



HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES Y ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS EN RAÍCES DE HELECHOS NATIVOS DE USO MEDICINAL DE LAS SIERRAS CENTRALES DE SAN LUIS, CENTRO-OESTE DE ARGENTINA

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND DARK SEPTATE ENDOPHYTES IN ROOTS OF NATIVE MEDICINAL FERNS FROM "SIERRAS CENTRALES DE SAN LUIS", CENTRAL-WEST ARGENTINA

María Luz Torres^{1,2} , Esteban M. Crespo^{1,2} , M. Cecilia Carosio¹ & Mónica A. Lugo^{1,2,3*}

1. Área de Ecología, Dpto. de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Facultad de Química Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, San Luis, Argentina

2. MICODIF- Grupo de Micología, Diversidad e Interacciones Fúngicas

3. IMIBIO-CONICET-UNSL

*lugo@unsl.edu.ar,
monicalugo63@gmail.com

Citar este artículo

TORRES, M. L., E. M. CRESPO, M. C. CAROSIO & M. A. LUGO. 2024. Hongos micorrícicos arbusculares y endófitos septados oscuros en raíces de helechos nativos de uso medicinal de las Sierras Centrales de San Luis, centro-oeste de Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 59: 375-392.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v59.n3.44533>

Recibido: 13 Mar 2024

Aceptado: 27 Jul 2024

Publicado en línea: 30 Sep 2024

Publicado impreso: 30 Sep 2024

Editora: Agustina Yañez

ISSN versión impresa 0373-580X

ISSN versión on-line 1851-2372

SUMMARY

Background and aims: The plant's roots and fungi establish symbiotic endophytic associations that can coexist: arbuscular mycorrhizae and "dark septate" endophytes. Ferns and lycophytes are vascular plants that can form both fungal symbioses. The objective of this work is to detect the presence of fungal root endosymbiosis, know the mycorrhizal status, and analyze the type of colonization in native and ornamental ferns from the "Sierras Centrales de San Luis".

M&M: In three sites in the "Sierras Centrales de San Luis", 9-10 individuals of each studied species were collected, their roots were processed to study these fungal. Characterization and quantification of their root colonization was evaluated.

Results: In the three sites studied, *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* formed mycorrhizal associations, the colonization presented abundant hyphal and arbusculated intracellular coils. In addition, glomoid spores of mycorrhizal fungi were found in their rhizospheres. Dark septate endophytes were absent in all species analyzed, none hyphae neither microsclerotia were recorded in roots of these native medicinal ferns.

Conclusions: The mycorrhizal status of *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*, one of the five medicinal fern species from the Sierras Centrales de San Luis studied, is presented. The arbuscular mycorrhizal colonization is described and quantified, and its type is determined as *Paris*. None of the fern species studied was associated with dark septate endophytes.

KEY WORDS

Arbuscular mycorrhizae, *Arum*, Chaco District, dark septate endophytes, ferns, *Paris*.

RESUMEN

Introducción y objetivos: Las raíces de las plantas y los hongos establecen asociaciones simbióticas endófitas que pueden coexistir: las micorrizas arbusculares y los endófitos "septados oscuros". Los helechos y licófitos son plantas vasculares que pueden formar ambas simbiosis fúngicas. El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de endosimbiosis radicales fúngicas, conocer el *status* micorrícico y analizar el tipo de colonización radical en helechos nativos y ornamentales de las Sierras Centrales de San Luis.

M&M: En tres sitios de las Sierras Centrales de San Luis, se recolectaron 9-10 individuos de cada especie estudiada y sus raíces fueron procesadas para el estudio de estas endosimbiosis fúngicas, la cuantificación y caracterización de la colonización radical.

Resultados: En los tres sitios estudiados, *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* formó asociaciones micorrícicas y la colonización radical presentó abundantes circunvoluciones hifales y arbusculadas intracelulares. Además, se hallaron esporas glomoides de hongos micorrícicos en sus rizósferas. Los endófitos septados oscuros estuvieron ausentes en todas las especies analizadas.

Conclusiones: Se da a conocer el *status* micorrícico de *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*, una de las cinco especies de helechos medicinales de las Sierras Centrales de San Luis estudiadas. Se describe y cuantifica la colonización micorrícico arbuscular, determinándose su tipo como *Paris*. Ninguna de las especies de helechos estudiadas estuvo asociada con endófitos septados oscuros.

PALABRAS CLAVE

Arum, Distrito Chaqueño, endófitos septados oscuros, helechos, Micorrizas arbusculares, *Paris*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos del filo Glomeromycota (Montoliu-Nerin *et al.*, 2021; Wijayawardene *et al.*, 2022), establecen asociaciones simbióticas mutualistas con las raíces *ca.* del 70% de las plantas terrestres, desde los briófitos, incluyendo a la gran mayoría de los helechos y licófitos hasta las plantas con semillas (Smith & Read, 2008; Lehnert *et al.*, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018). A estas interacciones simbióticas se las denomina micorrizas arbusculares (MA) por formar arbusculos, estructuras hifales muy ramificadas y características, que el simbionte fúngico desarrolla intracelularmente en las células radicales corticales (Smith & Read, 2008). En las MA los hongos micorrícicos arbusculares (HMA, Glomeromycota) permiten movilizar a través de sus hifas nitratos, fosfatos y otros elementos esenciales desde suelo a las raíces de la planta hospedante, de la que obtienen a cambio el carbono orgánico producto de la fotosíntesis para su nutrición heterotrófica (Hodge *et al.*, 2010). El intercambio de nutrientes es bidireccional hospedante-simbionte y ocurre en la interfase celular planta-hongo en los arbusculos (Smith & Read, 2008; Bonfante & Genre, 2010; Hodge *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017).

En las asociaciones MA pueden distinguirse dos tipos morfo-anatómicos de colonización de las raíces, los tipos *Arum* y *Paris* y morfologías intermedias o tipos intermedios (Dickson, 2004; Smith & Read, 2008). El morfotipo *Arum* se caracteriza por la presencia de hifas intercelulares entre las células corticales del hospedante, vesículas inter e intracelulares y ramificaciones cortas que constituyen los arbusculos masivos dentro de las células del hospedante. En el morfotipo *Paris* la colonización hifal de la raíz es intracelular, con repliegues hifales o circunvoluciones intracelulares sobre los que se forman arbusculos inconspicuos o circunvoluciones arbusculadas (Brundrett, 2002; Dickson, 2004). Las asociaciones del tipo *Paris* son más frecuentes en los ecosistemas naturales (Smith & Smith, 1997); podrían ser más ventajosas para las plantas de crecimiento lento, que habitan ecosistemas umbríos (Brundrett & Kendrick, 1990b; Yamato & Iwasaki, 2002), integran comunidades vegetales en etapas sucesionales avanzadas, crecen en condiciones ambientales de bajo contenido de nutrientes y estrés debido a que su tasa de propagación dentro de las raíces

es más lenta que la del tipo *Arum*, suministrando energía a los hongos discrecionalmente (Brundrett & Kendrick, 1990a, b; Ahlu *et al.*, 2005). En cambio, el tipo *Arum* es más frecuente en cultivos agrícolas (Dickson, 2004; Smith & Read, 2008; Muthukumar & Prakash, 2009), que incluyen en general especies de crecimiento rápido y ciclos de vida anuales, en malezas (Yamoto, 2004), en plantas pioneras en las sucesiones (Ahlu *et al.*, 2005) y en especies hospedantes invasoras exóticas (Shah *et al.*, 2009; Gucwa-Przepióra *et al.*, 2016). Sin embargo, las relaciones entre los tipos morfológicos de colonización MA, sus efectos y funcionalidad a nivel ecosistémico son aún inconsistentes (Brundrett & Kendrick, 1990b; Urcelay *et al.*, 2005). Es necesario examinar un rango de hospedantes más diverso y mayor número de especies en diferentes hábitats para poder comprender en profundidad la formación y el funcionamiento de los morfotipos *Arum*, *Paris* y los intermedios en las simbiosis MA.

Otro grupo importante de hongos involucrados en la asociación simbiótica con las raíces de más de 600 especies de plantas hospedadoras (Jumpponen & Trappe, 1998), son los endófitos denominados “septados oscuros” (SO) o endófitos radicales dematiáceos, reconocidos como un grupo heterogéneo que funcionalmente y ecológicamente coexisten con otros hongos del suelo, colonizando intra e intercelularmente los tejidos de las raíces, formando asociaciones simbióticas que van desde el mutualismo al parasitismo (Jumpponen & Trappe, 1998; Newsham, 2011; Knapp *et al.*, 2012). Los SO son un grupo heterogéneo y ubicuo de Ascomycota y Basidiomycota, generalmente con hifas pigmentadas y septadas que además pueden formar una estructura intracelular densamente replegada llamada microesclerocio (Jumpponen & Trappe, 1998; Knapp *et al.*, 2012). En la interacción mutualista, los SO proporcionan a la planta varios beneficios potenciales que conducen a inducir la resistencia a enfermedades, mejorar el crecimiento del hospedador, tolerar el estrés abiótico y proteger la planta de competidores patógenos e insectos predadores mediante la síntesis de metabolitos secundarios fúngicos (Barrow, 2003; Mandyam & Jumpponen, 2005, 2015; Schulz, 2006; Newsham, 2011).

