



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Ensayo de inducción de la simbiosis micorrícica entre el hongo exótico  
invasor *Amanita muscaria* y arboles nativos del género *Nothofagus*

Seminario de Título presentado a la  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Para optar al título de Bióloga

**Claudia Karina Márquez Parraguez**



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Botánica,  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.



Prof. Guía

Dr. Gotz Palfner

---

Prof. Co-Guía

Patricio Chung Guin-Po

---

Prof. Evaluadores

Dr. Aníbal Pauchard

---

Dr. Rafael García

---

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

---

## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo, y, por ende, iniciar una nueva etapa de mi vida, no me queda más que agradecer a toda la gente que ha estado acompañándome desde un inicio en esta travesía.

Primeramente, quisiera dar las gracias a mi profesor guía, el Dr. Gotz Palfner, cuya persona ha estado acompañándome desde mis inicios en la micología y no tuvo problema en acogerme en el Laboratorio de Micología. Gracias por la confianza depositada en mi persona, por enseñarme y compartirme toda su sabiduría y pasión sobre los hongos, mi alma queda un poco en deuda con todo lo que he aprendido con usted.

A Patricio Chung, quién si bien no es profesor (de profesión), fue más que un mentor para mí. Gracias por todas las enseñanzas en el laboratorio, por las conversaciones (y mostrarme sobre su legado musical), por las risas y momentos compartidos. Es usted una excelente persona. Durante el tiempo que trabajé en el laboratorio gané mucha confianza en lo que hacía, y siempre le estaré agradecida por eso.

Al Instituto Forestal, por la fuente de financiamiento y las facilidades de infraestructura proporcionadas para realizar esta tesis. ¡Un millón de gracias!

A mi familia: Mi mamá, mi papá, a mi Keka, a mi Tata y a Pato. Han sido fundamentales en este proceso. Gracias por todo el apoyo durante todo mi transcurso en la universidad. Gracias por aprender y conocerme un poco más sobre lo que me gustaba y que cada vez que ven un hongo o una plantita piensan en mí.

A Claudio Catrupay, mi mejor amigo, persona que ha sido más que importante en mi vida y un pilar fundamental en ella. Has estado ahí en las buenas y en las malas: en cada logro, pero también en cada caída, se me hace corto dar las gracias por todo lo que has hecho por mí. Por favor no dejes de pagarme las cuotas de la tarjeta.

A mis amigos de Concepción y de Castro: Bernardita, Alison, Catalina, John, Fabián, Francisca, Nicol y Víctor. Gracias por todas las palabras y apoyo fundamental en este proceso.

A Christobal por ser mi roomie (y soportarme) durante todos estos años, por estar ahí ante cualquier cosa y por todos los momentos juntos. Por último y no por eso menos importante, a Kodita, mi perrito.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
<b>ÍNDICE</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>METODOLOGÍA</b> .....	15
Figura 1. Test de viabilidad de semillas de <i>Pinus radiata</i> , <i>Nothofagus dombeyi</i> y <i>N. obliqua</i> .....	16
Figura 2. Semillas de <i>Nothofagus</i> organizadas en placas Petri con papel secante para su germinación. ....	17
Figura 3. Preparación de muestras de <i>Amanita muscaria</i> en MMN líquido para la inoculación.....	18
Figura 4. Cultivo in vitro de plántulas de pino ( <i>Pinus radiata</i> , izq.) y hualle ( <i>Nothofagus obliqua</i> , der.) con <i>A. muscaria</i> en condiciones de laboratorio. ....	19
Figura 5. Micorrizas formadas por <i>Amanita muscaria</i> con diferentes especies de árboles hospederos. A y B: Micorrizas formadas con <i>Betula sp.</i> Extraído de: Ingleby et al, 1990. ....	20
C y D: Micorrizas formadas con <i>Nothofagus cunninghamii</i> . Extraído de: Dunk et al, 2012. ....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	22
Figura 6. Plántulas inoculadas extraídas de los tubos de ensayo. A: <i>Pinus radiata</i> . B: <i>Nothofagus obliqua</i> . C: <i>Nothofagus dombeyi</i> . Barra de referencia 2 cm. ....	22

Figura 7. Sistema radicular de plántulas inoculadas con <i>Amanita muscaria</i> . A: <i>Pinus radiata</i> . B: <i>Nothofagus obliqua</i> . C: <i>Nothofagus dombeyi</i> . Aumento: 30x.....	23
Figura 8. Raíces secundarias bifurcadas de <i>Pinus radiata</i> . Aumento: 40x.....	24
Figura 9. Micelio observado en sistema radicular de <i>Pinus radiata</i> . Aumento: 40x.....	25
Figura 10: Gráficos de barra de comparación de atributos morfológicos de <i>Pinus radiata</i> entre grupo control y grupo experimental. ....	27
Tabla de resultados obtenidos.....	29
Tabla 1. Características morfológicas de plántulas de <i>Pinus radiata</i> inoculada con <i>Amanita muscaria</i> en cultivo in vitro.....	29
Tabla 2. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas inoculadas de <i>Pinus radiata</i> . ....	29
Tabla 3. Características morfológicas de plántulas de <i>Nothofagus obliqua</i> (Código: H) y <i>Nothofagus dombeyi</i> (Código: C) inoculada con <i>Amanita muscaria</i> en cultivo in vitro. ....	30
Tabla 4. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas inoculadas de <i>Nothofagus dombeyi</i> .....	30
Tabla 5. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas inoculadas de <i>Nothofagus obliqua</i> . ....	30
Tabla 6. Características morfológicas de plántulas de <i>Pinus radiata</i> como grupo control en cultivo in vitro.....	31
Tabla 7. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas control de <i>Pinus radiata</i> . ....	31
Tabla 8. Características morfológicas de plántulas de <i>Nothofagus dombeyi</i> como grupo control en cultivo in vitro. ....	31
Tabla 9. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas control de <i>Nothofagus dombeyi</i> . ....	32
<b>DISCUSIÓN</b> .....	33
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	39

## RESUMEN

La introducción de especies invasoras en nuevos hábitats es un fenómeno reconocido que puede tener graves consecuencias económicas y ambientales. Estas especies, provenientes de fuera de su área de distribución natural, pueden establecerse y propagarse en su nuevo entorno, compitiendo con especies nativas y alterando los ecosistemas. La presencia de hongos exóticos e invasores se ha relacionado principalmente con enfermedades vegetales, pero su impacto en ambientes naturales ha sido menos estudiado. La propagación geográfica de hongos foráneos con potencial invasivo, especialmente en el caso de especies biotróficas, puede ocurrir mediante plantas exóticas, que funcionan como portadoras de patógenos fúngicos exóticos, hongos micorrícicos y endófitos. En ecosistemas naturales, los hongos micorrícicos, que forman simbiosis con árboles, pueden establecerse junto a las plantaciones y extenderse a bosques nativos, compitiendo por recursos y afectando a hongos nativos. En Chile, la introducción de especies de pino ha llevado a la aparición de hongos exóticos asociados, como *Amanita muscaria*. Este hongo, originario de bosques templados del hemisferio norte, ha sido observado en bosques de *Nothofagus* en Chile y otros países. Este estudio tiene como objetivo investigar si *Amanita muscaria* es capaz de establecer simbiosis ectomicorrícicas con las raíces de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus dombeyi*. Se realizó un ensayo de inoculación controlada en laboratorio utilizando plántulas de estas especies de *Nothofagus* y pino como grupo control. Se planteó la hipótesis de que *A. muscaria* podrá formar asociaciones ectomicorrícicas con las raíces de *Nothofagus spp.* basándose en observaciones previas de su presencia en estos bosques. El estudio busca contribuir al entendimiento de las invasiones fúngicas en ambientes naturales y su posible impacto en la flora fúngica simbiótica nativa.

Palabras clave: Micorrizas, Especie Invasora, Bosque Nativo, *Amanita muscaria*, *Nothofagus*.

## ABSTRACT

The introduction of invasive species into new habitats is a recognized phenomenon that can have serious economic and environmental consequences. These species, originating from outside their natural distribution area, can establish and spread in their new environment, competing with native species and altering ecosystems. The presence of exotic and invasive fungi has been mainly associated with plant diseases, but their impact on natural environments has been less studied. The geographical spread of foreign fungi with invasive potential, especially in the case of biotrophic species, can occur through exotic plants, which act as carriers of exotic fungal pathogens, mycorrhizal fungi, and endophytes. In natural ecosystems, mycorrhizal fungi, which form symbioses with trees, can establish alongside plantations and spread to native forests, competing for resources and affecting native fungi. In Chile, the introduction of pine species has led to the appearance of associated exotic fungi, such as *Amanita muscaria*. This fungus, native to temperate forests in the northern hemisphere, has been observed in *Nothofagus* forests in Chile and other countries. This study aims to investigate whether *Amanita muscaria* is capable of establishing ectomycorrhizal symbioses with the roots of *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus dombeyi*. A controlled laboratory inoculation trial was conducted using seedlings of these *Nothofagus* species and pine as a control group. It was hypothesized that *A. muscaria* would be able to form ectomycorrhizal associations with the roots of *Nothofagus spp.* based on previous observations of its presence in these forests. The study seeks to contribute to the understanding of fungal invasions in natural environments and their possible impact on native symbiotic fungal flora.

Keywords: Mycorrhizae, Invasive Species, Native Forest, *Amanita muscaria*, *Nothofagus*.

## INTRODUCCIÓN

Es sabido que muchas especies son capaces de colonizar y adaptarse a nuevos ambientes fuera de su distribución natural, atravesando barreras ambientales o biogeográficas ya sea de forma dirigida, accidental o natural, en donde estas son capaces de introducirse, reproducirse y generar una nueva población en estas nuevas áreas (Koleff, 2017). La mayoría de estos organismos no logra adaptarse a largo plazo al sitio de introducción, sin embargo, un porcentaje de estas no solo logra acentuarse, si no, también se desarrolla a expensas de las especies nativas y se propagan masivamente mediante mecanismos como depredación, competencia, patogenicidad o alteración de hábitat (Ríos y Vargas, 2003). La expansión de estos individuos puede generar graves consecuencias ya sean económicas y/o ambientales en el lugar en el que se acentúan, a estas se les conoce como especies invasoras.

