Puerto Chucao (PNLA). Estos sitios comparten un mismo patrón, todos se encuentran expuestos a un alto grado de disturbio antrópico, debido a que son áreas transitadas y en algunos sitios hubo incendios forestales con posteriores tareas de reacondicionamiento, con presencia de suelos sueltos, lindantes a cursos de agua y senderos rocosos.

El Manso constituye un área con ejemplares de *N. dombeyi* muy longevos, a orillas del río Manso. Cruzando el río hay una plantación de *P. radiata* (a más de 1000 m) y algunos ejemplares de *Quercus* spp. y *B. pendula*. Los Hitos es un área transitada por personas que utilizan una senda de montaña a orillas del arroyo Los Hitos, se encuentra en el límite internacional con Chile y presenta un bosque dominado por *N. dombeyi* acompañado por *Lomatia hirsuta* Diels ex J.F.Macbr., *A. chilensis*, *Gevuina avellana* Molina, *Luma apiculata* (DC.) Burret, *Gaultheria mucronata* (L.f.) Hook. & Arn., *Berberis darwinii* Hook., *Rhaphithamnus spinosus* (Juss.) Moldenke y *Myrteola nummularia* (Poir.) O. Berg. El Camping Gendarmería es un sitio de acampe a orillas del Lago Puelo donde especies de los géneros *Pinus*, *Picea* y *Acer* L. han sido plantadas previamente a la creación del área protegida. En esta área predomina *N. dombeyi* junto con *A. chilensis*, *L. hirsuta* y *L. apiculata* y especies arbustivas como *B. darwinii*, *G. mucronata* y *R. spinosus*. La pasarela camino a Puerto Chucao es un área con presencia de ejemplares de *N. dombeyi* junto a *F. cupressoides*, a orillas del Lago Menéndez y sendero.

La época de fructificación de los basidiomas de *A. muscaria* fue durante los primeros días de abril a finales de mayo, coincidiendo con la temporada de otoño donde se concentran parte de las precipitaciones del año.

Descripción morfológica de las colecciones de *A. muscaria*

Los basidiomas encontrados en plantaciones y en bosque nativo presentaron las siguientes características macroscópicas: píleo convexo-globoso en estadios tempranos volviéndose aplanado en estadios maduros, con margen liso a levemente incurvado;

cubierto de resto de velo universal; olor y sabor levemente fúngico casi indetectable. Laminillas libres a adnexas, muy próximas y de color blanco cremoso (9 A 1). Pie cilíndrico, inserción concéntrica, consistencia corchosa, blanco a amarillento, bulboso en la base, rodeado de una volva tipo taza; con presencia de anillo en la parte superior, membranoso y blanco a amarillo. Esporada blanca (1 A 1).

Las diferencias morfológicas entre basidiomas de *A. muscaria* encontrados en plantaciones de pino y en bosque nativo fueron las siguientes: en los primeros, el diámetro promedio del píleo y la altura máxima promedio de la fructificación fue de 30 cm y 25 cm, y presentaron píleo de color rojo vivo y brillante (2 L 12); en los segundos el diámetro promedio del píleo y la altura máxima promedio de la fructificación fue de 17 cm y 20 cm respectivamente, mientras que el píleo presentó un color anaranjado rojizo (3 A-B 12).

Otra de las diferencias encontradas entre las colecciones de *A. muscaria* fue el tamaño de las esporas (Fig. 6, Tabla 4). Análisis estadísticos indicaron que existen diferencias en la longitud y ancho de estas, teniendo una mayor dispersión en ancho que en largo (Fig. 7). Adicionalmente, el análisis de conglomerados mostró 4 grupos, donde el Grupo 1 y 4 presentaron las mayores y menores dimensiones respectivamente. Mientras que el Grupo 2 y 3 mostraron dimensiones intermedias, siendo las primeras de menor ancho (Fig. 8). Sin embargo, el análisis de las secuencias incluidas dentro del grupo 2 y 3 mostraron que son genéticamente idénticas mientras que de los grupos 1 y 4 no se obtuvieron secuencias de buena calidad.

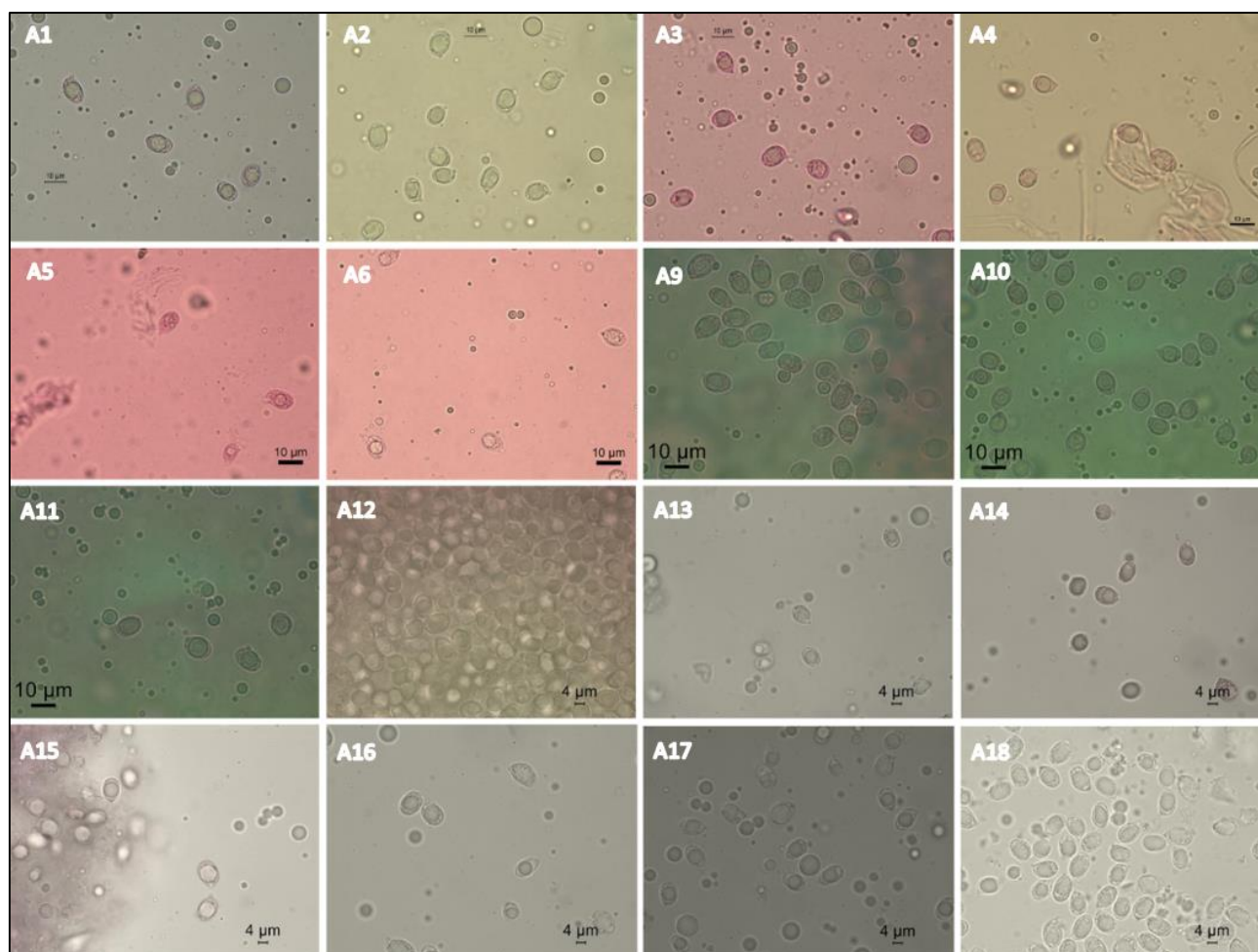


Figura 6. Esporas de las colecciones de los basidiomas colectados.