Las plantas actuales evolucionaron en diversas alternativas para la movilización de los nutrientes del suelo, siendo óptima la obtención de nutrientes

a través de las micorrizas (Brundrett, 2009). Estas simbiosis micorrícicas son diversas, se diferencian por la morfo-anatomía de la colonización fúngica en las raíces de los hospedantes, la identidad de los simbiontes fúngicos involucrados y su funcionalidad ecosistémica (Brundrett, 2004, 2009). Además, cada tipo micorrícico se asocia con un sistema radical particular; así, si las raíces son gruesas, crecen lentamente o son longevas, forman MA obligadas. En contraste, las plantas con raíces finas y activas y de ciclos vitales cortos, forman micorrizas facultativas; mientras que, algunas plantas no micorrícicas que no están asociadas a simbiontes micorrícicos en suelos fértiles, sí se benefician de esta asociación en suelos pobres (Brundrett, 2002). Los helechos y licófitos se hallan entre las plantas vasculares más primitivas, se originaron durante el Silúrico (Edwards & Fanning, 1985) y con el transcurso del tiempo fueron dominando la superficie terrestre con sus formas arborescentes, muchas de las cuales se encuentran extintas en la actualidad. Su reproducción se lleva a cabo a través de esporas producidas durante un ciclo de vida complejo, con alternancia de generaciones heteromórficas: gametófito (n) y esporófito (2n), que les permiten colonizar diferentes nichos ecológicos (Kenrick, 2017a, b); junto con otras especies, estos organismos son excelentes bioindicadores debido a su dependencia con el agua en alguna parte de su ciclo vital, sobre todo considerando que su área de distribución abarca hábitats vulnerables por la intervención humana (Mehlreter, 2010a, b). Debido a la diversidad y la importancia ecológica que presentan las plantas vasculares sin semilla como los helechos y licófitos (Mehlreter, 2010a; Sharpe *et al.*, 2010; Nagalingum, 2016; Anderson, 2021), es necesario investigar las asociaciones endosimbióticas radicales en este grupo.

Asimismo, el conocimiento de la naturaleza y la biología de esta asociación es clave para entender la evolución de la simbiosis fúngica como una innovación que lleva a las plantas a la colonización de los ambientes terrestres (Kessler *et al.*, 2010; Pressel *et al.*, 2016). Son escasos los estudios sobre la relación entre el hábitat, el hábito y el tipo de asociaciones simbióticas con HMA y SO en helechos y licófitos (Gemma *et al.*, 1992; Mehlreter, 2010b). Estudios recientes indican que estas plantas, en ambientes terrestres y saxícolas, se asocian más frecuentemente con HMA que con

SO (Lehnert *et al.*, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018). Por el contrario, las especies epífitas de helechos son colonizadas en un alto porcentaje por SO y en menor grado con HMA (Kessler *et al.*, 2010; Lehnert *et al.*, 2017). Si bien los helechos presentan más del 67% de las especies formando MA, las familias estudiadas están constituidas por pocos representantes, a excepción de Anemiaceae, Schizaceae y Nephrolepidaceae que presentan un alto número de taxones que participan en la asociación simbiótica (Lehnert *et al.*, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018). En Argentina los registros de las interacciones simbióticas entre los endófitos fúngicos HMA y SO en helechos y licófitos fueron realizados en el sur, centro y noroeste del país (Fontenla *et al.* 1998, 2001, 2022; Alborno & Hernández, 2006; Fernández *et al.*, 2008, 2010, 2012a, b; Hernández *et al.*, 2008, 2010; Fracchia *et al.*, 2009).

Por más de 2500 años los humanos han utilizado las plantas con fines medicinales; actualmente, en forma directa, se usan como fuente de medicina herbolaria para la cura de enfermedades en la mayoría de los países subdesarrollados, en particular en las zonas tropicales y subtropicales del planeta; e indirectamente, como proveedoras de los principios activos y sustancias químicas utilizados en la industria farmacéutica para la elaboración de medicamentos de uso comercial (World Health Organization-WHO global report on traditional and complementary medicine. <https://iris.who.int/handle/10665/312342>, 2019). Las plantas medicinales están amenazadas de extinción, por la pérdida y contaminación del hábitat; al mismo tiempo, el aumento en su demanda, el incremento concomitante de su producción y la estandarización requerida para su comercialización han contribuido a un incremento marcado de su cultivo intensivo (Porwal *et al.*, 2020; Mofokeng *et al.*, 2022). Asimismo, la producción a gran escala de las plantas medicinales implicó el detrimento de sus cualidades medicinales como la disminución de los contenidos de sus principios activos y de su actividad metabólica (Zeng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018).

Las interacciones simbióticas entre las plantas medicinales con SO, HMA y sus tipos de colonización (Zubek & Blaszkowski, 2009; Zeng *et al.*, 2013) han recibido especial interés a nivel mundial por los beneficios que estos simbiontes

fúngicos brindan a sus hospedantes, mejorando su nutrición, aumentando su productividad, resistencia a patógenos y a la sequía (Smith & Read, 2008). En particular, los HMA y las MA son fundamentales para su cultivo, debido a su rol primordial en el aumento de compuestos activos, metabolitos secundarios medicinales y la actividad metabólica del hospedante, y consecuentemente del incremento en la calidad farmacéutica de las plantas micorrizadas (Zhao *et al.*, 2022; Yuan *et al.*, 2023). Estos estudios se han realizado mayoritariamente en plantas con semillas, con predominio de las angiospermas y escasos representantes de las gimnospermas (Zubek & Blaszkowski, 2009; Zeng *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2022; Yuan *et al.*, 2023). A pesar del gran potencial y del amplio uso medicinal de los helechos y licófitos (Cao *et al.*, 2017; Abraham & Thomas, 2022; Antony & Suresh, 2022; Kholia & Balkrishna, 2022; Marimuthu *et al.*, 2022 entre otros), son escasos los estudios que abordan sus endosimbiosis fúngicas radicales en helechos medicinales en Asia (Muthukumar *et al.*, 2007; Zhang *et al.* 2022) y Norteamérica (Hodson *et al.*, 2009; De la Rosa Mera *et al.*, 2012; Chávez-Hernández *et al.*, 2021). En Sudamérica, los reportes sobre licófitos y helechos (Fernández *et al.*, 2008, 2010, 2012a, b; Hernández *et al.*, 2008), han incluido algunas especies registradas como medicinales (Barboza *et al.*, 2006), aunque el carácter medicinal de los hospedantes no fue parte del objetivo de estudio en ninguno de ellos. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de simbiosis con HMA y SO, cuantificar la colonización por estos endófitos radicales, caracterizar el tipo de colonización MA en helechos nativos y medicinales en las Sierras Centrales de San Luis en la región Chaqueña de la Argentina, y discutir sus posibles implicancias y aplicación en su cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y diseño de muestreo

En el centro-oeste de Argentina, en las Sierras Centrales de San Luis, localidad El Volcán, Cuesta del Gato, provincia de San Luis, se establecieron tres sitios de muestreo a ca. 900 m s.n.m.: Sitio A (33° 15' 0.16'' S, 66° 12' 46.8'' O), Sitio B (33° 15' 1.6'' S, 66° 12' 48'' O) y Sitio C (33° 15' 0'' S, 66°

12' 59.3'' O) (Fig. 1). En cada sitio se recolectaron entre nueve y diez individuos de helechos nativos, los que posteriormente se procesaron para la determinación de su colonización radical por HMA y SO. Las partes aéreas de los materiales cuyas raíces fueron analizadas, más tres individuos completos de cada especie recolectada, fueron herborizados para su identificación taxonómica y conservación como *vouchers* en la Micoteca MICODIF (Unidad 266 360-SNDB-UNSL, Argentina) registrada en el Index Herbariorum (<https://sweetgum.nybg.org/science/ih/herbarium-details/?irn=257568>).

Material estudiado

Anemia tomentosa (Savigny) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel. ARGENTINA. Prov. San Luis: Dpto. Juan Martín de Pueyrredón, El Volcán, Sierras Centrales de San Luis, Cuesta del Gato, 27-II-2014, Torres *et al.* 1, 3, 5, 7 (MICODIF). *Argyroschisma nivea* (Poir.) Windham var. *nivea*. ARGENTINA. Prov. San Luis: ídem, Torres *et al.* 10, 11 (MICODIF). *Cheilanthes buchtienii* (Rosenst.) R.M. Tryon. ARGENTINA. Prov. San Luis: ídem, Torres *et al.* 12 (MICODIF). *Myriopteris myriophylla* (Sw.) Sw. ARGENTINA. Prov. San Luis: ídem, Torres *et al.* 13 (MICODIF). *Pleopeltis pinnatifida* Gillies ex Hook. & Grev. ARGENTINA. Prov. San Luis: ídem, Torres *et al.* 14 (MICODIF).

Especies de helechos nativos estudiados

Se analizaron cinco especies nativas de helechos (Fig. 2): *Anemia tomentosa* (Savigny) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel (Anemiaceae), *Pleopeltis pinnatifida* Gillies ex Hook. & Grev. (Polypodiaceae), *Argyroschisma nivea* (Poir.) Windham var. *nivea*, *Cheilanthes buchtienii* (Rosenst.) R.M. Tryon y *Myriopteris myriophylla* (Sw.) Sw. (Pteridaceae). Todos los taxones estudiados presentan registros de sus usos medicinales populares en la región de estudio del centro-oeste de la Argentina (Roig, 2002; Barboza *et al.*, 2006; 2009). Así, *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* se utiliza como béquico y expectorante; *Argyroschisma nivea* var. *nivea* como emenagogo, laxante, diaforético, contra el dolor de cabeza y la sinusitis, pectoral y estornutatorio; *Myriopteris myriophylla* como diaforético y pectoral, y *Cheilanthes buchtienii* y *Pleopeltis pinnatifida* como abortivos (Roig, 2002; Barboza *et al.*, 2006; 2009).



Fig. 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo (A, B, C) en el área de estudio (recuadro amarillo) de las Sierras Centrales de San Luis, provincia de San Luis, Argentina.