Según el Convenio de Diversidad Biológica (CDB), especies invasoras son “aquellas que prosperan sin ayuda del ser humano y amenazan hábitats naturales o seminaturales fuera de su área de distribución” y como consecuencia tienen impactos económicos, sociales y medioambientales (CDB, 2009) incluso, las especies exóticas invasoras constituyen la segunda causa de las extinciones de especies nativas y pérdida de biodiversidad a nivel mundial (Cerdeira et al, 2017). Richardson et al (2000) definirá el concepto de invasor como “Las plantas invasoras, son plantas naturalizadas que producen descendencia reproductiva, a menudo en grandes cantidades, a distancias considerables de las plantas parentales y, por lo tanto, tienen el potencial de expandirse en un área considerable”. En Chile, se ha reportado la existencia de especies introducidas y exóticas desde la época colonial en el siglo XVI (Arroyo et al, 2000) y hasta el día de hoy, se han registrado un alrededor de 1.119 organismos exóticos asilvestrados en nuestro país (PNUD, 2017) en donde a lo menos, 128 actúan de forma invasora (Baeriswyl, 2017). En relación a la flora, Chile tiene un alto porcentaje de plantas introducidas en comparación a la flora nativa (15% del total, Fuentes et al, 2013) en donde la mayor concentración de especies exóticas se encuentra en zonas con clima mediterráneo y tropical abarcando entre las regiones de Coquimbo a Los Ríos y se establecen principalmente en lugares perturbados (Baeriswyl, 2017). Los taxones que se destacan son: *Acacia spp*, *Ulex europaeus* L. (Espinillo), *Teline monspessulana* (L.) K.Koch (Retamilla), *Rubus spp*. (Zarzamora), en donde algunas de ellas crecen incluso al interior de áreas

protegidas del país (Baeriswyl, 2017; Pauchard y Alaback, 2002). Considerando a los mamíferos, se han reportado entre 13 y 17 especies exóticas invasoras, como el visón y el jabalí (Baeriswyl, 2017).

Sin embargo, con respecto a invasiones fúngicas, la base de datos se vuelve mucho más escasa; El concepto de hongos exóticos y/o invasores, se asocia más con enfermedades destructivas asociadas a las plantas, tales como *Botrytis cinérea* Pers., mejor conocido como moho gris, causante de la podredumbre gris en diversos cultivos de importancia económica (Fillinger y Elad, 2016) o el género *Fusarium*, el cual es responsable de enfermedades en plantaciones de cereales (Figuroa-Rivera et al, 2010), pero no hay mucha información de invasiones fúngicas en ambientes naturales. Determinar qué es una especie exótica en el caso de los hongos puede resultar difícil, dado que hay numerosas especies fúngicas de distribución amplia (Rizzo, 2005), y la determinación de su estatus como nativo o introducido/ invasor depende de su documentación histórica en la región respectiva. Si bien, el concepto de especies exóticas para hongos es pobremente conocido, el primer catálogo de especies exóticas asilvestradas/naturalizadas en Chile incluyó 71 especies de hongos dentro de esta lista (PNUD, 2017).

El desplazo geográfico de hongos alóctonos de potencial invasor, sobre todo cuando se trata de especies biotróficas, puede ocurrir a través de las plantas exóticas, las cuales han servido como medio de transporte para patógenos fúngicos exóticos, hongos micorrícicos y endófitos (Rizzo, 2005). Estudios realizados por Duckie et al (2010) y Hayward et al (2015) demuestran que las plantas micorrícicas del género *Pinus*, co-invaden ambientes con sus mutualistas no nativos, evitando asociaciones novedosas con mutualistas locales, las cuales terminan siendo muy dependientes de su hongo micorrícico, inclusive, se puede decir que los hongos ECM permiten las invasiones, en el sentido de que los individuos no se establecerían y no podrían invadir sin sus hongos asociados (Hayward et al, 2015).

En los ecosistemas naturales, las distribuciones de los hongos micorrícicos están determinadas por las distribuciones de los árboles con los que forman simbiosis de forma natural (Geml et al, 2010), sin embargo, una vez que un árbol y sus hongos asociados son introducidos en un nuevo hábitat, los hongos micorrícicos de baja especificidad (generalistas) no solo se establecen en las plantaciones, sino que también pueden extenderse hacia los

bosques nativos, formando en ocasiones nuevas simbiosis con especies de plantas autóctonas (Moeller et al, 2015). Los hongos ectomicorrícicos invasores compiten por los recursos de la rizósfera y del suelo, por lo que un hongo invasor al producir varios esporocarpos al estar presente junto a una planta autóctona, esta puede capturar una parte significativa de los recursos disponibles, generando que estos recursos no estén disponibles para los hongos nativos (Dickie y Johnston, 2008).

En Chile, junto con la introducción de varias especies del género *Pinus* proveniente de América del Norte con el propósito de generar productos maderables a corto plazo, debido a su rápido crecimiento, se reportó rápidamente la aparición de varias especies de hongos, cómo *Lactarius deliciosus* (L.) Gray y *Russula sardonia* Fr. las cuales no se encontraban asociadas a ningún tipo de bosque nativo, si no, que se hallaban exclusivamente en plantaciones de pino (Garrido, 1982). Estudios micosociólogos (Valenzuela et al, 1998; Palfner y Casanova, 2019) en plantaciones de pino, han reportado principalmente especies introducidas o adventicias que forman asociaciones micorrícicas con *Pinus spp*, de las cuales se destacan los géneros: *Amanita*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula*, *Suillus* y *Xerocomus*. Valenzuela et al. (1998) al comparar un posible intercambio de especies entre bosque nativo y plantaciones exóticas no observaron “que especies micorrizógenas nativas desplacen o cohabitan con las citadas para *Pinus radiata*”, sin embargo, observaron la presencia del hongo *Amanita rubescens* Pers. en bosques nativos de *Nothofagus*, la cual es una especie micorrizógena que se introdujo en Chile con la llegada de *Pinus radiata* D. Don y con el potencial de desplazar algunos hongos micorrizógenos nativos (Garrido y Bresinsky, 1985). Un caso similar, el cual es el objeto de la presente investigación, es el hongo *Amanita muscaria* (L.) Lam. Este hongo, que llegó de igual manera con la introducción de *Pinus radiata*, se ha reportado desarrollándose en bosque nativo puro de *Nothofagus* en diversas regiones del país (Palfner y Casanova, 2019; Nouhra et al, 2019; Márquez, obs. Pers. 2023).

*Amanita muscaria* es un hongo ectomicorrícico con un amplio rango de hospedantes (Daniele et al, 2005). Natural de los bosques templados del hemisferio norte, este hongo se le ha visto asentarse en bosques de *Nothofagus* en Sudamérica, Nueva Zelanda y Tasmania, considerándose una invasión con éxito (Dunk et al, 2012). En Colombia, el estudio realizado por Vargas et al (2019), demostró que *Amanita muscaria* ha establecido una asociación

simbiótica con el árbol nativo *Quercus humboldtii* Bonpl. y que, en los últimos años, la especie ha persistido, sobrevivido y producido basidiomas en asociación con *Q. humboldtii*, superando tanto barreras geográficas como de huésped. En el mismo caso de Chile, la introducción de *Amanita muscaria* en Colombia está ligada con la introducción de las plantaciones de *Pinus patula* Schl. et Cham, en donde el hongo no se había registrado en Colombia hasta que las plantaciones forestales estuvieron bien establecidas. Si bien, los autores consideraron que *Amanita muscaria* actúa como especie invasora en Colombia bajo la definición de que “una especie invasora se define como aquella que se propaga de forma natural en zonas distantes de sus lugares de introducción”, aún no saben si *A. muscaria* está causando daños ambientales.

En base a los antecedentes de *A. muscaria* como especie invasora en Colombia y las observaciones de *A. muscaria* en los bosques de *Nothofagus* de nuestro país, se ha sugerido que este hongo simbiote es capaz de realizar asociaciones ectomicorrícicas con árboles nativos de Chile, trayendo posibles consecuencias como el desplazamiento de especies o, más grave aún, de géneros de hongos nativos que habitan naturalmente en las raíces de los árboles de *Nothofagus*, realizando estas conexiones micorrícicas como *Ramaria*, *Cortinarius*, *Boletus*, *Amanita*, entre otras. Sin embargo, aparte de la observación de esporomas en lugares con presencia de *Nothofagus* y ausencia de *Pinus*, esta posible asociación ectomicorrícica entre *A. muscaria* y *Nothofagus sp.* y su posterior efecto sobre la flora fúngica simbiótica nativa, no ha sido demostrado a nivel funcional. El objetivo de este trabajo fue evaluar si *Amanita muscaria* tiene la capacidad de realizar asociaciones ectomicorrícicas con las raíces de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst y *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. Para tal efecto, se realizó un ensayo de inoculación axénica controlada de raíces finas en laboratorio utilizando cepas de *Amanita muscaria* previamente recolectadas y cultivadas *in vitro* con plántulas de *Pinus radiata* (como grupo control) y plántulas de *N. obliqua* y *N. dombeyi*. De acuerdo con las observaciones mencionadas de *Amanita muscaria* creciendo en bosques de *Nothofagus*, se hipotetiza y espera que se evidencie un grado de asociación ectomicorrícica entre *Amanita muscaria* y las raíces de *Nothofagus spp.*

## **HIPÓTESIS**

*Amanita muscaria*, una especie ectomicorrícica adventicia que se estableció en Chile con la llegada de las plantaciones de *Pinus radiata*, tiene potencial para comportarse como especie invasora en los bosques de *Nothofagus spp* del país, formando asociaciones micorrícicas con estas plantas nativas. Se puede comprobar que mediante inoculación micorrícica in vitro se formen y evidencien ectomicorrizas por las mismas cepas de *A. muscaria* tanto como con las especies arbóreas nativas *Nothofagus obliqua* y *N. dombeyi* y la especie introducida *Pinus radiata* como grupo control.

# OBJETIVOS

## *Objetivo General*

Evaluar la capacidad de *Amanita muscaria* para formar asociaciones ectomicorrícicas con especies nativas del género *Nothofagus*.

## *Objetivos específicos (OE)*

O1. Evaluar las características de las plántulas de *Nothofagus* y *Pinus radiata* inoculadas con *Amanita muscaria*.

O2. Evaluar la presencia y grado de asociación micorrícica entre *Amanita muscaria*, dos especies de *Nothofagus* y *Pinus radiata*.

O3. Analizar y comparar los datos obtenidos de las plántulas de *Nothofagus* y de *Pinus radiata* inoculadas con el respectivo grupo control.