Tabla 4. Dimensiones de las distintas colecciones de *A. muscaria*.

Muestra	N	Largo				Ancho			
		Media	DE	Max	Min	Media	DE	Max	Min
A1	148	11,93	0,87	14,27	9,15	8,54	0,64	10,71	6,65
A2	156	12,00	0,92	14,27	9,84	8,49	0,78	10,71	6,46
A3	153	11,48	0,98	14,27	8,61	8,47	0,75	10,71	6,25
A4	153	11,19	0,84	14,11	9,09	7,94	0,60	9,48	6,29
A5	60	9,78	1,05	12,46	7,17	6,43	0,62	8,48	5,13
A6	103	9,99	0,87	12,41	8,13	6,82	0,51	8,10	5,38
A7*	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Muestra	N	Largo				Ancho			
		Media	DE	Max	Min	Media	DE	Max	Min
A8*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	125	11,32	0,83	13,23	8,95	7,71	0,74	9,82	5,77
A10	135	10,09	0,81	12,88	8,59	7,16	0,50	8,41	5,82
A11	128	11,40	0,89	14,24	8,78	8,00	0,60	9,81	6,58
A12	147	11,09	0,80	13,10	9,12	7,34	0,63	9,08	6,03
A13	75	10,44	1,00	12,56	8,62	7,15	0,75	9,28	5,45
A14	111	10,51	0,84	13,38	8,48	7,61	0,74	9,21	5,74
A15	61	11,05	0,86	13,19	8,50	7,44	0,81	9,10	5,45
A16	75	12,34	0,98	15,35	10,24	8,08	0,76	10,67	6,45
A17	147	11,23	1,01	14,40	8,49	7,40	0,69	9,42	5,68
A18	153	11,14	0,77	12,98	8,44	7,52	0,54	8,81	6,22

Las colecciones marcadas con * correspondieron a basidiomas inmaduros por lo cual no fueron incluidos en el análisis de esporas.

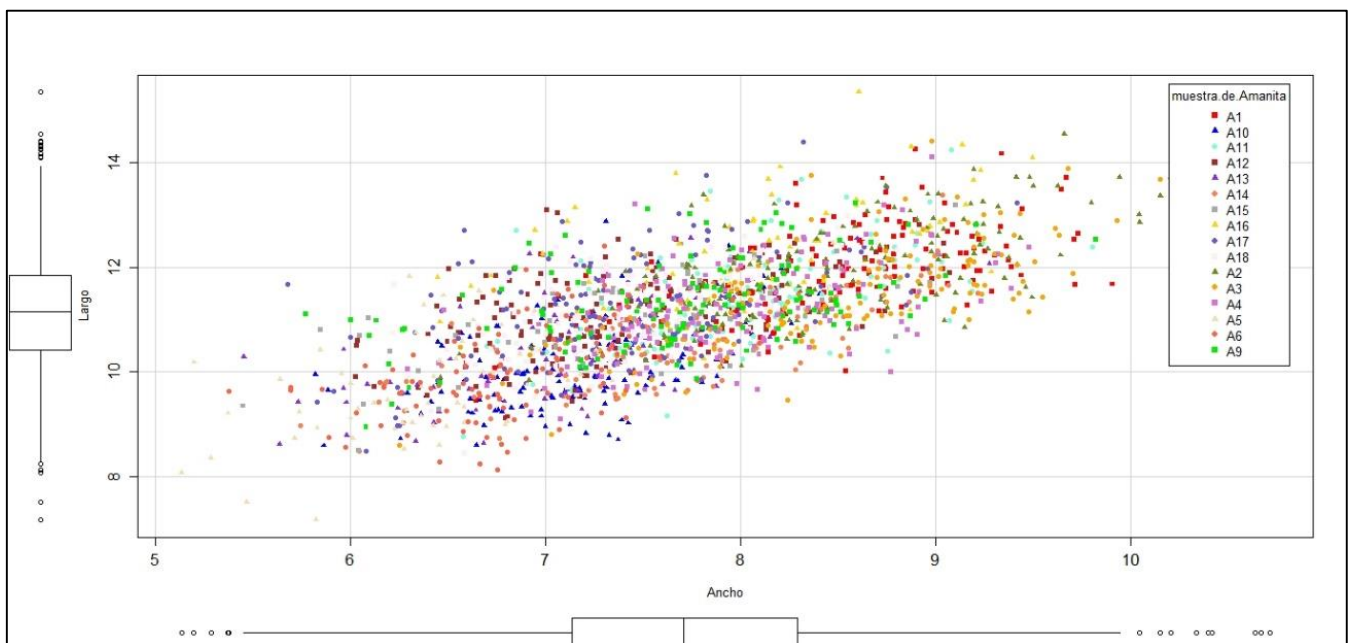


Figura 7. Análisis de la dispersión considerando ancho y largo de las esporas de las colecciones de *A. muscaria*.

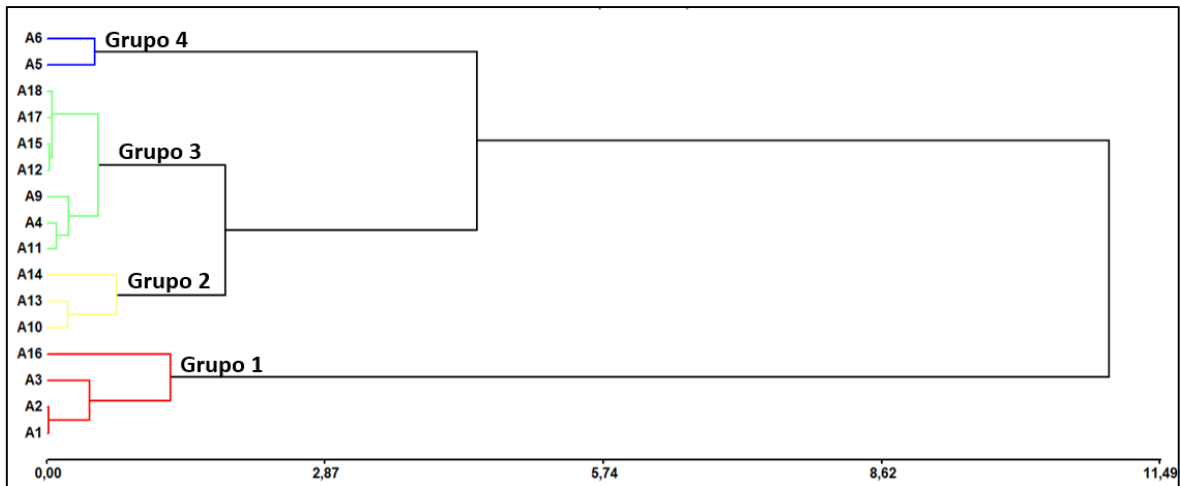


Figura 8. Análisis de conglomerados. Clasificación de las colecciones según ancho y longitud de las esporas.