Determinación de la colonización radical por HMA y SO

En las raíces de las especies de los helechos recolectados, se aplicaron las técnicas de clarificación y tinción que permitieron observar la colonización radical de los HMA y SO, siguiendo la metodología de Phillips y Hayman (1970), con modificaciones leves como el agregado de peróxido de oxígeno (10% V/V) para clarificar las raíces intensamente pigmentadas. Las muestras teñidas se analizaron al microscopio óptico a 400x, para determinar la presencia de los endófitos radicales (HMA, SO) y la intensidad de colonización (medida como porcentaje de colonización) en cada uno de los individuos de los helechos nativos recolectados. El porcentaje de colonización se cuantificó por el método de McGonigle *et al.* (1990); para los HMA las variables evaluadas fueron los porcentajes de arbuscúlos (%A), vesículas (%V) y colonización hifal MA (%H); mientras que para los SO, las variables cuantificables fueron la colonización hifal SO (%H-SO) y el porcentaje de microesclerocios (%ME-SO). El tipo de colonización por HMA se caracterizó considerando la propuesta de Dickson (2004) con

los morfotipos principales *Arum* (definido por el crecimiento intercelular de las hifas y la formación de arbuscúlos conspicuos intracelulares) y *Paris* (con hifas colonizando siempre intracelularmente en las células hospedantes, replegándose formando circunvoluciones con ramificaciones que originan pequeños arbuscúlos o circunvoluciones arbusculadas) como los tipos extremos de un continuo morfo-anatómico del desarrollo del hongo en la raíz hospedante. Los preparados fijados en alcohol polivinílico (Omar *et al.*, 1979) se resguardaron como *vouchers* en la Micoteca MICODIF (Unidad 266-360 SNDB-UNSL, Argentina).

Análisis de los datos

Las variables evaluadas (%A, %V y %H), no presentaron distribución homogénea de sus varianzas aplicando la prueba de Levene y fueron analizadas aplicando el test de la varianza no paramétrica de Kruskal Wallis (Infostat estudiantil, <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37&lang=es>/<https://infostat.dirienzo.com.ar/estudiantil/>).

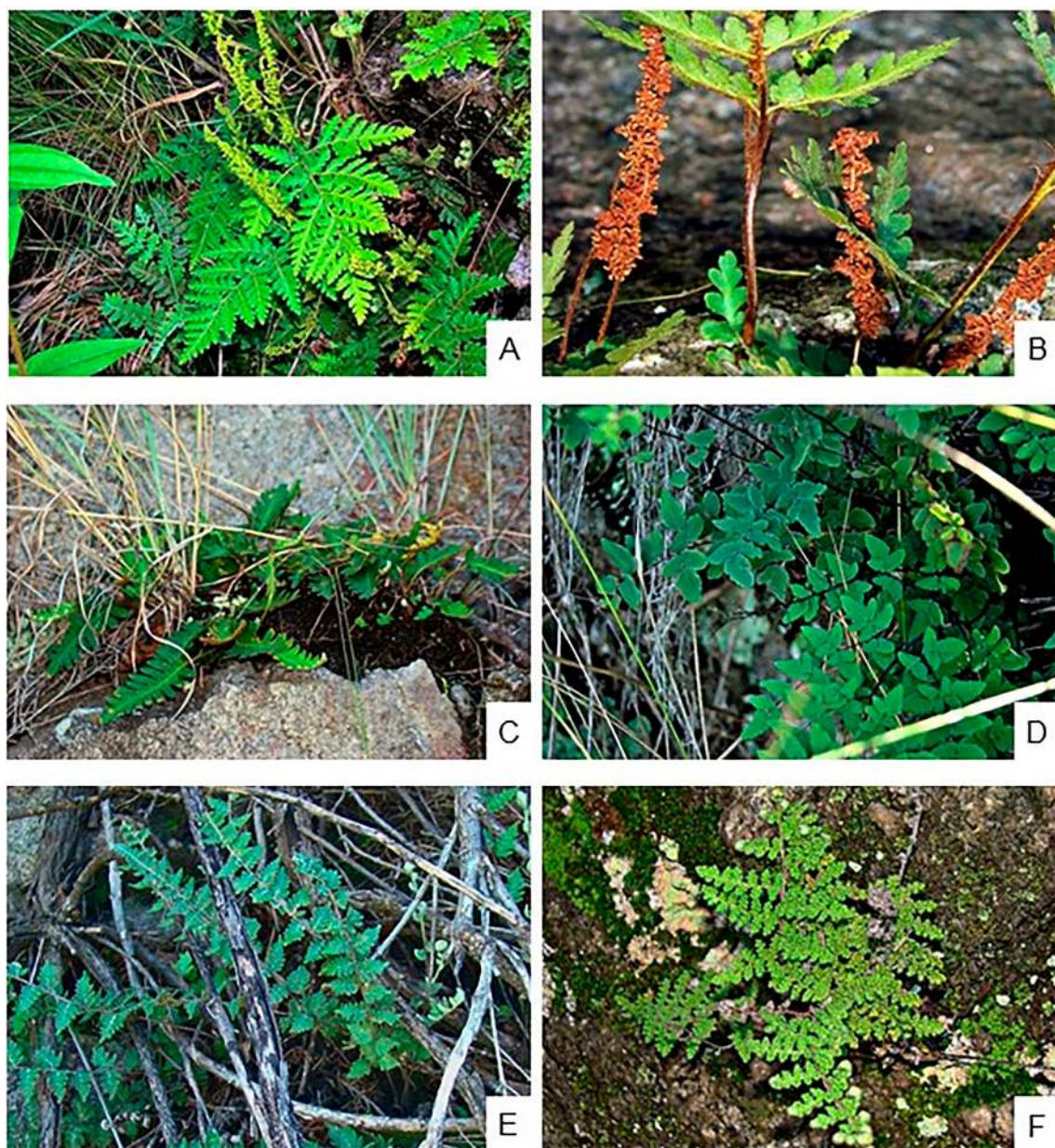


Fig. 2. Helechos medicinales nativos estudiados en las Sierras Centrales de San Luis. **A:** *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* con pinnas fértiles inmaduras. **B:** con pinnas fértiles maduras. **C:** *Pleopeltis pinnatifida*. **D:** *Argyrochosma nivea* var. *nivea*. **E:** *Cheilanthes buchtienii*. **F:** *Myriopteris myriophylla*.

RESULTADOS

Detección de los endófitos radicales

La asociación micorrícica arbuscular (MA) sólo se detectó en una de las especies estudiadas, *A. tomentosa*

var. *anthriscifolia*, Anemiaceae; el resto de las especies analizadas no formaron MA (Tabla 1, Fig. 3). En relación a los microesclerocios-SO (%ME-SO) y la colonización hifal-SO (%H-SO), no estuvieron presentes en ninguna de las especies estudiadas (Tabla 1).

Tabla 1. Colonización radical por endófitos fúngicos en helechos medicinales nativos de las Sierras Centrales de San Luis, Argentina. Abreviaturas= MA: micorrizas arbusculares; SO: septados oscuros.

Familia	Especies	Sitio	MA	SO
Anemiaceae	<i>Anemia tomentosa</i> var. <i>anthriscifolia</i>	A, B, C	Paris	-
Polypodiaceae	<i>Pleopeltis pinnatifida</i>	B	-	-
Pteridaceae	<i>Argyrochosma nivea</i> var. <i>nivea</i>	A	-	-
	<i>Cheilanthes buchtienii</i>	A	-	-
	<i>Myriopteris myriophylla</i>	C	-	-

Determinación del tipo de colonización y el porcentaje de colonización por HMA

Los individuos *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* de todos los sitios muestreados presentaron colonización por HMA típica del morfotipo *Paris* (Fig. 3). Las raíces, con numerosos pelos radicales, estuvieron colonizadas sólo por hifas y vesículas de HMA (Fig. 3A); cuando estuvieron colonizadas además por circunvoluciones arbusculadas y circunvoluciones, la cantidad de pelos radicales fue escasa (Fig. 3B). Además, en la rizosfera se observaron esporas glomoides de pequeño tamaño, en su mayoría de un diámetro de entre 10-20 µm, mientras que algunas presentaron dimensiones mayores (40-50 µm de diámetro) (Fig. 3C, D). En el sitio A la colonización radical presentó hifas gruesas, con ensanchamientos diferenciales de la pared hifal, otorgándoles el aspecto irregular característico de los HMA. Estas hifas también se observaron por fuera del hospedante, adelgazándose y dividiéndose en hifas más finas en las zonas de ingreso a la raíz (en los puntos de entrada), intercelularmente entre las células epidérmicas del hospedante y más frecuentemente a través de pelos radicales (Fig. 3E). Intracelularmente se observaron abundantes circunvoluciones arbusculadas y circunvoluciones (Fig. 3F). Las vesículas fueron siempre intracelulares y similares en todas las muestras en lo que respecta a la variabilidad de sus formas (cilíndricas, elipsoidales, claviformes, esféricas, subesféricas, irregulares); el número de vesículas intracelulares fue variable, de 1 a 6 por célula del hospedante (Fig. 4A). En el sitio B, si bien la colonización fue del tipo *Paris*, en la mayoría de las raíces el porcentaje de colonización fue escaso; las hifas intrarradicales fueron irregulares, en ocasiones finas; las vesículas intracelulares fueron irregulares, alargadas, cilíndricas, con gúttulos en su interior (Fig. 4B). Las raíces de los individuos del

sitio C presentaron hifas intracelulares irregulares y gruesas, formando abundantes circunvoluciones arbusculadas. Las vesículas, de formas variables e irregulares (Fig. 4C), esféricas, cilíndricas u ovadas (Fig. 4D), fueron siempre intracelulares y más de una por célula hospedante. En los tres sitios se registraron los puntos de entrada de la colonización predominantemente a través de los pelos radicales, que fueron muy abundantes (Fig. 3A, E).