# METODOLOGÍA

## 1. Material vegetal.

### 1.1 Tratamiento, esterilización y germinación de semillas.

Para la realización del experimento, se utilizaron 50 g de semillas de *Nothofagus dombeyi* (Coihue) y 50 g de semillas de *Nothofagus obliqua* (Hualle) obtenidas de la colección de semillas con las que cuenta el Instituto Forestal. A su vez, también se recolectaron conos de pinos (*Pinus radiata*) en el campus del Instituto Forestal sede Biobío para extraer sus semillas, de las cuales se germinaron 20 g de semillas para el experimento. El protocolo se resume de la siguiente forma:

- I. Tratamiento pre-germinativo: Las semillas de *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus obliqua* poseen una latencia fisiológica que les impide germinar, por lo que es necesario realizar un tratamiento pre-germinativo. Para ello, se mantuvieron las semillas de *N. dombeyi* y *N. obliqua* 24 horas en una solución de ácido giberélico a 200 ppm.
- II. Esterilización de las semillas: Para la desinfección de las semillas de *Pinus radiata*, se utilizó el protocolo desarrollado por Royo et al (1998), el cual consistió en lavar las semillas en agua corriente durante 24 h para luego sumergirlas durante 30 min en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30p, 100 en agitación. En relación a las semillas de *Nothofagus dombeyi* y *N. obliqua*, se realizó un test de viabilidad de las semillas (Figura 1), en lo que posteriormente, las semillas viables fueron lavadas con detergente por 2 minutos para retirar el exceso de materia lipídica y luego, se enjuagaron hasta eliminar el contenido de detergente. A continuación, se remojaron en etanol (95%) por 5 segundos y nuevamente se enjuagaron, luego las semillas fueron remojadas en hipoclorito de sodio comercial al 4,9% por 10 minutos y posteriormente se lavaron con agua. Por último, las semillas se dejaron remojando en ácido giberélico por 24 horas (Alonso, 2005).

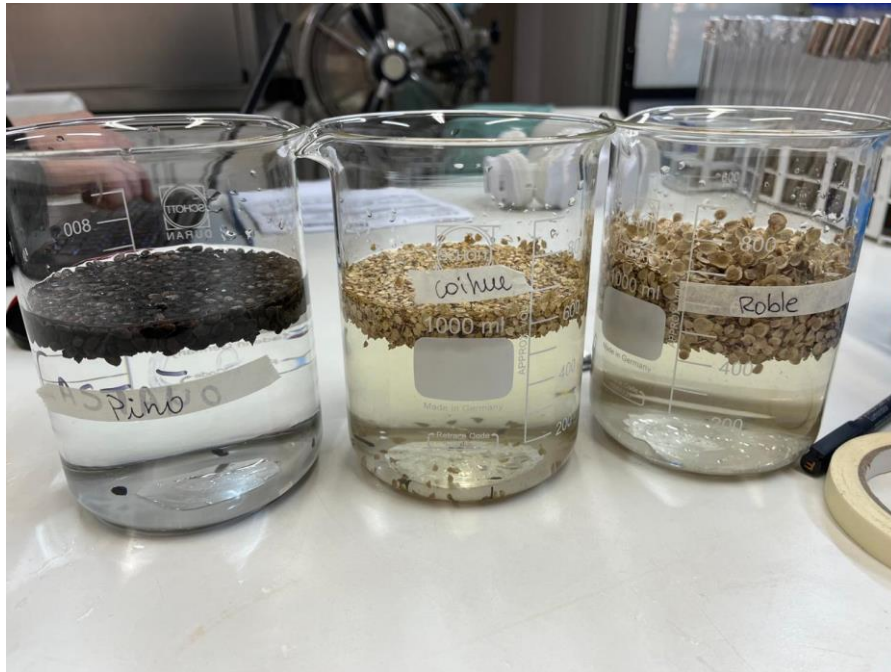


Figura 1. Test de viabilidad de semillas de *Pinus radiata*, *Nothofagus dombeyi* y *N. obliqua*.

- III. Germinación de las semillas: Se ordenaron las semillas de *Nothofagus* en papel secante, en donde se agruparon aproximadamente 70 semillas por cada placa Petri (Figura 2). Estas semillas fueron incubadas a 25°C y se controló diariamente su humedad y germinación. En relación a las semillas de *Pinus radiata*, estas se agruparon de igual forma 70 semillas por cada placa Petri.

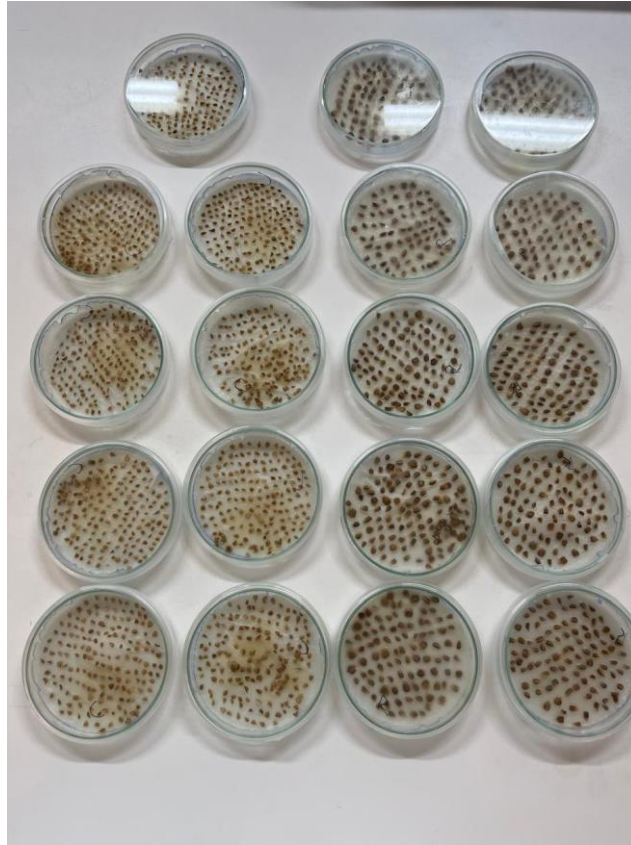


Figura 2. Semillas de *Nothofagus spp* organizadas en placas Petri con papel secante para su germinación.

### 1.2 Obtención de micelio

Para realizar el trabajo, se seleccionó el hongo *Amanita muscaria*, ectomicorrícico natural de *Pinus spp* y el cual se le ha observado desarrollándose en bosques de *Nothofagus spp*. El micelio del hongo se obtuvo del cepario del Instituto Forestal sede Biobío, en donde se escogieron dos cepas provenientes de la Región del Biobío (1F865001) y la Región de Los Ríos (1F1412003) para los experimentos.

Para la masificación del micelio, se extrajeron 80 fragmentos de micelio de aproximadamente 2x2cm provenientes de las cepas, luego se aislaron asépticamente en placas petri que contenían 20 ml de medio agar MNM (Melin-Norkrans Modified) (Marx, 1969). Estas se incubaron en una cámara de cultivo a 23°C en condiciones de oscuridad.

## 2. Diseño del experimento

Una vez masificado el micelio, con la ayuda de un sacabocado de 5mm se traspasó equitativamente el micelio de ambas cepas (90 y 90) a 180 tubos de ensayo de 125 x 16 mm que contenían 10 ml de MNM líquido para utilizarlos directamente en los ensayos de inoculación micorrícica, los que se incubaron en una cámara de cultivo a 23°C en condiciones de oscuridad (Figura 3).

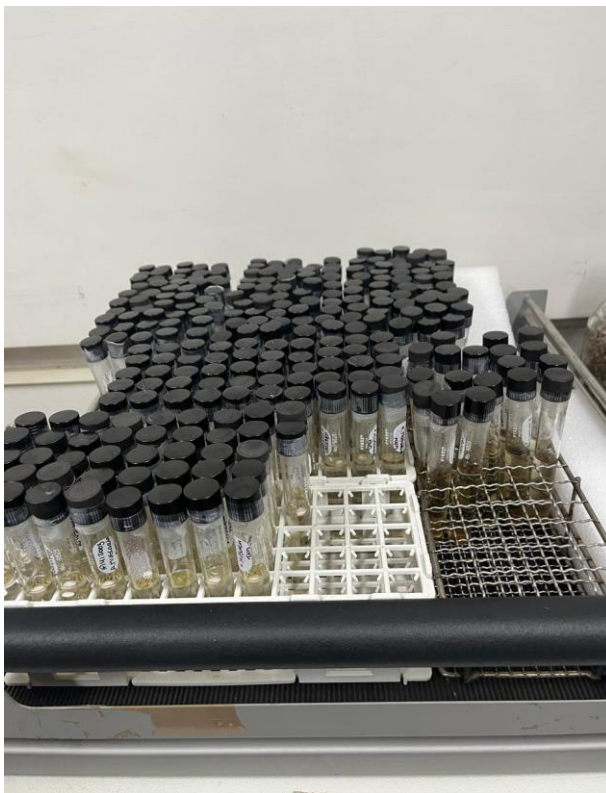


Figura 3. Preparación de muestras de cepas de *Amanita muscaria* en MNM líquido para la inoculación.

Para la síntesis de inoculación micorrícica, se utilizó el método desarrollado por Royo et al (1998). Para ello, se ocuparon tubos de 200 x 20 mm que contenían un sustrato de 20 ml de vermiculita (tamaño partícula 2mm) y 5 ml de turba (tamaño partícula 1mm), éste humedecido con 15 ml de MNM líquido (Melin-Norkrans Modified) (Marx, 1969) al que se le modificó su composición química, reduciendo la cantidad de glucosa a 2,5 g/l. Este sustrato fue autoclavado a 120°C durante 30 minutos.

Para la siembra e inoculación micorrícica (Figura 4), se procedió a introducir inicialmente el hongo en los tubos de síntesis, y posteriormente, la semilla germinada se incorporó al tubo de síntesis a un máximo de 10 días. Las plantas se mantuvieron a una temperatura ambiente, entre 20-30°C y bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. De esta forma, se inocularon cada una de las plántulas de *Nothofagus dombeyi*, *Nothofagus obliqua* y *Pinus radiata* como testigos.