Caracterización del morfotipo EM de *A. muscaria* asociado a *N. dombeyi*

Se encontraron 4 colecciones de morfotipos correspondientes a *A. muscaria* asociados a *N. dombeyi* (Tabla 5). Los mismos se utilizaron para las descripciones morfo-anatómicas que se detallan a continuación:

Macroscopía: ramificación monopodial a simple (Fig. 9). Morfotipos de 0,21-0,30 mm de diámetro, derechas a curvadas en varios sentidos a levemente tortuoso. Textura granulosa. Brillo satinado. Elementos emanantes tipo rizomorfos blanquecinos satinados, cuando presentes, restringidos a un punto.

Microscopía: hifas emanantes ausentes. Hifas tipo cistidios hialinas de paredes delgadas, con contenidos granulares y septos simples (Fig. 10 a y b), localizados desde la superficie del manto, con fíbulas basales muy poco frecuentes (observadas una sola vez).

Manto exterior: prosénquima neto denso (Fig. 10 c).

Manto interior: sinénquima irregular no intertrabado con ocasionales arreglos tipo anillo (Fig. 10 d).

Tabla 5. Colecciones de los morfotipos de *A. muscaria* colectados en esta tesina.

Colección	Especie	Sitio	Especie asociada
A	<i>Amanita muscaria</i>	El Manso-PNNH	<i>Nothofagus dombeyi</i>
C	<i>Amanita muscaria</i>	Camping Gendarmería-PNLP	<i>Nothofagus dombeyi</i>
D	<i>Amanita muscaria</i>	A° Los Hitos-PNLP	<i>Nothofagus dombeyi</i>
E	<i>Amanita muscaria</i>	A° Los Hitos-PNLP	<i>Nothofagus dombeyi</i>



Figura 9. Morfotipos de *A. muscaria* asociados a *N. dombeyi*.

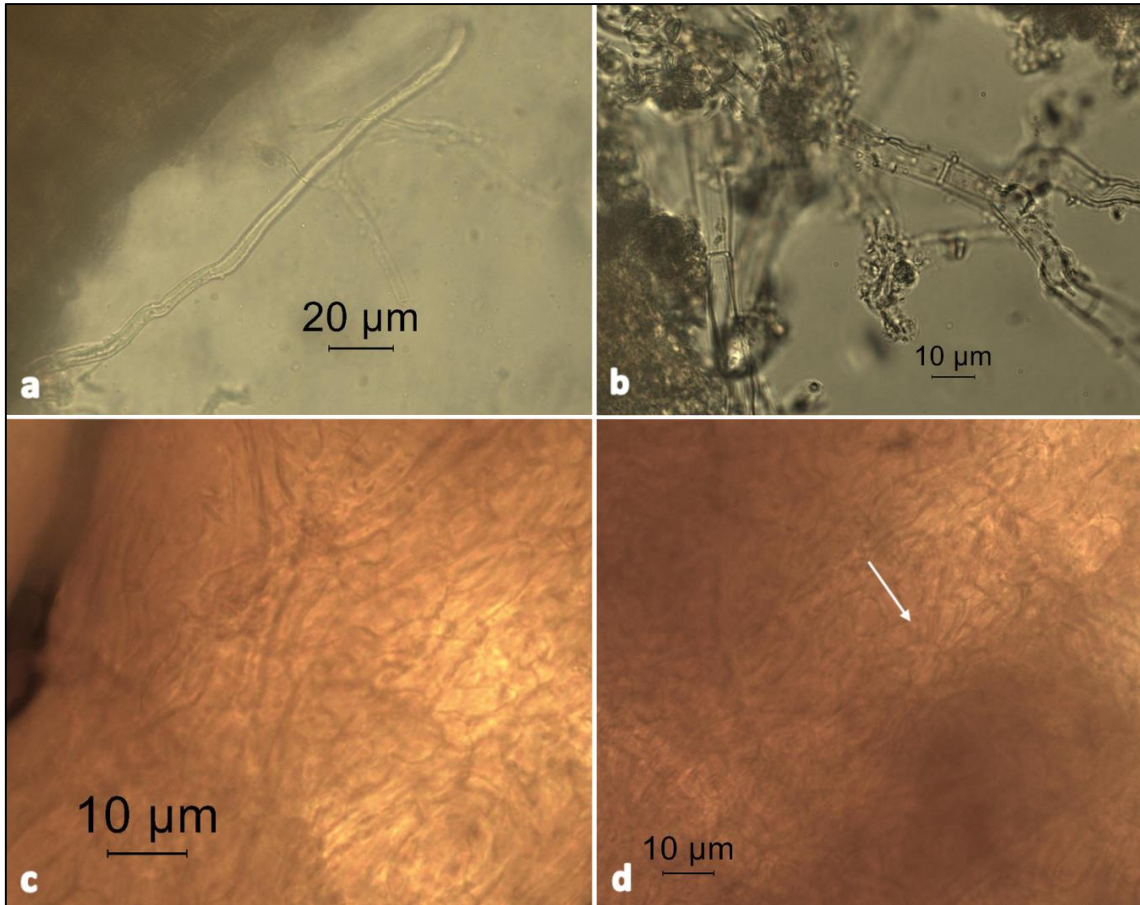


Figura 10. Anatomía de los morfotipos de *A. muscaria*. a) y b) Hifas tipo cistidios con contenidos granulares y septos simples, c) Manto exterior: prosénquima neto denso, d) Manto interior: sinénquima irregular no intertrabado. La flecha blanca indica un arreglo tipo anillo.

El morfotipo de *A. muscaria* asociado a *N. dombeyi* presenta diferencias en el tipo de ramificación y en la textura respecto al morfotipo asociado a *L. cunninghamii*, mientras que con el morfotipo de *Betula* se diferencia en el tipo de manto presentado, el tipo de ramificación y la textura.

Identificación molecular

Se determinaron molecularmente 15 basidiomas y 2 morfotipos asociados a bosques de *N. dombeyi* identificados en BLAST como *A. muscaria*. De ellos, 6 basidiomas y 1 morfotipo fueron utilizados para los análisis filogenéticos. Todos los materiales asociados a este trabajo se agruparon en un mismo clado con materiales

pertenecientes a Eurasia y Alaska (Fig. 11) pero también a los materiales obtenidos por Dunk et al. (2011) para *A. muscaria* invasora con *L. cunninghami*. Morfológicamente las *A. muscaria* encontradas asociadas a *N. dombeyi* coinciden con las descripciones de *A. muscaria* var. *formosa* Pers., las cuales tienen un píleo anaranjado a amarillento y el moteado amarillento a crema (Persoon 1796). Mientras que las encontradas asociadas a bosques de coníferas corresponden a *A. muscaria* var. *muscaria*, con píleo rojo y moteado blanco (Geml et al. 2006). Sin embargo, aunque se observaron diferencias morfológicas las mismas no fueron confirmadas con el análisis filogenético, perteneciendo todas al clado *A. muscaria* sensu stricto.