A. tomentosa var. *anthriscifolia* (Anemiaceae, Schizaeales) fue el único helecho asociado formando MA (Figs. 3, 4). No hubo diferencias significativas entre los tres sitios de muestreo (A, B y C) para ninguna de las variables de colonización analizadas (Fig. 5). En los sitios A, B y C, respectivamente, la colonización MA tuvo valores medios de colonización hifal (%H: 24,83; 11,97; 14,25) (Fig. 5). En general fueron bajos los porcentajes de arbusculos (%A: 7,06; 2,00; 1,75), excepto en el sitio A (7,06%) y también los porcentajes de vesículas (%V: 2,61; 2,53; y 3,60) (Fig. 5). Los SO estuvieron ausentes en todas las raíces analizadas de todas las especies de helechos estudiadas en los tres sitios de muestreo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La información de las interacciones fúngicas asociadas a los sistemas radicales de helechos y licófitos es escasa a nivel mundial (Kessler *et al.*, 2010; Pressel *et al.*, 2016; Lehnert *et al.*, 2017) y también en Sudamérica (Pagano & Cabello, 2012; Godoy & Marín, 2019; Lugo & Menoyo, 2019; Lugo & Pagano, 2019, 2022; Fontenla *et al.*, 2022; Marín *et al.*, 2022), donde nuestro país tampoco es una excepción. En Argentina solo fueron estudiadas estas simbiosis fúngicas en la Patagonia, en ecosistemas boscosos templados

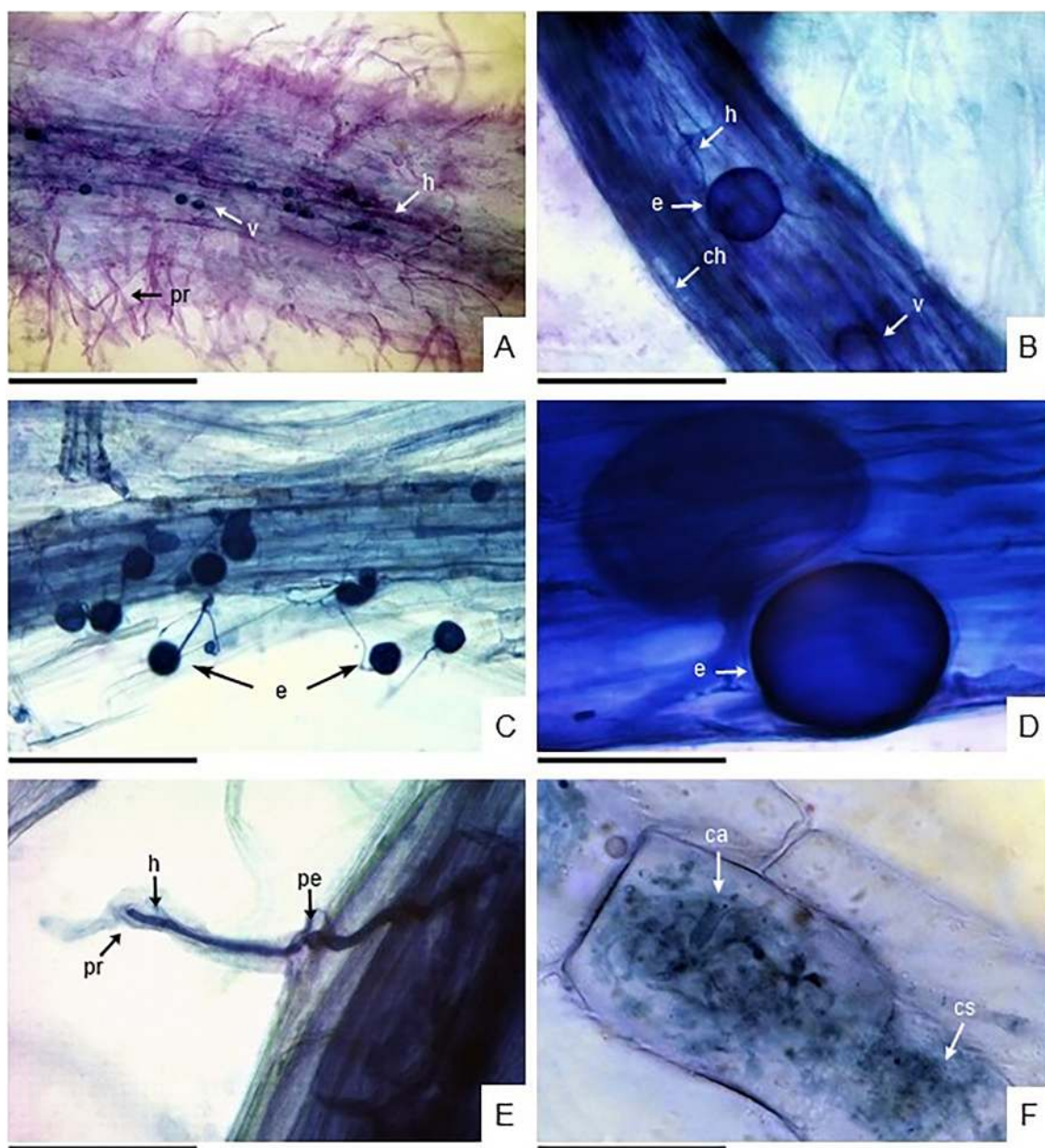


Fig. 3. Estructuras de los HMA colonizando las raíces de *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. **A:** Raíces con numerosos pelos radicales, colonizadas por hifas y vesículas de HMA. **B:** Raíces con escasos pelos radicales, colonizadas por hifas, circunvoluciones hifales y circunvoluciones arbusculadas. **C:** Esporas de HMA colonizando la rizosfera del hospedante. **D:** Detalle de una espora de HMA en la rizosfera del hospedante. **E:** Punto de entrada de la colonización en la raíz mediante un pelo radical. **F:** Circunvoluciones intracelulares hifales, arbusculadas y senescentes. Escalas= A-C, E: 100 μ m; D, F: 40 μ m. Abreviaturas= ca: circunvolución arbusculada; ch: circunvolución hifal; cs: circunvolución senescente; e: esporas; h: hifa; HMA: hongos micorrízicos arbusculares; pe: punto de entrada; pr: pelo radical; v: vesícula.

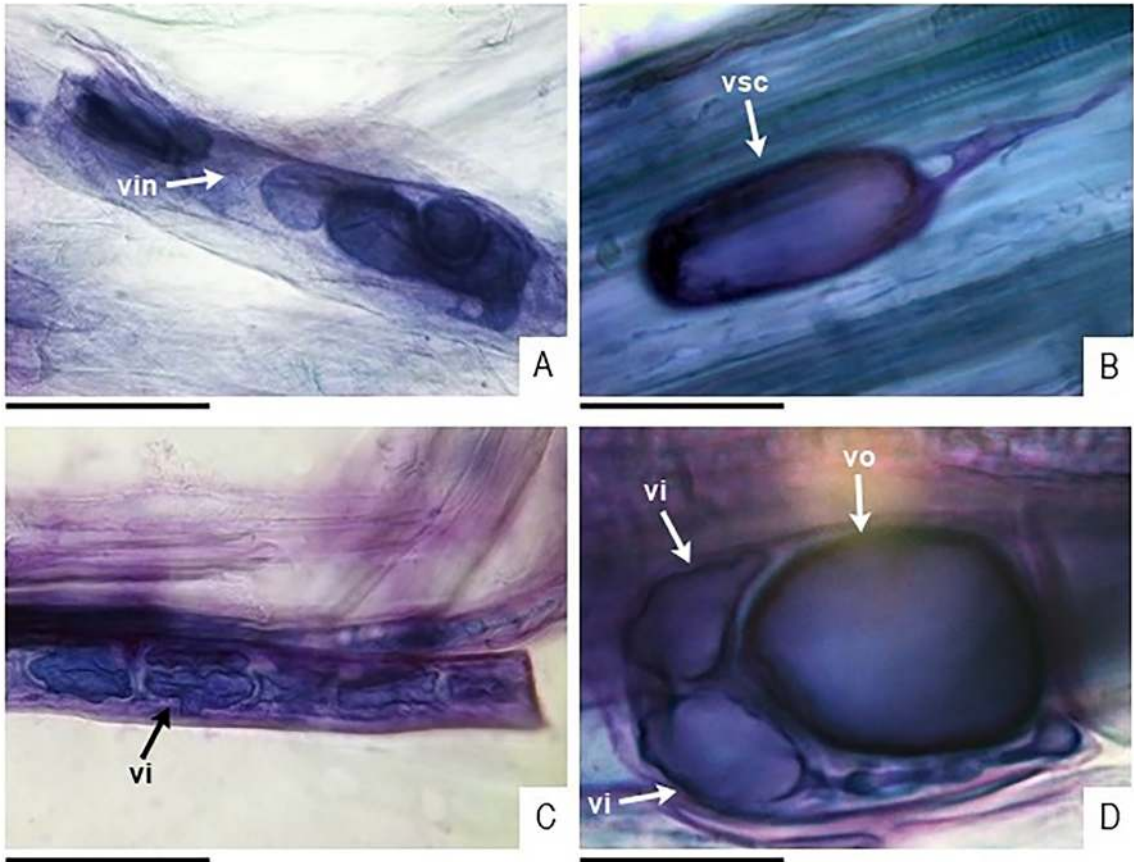


Fig. 4. Estructuras vesiculares de los HMA colonizando las raíces de *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. **A:** Vesículas intracelulares, solitarias o numerosas colonizando la célula hospedante. **B:** Vesículas intracelulares solitarias cilíndricas. **C:** Vesículas intracelulares irregulares. **D:** Vesículas intracelulares ovoides. Escalas= A, C: 100 µm; B, D: 40 µm. Abreviaturas= HMA: hongos micorrízicos arbusculares; vi: vesícula irregular; vin: vesículas intracelulares numerosas; vo: vesícula ovoide; vsc: vesícula solitaria cilíndrica.

húmedos (Fernández *et al.* 2008, 2010, 2012ab), secos a subhúmedos (Fontenla *et al.*, 1998) y en la estepa (Fontenla *et al.*, 2001); en el Noroeste en las selvas húmedas y de altura de las Yungas (Albornoz & Hernández, 2006; Becerra *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008, 2010) y en bosques del Chaco Serrano cordobés (Menoyo *et al.*, 2007; Fracchia *et al.*, 2009). En este trabajo se aportan nuevos datos sobre las simbiosis con endófitos fúngicos HMA y SO en el centro-oeste del Chaco Serrano para la región Cuyana, en la provincia de San Luis.