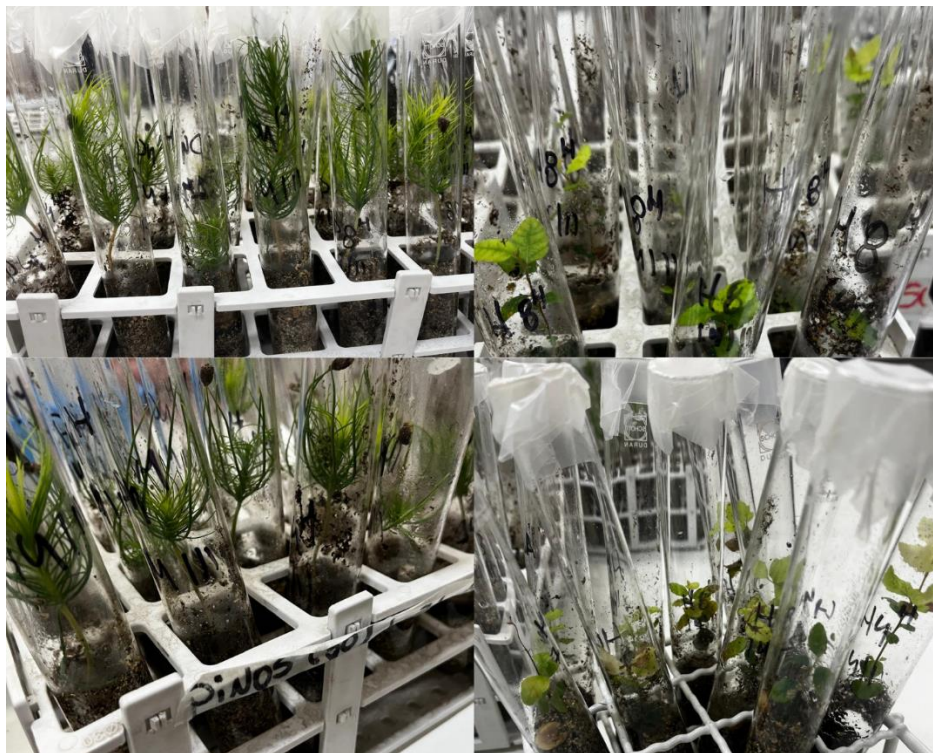


Figura 4. Cultivo in vitro de plántulas de pino (*Pinus radiata*, izq.) y hualle (*Nothofagus obliqua*, der.) con *A. muscaria* en condiciones de laboratorio.

### 3. Evaluación del crecimiento y micorriza.

Cumplido el plazo de 4 meses, las plantas fueron extraídas de los tubos de síntesis y se efectuó una limpieza del sistema radical bajo agua corriente para favorecer la observación distintas características tanto de las plantas como de las micorrizas. Dentro de las variables a medir a cada una de las plántulas, se tomaron los datos de: Largo planta, largo raíz, número de hojas y número de raíces secundarias. Para la descripción de las micorrizas se realizó la

caracterización y medición utilizada por Galindo-Flores et al (2015). Como atributos macroscópicos se consideraron el tipo de ramificación, coloración, longitud total del sistema ramificado y presencia de micelio y rizomorfos. Como atributos microscópicos se consideraron el grosor del manto, red de Hartig y diámetro de las hifas. Para identificar las micorrizas de *Amanita muscaria*, se utilizó literatura afín (Ingleby et al, 1990; Dunk et al, 2012) en donde esta asociación simbiótica se caracteriza por presentar estructuras radicales cortas, gruesas y sinuosas, con ramificaciones irregulares distribuidas de manera espaciada, formando frecuentemente agrupaciones densas. El eje principal no supera los 5 mm de longitud ni los 0.6 mm de diámetro. La textura del manto es áspera, con una notable apariencia granular. Aunque las hifas sueltas son escasas, es común encontrar cordones lisos y ramificados de menos de 0.1 mm de diámetro. En cuanto a su coloración, las micorrizas jóvenes exhiben un tono blanco plateado que, con el tiempo o al ser dañadas, se torna pardo (Figura 5).

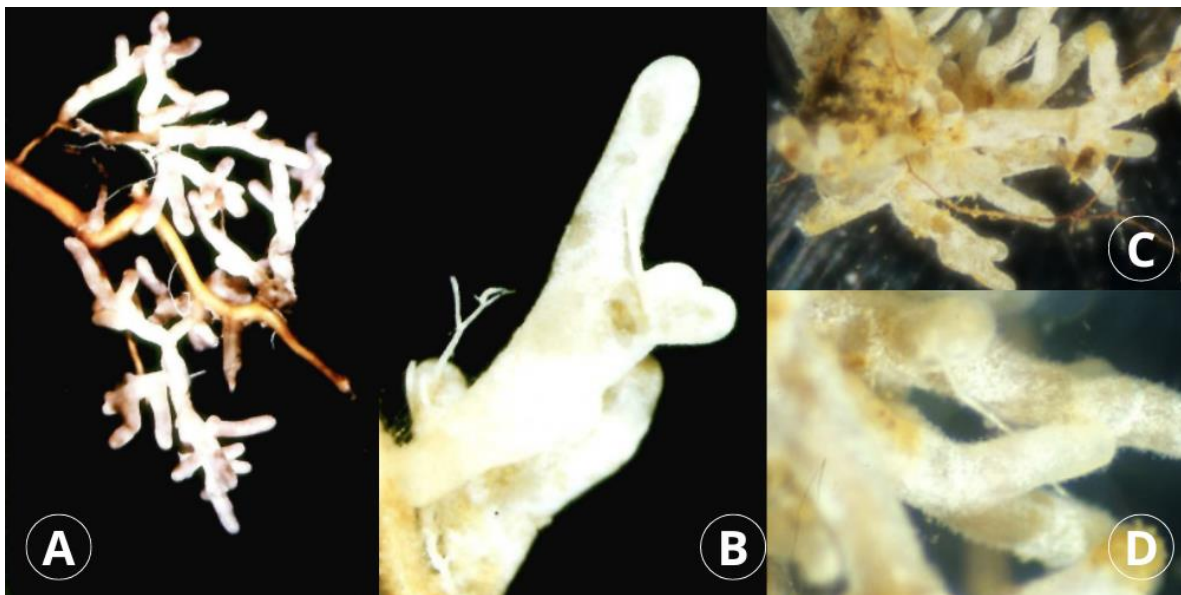


Figura 5. Micorrizas formadas por *Amanita muscaria* con diferentes especies de árboles hospederos. A y B: Micorrizas formadas con *Betula sp.* Extraído de: Ingleby et al, 1990.

C y D: Micorrizas formadas con *Nothofagus cunninghamii*. Extraído de: Dunk et al, 2012.

#### 4. Análisis estadísticos.

Para evaluar el efecto de la inoculación con *Amanita muscaria* en las variables morfológicas de las plantas de Pino (*Pinus radiata*) y Coigue (*Nothofagus dombeyi*), se realizó una prueba estadística de Wilcoxon (Hollander et al, 2013). Esta prueba no paramétrica permite comparar dos muestras relacionadas, en este caso, el grupo control y el grupo experimental para cada especie vegetal. Se compararon las variables de longitud de raíces, número de raíces secundarias y longitud de la planta entre los grupos control y experimentales, tanto para *Pinus radiata* como para *Nothofagus dombeyi*. La prueba de Wilcoxon determina si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados para cada variable morfológica evaluada, con un nivel de significancia de 0.05. Este análisis permitirá evaluar si la inoculación con *A. muscaria* tuvo un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en comparación a los respectivos grupos control.

## RESULTADOS

### **Objetivo 1:** Evaluar las características de las plántulas inoculadas con *Amanita muscaria*.

Atributos morfológicos y de crecimiento de la planta.

En base a la metodología anteriormente descrita, pasado los 4 meses, se extrajeron las plántulas de los tubos de ensayo para observar y describir las características tanto del tallo y sistema radicular de las plántulas inoculadas. En total, se extrajeron 18 plántulas vivas de un total de 60 de pino (*Pinus radiata*), 8 plántulas vivas de un total de 60 de hualle (*Nothofagus obliqua*) y 5 plántulas vivas de un total de 60 de coigue (*Nothofagus dombeyi*) (Figura 6). Los porcentajes de mortalidad de las plántulas inoculadas fueron muy altos, siendo el pino con mayor porcentaje de supervivencia con un 30% y un porcentaje de mortalidad de 70%. El porcentaje de mortalidad de hualle fue de 86% y el porcentaje de mortalidad de coigue fue de un 90%.



Figura 6. Plántulas inoculadas extraídas de los tubos de ensayo. A: *Pinus radiata*. B: *Nothofagus obliqua*. C: *Nothofagus dombeyi*. Barra de referencia 2 cm.

Con relación al largo del tallo de las plántulas de pino, estas variaban desde 6 cm hasta 14 cm, abarcando un promedio de 8,4 cm (tablas 1 y 2). Con las plántulas de *N. obliqua*, los

tallos crecieron en un rango de 5,5 hasta 9 cm, siendo más pequeñas que las plántulas de pino, dando un promedio de 6,625 cm (tablas 3 y 4). Finalmente, los tallos de las plántulas de *N. dombeyi* tenían un rango de 3 cm a 7 cm, dando un promedio de 4,6 cm, siendo estas las que crecían en menor tamaño.