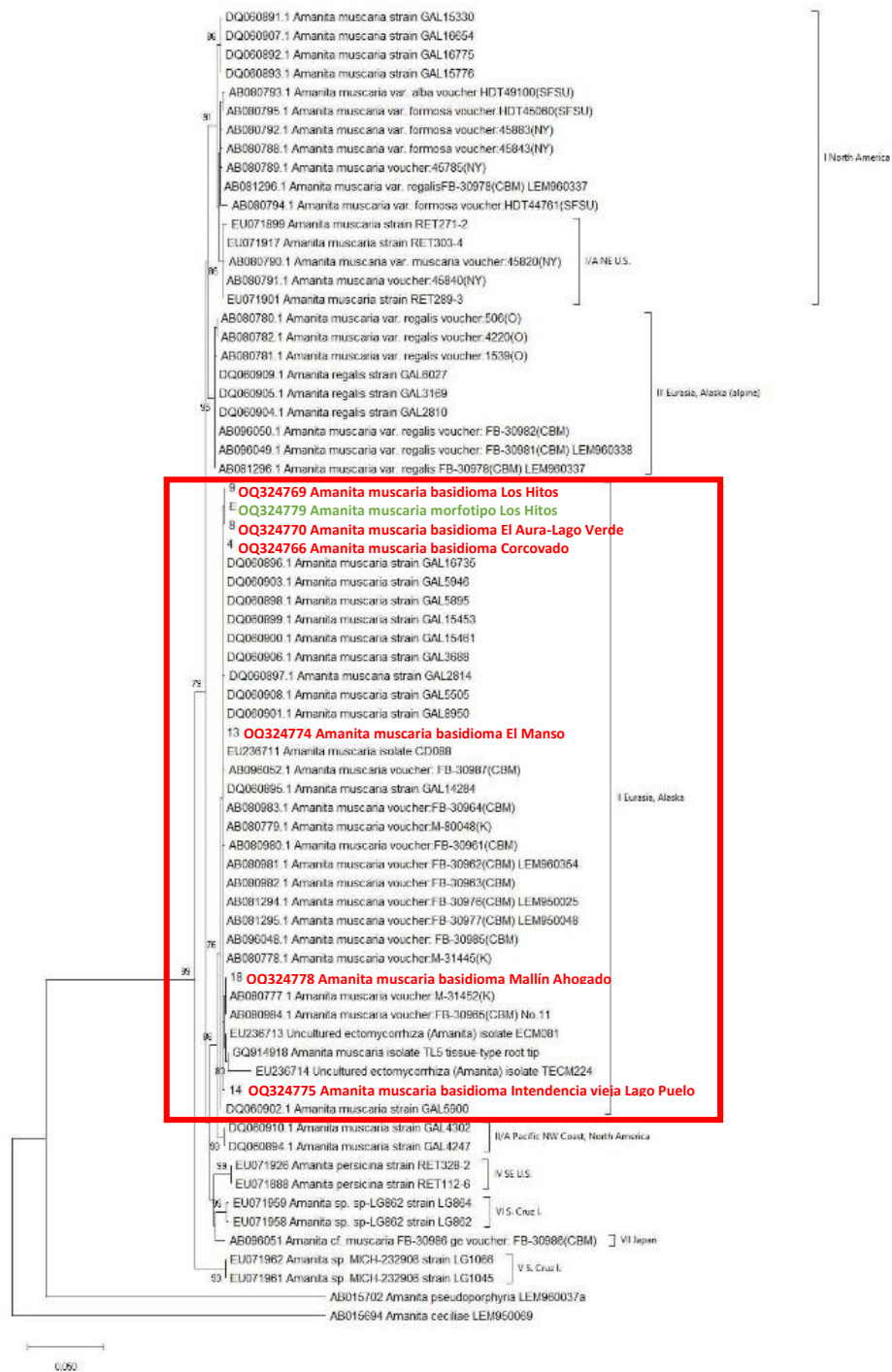


Figura 11. Filograma de *A. muscaria* basado en datos de secuencias ITS disponibles públicamente y propias (en rojo y verde), utilizando el análisis Maximum Likelihood. Los valores de Bootstrap en el árbol más probable fueron calculados con 1000 repeticiones. Outgroup: *A. ceciliae* LEM950069 AB015694.

Bioensayo

No se formó micorriza de *A. muscaria* en ninguno de los bioensayos realizados. En los plantines control tampoco se observaron EM lo que indica que no hubo fuente de contaminación.

Medidas de manejo aplicadas en PN Lago Puelo

Aunque no se cuenta con réplicas en otras áreas protegidas donde también se ha observado el fenómeno, las mismas han redundado en una menor densidad de basidiomas tanto en Los Hitos como en Camping Gendarmería (Raymundi Coms. Pers.). La cantidad inicial y final de basidiomas en los Hitos fue de 3 y 1 respectivamente mientras que para Camping Gendarmería 7 y 4.

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra sin lugar a dudas que *A. muscaria* está invadiendo los bosques de *N. dombeyi* dentro de las áreas protegidas de Parque Nacional Nahuel Huapi, Lago Puelo y Los Alerces, evidenciado por la presencia de basidiomas de la especie en sitios con ausencia de especies vegetales exóticas, confirmada además por presencia de morfotipos de *A. muscaria* determinados morfológica y molecularmente en sus raíces. Esto coincide con lo reportado en Oceanía, donde el fenómeno fue encontrado en bosque mixto de *Lophozonia-Eucalyptus* (Dunk et al. 2011). Si bien se determinó que los morfotipos hallados comparten algunas características morfológicas en común con las descritas para *A. muscaria* asociado a *Betula* por Agerer & Rambold (2004-2023) y a *L. cunninghamii* por Dunk et al. (2011), otras difieren. En este sentido, es sabido que las características de las ectomicorrizas (tales como tamaño de la EM, patrón de ramificación, tipo de manto, y localización de la red de Hartig) pueden variar entre las diferentes especies vegetales asociadas con un mismo hongo micorrízico (Godbout & Fortin 1985).

Amanita muscaria es el hongo más famoso, pero a su vez menos estudiado en cuanto a su distribución geográfica y su filogenia (Geml et al. 2006). En estudios previos se determinó que *A. muscaria* agrupa 6 clados filogenéticos considerando 98 secuencias obtenidas en el hemisferio norte (Geml et al. 2008). Tanto las secuencias de colecciones de *A. muscaria* invasoras obtenidas en esta Tesina como las obtenidas por Dunk et al. (2011) para Australia coinciden con el clado II propuesto por Geml et al. (2008) con muy buen soporte (Bootstrap 86%). El mismo es el más distribuido y que registra mayor cantidad de colecciones, todas ellas reportadas para bosques boreales, templados y costeros de Europa, Asia, Alaska y la costa noroeste pacífica de Estados Unidos (Geml et al. 2008). Si bien el inóculo que dio origen a las invasiones de *A. muscaria* reportadas en esta Tesina estaría asociado a especies de coníferas de América del Norte (*P. radiata*, *P. ponderosa*, *P. menziesii* y *Abies*), este clado podría representar, además, a las *A. muscaria* con mayor capacidad de colonización de nuevas especies asociadas, considerando su amplia distribución y abundancia de reportes de la misma (Geml et al. 2006, 2008; Oda et al. 2004; Dunk et al. 2011). En este sentido, *A. muscaria* invasora en bosques de *Q. humboldtii* nativos de Colombia fueron agrupados en el mismo clado reafirmando su capacidad de colonización y amplia distribución (Vargas et al. 2019). De todas maneras, los estudios presentados en esta Tesina no permiten aseverar el origen de las *A. muscaria* invasoras en las áreas protegidas estudiadas. Para ello es necesario realizar estudios de

redes de haplotipos, distancias genéticas y estudios poblacionales para saber el patrón de distribución como el utilizado para el estudio de otros hongos introducidos como *Suillus luteus* (L.: Fries) Gray (Pildain et al. 2021).