A diferencia de otros ambientes de nuestro país (Albornoz & Hernández, 2006; Menoyo *et*

al., 2007; Fernández *et al.*, 2008, 2010, 2012a, b; Hernández *et al.*, 2008; Fontenla *et al.*, 2022), en las Sierras Centrales de San Luis las especies de Polypodiaceae y Pteridaceae estudiadas no estuvieron colonizadas por HMA ni tampoco por SO. En el caso de la Polypodiaceae endémica *Pleopeltis pinnatifida*, esta falta de colonización podría estar relacionada con su hábito epífita o epipétrico (De la Sota *et al.*, 2009). En las Pteridaceae nativas estudiadas, *Argyrochosma nivea* var. *nivea* y *Cheilanthes buchtienii* (comunes en lugares expuestos, saxícolas o saxícolas y terrestres, respectivamente) y *Myriopteris myriophylla* (que puede habitar ambientes muy diversos, desde

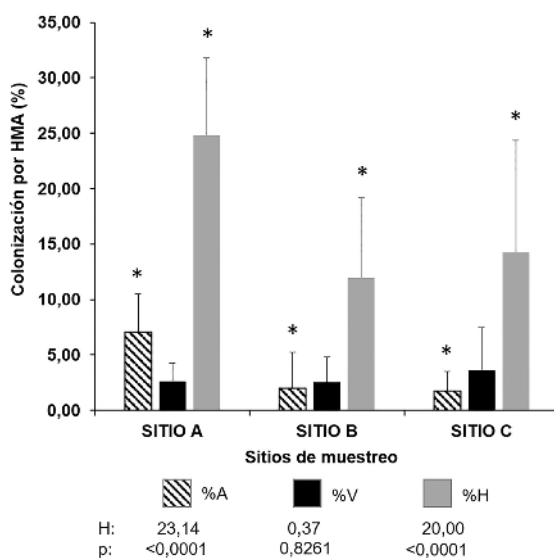


Fig. 5. Porcentaje de colonización por hongos micorrícicos arbusculares en raíces de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* en los tres sitios de muestreo de las Sierras Centrales de San Luis. Abreviaturas= A%: porcentaje de arbusculos; V%: porcentaje de vesículas; H% porcentaje de colonización hifal. Los datos graficados son promedios $\pm$ el desvío estándar de cada variable. Símbolo= *: las diferencias significativas entre sitios para las variables analizadas por Kruskal Wallis.

hábitats rocosos y sombríos hasta muy expuestos) (De la Sota *et al.*, 2009), serían otros los factores que explicarían la ausencia de colonización, como la disponibilidad de agua y nutrientes en cada hábitat, estrés ambiental o el exceso de exposición solar. Así, otras especies del género *Cheilanthes* y *M. myriophylla* sí estuvieron asociadas a estos simbiontes radicales en otros ecosistemas del noroeste de nuestro país (Hernández *et al.*, 2008). En Anemiaceae, Fracchia *et al.* (2009) detectaron la presencia de MA en ejemplares de *A. tomentosa* (Anemiaceae = Schizaeaceae, Schizaeales) en la Sierra de Comechingones (Córdoba), aunque no se analizaron variedades de esta especie. En las Sierras Centrales de San Luis *A. tomentosa* var. *anthriscifolia*, Anemiaceae, resultó ser el único hospedante de simbiontes fúngicos y solo se asoció a HMA; además, en esta variedad el tipo de colonización fue *Paris* en las tres poblaciones

estudiadas y coincide con la morfología de la colonización MA para la especie *A. tomentosa* en la Sierra de Comechingones (Fracchia *et al.*, 2009).

Las MA son el tipo de micorrizas predominante entre las plantas terrestres (Brundrett & Tedersoo, 2018), detectadas frecuentemente en el grupo basal de las plantas sin semillas, los helechos y licófitos (Lehnert *et al.*, 2017). Debido a esta posición evolutiva clave de estos hospedantes, se consideran a los HMA como los simbiontes fúngicos ancestrales que actuaron como factor determinante para la colonización del ambiente terrestre por las primeras plantas vasculares (Wang & Qiu, 2006; Kessler *et al.*, 2010; Lehnert *et al.*, 2017). Evolutivamente, entre las plantas sin semillas, los licófitos son un grupo basal en la filogenia, mientras que entre los helechos, los órdenes y familias estudiadas en San Luis son todos helechos leptosporangiados incluidos en Polypodiopsida (Schuettpeitz *et al.*, 2016; Nitta *et al.*, 2022), siendo Anemiaceae (Schizaeales) integrante basal del grupo; en cambio, Polypodiaceae y Pteridaceae, como familias de Polypodiales, se ubican en clados derivados en la filogenia (Cole *et al.*, 2022). Los resultados obtenidos en este trabajo son parcialmente congruentes con estos datos, por la presencia de colonización en los representantes basales de Anemiaceae y por su ausencia en las especies del clado derivado Polypodiaceae.

Para las especies incluidas en Pteridaceae, los resultados son contradictorios y difieren de los hallados en la Yunga, en donde *Pellaea ternifolia* subsp. *ternifolia* (Albornoz & Hernández, 2006), *C. pruinata* y *M. myriophylla* (= *C. myriophylla*) presentaron colonización MA (Hernández *et al.*, 2008) y dual MA-SO en *Dryopteris concolor* (Hernández *et al.*, 2010); en Patagonia, ambos tipos de colonización (MA y SO) fueron detectadas co-colonizando las raíces de diversos grupos de plantas (Fernández *et al.*, 2012a, b; Fontenla *et al.*, 2022); mientras que las Pteridaceae de las Sierras Centrales de San Luis (*C. buchtienii* y *M. myriophylla*) no estuvieron colonizadas por HMA ni por SO. Esto podría deberse a diferentes factores, tales como la disponibilidad diferencial de inóculos fúngicos en los suelos de los distintos hábitats, las condiciones ambientales y fisicoquímicas como la humedad del suelo, el pH, la cantidad de carbono orgánico que pueden afectar la colonización y disturbios en el ambiente (Fernández *et al.*, 2008).

Así, las Pteridaceae *C. buchtienii* y *M. myriophylla* pueden considerarse como especies micorrícicas facultativas, ya que pueden o no asociarse a HMA dependiendo de las condiciones ambientales a las que están expuestas. En cambio, *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* (Anemiaceae) sería un taxón micorrícico obligado ya que resultó colonizada formando MA en los tres sitios estudiados, sumado a que Anemiaceae ha sido considerada como una familia con la máxima frecuencia de micorrización a nivel mundial (Lehnert *et al.*, 2017). Sin embargo, se requieren más estudios a lo largo de la distribución de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* para confirmar su *status* micorrícico, ya que su colonización micorrícica coexistió junto con abundantes pelos radicales y la presencia de numerosos pelos radicales es común en plantas no micorrícicas o micorrícicas facultativas (Janos, 1980; Lehnert *et al.*, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018).

La colonización tipo *Paris* en helechos nativos se ha registrado en especies terrestres de las familias Blechnaceae, Dicksoniaceae (= Lophosoriaceae), Dryopteridaceae, Gleicheniaceae y Pteridaceae formando MA como hospedantes micorrícicos “consistentemente colonizados” por HMA (Fernández *et al.*, 2012a, b). Así, nuestros resultados incorporan a las Anemiaceae nativas a este grupo de hospedantes “consistentemente colonizados” que podrían considerarse como micorrícicos obligados mientras se constaten sus simbiosis micorrícicas en su extensa área de distribución.

En la evolución de los helechos y licófitos hubo una reducción de la dependencia micorrícica correlacionada con la disminución del diámetro de las raíces, un aumento de los pelos radicales junto con la adquisición del hábito epífita y la disminución de la colonización micorrícica (Schuettpehlz & Pryer, 2009; Lehnert *et al.*, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018). En nuestro país, los integrantes epífitos de Polypodiaceae han sido considerados no micorrícicos en el bosque valdiviano (Fernández *et al.*, 2010, 2012a, b) y en el Palmar del Espinal (Velázquez *et al.* 2010); por el contrario, estuvieron asociados formando MA en bosques de *Polylepis* del Chaco serrano (Menoyo *et al.*, 2007). La ausencia de asociación micorrícica en Polypodiaceae podría asociarse al tipo de hábitat epífita como también ocurre en Hymenophyllaceae y Gleicheniaceae distribuidas

en regiones biogeográficas muy diferentes como los bosques templados húmedos de la Patagonia y el Palmar del Espinal (Fernández *et al.*, 2010, 2012a, b; Velázquez *et al.*, 2010). Por el contrario, los representantes terrestres y saxícolas de esta familia son micorrícicos en bosques templados húmedos patagónicos, Yunga y los bosques de *Polylepis* en el Chaco Serrano (Becerra *et al.*, 2007; Menoyo *et al.*, 2007; Fernández *et al.* 2012a, b). *Pleopeltis pinnatifida*, especie saxícola y epífita (De la Sota *et al.*, 2009), no estuvo colonizada en las Sierras Centrales de San Luis. Esta falta de asociación estaría relacionada al hábito epífita y saxícola de la especie. Además, la ausencia de colonización en los helechos en general y las Polypodiaceae en particular, podría deberse a la coevolución planta-simbionte fúngico, ya que esta familia incluye al grupo de helechos denominados “no-grammítidos” de la subfamilia Polypodioideae (Schuettpehlz *et al.*, 2016) que evolutivamente ha perdido la simbiosis MA, independizándose de la asociación simbiótica en sus raíces como una vía nutricional para la planta (Janos, 2007; Lehnert *et al.*, 2009, 2017). Contrariamente, los representantes “grammítidos” de la subfamilia monofilética Grammitidoideae (Zhou *et al.*, 2023), continuaron utilizando sus simbiosis radicales como un modo efectivo de adquirir sus nutrientes y presentan altas tasa de colonización por HMA (Lehnert *et al.*, 2017). La ausencia de colonización en los individuos saxícolas de *P. pinnatifida* indicarían el carácter facultativo de las simbiosis MA en esta especie de Polypodiaceae.