Con respecto al sistema radicular (Figura 7), el tamaño promedio del largo de la raíz de las plántulas de pino fue de 10,5 cm, además de un promedio de raíces secundarias de 13 (tablas 1 y 2). En las plántulas de *N. obliqua*, el promedio de largo de la raíz fue de 3,2 cm, sin embargo, el promedio de raíces secundarias de hualle fue de 21, siendo considerablemente mayor a la cantidad de raíces secundarias de pino (tablas 3, 4). Finalmente, en relación con el promedio del largo de la raíz de *N. dombeyi*, esta fue de un total de 2 cm, mientras que el promedio de raíces secundarias fue de 11 (tablas 3, 4). Las raíces secundarias de *Nothofagus* se caracterizaban por ser raíces delgadas y de gran cantidad, a diferencia de las de pinos, que son raíces gruesas y poseen menor cantidad de raíces secundarias (ver Tabla 1 – 5)

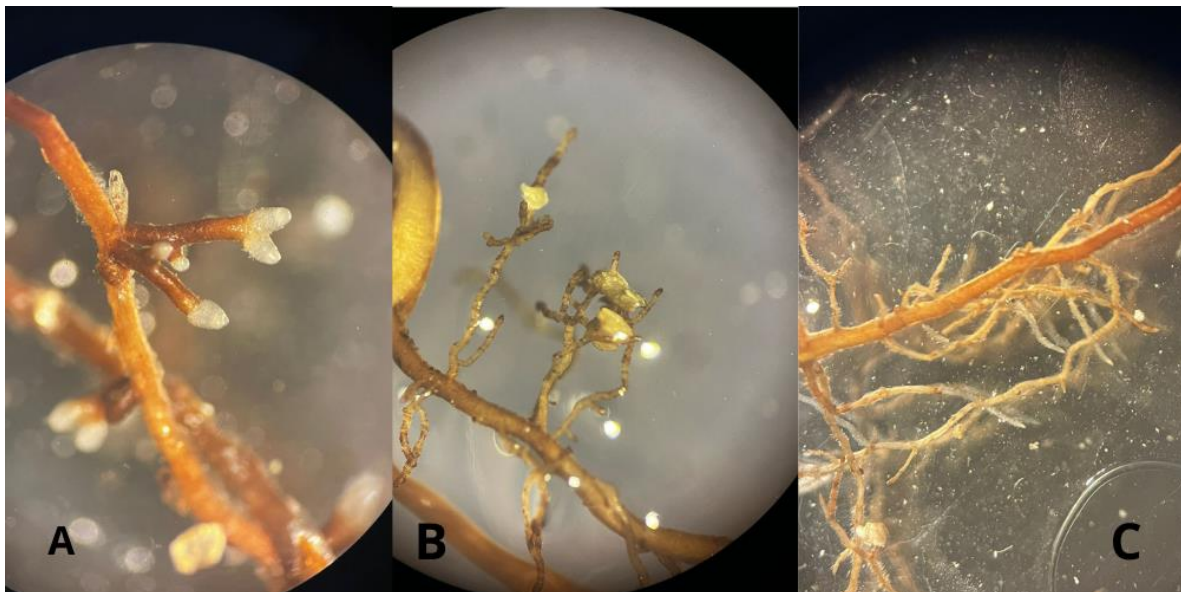


Figura 7. Sistema radicular de plántulas inoculadas con *Amanita muscaria*. A: *Pinus radiata*. B: *Nothofagus obliqua*. C: *Nothofagus dombeyi*. Aumento: 30x

**Objetivo 2:** Evaluar la presencia y grado de asociación micorrícica entre *Amanita muscaria* y dos especies de *Nothofagus* y *Pinus radiata*.

No se registraron ectomicorrizas de *Amanita muscaria* asociada a las raíces de *Nothofagus* ni de *Pinus radiata*. Tanto las raíces de *Pinus radiata*, *Nothofagus obliqua* y *N. dombeyi* inoculadas con ambas cepas de *Amanita muscaria*, mostraron raíces secundarias desnudas, con presencia de pelos radicales, con ausencia de características típicas de la presencia de ectomicorrizas, como manto fúngico, red de Hartig o micelio periférico. Algunas raíces secundarias de pino presentaban bifurcaciones (Figura 8) presentándose como un indicio de la fase temprana de ectomicorrización.

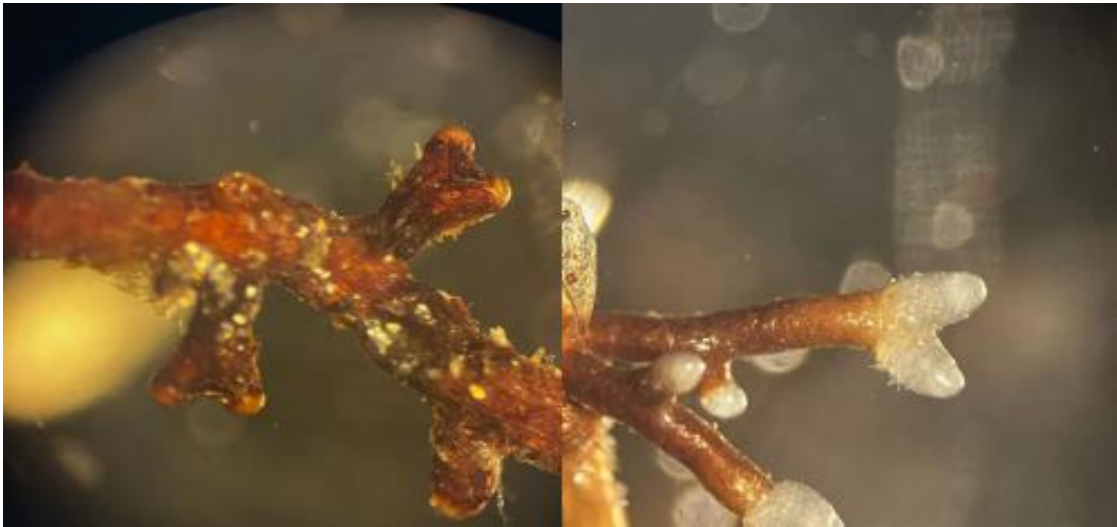


Figura 8. Raíces secundarias bifurcadas de *Pinus radiata*. Aumento: 40x

Otro de los indicios de una posible micorrización, es de que ciertas raíces tanto de pino y coigue, a excepción de las de hualle, presentaban micelio blanquecino en las raíces secundarias y raíz principal (Figura 9), producto posible del crecimiento de la cepa de *A. muscaria* inoculada en los tubos. Se destacó de igual forma la ausencia de pelos radicales en algunas de las plántulas inoculadas.



Figura 9. Micelio observado en sistema radicular de *Pinus radiata*. Aumento: 40x

**Objetivo 3.** Analizar y comparar los datos obtenidos de las plántulas de *Nothofagus* y de *Pinus radiata* inoculadas con el respectivo grupo control.

En relación con las plántulas del grupo control, se cultivaron 45 plantas en total en los respectivos tubos de ensayo sin inocular. 15 plantas correspondían a *Pinus radiata*, 15 plantas a *Nothofagus obliqua* y 15 plantas a *N. dombeyi*. Con respecto a *Pinus radiata*, de 15 plantas inoculadas, 14 sobrevivieron. Por el contrario, las plantas de *Nothofagus* tuvieron un índice de mortalidad más alto. En *Nothofagus obliqua*, no sobrevivió ninguna de las 15 plantas inoculadas en los tubos de control, mientras que en *Nothofagus dombeyi*, de 15 plantas inoculadas, solo 4 sobrevivieron. Las plántulas muertas y/o moribundas principalmente del género *Nothofagus*, presentaban síntomas de pudrición o decoloración de la hoja, a un color marrón o negro después de 1 mes. A pesar de que se hayan realizado protocolos de desinfección durante la germinación de semillas de *Nothofagus*, algunas de ellas presentaban patógenos visibles que impedían el crecimiento óptimo de la plántula.

Se compararon y analizaron los datos obtenidos de las plántulas de *Nothofagus dombeyi* y *Pinus radiata* inoculadas con las cepas de *Amanita muscaria* y se compararon con las plántulas obtenidas en el grupo control, sin inoculación de la cepa de *Amanita muscaria*. Se compararon tanto las variables de largo de la planta, largo de la raíz y cantidad de raíces secundarias presentes en las plántulas.

En lo que respecta a las plántulas de Pino, por medio de un análisis estadístico de Prueba Wilcoxon para muestras independientes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las variables de largo de la planta, largo de la raíz ni cantidad de raíces secundarias. Con relación a la variable largo de la planta, la media obtenida para el grupo de plántulas inoculadas fue de 8.42, mientras que la media para el grupo control fue de 7.14, siendo ligeramente más baja que las plántulas inoculadas (Figura 10). Con lo que respecta al largo de la raíz, la media obtenida para el grupo de plántulas inoculadas fue de 10.50, mientras que el grupo control, obtuvo una media de 9.39 (Figura 10). Finalmente, con relación a las raíces secundarias la media para el grupo experimental de plántulas fue de 13.22, mientras que el grupo control tiene una media de 9.44, demostrando que las plántulas de pino inoculadas poseen mayor cantidad de raíces secundarias, esto posiblemente debido a la inoculación y a la posible formación temprana de micorrizas (Ver tabla 6 – 7)

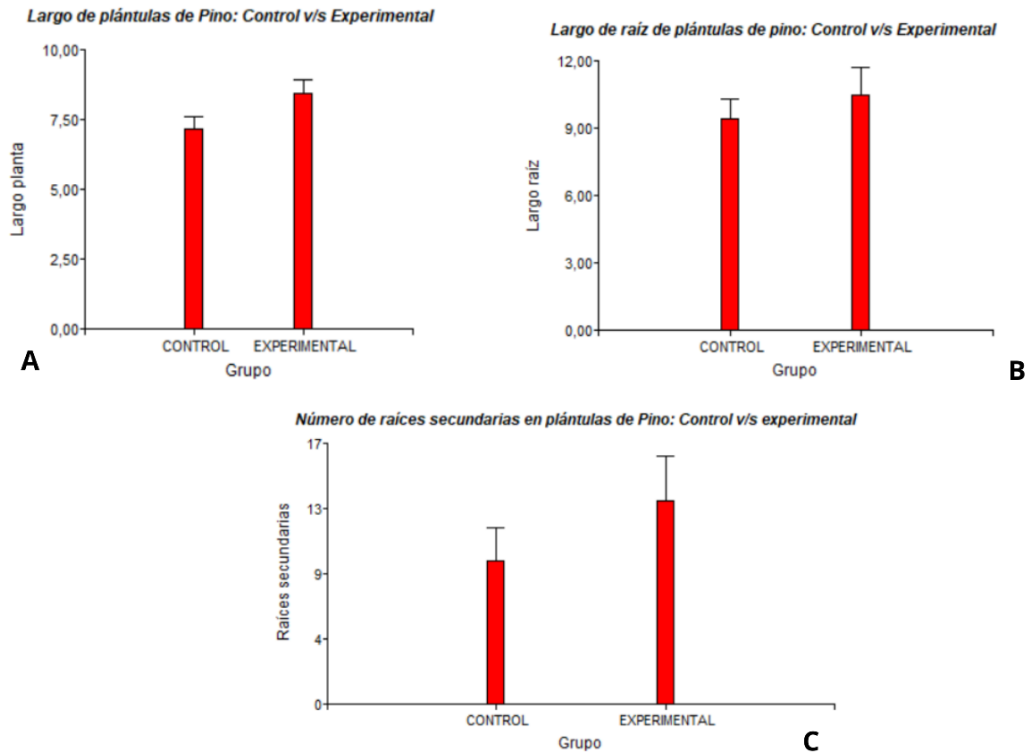


Figura 10: Gráficos de barra de comparación de atributos morfológicos de *Pinus radiata* entre grupo control y grupo experimental.