Amanita muscaria es un hongo EM considerado *late stage*, que en su rango de distribución natural crece asociado a bosques maduros (Nara 2008). Se ha demostrado que los hongos EM *early* and *late stage* tienen diferentes demandas de carbohidratos (Mason & Last 1986) y generalmente se admite que los hongos con baja demanda de nutrientes, como los perteneciente a los géneros *Wilcoxina*, *Hebeloma* (Fr.) P. Kumm, *Inocybe* Fr. o *Laccaria* Berkeler & Broome, forman EM en árboles jóvenes, mientras que aquellos tales como especies pertenecientes a los géneros *Amanita* Pers., *Lactarius* Pers. o *Russula* Pers. con una mayor demanda se asocian a árboles maduros (Herrmann & Buscot 2008). Una alta dependencia de la glucosa para el colonizador *late stage* *A. muscaria* durante la formación de EM fue reportado por Gibson y Deacon (1990), quienes encontraron que la formación de EM por esta especie se desencadena por el aumento de la concentración de glucosa. Sin embargo, en cuanto a la nula micorrización obtenida en el bioensayo no podemos atribuir este resultado únicamente a que *A. muscaria* es una especie *late stage*. En diversos trabajos (Malajczuk et al. 1982, 1984; Mason et al. 1983; Kottke et al. 1987) se realizaron ensayos de inoculación donde aparentemente *A. muscaria* formó EM con plantines de los géneros *Eucalyptus* L'Hér., *Corymbia* K.D.Hill & L.A.S.Johnson, *Betula*, *Pinus* y *Picea*. Previo a la inoculación de los plantines se realizaron cultivos puros [en tubos de vidrio conteniendo turba autoclavada más vermiculita humedecida con medio de cultivo Melin-Norkrans modificado (MNM)] y finalmente se inocularon con inóculo vegetativo. Sin embargo, al no haber realizado análisis moleculares no se puede confirmar fehacientemente la formación de éstas. En el caso de que la simbiosis haya existido, la síntesis de *A. muscaria* se logró en un ambiente modificado, por lo que los resultados del presente bioensayo no son concluyentes y se podría repetir la inoculación utilizando inóculo vegetativo y no esporal.

En todos los sitios donde *A. muscaria* fue encontrada invadiendo la rizósfera de *N. dombeyi*, los sitios presentaban características en común: áreas de trashumancia, principalmente de turistas, pero también de ganado, con remoción de suelo constante, lindantes a cursos de agua y que en algún momento han sufrido incendios forestales con posteriores tareas de reacondicionamiento. Como otras especies invasoras, los hongos EM son capaces de sobrevivir y colonizar de forma activa sitios disturbados (Baar et al.

1999; Dunk et al. 2011; Glassman et al. 2016). En particular, *A. muscaria* ha sido asociada a ambientes disturbados donde la presencia de vectores de dispersión y el movimiento de suelo fueron altos (Dunk et al. 2011). Si bien la distribución de *A. muscaria* en los sitios invadidos en áreas protegidas patagónicas está aún circunscripta, a pequeños parches, en sectores que han sufrido alguna forma de disturbio, su presencia podría avanzar comprometiendo la biodiversidad local por el desplazamiento de especies fúngicas nativas, generando maladaptación de la especie forestal asociada, y pérdida de la biodiversidad de la biota EM en estos ecosistemas forestales nativos, de gran valor paisajístico, ecológico y económico.

El manejo de hongos EM invasores cuenta con una primera experiencia a escala local, llevada a cabo por el personal del Parque Nacional Lago Puelo (APN), con el asesoramiento de investigadores involucrados en este trabajo. Anteriormente, se habían implementado medidas de manejo que incluían la remoción de los posibles hospedadores nativos en un área invadida delimitada (Policelli 2019). Estas acciones no impidieron la aparición de nuevos basidiomas en el bosque nativo, sino que aumentaron la dispersión del mismo por aumentar el disturbio en el sitio (Raymundi Coms. Pers.), 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. Además, hay que tener en cuenta que una vez dispersadas las esporas éstas quedan en el sitio aun removiendo los árboles (Dickie et al. 2016). En contraposición, en el presente trabajo se propone el siguiente protocolo de mínima invasión, a fin de generar el menor disturbio posible para evitar dañar la biodiversidad del suelo, como así también disminuir las posibles áreas factibles de ser invadidas por *A. muscaria*:

- a) Visita y referenciación de sitios con presencia de *A. muscaria* en bosques de *Nothofagus* o que puedan ser fuente de contaminación.
- b) Cosecha de todos los basidiomas cuando están en estado inmaduro mediante visitas periódicas desde los primeros días de abril hasta finales de mayo, de modo de adelantarse a la dispersión de las esporas maduras durante el otoño. Para aquellas especies de hongos EM que producen un bajo número de basidiomas y que poseen esporas con poca viabilidad una vez dispersadas, como el caso de *A. muscaria*, la remoción manual de basidiomas podría ser recomendada para

controlar la invasión, además es fácil de implementar y de bajo costo (Dickie et al. 2016).

- c) La colecta debe ser en bolsas de plástico que eviten la dispersión de las esporas en el bosque. El material colectado puede ser sumergido en lavandina 1:5 por 6 hs y descartado, también puede ser quemado, pero tomando precauciones para el personal que lo realice.
- d) Disrupción de la red miceliar por debajo de la fructificación encontrada utilizando una pala pequeña, tipo pala de jardín.

No se recomienda la remoción de las posibles especies vegetales nativas asociadas debido a que es un área protegida con un alto valor de conservación y podría verse comprometida su biodiversidad tanto fúngica como vegetal y servicios ecosistémicos. En América del Sur cuanto mayor es el área destinada a plantaciones forestales, más son los reportes de introducciones de especies exóticas (Vargas et al. 2019), por esto es necesario fijar límites en la plantación de éstas alejadas de los bosques nativos en áreas protegidas. Lamentablemente, en varias de estas áreas, especies exóticas ya se encuentran instaladas, por lo que habría que aplicar técnicas de raleo y si aparecieran habría que realizar cortas inmediatas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten responder a la pregunta que dio origen al presente trabajo: *A. muscaria* está invadiendo los bosques de *N. dombeyi* de Patagonia Argentina.

Sin embargo, es necesario realizar estudios filogenéticos con otros genes tales como β -tubulina y LSU para confirmar posibles orígenes del inóculo. Además, dado los antecedentes previos de *N. antarctica*, donde otros hongos EM se han reportado invadiendo plantines (Salgado Salomón et al. 2018a), es necesario considerar que este fenómeno puede replicarse en otras especies de *Nothofagus*. En estudios anteriores se ha reportado la importancia de los mutualismos, como las ectomicorrizas, como facilitadores o barreras a la invasión de especies vegetales (Richardson et al. 2008). Sin embargo, los hongos EM no han sido estudiados como invasores en sí mismos y por lo tanto el concepto de especie EM invasora es relativamente novel y merece ser considerado en profundidad tanto en los bosques de *N. dombeyi* como en otras formaciones boscosas, incluso en ausencia de la especie vegetal invasora. El hecho de que las consecuencias de este fenómeno estén pobremente dilucidadas para los bosques de *Nothofagus* en Patagonia realza la importancia de continuar con el monitoreo y la investigación para entender el impacto que estas invasiones podrían producir en el bosque nativo y en la diversidad de la micobiota autóctona asociada.