La hipótesis de Baylis (1975), establece que la dependencia micorrícica está relacionada con la arquitectura radical y de manera inversa con la cantidad y longitud de sus pelos radicales. Así, cuando las raíces tuvieran escasos pelos radicales y ramificaciones, los hospedantes dependerían más de sus simbiosis micorrícicas para la adquisición de nutrientes que aquéllos con las raíces finamente ramificadas o con abundantes pelos radicales (Fitter, 2004). En todos los sitios muestreados se observaron pelos radicales en las raíces colonizadas, una desventaja para el costo-beneficio de la planta cuando los nutrientes del suelo podrían estar al alcance gracias a la interacción con los HMA. Sin embargo, fueron estos mismos pelos radicales los que funcionan como puntos de entrada para la colonización de los HMA, lo que podría indicar que

su formación antecede a la asociación simbiótica y aportaría evidencias para reforzar la hipótesis sobre el carácter facultativo de la asociación de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* con los HMA, en oposición a la hipótesis de que este helecho forma simbiosis obligada con estos hongos, basada en su constante presencia en todas las poblaciones estudiadas de esta variedad y en el taxón específico en otras áreas del Chaco Serrano del país (Fracchia *et al.*, 2009). Por otra parte, el carácter facultativo de la simbiosis ha sido mencionado como una característica muy común en helechos; la presencia o ausencia de simbiontes en las raíces y el grado de dependencia micorrícica en este grupo basal de plantas vasculares estaría supeditada no sólo a la anatomo-morfología de las raíces de los hospedantes sino a la disponibilidad de nutrientes en el sustrato (Janos, 1993, 2007; Brundrett, 2002; Fernández *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012; Pressel *et al.*, 2016). Esta hipótesis ampliamente aceptada aún no ha sido totalmente demostrada. Por esta razón, siguiendo la propuesta de Baylis (1975) sobre un continuo para la dependencia micorrícica desde la condición facultativa a la obligada, la ausencia de colonización en plantas reproductivamente maduras indicaría que la asociación puede ser facultativa. Al mismo tiempo, el registro de la asociación activa en el hospedante no implicaría que la interacción sea exclusivamente obligada, porque las raíces muestreadas y analizadas representan una fracción dispersa del total de raíces colonizadas del hospedante, sumada a la discontinuidad temporal que afecta al muestreo y que influye directamente sobre estas interacciones por su comportamiento estacional (Smith & Read, 2008), también registrado en áreas del Chaco Serrano (Lugo & Cabello, 2002; Lugo *et al.*, 2003).

La colonización MA de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* en las Sierras Centrales de San Luis fue del tipo *Paris*. Este tipo de colonización micorrícica es considerado como el más frecuente en las comunidades naturales de plantas terrestres (Brundrett & Kendrick, 1990a, b) y predominante en los helechos y licófitos (Smith & Smith, 1997). Los resultados obtenidos confirman a *Paris* como el morfotipo típico de la asociación MA en *A. tomentosa* var. *anthriscifolia*, ya que esta morfología de colonización se encontró en los individuos analizados en los tres sitios muestreados. Además, se observaron hifas de HMA colonizando las

raíces de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* a través de pelos radicales, una característica muy común en helechos y licófitos a nivel mundial (Brundrett, 2002; Dickson, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Smith & Read, 2008; Pressel *et al.*, 2016), coincidiendo con los registros previos de MA en las especies nativas de la Patagonia (Fernández *et al.*, 2012b).

A. tomentosa var. *anthriscifolia* es una especie nativa con reconocidos usos en medicina popular de sus frondes como béquico y expectorante, con una amplia distribución que abarca desde la selva misionera hasta el litoral del Río de la Plata, a lo largo de toda la llanura del centro-oeste del país (Barboza *et al.*, 2006), llegando a América Meridional, Bolivia, Brasil y Paraguay (De la Sota *et al.*, 2009). Otras especies nativas del género *Anemia*, como *A. australis* (= *A. tomentosa* var. *australis*) son popularmente utilizadas y tienen un amplio mercado comercial como hierbas medicinales (Luján *et al.*, 2000). Son escasos los trabajos exploratorios enfocados en las plantas medicinales nativas y sus simbiosis radicales (Polanco & Lugo, 2005) y las especies estudiadas fueron angiospermas. Los resultados de este trabajo aportan nueva información sobre las asociaciones con endófitos fúngicos en raíces de helechos medicinales y nativos. La detección de la simbiosis MA en *A. tomentosa* var. *anthriscifolia*, del tipo *Paris* y consistentemente establecida en las poblaciones estudiadas del Chaco Serrano en San Luis es información de base que podrá utilizarse en estudios para profundizar los efectos de esta simbiosis en este helecho medicinal, con especial interés en los beneficios que puedan conferirles los HMA en cuanto a la producción de principios activos de interés farmacéutico medicinal o aplicable a perfumería como sus aceites esenciales (Santos *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2013). Además, la implementación del cultivo de *A. tomentosa* var. *anthriscifolia* podría contribuir a su utilización como planta ornamental. Estas metodologías de cultivo que involucran la inoculación con hongos micorrícicos, previa detección de la presencia de simbiontes HMA en otras especies nativas de amplio uso en medicina popular, serían beneficiosas tanto para su producción como para la biodiversidad de los ambientes serranos. Además, esta información podrá implementarse para favorecer la propagación para la comercialización con fines ornamentales de este helecho nativo considerado con potencial para floricultura (Morero *et al.*, 2014).

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

MLT realizó predominantemente con la colaboración de ML y MCC la recolección y acondicionamiento de los materiales vegetales para su posterior análisis, aplicó las metodologías utilizadas, analizó las muestras y los resultados obtenidos. La discusión de los datos, la elaboración de las conclusiones y la redacción del manuscrito de este trabajo fueron realizados mayoritariamente por MLT y ML con la revisión crítica de EMC y MCC del manuscrito original. La redacción del texto en inglés es responsabilidad de ML.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos especialmente la colaboración de la Microb. Hebe J. Iriarte (CPA del IMIBIO-UNSL-CONICET-CCT SL) en la elaboración de las Figuras y Tablas de este trabajo. Este trabajo fue financiado con fondos del PROICO 02-2023-FQByF (Universidad Nacional de San Luis). Además, para llevar adelante este trabajo, MLT fue beneficiaria de una Beca Estímulo financiada por FQByF (SeCyT, Universidad Nacional de San Luis). M. A. Lugo es Investigadora del IMIBIO-UNSL-CONICET-CCT SL.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, S. & T. THOMAS 2022. Ferns: A potential source of medicine and future prospects. En: MARIMUTHU, J., H. FERNÁNDEZ, A. KUMAR & S. THANGAIAH (eds.), *Ferns*, pp. 345-378. Springer, Singapore.
- AHULU, M. E., M. NAKATA & M. NONAKA. 2005. *Arum*- and *Paris*-type arbuscular mycorrhizas in a mixed pine forest on sand dune soil in Niigata Prefecture, central Honshu, Japan. *Mycorrhiza* 15: 129-36. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0310-9>
- ALBORNOZ, P. L. & M. HERNÁNDEZ. 2006. Anatomía y endomicorrizas en *Pellaea ternifolia* (Cav.) Link subsp. *ternifolia* (Pteridaceae) en Tucumán. *Lilloa* 43: 13-21.
- ANDERSON, O.R. 2021. Physiological ecology of ferns: Biodiversity and conservation perspectives. *Inter. J. Biodiv. Conserv.* 13: 49-63. <https://doi.org/10.5897/IJBC2021.1482>
- ANTONY, R. & S. SURESH. 2022. Ethnobotanical uses of ferns and lycophytes of Kerala. En: MARIMUTHU, J., H. FERNÁNDEZ, A. KUMAR & S. THANGAIAH (eds.), *Ferns*, pp. 413-432. Springer, Singapore.
- BARBOZA, G. E., J. J. CANTERO, C. O. NUÑEZ & L. ARIZA ESPINAR. 2006. *Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina): Pteridófitas y Antófitas silvestres o naturalizadas*. Museo Botánico de Córdoba, Córdoba.
- BARBOZA, G. E., J. J. CANTERO, C. O. NUÑEZ, A. PACCIARONI & L. ARIZA ESPINAR. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34: 7-365.
- BARROW, J. R. 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 13: 239-247. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0222-0>
- BAYLIS, G. T. S. 1975. The magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. En: SANDERS F. E., B. MOSSE & P. B. TINKER (eds.), *Endomycorrhizas*, Proceedings of a Symposium held at the University of Leeds, 22-25 July 1974, pp. 373-389. Academic Press, London.
- BECERRA, A., M. CABELLO & F. CHIARINI. 2007. Arbuscular mycorrhizal colonization of vascular plants from the Yungas forests, Argentina. *Ann. For. Sci.* 64: 765-772.
- BONFANTE, P. & A. GENRE. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1: 48. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- BRUNDRETT, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154: 275-304.
- BRUNDRETT, M. C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 78: 473-495.
- BRUNDRETT, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37-77. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9>
- BRUNDRETT, M. & B. KENDRICK. 1990a. The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. I. Quantitative aspects of morphology. *New Phytol.* 114: 457-468.
- BRUNDRETT, M. & B. KENDRICK. 1990b. The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. II.