En cuanto a las plántulas de *N. dombeyi*, observamos un escenario diferente (Ver tabla 8 – 9) . Por medio del mismo análisis estadístico de prueba de Wilcoxon, observamos diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta las variables del grupo experimental y el grupo control. En lo que respecta a la variable largo de la planta; la media del grupo control es de 7.88, mientras que el largo de la planta en el grupo experimental, es de 4.67, siendo significativamente más bajo que el grupo control ( $p= 0.01$ ). En relación al largo de la raíz, en el grupo experimental, el largo de la raíz obtiene una media de 2.00, mientras que en el grupo control, la media del largo de la raíz es de 4.75, siendo significativamente ( $P=0.02$ ) mayor al del grupo experimental. Por último, en las raíces secundarias es donde encontramos las mayores diferencias significativas ( $P=0.01$ ), ya que la media de raíces secundarias de las plántulas de *N. dombeyi* en el grupo control es de 44.75, siendo excesivamente abundantes ante la ausencia del inóculo de *Amanita muscaria*, mientras que la media de raíces

secundarias en el grupo experimental es de 10.33, obteniendo una menor cantidad en aquellas plantas inoculadas (Figura 11).

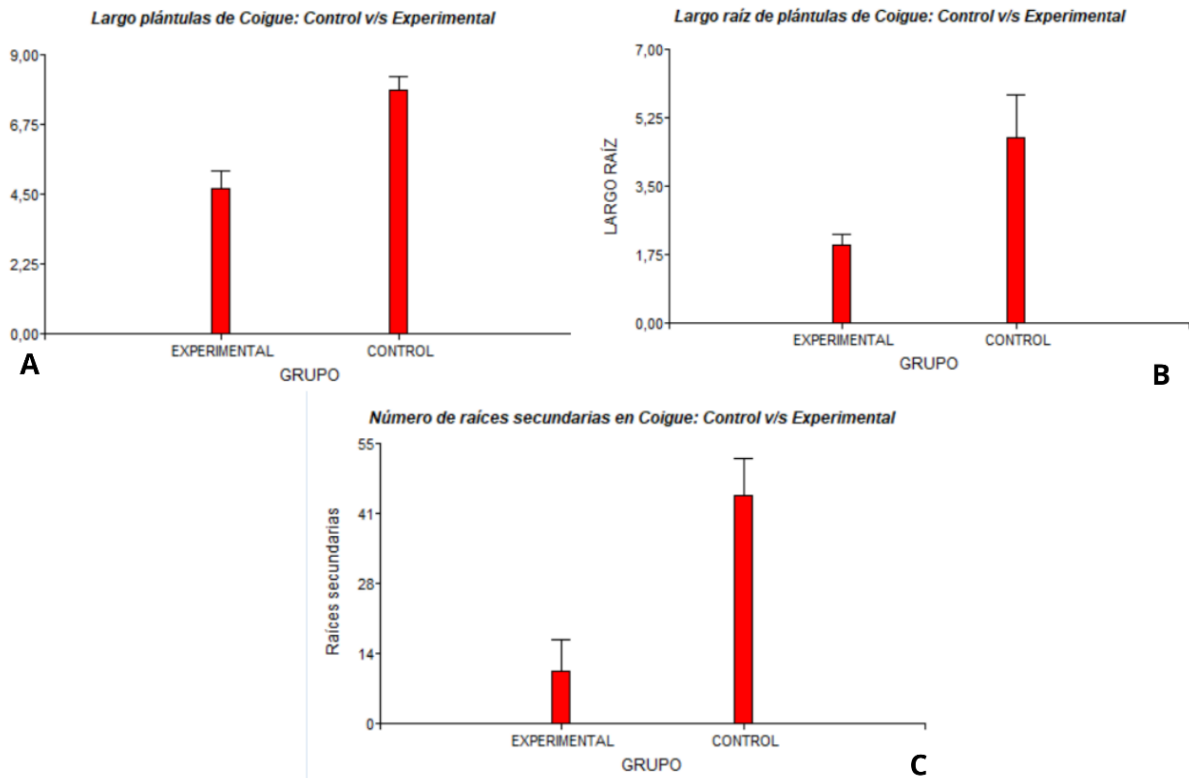


Figura 11: Gráficos de barra de comparación de atributos morfológicos de *Nothofagus dombeyi* entre grupo control y grupo experimental.

Tabla de resultados obtenidos.

Tabla 1. Características morfológicas de plántulas de *Pinus radiata* inoculada con *Amanita muscaria* en cultivo in vitro.

CÓDIGO	CEPA	LARGO PLANTA	LARGO RAÍZ	RAÍCES SEC.
P1	4	9	7	11
P2	4	10	7	7
P3	4	9,5	12	10
P4	4	12	25	40
P5	8	7	8	10
P6	8	5	9	4
P7	4	7,5	10	10
P8	8	6	7	4
P9	4	11	12	42
P10	4	7,5	9	13
P11	4	7	14	7
P12	4	8	7	1
P13	4	9,5	6,5	24
P14	4	9,5	15	30
P15	8	14	15	10
P16	4	6,5	15,5	6
P17	8	8,5	3	2
P18	8	6,5	7	7

Tabla 2. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas inoculadas de *Pinus radiata*.

VARIABLE	n	MEDIA	D.E
LARGO PLANTA	18	8,42	2,28
LARGO RAÍZ	18	10,50	5,07
RAÍCES SEC.	18	13,22	12,37

Tabla 3. Características morfológicas de plántulas de *Nothofagus obliqua* (Código: H) y *Nothofagus dombeyi* (Código: C) inoculada con *Amanita muscaria* en cultivo in vitro.

CÓDIGO	CEPA	LARGO PLANTA	LARGO RAÍZ	RAÍCES SEC.
H1	4	7	3	27
H2	4	5,5	3,7	21
H3	4	6	4	20
H4	8	6,5	2,5	4
H5	4	9	3	73
H6	8	8	5	5
H7	8	6	2	3
H8	8	5	3	21
C1	8	4	1,5	2
C2	8	5,5	2,5	39
C3	4	4,5	3	13
C4	4	7	1,5	6
C5	4	4	1,5	2
C6	4	3	2	0

Tabla 4. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas inoculadas de *Nothofagus dombeyi*.

VARIABLE	n	MEDIA	D.E
LARGO PLANTA	6	4,67	1,40
LARGO RAÍZ	6	2,00	0,63
RAÍCES SEC.	6	10,33	14,79

Tabla 5. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas inoculadas de *Nothofagus obliqua*.

VARIABLE	n	MEDIA	D.E
LARGO PLANTA	8	6,63	1,33
LARGO RAÍZ	8	3,28	0,94
RAÍCES SEC.	8	27,75	22,70

Tabla 6. Características morfológicas de plántulas de *Pinus radiata* como grupo control en cultivo in vitro.

CÓDIGO	LARGO PLANTA	LARGO RAÍZ	RAÍCES SEC.
PC1	7	12	28
PC2	6	9,5	7
PC3	5	6	0
PC4	6,5	9	14
PC5	5	14	4
PC6	10	14,5	18
PC7	7,5	5,5	0
PC8	8,5	6,5	6
PC9	6,3	4,5	1
PC10	6	8	5
PC11	9	9,5	12
PC12	9,5	15	16
PC13	6,5	8,5	7
P14	11	9	13

Tabla 7. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas control de *Pinus radiata*.

VARIABLE	n	MEDIA	D.E
LARGO PLANTA	14	7,14	1,65
LARGO RAÍZ	14	9,39	3,37
RAÍCES SEC.	14	9,36	7,96

Tabla 8. Características morfológicas de plántulas de *Nothofagus dombeyi* como grupo control en cultivo in vitro.

CÓDIGO	LARGO PLANTA	LARGO RAÍZ	RAÍCES SEC
CC1	7,5	5,5	43
CC2	9	3	41
CC3	8	3	30
CC4	7	7,5	65

Tabla 9. Promedio y desviación estándar (D.E.) de las variables morfológicas medidas en las plántulas control de *Nothofagus dombeyi*.

VARIABLE	n	MEDIA	D.E
LARGO PLANTA	4	7,88	0,85
LARGO RAÍZ	4	4,75	2,18
RAÍCES SEC.	4	44,75	14,66

## DISCUSIÓN

Si bien, los resultados obtenidos no favorecen la hipótesis de formación de micorrizas in vitro, no es un motivo para descartar la posibilidad de que se puedan formar micorrizas de *Amanita muscaria* asociada a especies de *Nothofagus spp.* Los factores que influyen en la formación de micorrizas pueden ser múltiples: Un estudio de micorrización in vitro (Reddy y Natarajan, 1996), evaluó la capacidad de distintos hongos para formar micorrizas con diferentes especies del género *Pinus*, en donde se observó que *Amanita muscaria* mostró una deficiente colonización y para la semana 12 no había logrado inducir una formación de ectomicorriza y uno de los factores atribuidos fue la nula cantidad de glucosa utilizada en el estudio. *Amanita muscaria* ha sido considerado un hongo de fase tardía (aspecto que se discutirá más adelante) en donde los hongos de fase temprana y tardía difieren en la formación de micorriza dependiendo de la disponibilidad de glucosa en el medio en donde Gibson y Deacon (1990), encontraron que los hongos de fase tardía eran altamente dependientes de la glucosa. Los resultados coinciden con la metodología implementada en este estudio, en donde se redujo la cantidad de glucosa con este mismo fin de evitar la dependencia de la glucosa y permitir al hongo formar la micorriza con las plantas. De igual forma, los hongos tardíos como *A. muscaria*, se encuentran en árboles en maduración, particularmente en las partes más antiguas del sistema radicular (Fleming et al, 1985). Esto pudo haber influenciado fuertemente en la formación de ectomicorrizas con *Nothofagus sp*, pues, si bien, en las plántulas de pino se observaron indicios de formación de ectomicorrizas (Figura 7) las cuales se caracterizan por poseer formas bifurcadas, siendo cortas y robustas cuando son jóvenes (Mohan et al, 1993), las plantas de *Nothofagus sp* a comparación de *Pinus sp*, se caracterizan por tener un crecimiento lento, como podemos observar en los resultados, el promedio de largo de raíces de pino es de 10,5 cm aproximadamente, mientras que en las plántulas de coigue y hualle el promedio no superaba 4 cm de largo, factor que pudo haber sido determinante al no evidenciar esta formación o indicios de ectomicorriza en las plántulas de *Nothofagus*.