Si bien esta Tesina propone pautas de manejo tendientes al control de *A. muscaria* en áreas protegidas es necesario continuar con los monitoreos a fin de ajustar las medidas y tener datos certeros de la efectividad de las mismas. Diseñar políticas para reducir el movimiento y liberación de especies exóticas y para manejar aquellas ya establecidas deben emerger como prioridades para futuros programas relacionados con la conservación del bosque nativo y de la diversidad fúngica.

BIBLIOGRAFÍA

- Agerer R. (Ed). 1994. Colours Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlac.
- Agerer R, Rambold G. 2004–2023. DEEMY, an Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. Disponible en: www.deemy.de–München, Germany.
- Aguilar-Aguilar S, Pérez-Moreno J, Ferrera-Cerrato R, Grimaldo-Juarez O, Cervantes-Díaz L, González-Mendoza D. 2009. Hongos ectomicorrícicos y la tolerancia a la salinidad en plantas. *Revista chilena de historia natural*, 82(1), 163-168.
- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, 19(6), 716-723.
- Allen MF. 1991. *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press.
- Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E. 1995. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil*, 170, 47-62.
- Arnold C. 2016. No, Coyotes Don't Get High-But These Animals Do. *National Geographic*. Disponible en: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/160224-coyotes-mushrooms-drugs-high-animals-science>.
- 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.
- Bagley SJ, Orlovich DA. 2004. Genet size and distribution of *Amanita muscaria* in a suburban park, Dunedin, New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 42, 939–947.
- Ballari SA, Pastore H, Varela D. 2019. *Pudu puda*. En: SAyDS–SAREM (eds.) Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>.
- Barroetaveña C. 2006. Hongos asociados a las plantaciones forestales de la región Andino Patagónica. Manual N°6, Centro Forestal CIEFAP. Esquel, Chubut. 64 pp.

- Barroetaveña C, Cázares E, Rajchenberg M. 2006. Mycorrhizal fungi of *Pseudotsuga menziesii*, an introduced tree species in central Patagonia (Argentina). *Nova Hedwigia*, 83, 53–66.
- Barroetaveña C, Cázares E, Rajchenberg M. 2007. Ectomycorrhizal fungal species associated with ponderosa pine and Douglas fir: a comparison of species richness in native forests and Patagonian plantations. *Mycorrhiza*, 17, 355–373.
- Barroetaveña C, Pildain MB, Salgado Salomón ME, Eberhart JL. 2010. Molecular identification of ectomycorrhizas associated with ponderosa pine seedlings in Patagonian nurseries (Argentina). *Canadian Journal Forest Research*, 40(10), 1940–1950.
- Barroetaveña C, Rajchenberg M, Cázares E. 2005. Mycorrhizal fungi in *Pinus ponderosa* introduced in central Patagonia (Argentina). *Nova Hedwigia*, 80, 453–464.
- Bassani VN, Barroetaveña C, Rajchenberg M. 2013. Spores of ectomycorrhizal fungi as inoculants for *Nothofagus pumilio* and exotic conifer seedlings in Patagonia, Argentina: their activity and conservation. *New Forests*, 44(4), 471-485.
- Bava J, Lencinas J, Haag A. 2006. Determinación de la materia prima disponible para proyectos de inversión forestales en cuencas de la provincia del Chubut. Informe Parcial. Consejo Federal de Inversiones. 85 pp.
- Beale I, Clodoveo Ortiz E. 2013. El sector forestal Argentino - Bosques Implantados. *Revista de Divulgación Técnica, Agrícola y Agroindustrial*, 41, 1–6.
- Bengtsson J, Angelstam P, Elmqvist T, Emanuelsson U, Folke C, Ihse M, Nyström M. 2003. Reserves, resilience and dynamic landscapes. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 32(6), 389-396.
- Beug MW, Shaw M. 2009. Animal poisoning by *Amanita pantherina* and *Amanita muscaria*: A commentary. *McIlvainea*, 18(1), 37-39.
- Black-Decima PA, Corti P, Díaz N, Fernandez R, Geist V, Gill R, Gizejewski Z, Jiménez J, Pastore H, Saucedo C, Wittmer H. 2016. *Hippocamelus bisulcus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T10054A22158895. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T10054A22158895.en>. Accessed on 16 January 2023.

- Bogar LM, Dickie IA, Kennedy PG. 2015. Testing the co-invasion hypothesis: ectomycorrhizal fungal communities on *Alnus glutinosa* and *Salix fragilis* in New Zealand. *Divers. Distrib.*, 21, 268–278.
- Borowicz VA, Juliano SA. 1991. Specificity in host-fungus associations: do mutualists differ from antagonists? *Evolutionary Ecology*, 5, 385–392.
- Brundrett M, Bougher N, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Center for International Agricultural Research, Monograph 32. Canberra, Australia. 374 pp.
- Cabrera AL, Willink A. 1980. Biogeografía de América Latina. Serie de Biología, Monografía 13. The General Secretariat of the Organization of American States, Washington, DC. 122 pp.
- Cline ET, Ammirati JF, Edmonds RL. 2005. Does proximity to mature trees influence ectomycorrhizal fungus communities of Douglas-fir seedlings? *New Phytol.*, 166, 993–1009.
- Comandini O, Contu M, Rinaldi AC. 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16(6), 381-395.
- Crundwell E. 1987. The unnatural history of the fly agaric. *Mycologist*, 1(4), 178-181.
- Daniele G, Becerra A, Crespo E. 2005. *Amanita muscaria* (Basidiomycota) y su asociación micorrícica con *Cedrus deodara* (Pinaceae) en las Sierras de Córdoba, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 40(1-2), 45-49.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- Dickie IA, Bolstridge N, Cooper JA, Peltzer DA. 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 187, 475–484.
- Dickie IA, Johnston P, Singers N, Toft R, Waipara N, Walbert K, Council NR. 2008. Invasive fungi research priorities, with a focus on *Amanita muscaria*. Landcare Research, Lincoln.

- Dickie IA, Nuñez MA, Pringle A, Lebel T, Tourtellot SG, Johnston PR. 2016. Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biological Invasions*, 18, 3383-3395.
- Dimitri MJ, Orfila EN. 1985. *Tratado de Morfología y Sistemática Vegetal*. 1ra. Ed. ACME, Bs As.
- Donoso Zegers C. 2006 *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina, Autoecología*. Marisa Cuneo Ediciones Valdivia, Chile, 678 pp.
- Dunk CW. 2002. The ectomycorrhizae of *Nothofagus cunninghamii* in Noojee State Forest, Victoria, and evidence of host shifting by the introduced fungus *Amanita muscaria* - identification, host determination, and characterisation of the new association. Honours Thesis, La Trobe University, Australia.
- Dunk CW, Lebel T, Keane PJ. 2011. Characterisation of ectomycorrhizal formation by the exotic fungus *Amanita muscaria* with *Nothofagus cunninghamii* in Victoria, Australia. *Mycorrhiza*, 22(2), 135-147.
- Fontenla S, Godoy R, Rosso P, Havrylenko M. 1998. Root associations in *Austrocedrus* forests and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 8(1), 29-33.
- Fuhrer BA. 2005. *A field guide to Australian fungi*. Melbourne: Bloomings Books. pp. 24. ISBN 1-876473-51-7.
- Fuhrer BA, Robinson RM. 1992. *Rainforest Fungi of South-east Australia*. CSIRO, Melbourne and the Forestry Commission, Tasmania. 95 pp.
- Furci G-N GM. 2007. *Fungi Austral: Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile*. CORMA.
- Galán R, Moreno G. 1998. *Ruhlandiella berolenensis*, an exotic species in Europe. *Mycotaxon* 68, 265–271.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2,113–118.