- Structural aspects of morphology. *New Phytol.* 114: 469-479.
- BRUNDRETT, M. C. & L. TEDERSOO. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol.* 220: 1108-1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- CHÁVEZ-HERNÁNDEZ, C. G., C. C. BARRERA AGUILAR, G. J. TÉLLEZ ESPINOSA, E. CHIMAL-SÁNCHEZ & R. GARCÍA-SÁNCHEZ. 2021. Colonización micorrízica y comunidades de hongos micorrizógenos arbusculares en plantas medicinales del bosque templado “Agua Escondida”, Taxco, Guerrero, México. *Sci. Fungorum* 51:e1325. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1325>
- CAO, H., T.-T. CHAI, X. WANG, M. F. B. MORAIS-BRAGA, ..., & H. D. M. COUTINHO. 2017. Phytochemicals from fern species: potential for medicine applications. *Phytochem. Rev.* 16: 379-440. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9488-7>
- DE LA ROSA-MERA, C. J., R. FERRERA-CERRATO, A. ALARCÓN, M. J. SÁNCHEZ-COLÍN & A. FRANCO-RAMÍREZ. 2012. Aislamiento de consorcios de hongos micorrícicos arbusculares de plantas medicinales y su efecto en el crecimiento de vinca (*Catharanthus roseus*). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 85: 187-198. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2012000200005>
- DE LA SOTA, E. R., M. M. PONCE & L. CASSA' DE PAZOS. 1998. Pteridophyta. En: CORREA, M. N. (ed.), *Flora patagónica*, Parte I, Tomo I, pp. 282-371. Colección Científica del INTA, Buenos Aires.
- DE LA SOTA, E. R., M. L. LUNA, G. E. GIUDICE & J. P. RAMOS GIACOSA. 2009. Sinopsis de las Pteridofitas de la Provincia de San Luis (Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 44: 367-385.
- DICKSON, S. 2004. The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 163: 187-200. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01095.x>
- EDWARDS, D. & U. FANNING. 1985. Evolution and environment in the late Silurian-early Devonian: the rise of the pteridophytes. *Phil. Trans. Royal Soc. London B* 309: 147-165. <https://royalsocietypublishing.org/doi/epdf/10.1098/rstb.1985.0076>
- FERNÁNDEZ, N., M. I. MESSUTI & S. FONTENLA. 2008. Arbuscular mycorrhizas and dark septate fungi in *Lycodium paniculatum* (Lycopodiaceae) and *Equisetum bogotense* (Equisetaceae) in a Valdivian temperate forest of Patagonia, Argentina. *Am. Fern J.* 98: 117-127.
- FERNÁNDEZ, N., S. FONTENLA & M. I. MESSUTI. 2010. Mycorrhizal status of obligate and facultative epiphytic ferns in a Valdivian Temperate Forest of Patagonia, Argentina. *Am. Fern J.* 100: 16-26.
- FERNÁNDEZ, N. V., M. I. MESSUTI & S. B. FONTENLA. 2012a. Occurrence of arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in pteridophytes from a Patagonian rainforest, Argentina. *J. Basic Microbiol.* 52: 1-11.
- FERNÁNDEZ, N. V., S. B. FONTENLA & M. I. MESSUTI. 2012b. Co-occurrence of arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in pteridophytes from a Valdivian temperate rainforest in Patagonia, Argentina. En: PAGANO, M. C. (ed.), *Mycorrhiza. Occurrence in natural and restored environments*, pp. 99-125. NOVA Science Publishing Inc., New York.
- FITTER, A. H. 2004. Magnolioid roots-hairs, architecture and mycorrhizal dependency. *New Phytol.* 164: 15-16. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01193.x>
- FONTENLA, S., R. GODOY, P. ROSSO & M. HAVRYLENKO. 1998. Root associations in *Austrocedrus* forests and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhizas* 8: 29-33
- FONTENLA, S., J. PUNTIERI & J. A. OCAMPO. 2001. Mycorrhizal associations in the Patagonia steppe, Argentina. *Plant Soil* 233:13-29.
- FONTENLA, S. B., N. V. FERNÁNDEZ, M. C. MESTRE & J. P. PUNTIERI. 2022. Current knowledge on mycorrhizal symbiosis and endophytes in Northwest Patagonia, Argentina. En: LUGO, M. A. & M. C. PAGANO (eds.), *Mycorrhizal Fungi in South America: Biodiversity, Conservation, and Sustainable Food Production*, pp. 255-280. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-12994-0>
- FRACCHIA, S., A. ARANDA, A. GOPAR, V. SILVANI, L. FERNANDEZ & A. GODEAS. 2009. Mycorrhizal status of plant species in the Chaco Serrano Woodland from central Argentina. *Mycorrhiza* 19: 205-214.
- GEMMA, J. N., R. E. KOSKE & T. FLYNN. 1992. Mycorrhizae in Hawaiian pteridophytes: occurrence and evolutionary significance. *Am. J. Bot.* 79: 843-852.
- GODOY, R. & C. MARÍN. 2019. Mycorrhizal studies in temperate rainforests of Southern Chile. En: PAGANO, M. C. & M. A. LUGO (eds.), *Mycorrhizal fungi in South America*, pp. 315-341. Springer, Cham.

- GUCWA-PRZEPIÓRA, E., D. CHMURA & K. SOKOŁOWSKA. 2016. AM and DSE colonization of invasive plants in urban habitat: a study of Upper Silesia (southern Poland). *J. Plant Res.* 129: 603-614. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0802-7>
- HERNÁNDEZ, M., P. L. ALBORNOZ, F. RODRÍGUEZ & S. SERRANO. 2008. Anatomía de rizoma, raíz y micorrizas arbusculares en *Cheilanthes pruinata* Kaulf. y *Cheilanthes myriophylla* Desv. (Pteridaceae) en el Noroeste Argentino. *Lilloa* 45: 73-82.
- HERNÁNDEZ, M., G. TERÁN & P. L. ALBORNOZ. 2010. Morfología, anatomía y endomicorrizas en el esporofito de *Doryopteris concolor* (Pteridaceae). *Lilloa* 47: 74-84.
- HODGE, A., T. HELGASON & A. H. FITTER. 2010. Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecol.* 10: 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.02.002>
- HODSON, E., F. SHAHID, J. BASINGER & S. KAMINSKYJ. 2009. Fungal endorhizal associates of *Equisetum* species from Western and Arctic Canada. *Mycol. Progress* 8: 19-27.
- JANOS, D. P. 1980. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica* 12: 56-64.
- JANOS, D. P. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizae of epiphytes. *Mycorrhiza* 4: 1-4. <https://doi.org/10.1007/BF00203242>
- JANOS, D. P. 2007. Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* 17: 75-91.
- JUMPPONEN, A. & J. M. TRAPPE. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 140: 295-310.
- KENRICK, P. 2017a. Changing expressions: a hypothesis for the origin of the vascular plant life cycle. *Phil. Trans. R. Soc. B* 373: 20170149. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2017.0149>
- KENRICK, P. 2017b. How land plant life cycles first evolved. *Science* 358: 1538-1539. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aan2923>
- KESSLER, M., R. JONAS, D. CICUZZA, J. KLUGE, ..., & M. LEHNERT. 2010. A survey of the mycorrhization of Southeast Asian ferns and lycophytes. *Plant Biol.* 12: 788-793.
- KHOLIA, B. S. & A. BALKRISHNA. 2022. Pteridophytes used by peoples of Indian Himalayan Region and Northern India: An overview. En: MARIMUTHU, J., H. FERNÁNDEZ, A. KUMAR & S. THANGAIAH (eds.), *Ferns*, pp. 379-412. Springer, Singapore.
- KNAPP, D. G., A. PINTYE & G. M. KOVÁCS. 2012. The dark side is not fastidious. Dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *Plos One* 7: e32570.
- LEHNERT, M., I. KOTTKE, S. SETARO, L. F. PAZMIÑO, J. P. SUÁREZ & M. KESSLER. 2009. Mycorrhizal associations in ferns from Southern Ecuador. *Am. Fern J.* 99: 292-306.
- LEHNERT, M., M. KRUG & M. KESSLER. 2017. A review of symbiotic fungal endophytes in lycophytes and ferns-a global phylogenetic and ecological perspective. *Symbiosis* 71: 77-89.
- LUGO, M. A. & M. N. CABELLO. 2002. Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* 94: 579-586.
- LUGO, M. A., M. E. GONZÁLEZ MAZA & M. N. CABELLO. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from native Argentinian -South American-mountain grassland II. Seasonal variation of colonization and its relation with grazing and metabolic host type. *Mycologia* 95: 407-415.
- LUGO, M. A. & E. MENOYO. 2019. Southern Highlands: Fungal endosymbiotic associations. En: PAGANO, M. C. & M. A. LUGO (eds.), *Mycorrhizal Fungi in South America*, pp. 217-255. Springer, Cham.
- LUGO, M. A. & M. C. PAGANO. 2019. Overview of the mycorrhizal fungi in South America. En: PAGANO, M. C. & M. A. LUGO (eds.), *Mycorrhizal Fungi in South America*, pp. 1-27. Springer, Cham.
- LUGO, M. A. & M. C. PAGANO. 2022. Overview of the biodiversity, conservation, and sustainable food production with mycorrhizal fungi in South America. En: LUGO, M. A. & M. C. PAGANO (eds.), *Mycorrhizal Fungi in South America: Biodiversity, Conservation, and Sustainable Food Production*, pp. 1-23. Springer, Cham.
- LUJÁN, M. C., G. E. BARBOZA, S. WELER DE SERRA & L. ARIZA ESPINAR. 2000. Quality control in two medicinal ferns and its local market insertion. *Stud. Bot.* 19: 75-94.
- MANDYAM, K. & A. JUMPPONEN. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies Mycol.* 53: 173-189.
- MANDYAM, K. & A. JUMPPONEN. 2015. Mutualism parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Front. Microbiol.* 5: 1-13.
- MARIMUTHU, J., N. JANAKIRAMAN, J. CHANDRA SALERIDE, A. SIVARAMAN, ... & K. PAULRAJ. 2022. Biopotency of Pteridophytes: A review. En:

- MARIMUTHU, J., H. FERNÁNDEZ, A. KUMAR & S. THANGAIAH (eds.), *Ferns*, pp. 481-520. Springer, Singapore.
- MARÍN, C., R. GODOY & J. RUBIO. 2022. Gaps in South American mycorrhizal biodiversity and ecosystem function research. En: LUGO, M. A. & M.C. PAGANO (eds.), *Mycorrhizal Fungi in South America: Biodiversity, Conservation, and Sustainable Food Production*, pp. 445-461. Springer, Cham.
- MARTÍNEZ, A. E., V. CHIOCCHIO, L. TAI EM, M. A. RODRIGUEZ & A. M. GODEAS. 2012. Mycorrhizal association in gametophytes and sporophytes of the fern *Pteris vittata* L. (Pteridaceae) with *Glomus intraradices*. *Rev. Biol. Trop.* 60: 857-865.
- McGONIGLE, T. P., S. M. H. MILLERS, D. G. EVANS, G. L. FAIRCHILD & J. A. SWAN. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495-501.
- MEHLTRETER, K. 2010a. Fern conservation. En: MEHLTRETER K., L. R. WALKER & J. M. SHARPE (eds.), *Fern ecology*, pp. 323-359. Cambridge University Press, Cambridge.
- MEHLTRETER, K. 2010b. Interactions of ferns with fungi and animals. En: MEHLTRETER K., L. R. WALKER & J. M. SHARPE (eds.), *Fern ecology*, pp. 220-254. Cambridge University Press, Cambridge.
- MENOYO, E., A. BECERRA & D. RENISON. 2007. Mycorrhizal associations in *Polylepis* woodlands of Central Argentina. *Can. J. Bot.* 85: 526-531. <https://doi.org/10.1139/B07-04>
- MOFOKENG, M. M., C. P. DU PLOOY, H. T. ARAYA, S. O. AMOO, S. N. MOKGEHLE, K. M. POFU & P. W. MASHELA. 2022. Medicinal plant cultivation for sustainable use and commercialisation of high-value crops. *S. Afr. J. Sci.* 118: Art. #12190. <https://doi.org/10.17159/sajs.2022/12190>
- MONTOLIU-NERIN, M., M. SÁNCHEZ-GARCÍA, C. BERGIN, C. KUTSCHERA, ..., & A. ROSLING. 2021. In-depth phylogenomic analysis of arbuscular mycorrhizal fungi based on a comprehensive set of de novo genome assemblies. *Front. Fungal Biol.* 2: 716385. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.716385>
- MORERO, R. E., M. A. GIORGIS, M. D. ARANA & G. BARBOZA. 2014. *Helechos y licófitas del centro de Argentina, cultivo y especies ornamentales*. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET-UNC), Córdoba.
- MUTHUKUMAR, T. & S. PRAKASH. 2009. Arbuscular mycorrhizal morphology in crops and associated weeds in tropical agroecosystems. *Mycoscience* 50: 233-239.
- MUTHUKUMAR, T., M. SENTHILKUMAR, M. RAJANGAM & K. UDAIYAN. 2007. Arbuscular mycorrhizal morphology and dark septate fungal associations in medicinal and aromatic plants of Western Ghats, Southern India. *Mycorrhiza* 17: 11-24. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0077-2>
- NAGALINGUM, N. S. 2016. Evolution and diversification of seedless land plants En: KLIMAN, R. D. (ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, vol. 4, pp. 16-21. Elsevier, Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00255-9>
- NEWSHAM, K. K. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol.* 190: 783-793.
- NITTA, J. H., E. SCHUETTPELZ, S. RAMÍREZ-BARAHONA & W. IWASAKI. 2022. An open and continuously updated fern tree of life. *Front. Plant. Sci.* 24: 909768. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.909768>
- OMAR, M. B., L. BOLLAND & W. A. HEATHER. 1979. P.V.A. (polivinil alcohol). A permanent mounting medium for fungi. *Bull. Brit. Mycol. Soc.* 13: 31-32.
- PAGANO, M. C. & M. N. CABELLO. 2012. Mycorrhizas in natural and restored riparian zones. En: PAGANO, M. C. (ed.), *Mycorrhiza. Occurrence in natural and restored environments*, pp. 291-316. NOVA Science Publishing Inc., New York.
- PINTO, S. C., G. G. LEITÃO, A. CASTELLAR, D. S. D'ELIA, ..., & S. G. LEITÃO. 2013. Chemical composition of the volatile fractions from wild and in vitro plants of *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* (Pteridophyta). *J. Ess. Oil Res.* 25:3: 198-202. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.755477>
- POLANCO, M. & M. A. LUGO. 2005. Micorrizas arbusculares en plantas medicinales de la Reserva Provincial Floro-Faunística La Florida (San Luis, Argentina). Encuentro de Jóvenes Investigadores de Investigadores de las Universidades Nacionales. En: *Libro de resúmenes Jóvenes Investigadores*, pp. 114. Universidad Nacional de San Luis, San Luis.
- PORWAL, O., S. K. SINGH, D. K. PATEL, S. GUPTA, ... & S. KATEKHAYE. 2020. Cultivation, collection and processing of medicinal plants. En: AHMAD, J. (ed.), *Bioactive phytochemicals: drug discovery to product development*, pp. 14-30. Bentham Science Publishers, Sharjah.
- PRESSEL, S., M. I. BIDARTONDO, K. J. FIEL, W. R. RIMINGTON & J. G. DUCKETT. 2016. Pteridophyte

- fungual associations: Current knowledge and future perspectives. *J. Syst. Evol.* 54: 666-678.
- PHILLIPS, J. M. & D. S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- ROIG, F. A. 2002. *Flora medicinal mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina)*. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
- SANTOS, M. G., L. M. ROCHA, E. S. CARVALHO & A. KELECOM. 2006. Isoafricanol, um sesquiterpeno incomum encontrado na pteridófita *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. *Rev. Bras. Plant. Med.* 8: 71-75.
- SCHUETTPELZ, E. & K. M. PRYER. 2009. Evidence for a Cenozoic radiation of ferns in an angiosperm-dominated canopy. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 106: 11200-11205. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811136106>
- SCHUETTPELZ, E., H. SCHNEIDER, A. R. SMITH, P. HOVENKAMP, ..., & X.-M. ZHOU. 2016. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *PPG I. J. Syst. Evol.* 54: 563-603. <https://doi.org/10.1111/jse.12229>
- SCHULZ, B. 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. En: SCHULZ, B. J. E., C. J. C. BOYLE & T. N. SIEBER (eds.), *Microbial root endophytes*, pp. 261-279. Springer, Berlin.
- SHAH, M. A., Z. A. RESHI & D. P. KHASA. 2009. Arbuscular mycorrhizas: drivers or passengers of alien plant invasion. *Bot. Rev.* 75: 397-417.
- SHARPE, J. M., K. MEHLTRETER & L. R. WALKER. 2010. Ecological importance of ferns. En: MEHLTRETER, K., L. R. WALKER & J. M. SHARPE (eds.), *Fern ecology*, pp. 1-21. Cambridge University Press, Cambridge.
- SMITH, S. E. & D. J. READ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd Ed. Academic Press, London.
- SMITH, F. A. & S. E. SMITH. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 137: 373-388.
- URCELAY, C., P. A. TECCO & F. CHIARINI. 2005. Micorrizas arbusculares del tipo Arum y Paris y endófitos radicales septados oscuros en *Miconia ioneura* y *Tibouchina paratropica* (Melastomataceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 40: 151-155.
- VELÁZQUEZ, M. S., F. BIGANZOLI & M. N. CABELLO. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi in El Palmar National Park (Entre Rios Province, Argentina)-a protected reserve. *Sydowia* 62: 149-163.
- WANG, B. & Y. L. QIU. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- WANG, W., J. SHI, Q. XIE, Y. JIANG, ... & E. WANG. 2017. Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant.* 10: 1147-1158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
- WANG, C. C., H. CAI, H. ZHAO, Y. YAN, ..., & X. LIU. 2018. Distribution patterns for metabolites in medicinal parts of wild and cultivated licorice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 161: 464-473. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.004>
- WIJAYAWARDENE, N. N., K. D. HYDE, D. Q. DAI, M. SÁNCHEZ-GARCÍA, ..., & M. THINES. 2022. Outline of fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere* 13: 53-453.
- YAMATO, M. & M. IWASAKI M. 2002. Morphological types of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of understory plants in Japanese deciduous broadleaved forests. *Mycorrhiza* 12: 291-296.
- YAMOTO, M. 2004. Morphological types of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of weeds on vacant land. *Mycorrhiza* 14: 127-131. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0246-5>
- YUAN, M.-L., M.-H. ZHANG, Z.-Y. SHI, S. YANG, ..., & J.-K. GAO. 2023. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance active ingredients of medicinal plants: a quantitative analysis. *Front. Plant Sci.* 14: 1276918. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1276918>
- ZENG, Y., L. P. GUO, B. D. CHEN, Z. P. HAO, ..., & Y. ZHANG. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and prospectives. *Mycorrhiza* 23: 253-265. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0484-0>
- ZHANG, Y., L. D. GUO & R. J. LIU. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with common pteridophytes in Duijiangyan, southwest China. *Mycorrhiza* 14: 25-30.
- ZHANG, M., Z. SHI, S. ZHANG & J. GAO. 2022. A Database on mycorrhizal traits of Chinese medicinal plants. *Front. Plant Sci.* 13: 840343. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.840343>
- ZHAO, Y., A. CARTABIA, I. LALAYMIA & S. DECLERCK. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi and production of secondary metabolites in medicinal plants. *Mycorrhiza* 32: 221-256. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.840343>

- ZHOU, X.-M., J.-J. YANG, Z.-L. LIANG, R. POLLAWATN, ..., & L.-B. ZHANG. 2023. A global phylogeny of grammitid ferns (Polypodiaceae) and its systematic implications. *Taxon* 72: 974-1018. <https://doi.org/10.1002/tax.12992>
- ZUBEK, S. & J. BLASZKOWSKI. 2009. Medicinal plants as hosts of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Phytochem. Rev.* 8: 571-580. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9135-7>