Como se mencionó en el párrafo anterior, *Amanita muscaria* es considerado un hongo de fase tardía (Ingleby et al, 1990; Mason et al, 1983). Mason et al (1983) se refiere al concepto de

sucesión micorrícica como la idea de que diferentes especies de hongos micorrícicos se asocian con árboles en distintas etapas de crecimiento, los cuerpos fructíferos de hongos micorrícicos aparecen en secuencias específicas, tanto en el tiempo como en el espacio, a medida que los árboles crecen. Además, menciona que algunas especies de hongos micorrícicos solo forman micorrizas en árboles más viejos, mientras que otras son más comunes en árboles jóvenes, como, aislaciones de raíces realizadas por Chu-Chou y Grace (1981) confirmaron que *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) estaba asociada únicamente a plántulas jóvenes de Abeto, mientras que *Amanita muscaria* solo pudo ser aislada de micorrizas cuando los árboles poseían entre 13 o más años. También, Mason et al (1983) menciona observaciones en plantaciones de pino (*Pinus patula*) en el sur de India, en donde se observó un aumento significativo en la producción de cuerpos fructíferos de *A. muscaria* a medida que los árboles envejecían, pasando de 32 cuerpos fructíferos por mil árboles en plantaciones de 5 años a 3.720 cuerpos fructíferos por mil árboles en plantaciones de 16 años. Esto pudo haber sido un factor determinante en la formación de micorriza en el estudio, pues las observaciones hacen referencia a que esta especie de hongo necesita árboles en una etapa más avanzada de crecimiento para establecerse correctamente. La ausencia de micorriza podría estar influenciada por la falta de desarrollo adecuado del árbol, que aún no ha alcanzado la etapa en la que *Amanita muscaria* comienza a formar asociaciones micorrícicas.

Por otra parte, cabe destacar la comparación entre los atributos morfológicos del grupo experimental de Coigue con el grupo control, en donde se observa una diferencia estadísticamente significativa tanto en las mediciones del sistema radicular como del largo de la planta. Esta diferencia radica principalmente en que la planta no inoculada presenta mayores crecimientos tanto en la raíz como en el tallo que la planta inoculada con *A. muscaria*, este hecho es comparable a resultados encontrados por Alonso (2005), en donde se inocularon plantas de *Nothofagus* con el hongo ectomicorrícico nativo *Descolea antarctica* Singer y se observó que el tratamiento que obtuvo las variables morfológicas mejores evaluadas fueron correspondientes al tratamiento testigo que corresponde a plántulas de *Nothofagus* sin inocular, en el cual, la autora hipotetiza que una de las razones puede ser debido al tiempo corto considerado para la evaluación de los tratamientos (6 meses), el cual pudo no ser óptimo para llegar a observar la eficiencia de la micorrización. Aparte de los mencionados factores en relación con el tiempo de tratamiento o la cantidad de glucosa, otros

factores que pudieron haber afectado en la formación de micorriza en cultivo in vitro pueden ser variados, pues, el desarrollo de una micorriza es un proceso complejo en donde puede influenciar la edad de la planta, el lento crecimiento de los hongos, los niveles de fósforo y nitrógeno del medio o el contenido hídrico del sustrato (Royo et al, 1998), más si tomamos en cuenta el hecho de que *Amanita muscaria* no es un hongo que se desarrolle de forma nativa con Coigue o Hualle.

Siguiendo el hecho de que el grupo control obtuvo mejores resultados que el grupo experimental en las plántulas de Coigue, esto podría indicar que la presencia del hongo tuvo una gran influencia sobre el crecimiento de las plántulas de Coigue, es posible que *A. muscaria* haya tenido un efecto negativo sin establecer una simbiosis efectiva, en donde la presencia de este hongo pudo haber desencadenado respuestas de estrés en la planta, afectando su crecimiento o incluso no permitiendo su ectomicorrización. La aleopatía es un proceso ecológico importante en la composición vegetal, la cual se considera una herramienta de autodefensa que ayuda a las plantas a protegerse de diferentes organismos como insectos, otras plantas u hongos (Javaid, 2007), sin embargo, también se han registrado estudios que prueban que algunas especies de macro hongos tienen potencial alelopático (Araya, 2015; Putra, 2020). Los aleloquímicos son metabolitos secundarios producidos a través de las vías del ácido acético y del ácido shikímico, e incluyen muchas clases químicas tales como ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, terpenoides, alcaloides y sulfuros (Putra, 2020). En vista de lo anterior mencionado, los compuestos fenólicos son conocidos por su capacidad para inhibir o estimular el crecimiento de ciertos hongos micorrícicos, lo que podría ser un mecanismo mediante el cual la planta selecciona las especies de hongos que colonizan sus raíces. Ciertas características de las raíces sugieren un papel de los compuestos fenólicos en la regulación tanto de las especies de hongos que pueden infectar como del grado en que infectan la raíz, en donde los compuestos fenólicos pueden formar una barrera, limitando potencialmente el desarrollo de hongos micorrícicos (Koide et al, 1998). En el caso de *Amanita muscaria*, es plausible que la presencia de compuestos fenólicos específicos en *Nothofagus* como el fenol (Quiroz et al, 1999) en el ambiente in vitro puede haber impedido la formación de micorrizas. La variabilidad en los perfiles fenólicos entre diferentes especies de plantas podría explicar por qué ciertos hongos se asocian preferentemente con determinadas especies de plantas. Un estudio realizado por Koide et al (1998) ha demostrado

que diferentes especies de hongos micorrícicos responden de manera diferente a los compuestos fenólicos. Por ejemplo, algunas especies pueden ser inhibidas por ciertos fenólicos, mientras que otras pueden ser estimuladas. En particular, *Suillus intermedius* (Pat.) Kuntze es una especie que tiene un rango de huéspedes muy específico, asociándose frecuentemente con el pino rojo, en donde se demostró que las agujas de pino rojo (*Pinus Resinosa* Ait.), las cuales contienen compuestos fenólicos, estimulan el crecimiento de *Suillus intermedius*. En contraste, el crecimiento de *Amanita rubescens*, una especie con un rango de huéspedes más amplio se ve negativamente afectado por la presencia de agujas de pino. Esto podría perfectamente relacionarse al hecho de que *Nothofagus* tiene asociaciones micorrícicas con hongos especializados y específicos de sus hábitats naturales, en donde *A. muscaria*, al ser un hongo generalista e introducido, podría haberse visto inhibida por la presencia de compuestos fenólicos que produce este árbol, así afectando el éxito de la micorrización en sus estadios iniciales.

Si bien, no se formó la micorrización esperada, no se puede descartar el hecho de una invasión por parte de *A. muscaria* en los bosques nativos con especies del género *Nothofagus*. Según Richardson et al (2000), una invasión requiere que la especie en cuestión sea capaz de producir descendencia en áreas fuera de su sitio de introducción, en escalas aproximadas de 100 metros desde el propágulo de origen y por al menos 50 años. En base a la definición de este concepto, es sabido que las plantaciones de pino no pueden prosperar sin sus hongos ectomicorrícicos (Dickie et al, 2010). La invasión de *Pinus sp* es claramente un proceso dominado por la co-invasión, en donde un estudio realizado por Dickie et al (2010) demostró que en las muestras de suelo por especie en lugares donde se observaba plantaciones de *Pinus sp*, el 93% de las asociaciones ectomicorrícicas eran de *Pinus sp* con hongos no nativos, además, que la invasión generalizada de pinos en pastizales de Nueva Zelanda, contrasta de igual forma con el fracaso de especies del género *Nothofagus* para extenderse a zonas de estas áreas, a pesar de una abundante fuente local de semillas y que ese mismo pastizal fue un bosque de *Nothofagus* antes de la colonización humana. *Pinus radiata* se introdujo en Chile en el año 1885 con fines ornamentales, y actualmente es la base de la industria forestal en Chile (Bustamante et al, 2004), y que para el año 1993, estas plantaciones alcanzaron 1.24 millones de hectáreas, en este tiempo, la mayor superficie de plantaciones de *P. radiata* en todo el mundo (Lara y Veblen, 1993). Valenzuela et al. (1998) registra la presencia de *A.*

*muscaria* en plantaciones de *Pinus radiata* en el sur del país. Distintos registros locales reportadas en bases de datos como Inaturalist, han realizado observaciones (912) de *Amanita muscaria* a lo largo del país, desde la región de Valparaíso hasta la región de Aysén, lo que demuestra su gran capacidad de dispersión. Si bien, no se han hecho estudios de dispersión en Chile, en Colombia, Vargas et al (2019), registraron que la distancia mínima entre *A. muscaria* con el árbol nativo colombiano *Quercus* y *A. muscaria* con las plantaciones de pino fue de 851 m, lo que sugiere que el hongo ha colonizado un hospedero nuevo a una distancia considerable de la fuente original.

A pesar de los resultados obtenidos en este estudio, no se puede descartar la posibilidad de que este hongo pueda establecer asociaciones simbióticas con los árboles nativos en condiciones naturales. Es necesario profundizar en la investigación sobre los factores que influyen en la micorrización, como las condiciones ambientales específicas de los bosques de *Nothofagus*. Además, se requieren estudios sobre la capacidad de dispersión de *A. muscaria* en Chile y su potencial invasión en los ecosistemas nativos, lo que podría tener implicaciones importantes para la conservación de estos valiosos bosques.