- 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.
- Geml J, Laursen GA, O'Neill K, Nusbaum HC, Taylor DL. 2006. Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Molecular Ecology*, 15(1), 225-239.
- Geml J, Tulloss RE, Laursen GA, Sazanova NA, Taylor DL. 2008. Evidence for strong inter-and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2), 694-701.
- Gibson F, Deacon JW. 1990. Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of glucose, nitrogen and phosphorus in relation to successions. *Mycological Research*, 94(2), 166-172.
- Glassman SI, Levine CR, Dirocco AM, Battles JJ, Bruns TD. 2016. Ectomycorrhizal fungal spore bank recovery after a severe forest fire: Some like it hot. *ISME Journal*, 10,1228–1239.
- Godbout C, Fortín JA 1985. Ectomicorrizas sintetizadas de álamo temblón: nivel de género fúngico de caracterización estructural. *Revista Canadiense de Botánica*, 63 (2), 252-262.
- Goodman DM, Durall DM, Trofymow JA. (Eds.). 1996. Concise descriptions of North American Ectomycorrhizae. *Mycologue publications & Canade-B.C. Forest Res. Dev. Agreement. Canadian Forest Service. Victoria. Canada.*
- Guiñón RG. 2014. *Amanita muscaria*, un bolet de conte de fades. *Revista Catalana de Micologia*, 3-41.
- Hall IR, Stephenson SE, Buchanan PK, Yn W, Cole AL. 2003. Edible and poisonous mushrooms of the world. *New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited. pp. 130–1. ISBN 0-478-10835-4.*
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).*

- Hayward J, Horton TR, Núñez M. 2015. Ectomycorrhizal fungal communities coinvasive with Pinaceae host plants in Argentina: Gringos bajo el bosque. *New Phytol.*, 208(2), 497–506.
- Herrmann S, Buscot F. 2008. Why and how using micropropagated trees rather than germinations for controlled synthesis of ectomycorrhizal associations? En: Varma A (Ed.) *Mycorrhiza*. 439-465 pp.
- Hinojosa Becerra M, Marín-Gutiérrez I. 2017. La furia vikinga, el cáñamo y la *Amanita muscaria*. *Cannabis Magazine*, pp. 96-103.
- Horton T, Bruns T. 1998. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytol.*, 139, 331–339.
- Hynson NA, Merckx VSFT, Perry BA, Treseder KK. 2013. Identities and distributions of the co-invading ectomycorrhizal fungal symbionts of exotic pines in the Hawaiian Islands. *Biol. Invasions*, 15, 2373–2385.
- Inderjit, Callaway RM, Vivanco JM. 2006. Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? *Trends in Plant Science*, 11(12), 574-580.
- Jenkins DT, Petersen RH. 1976. A neotype specimen for *Amanita muscaria*. *Mycologia*, 68(3), 463-469.
- Johnston P, Buchanan P, Leathwick J, Mortimer S. 1998. Fungal invaders. *Australasian Mycological Newsletter*, 17, 48–52.
- Kalucka IL, Jagodzinski AM. 2016. Successional traits of ectomycorrhizal fungi in forest reclamation after surface mining and agricultural disturbances: A review. *Dendrobiology*, (76).
- Kamiński L, López DP. 2017. *Las drogas en la guerra*. Editorial Crítica.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.

- Kennedy PG, Bergemann SE, Hortal S, Bruns TD. 2007. Determining the outcome of field-based competition between two *Rhizopogon* species using real-time PCR. *Molecular ecology*, 16(4), 881-890.
- Klironomos JN. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84(9), 2292-2301.
- Kottke I, Guttenberger M, Hampp R, Oberwinkler F. 1987. An in vitro method for establishing mycorrhizae on coniferous tree seedlings. *Trees*, 1, 191-194.
- Kranabetter JM, Stoehr M, O'Neill GA. 2015. Ectomycorrhizal fungal maladaptation and growth reductions associated with assisted migration of Douglas-fir. *New Phytologist*, 206(3), 1135-1144.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Largent DL. 1986. How to identify mushrooms to genus I: Macroscopic features. Mad River press. Eureka California. 166 pp.
- Largent DL, Johnson D, Watling R. 1986. How to identify mushrooms to genus III: Microscopic features. Mad River press. Eureka California. 146 pp.
- Lee KJ, Kim YS. 1987. Host specificity and distribution of putative ectomycorrhizal fungi in pure stands of twelve tree species in Korea. *Korean Journal of Mycology*, 15, 48–69.
- Lorenzo LE. 2018. El hongo de las caricaturas (*Amanita muscaria*) en la Patagonia. Desde la Patagonia N°3. UNCOMA.
- Maerz A, Paul MR. 1930. A dictionary of color. First Edition. Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York. United States of America. 207 pp.
- Malajczuk N, Molina R, Trappe JM. 1982. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus* I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytologist*, 91, 467–482.

- Malajczuk N, Molina R, Trappe JM. 1984. Ectomycorrhiza formation in Eucalyptus: II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New phytologist*, 96(1), 43-53.
- Mason PA, Dighton J, Last FT, Wilson J. 1983. Procedure for establishing sheathing mycorrhizas on tree seedlings. *Forest Ecology and Management*, 5(1), 47–53.
- Mason PA, Last FT. 1986 Are the occurrence of sheathing mycorrhizal fungi in new and regenerating forests and woodlands in Scotlands predictable. In: Jenkins D (ed) *Trees and wildlife in Scottish uplands*. Institute of Terrestrial Ecology, Huntingdon, pp 63–70.
- May T. 2006. News from the Fungimap president. *Fungimap Newsletter*. Melbourne. 29, 1.
- Meyer FD. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In 'Ectomycorrhizae-Their Ecology and Physiology'. eds G. C. Marks and T. T. Kozlowski, pp. 79-105. (Academic Press: New York.)
- Michelot D, Melendez-Howell LM. 2003. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological research*, 107(2), 131-146.
- MinAgrI. 2017. Inventario Nacional de Plantaciones Forestales en secano. Región Patagonia. Technical Report. 138 pp.
- Moeller HV, Dickie IA, Peltzer DA, Fukami T. 2015. Mycorrhizal co-invasion and novel interactions depend on neighborhood context. *Ecology*, 96, 2336–2347.
- Mohr-Bell D, Díaz G, Príncipe R, Gonzalez C, Bono J, Ciuffoli L, Strada M, Parmuchi G, Chomnalez F, Montenegro C, Loguercio G, Bava J. 2019. Monitoreo de la Superficie de Bosque Nativo de la República Argentina, Región Forestal Bosque Andino Patagónico. Tomo I Informe. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Esquel (Chubut), Argentina. 87 pp.
- Mummey DL, Rillig MC. 2006. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil*, 288(1), 81-90.