A modo de conclusión, para facilitar la formación de *A. muscaria* con *Nothofagus*, se podrían modificar varios factores cruciales: Primero, el tiempo de incubación debería ser extendido, esto debido a que *A. muscaria* es un hongo de fase tardía que establece asociaciones micorrícicas en árboles maduros. Un período más largo quizás permitiría al hongo adaptarse y formar micorrizas más efectivamente. Además, ajustar la concentración de glucosa en el medio de cultivo es importante, pues, como se observó en estudios pasados (Gibson y Deacon, 1990), *A. muscaria* necesita condiciones en las que pueda desarrollar una simbiosis óptima con la ayuda de altas concentraciones de glucosa. También es recomendable optimizar las condiciones ambientales del cultivo, incluyendo tanto el contenido hídrico, el sustrato a utilizar, y la temperatura, para crear un entorno que favorezca la micorrización, tomando adecuaciones específicas para el hongo. Por otro lado, existen otros métodos que se pueden utilizar para comprobar la formación de *A. muscaria* con *Nothofagus*, como el uso de análisis moleculares utilizando secuencias de ADN, como las regiones ITS-1 e ITS-2 (Dunk et al, 2012; Vargas et al, 2019) para confirmar la presencia de *A. muscaria* y el tipo de planta

asociada por medio de extracción de raíces y micelio con presencia de esporocarpos de *Amanita muscaria*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Araya, H. 2015. Allelopathy of Mushrooms. In New Developments in Allelopathy Research; Price, J.E., Ed.;Nova Publisher: New York.
2. Alonso, C. 2005. “DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA MICORRIZACIÓN CON CEPAS DE *Descolea antarctica* Singer EN PLÁNTULAS DE *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst., CULTIVADAS EN CONDICIONES DE VIVERO”. [<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fca454d/doc/fca454d.pdf>]
3. Arroyo, M., C. Marticorena, O. Matthei & L. Cavieres. 2000. Plant invasions in Chile: present patterns and future predictions. In. H. Mooney & R. Hoobs (eds.) Invasive Species in a Changing World. Island Press, Washington, pp. 395-421.
4. Baeriswyl, F. 2017. PROYECTO MMA/GEF/PNUD Fortalecimiento de los Marcos Nacionales para la Gobernabilidad de las Especies Exóticas Invasoras (EEI). Proyecto Piloto en el Archipiélago Juan Fernández. [<https://info.undp.org/docs/pdc/Documents/CHL/Informe%20Final%20proyecto%20JFA.PDF>]. Revisado: 28 Junio 2023.
5. Barra, S. 2004. Ensayos de inoculación micorrízica en *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst., en condiciones de invernadero. [<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fifb268e/doc/fifb268e.pdf>] Revisado: 30 Julio 2023
6. Bustamante, R. O., Simonetti, J. A., Grez, A. A., & San Martín, J. 2005. Fragmentación y dinámica de regeneración del bosque maulino: diagnóstico actual y perspectivas futuras. *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*, 555-564.
7. CDB. 2009. Conferencia de las Partes COP 6, Decisión VI/23: Especies exóticas que amenazan a los ecosistemas, los hábitats o las especies. Convenio sobre Diversidad Biológica. [[www.cbd.int/decision/cop/?id=7197](http://www.cbd.int/decision/cop/?id=7197)]. Revisado: 28 Junio 2023.
8. Cerda, C., G. Cruz, O. Skewes, A. Araos, P. Tapia, F. Baeriswyl & P. Critician. 2017. Especies exóticas invasoras en Chile como un problema económico: valoración preliminar de impactos. *Revista del Jardín Botánico Chagual*. 15: 12-22.

9. Chu-Chou, M., & Grace, L. J. 1981. Mycorrhizal fungi of *Pseudotsuga menziesii* in the South Island of New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* 13, 247-249
10. Daniele, G., A. Becerra, & E. Crespo. 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.
11. Dickie, I. A., Johnston, P., Singers, N., Toft, R., Waipara, N., Walbert, K., & Council, N. R. 2008. Invasive fungi research priorities, with a focus on *Amanita muscaria*. *Landcare Research, Lincoln*.
12. Dickie, I. A., Bolstridge, N., Cooper, J. A., & Peltzer, D. A. 2010. Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 187(2), 475-484.
13. Dunk, C., T. Lebel & P. Keane. 2012. Characterisation of ectomycorrhizal formation by the exotic fungus *Amanita muscaria* with *Nothofagus cunninghamii* in Victoria, Australia. *Mycorrhiza*, 22:135-147.
14. Figueroa - Rivera, G., R. Rodríguez, B. Guerrero, M. González, J. Pons, J. Jiménez, J. Ramírez, E. Enríquez & M. Mendoza. 2010. Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28: 124-134.
15. Fillinger, S. & Y. Elad. 2016. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Nueva York, 485 pp.
16. Fleming, L. V. (1985). *Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi on birch (Betula SP.) seedling root systems*. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(5), 591–600. doi:10.1016/0038-0717(85)90034-3
17. Fuentes, N., A. Pauchard, P. Sánchez, J. Esquivel & A. Marticorena. 2013. A new comprehensive database of alien 37 26 plant species in Chile based on herbarium records. *Biological Invasions*, 15: 847-858.
18. Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., & Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93(4), 855-863.
19. Garrido, N. & A. Bresinsky. 1985. *Amanita merxmuelleri* (Agaricales), eine neue Art aus *Nothofagus*-Waldern Chiles. *Botanische Jahrbücher Systematik*, 107: 521-540.

20. Garrido, N. 1982. Russulaceae en plantaciones introducidas en Chile. *Boletín de la sociedad argentina en botánica*, 21: 7-16.
21. Geml, J., R. Tulloss, G. Laursen, N. Sazanova, & D. Taylor. 2010. Phylogeographic analyses of a boreal-temperate ectomycorrhizal basidiomycete, *Amanita muscaria*, suggest forest refugia in Alaska during the last glacial maximum. *Relict species: phylogeography and conservation biology*, 173-186.
22. Gibson, F. and Deacon, J. W. 1990. Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture : effects of glucose, nitrogen and phosphorus in relation to successions . *Mycol . Res .* 94: 166-172 .
23. Hayward, J., Horton, T. R., Pauchard, A., & Nuñez, M. A. 2015. A single ectomycorrhizal fungal species can enable a *Pinus* invasion. *Ecology*, 96(5), 1438-1444.
24. Hollander, M., Wolfe, D. A., & Chicken, E. (2013). *Nonparametric statistical methods*. John Wiley & Sons.
25. Ingleby, K., Mason, P. A., Last, F. T., & Fleming, L. V. 1990. *Identification of ectomycorrhizas*. Hmsco.
26. Javaid, A. 2007. Allelopathic interactions in mycorrhizal associations. *Allelopathy Journal*, 20(1), 29.
27. Koide, R., Suomi, L., & Berghage, R. 1998. Tree-fungus interactions in ectomycorrhizal symbiosis. In *Phytochemical Signals and Plant-Microbe Interactions* (pp. 57-70). Boston, MA: Springer US.
28. Koleff, P. 2017. Conceptos básicos sobre las invasiones biológicas y sus impactos a la biodiversidad. MC editores. Principales retos que presenta México ante las especies exóticas invasoras. Cesop, CDMX, pp. 13- 33.
29. Lara, A., & Veblen, T. T. 1993. Forest plantations in Chile: a successful model. *Afforestation: policies, planning and progress*, 118-139.
30. LIB. 2023. Invasiones biológicas. [<http://www.lib.udec.cl/invasiones-biologicas/su-impacto-en-chile/>]. Revisado: 30 Junio 2023.
31. Marx, D. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.

32. Mason, P. A., Wilson, J., Last, F. T., & Walker, C. 1983. The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil*, 71, 247-256.
33. Moeller, H., I. Dickie, D. Peltzer & T. Fukami. 2015. Mycorrhizal co-invasion and novel interactions depend on neighborhood context. *Ecology*, 96 (9): 2336-2347.
34. Mohan, V., Natarajan, K., & Ingleby, K. 1993. Anatomical studies on ectomycorrhizas: II. The ectomycorrhizas produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. *Mycorrhiza*, 3, 43-49.
35. Moser, M. 1960. Die Gattung *Phlegmacium*. Die Pilze Mitteleuropas 4. J. Bad Heilbrunn.
36. Nouhra, E., G. Palfner, F. Kuhar, N. Pastor & E. Smith. 2019. Ectomycorrhizal fungi in South America: their diversity in past, present and future research. *Mycorrhizal Fungi in South America*: 73-95.
37. Palfner, G. & A. Casanova. 2018. Micocenosis en remanentes de bosque nativo y en plantaciones forestales en la península de Arauco, Biobío, Chile: composición, aspectos funcionales y conservación. *Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile*, 175 - 210.
38. Pauchard, A. & P. Alaback. 2002. La amenaza de plantas invasoras. *Chile Forestal*, 289: 13-15.
39. PNUD. 2017. Catálogo de las especies exóticas asilvestradas/ naturalizadas en Chile. Laboratorio de Invasiones Biológicas (LIB) Universidad de Concepción, Proyecto GEF/MMA/PNUD Fortalecimiento de los Marcos Nacionales para la Gobernabilidad de las Especies Exóticas Invasoras: Proyecto Piloto en el Archipiélago de Juan Fernández. Santiago de Chile. 61 pp
40. Putra, I. 2020. Allelopathic activity of some wild mushroom in Indonesia.
41. Quiroz, A., Fuentes-Contreras, E., Ramírez, C. C., Russell, G. B., & Niemeyer, H. M. 1999. Host-plant chemicals and distribution of *Neuquenaphis* on *Nothofagus*. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1043-1054.
42. Reddy, M. , & Natarajan, K. 1996. In vitro ectomycorrhizal formation of *Pinus patula*, *P. pseudostrobus*, *P. oocarpa* and *P. elliotii* grown in southern India. *New forests*, 11, 149-153.

43. Richardson, D. M., Pyšek, P., Rejmanek, M., Barbour, M. G., Panetta, F. D., & West, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and distributions*, 6(2), 93-107.
44. Ríos, H. & O. Vargas. 2003. Ecología de las especies invasoras. *Pérez-Arbelaezia*, 14: 119- 148.
45. Rizzo, D. 2005. Exotic Species and Fungi: Interactions with Fungal, Plant, and Animal Communities. *Mycology Series*, 23: 857 - 877
46. Royo, P., C. Fischer & L. Fernández. 1998. Síntesis micorrícica de "Lactarius deliciosus" Fr. y "Pinus sylvestris" L. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 7: 85-94.
47. Valenzuela, E., G. Moreno, S. Garnica & C. Ramirez. 1998. Micosociología en bosques nativos de *Nothofagus* y plantaciones de *Pinus radiata* en la X Región de Chile: diversidad y rol ecológico. *Revista Chilena de Historia Natural*, 71: 133 - 146.
48. Vargas, N., S. Gonçalves, A. Franco-Molano, S. Restrepo & A. Pringle. 2019. In Colombia the Eurasian fungus *Amanita muscaria* is expanding its range into native, tropical *Quercus humboldtii* forests. *Mycologia*, 111(5): 758-771.