- NAMA (The North American Mycological Association). 2023. Mushroom poisonings in dogs and cats. Disponible en: https://namyco.org/mushroom_poisonings_in_dogs_an.php
- Nara K. 2008. Community Developmental Patterns and Ecological Functions of Ectomycorrhizal Fungi: Implications from Primary Succession. En: Varma A (Ed.) Mycorrhiza. 581–599 pp.
- Newton AC, Haigh JM. 1998. Diversity of ectomycorrhizal fungi in Britain: A test of the species-area relationship, and the role of host specificity. *New Phytologist*, 138, 619–627.
- Oda T, Tanaka C, Tsuda M. 1999. Molecular phylogeny of Japanese *Amanita* species based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Mycoscience*, 40(1), 57-64.
- Oda T, Tanaka C, Tsuda M. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pantherina*. *Mycological Research*, 108(8), 885-896.
- Pérez-Moreno J, Read DJ. 2004. Los hongos ectomicorrícicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5), 239-247.
- Persoon CH. 1796. *Observationes mycologicae. Seu descriptiones tam novorum, quam notabilium fungorum exhibitae a CH Persoon. Pars prima-secunda: 1. Apud Petrum Philippum Wolf.*
- Peri PL, Tejera L, Amico I, von Müller A, Martínez Pastur G, Bava J, Bahamonde H, Mondino V, Schinelli T, Gargaglione V, Ormaechea S, Boyeras F, Salvador G, Lloyd C, Huertas L. 2016. Estado de situación del sector forestal en Patagonia Sur. Technical report. INTA. 43 pp.
- Pildain MB, Marchelli P, Azpilicueta MM, Starik C, Barroetaveña C. 2021. Understanding introduction history: Genetic structure and diversity of the edible ectomycorrhizal fungus, *Suillus luteus*, in Patagonia (Argentina). *Mycologia*, 113(4), 715-724.

- Policelli N. 2019. Invasiones subterráneas: Co-invasión de pinos y sus hongos ectomicorrícicos. Tesis Doctoral. Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB), Universidad Nacional del Comahue.
- Policelli N, Bruns TD, Vilgalys R, Nuñez MA. 2019. Suilloid fungi as global drivers of pine invasions. *New Phytologist*, 222(2), 714-725.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- R Core Team 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>.
- Rampolli FI, Kamler P, Carlino CC, Bedussi F. 2021. The deceptive mushroom: accidental *Amanita muscaria* poisoning. *European journal of case reports in internal medicine*, 8(2).
- Richardson DM, van Wilgen BW, Núñez MA. 2008. Alien conifer invasions in South America: short fuse burning? *Biol Invasions*, 10, 573–577.
- Robinson R. 2010. First Record of *Amanita muscaria* in Western Australia. *Australasian Mycologist*, 29 (1), 4–6.
- Romano G, Kuhar F. 2017. Dos registros de Agaricales (Basidiomycota) exóticos en bosques nativos de la Patagonia argentina. *Boletín Micológico*, 32(1), 9-12.
- Romano MC, Doan HK, Poppenga RH, Filigenzi MS, Bryant UK, Gaskill CL. 2019. Fatal *Amanita muscaria* poisoning in a dog confirmed by PCR identification of mushrooms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(3), 485-487.
- Rudgers JA, Orr S. 2009. Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *Journal of Ecology*, 97(2), 247-255.
- Salgado Salomón ME, Barroetaveña C, Pildain MB, Kuhar F, Rajchenberg M. 2017. *Tomentella* (Thelephorales, Basidiomycota) en bosques de Nothofagaceae de Patagonia, Argentina: micorrizas de nuevas especies. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 52(3), 423-434.

- Salgado Salomón ME, Barroetaveña C, Pildain MB, Williams EA, Rajchenberg M. 2018a. What happens to the mycorrhizal communities of native and exotic seedlings when *Pseudotsuga menziesii* invades Nothofagaceae forests in Patagonia, Argentina? *Acta Oecologica*, 91, 108–119.
- Salgado Salomón ME, Barroetaveña C, Rajchenberg M. 2011. Do pine plantations provide mycorrhizal inocula for seedlings establishment in grasslands from Patagonia, Argentina? *N. For.* 41, 191–205.
- Salgado Salomón ME, Barroetaveña C, Rajchenberg M. 2013. *Pseudotsuga menziesii* invasion in native forests of Patagonia, Argentina: what about mycorrhizas? *Acta Oecol.*, 49, 5–11.
- Salgado Salomón ME, Dresch P, Horak E, Galleguillos F, Barroetaveña C, Peintner U. 2018b. The enigmatic *Cortinari* *magellanicus* complex occurring in Nothofagaceae forests of the Southern Hemisphere. *Fungal biology*, 122, 1077-1097.
- Sapsford SJ, Paap T, Hardy GESJ, Burgess TI. 2021. Anthropogenic disturbance impacts mycorrhizal communities and abiotic soil properties: implications for an endemic Forest disease. *Frontiers in Forests and Global Change*, 3, 593243.
- Schinelli Casares T. 2012. Producción de *Nothofagus* bajo condiciones controladas. Ediciones INTA.
- Schultes RE, Hofmann A. 1979. Plants of the gods: origins of hallucinogenic use (p. 149). New York: McGraw-Hill.
- Selosse MA, Roy M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in plant science*, 14(2), 64-70.
- Silva-Rodríguez E, Pastore H, Jiménez J. 2016. *Pudu puda*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T18848A22164089. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T18848A22164089.en>. Accessed on 16 January 2023.
- Singer R, Morello JH. 1960. Ectotrophic forest tree mycorrhizae and forest communities. *Ecology*, 41(3), 549-551.
- Smith SE, Read DJ. 2010. Mycorrhizal symbiosis. Academic press.

- Sousa NR, Ramos MA, Marques AP, Castro PM. 2012. The effect of ectomycorrhizal fungi forming symbiosis with *Pinus pinaster* seedlings exposed to cadmium. *Science of the Total Environment*, 414, 63-67.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stevenson G. 1962. The Agaricales of New Zealand: I. Boletaceae and Strobilomycetaceae. *Kew Bulletin* 15, 381–385.
- Tibbett M, Sanders F. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany*, 89(6), 783-789.
- Valenzuela Flores E. 1993. Estudio sistemático, corológico y ecológico de los Agaricales sensu lato de los bosques autóctonos de la Región de los Lagos en Chile. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá de Henares: Facultad de Ciencias.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Letter to nature*, 396, 69-72.
- Vargas N, Gonçalves SC, Franco-Molano AE, Restrepo S, Pringle A. 2019. In Colombia the Eurasian fungus *Amanita muscaria* is expanding its range into native, tropical *Quercus humboldtii* forests. *Mycologia*, 111(5), 758-771.
- Willan RL. 1991. Guía para la manipulación de las semillas forestales, con especial referencia a los trópicos. Estudio FAO. Monte 20/2.
- White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis AM, Gelford DH, Sninsky JJ, White JF (Eds.). Academic Press, New York, USA. pp. 315–322.
- Zhang Q, Yao LJ, Yang RY, Yang XY, Tang JJ, Chen X. 2007. Potential allelopathic effects of an invasive species *Solidago canadensis* on the mycorrhizae of native plant species. *Allelopathy Journal*, 20(1), 71-78.
- Zhou D, Hyde KD. 2001. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycol. Res.*, 105 (12), 1449–1457.